



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

Inducción de dermatitis por contacto en ratones BALB/c mediante la prueba de edema en la oreja del ratón (MEST) tras la exposición a los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

**TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACIÓN EN
BIOQUÍMICA CLÍNICA PRESENTA**

M. C. MARIA DEL ROSARIO SANDOVAL ROMERO

MÉXICO, DF.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Armando Isibasi Araujo
Vocal: Dra. María Dolores Lastra Azpilicueta
Secretario: Dra. Concepción Toriello Nájera
1er Suplente: M. en C. Rodolfo Pastelín Palacios
2do Suplente: Dr. Javier Cabiedes Contreras

SITIOS DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Inmunoalergología y Micología Médica de la División de Investigación del Hospital Juárez de México, SSA y Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F.

FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. MISAEL GONZALEZ IBARRA

SUSTENTANTE

MARIA DEL ROSARIO SANDOVAL ROMERO

Esta tesis se desarrolló y se concluyó bajo la co-tutoría de la Dra. Concepción Toriello Nájera jefa del Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en Ciudad Universitaria.

DEDICATORIAS

A mi madre Ángeles, mi abuela Rosa y mi bisabuela Margarita, gracias por su ejemplo.

A mi familia cercana y a la que no esta tan cerca.

A los que espiritualmente me acompañan en este camino aunque su materia ya no este presente.

A mis amigos, los pocos que tengo, pero sinceros.

A mis maestros, gracias por brindarme conocimiento, apoyo incondicional y consejos pero sobre todo gracias por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dr. Juan Carlos Maldonado, Q.F.B Misael González Ibarra, Dra. Concepción Toriello Nájera por ser ejemplos a seguir, por confiar en mi y por tenderme la mano cuando más lo necesitaba.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Amelia, David, Elena, Angélica pero sobre todo gracias a ti Horte. Son un grupazo de trabajo.

Gracias Dr. Armando Pérez Torres, Dr. Marte Lorenzana, Dra. Ma. Dolores Lastra, Dr. Armando Isibasi, Dr. Rodolfo Pastelín, Dr. Javier Cabiedes por su ayuda, críticas y consejos.

Gracias Gelos, Hüicha, Queco, Ere, Josué, Gonzalo, Miguel, José, Rodrigo, Erandi, América, Xto, Guille, Ale, Jorge, Javier, Neto, Conita y demás ángeles que me acompañan. Tía Tere, Tío Rigo, Tío Jorge, primos y primas los amo.

Otelo, Joda, Cita y Garé gracias por sus gestos, sus travesuras, su infinita paciencia y amor.

También quiero agradecer a todos aquellos que de manera directa o indirecta me hicieron ver que la vida no es color de rosa y que así como existe gente y cosas buenas, también existe lo contrario. Gracias por ayudarme a madurar.

INDICE

	Páginas
1. Introducción	9
2. Antecedentes	12
• Aspectos generales	15
• Hongos entomopatógenos	17
• Genero <i>Metarhizium</i> sp.	18
3. Hipersensibilidad	26
• Hipersensibilidad retardada (tipo IV).....	27
• Mecanismo de sensibilización	29
4. Dermatitis alérgica por contacto (DAC)	30
5. Planteamiento del problema	37
6. Objetivos	38
• General	38
• Particulares	39
7. Hipótesis	40
8. Material y Métodos	41
• Prueba de sensibilización cutánea	41
• Prueba del edema en la oreja del ratón (MEST)	42
• Cepas Fúngicas.....	43
• Estudios micro y macromorfológicos de los hongos entomopatógenos (HE)	44

- Obtención de los extractos antigénicos fúngicos (EAF) 44
- Obtención de la suspensión de conidios viables 45
- Animales 46
 - Testigo positivo 47
 - Testigo negativo 48
 - Grupo 1 (A y B) 48
 - Grupo 2 (C y D) 48
- Examen Clínico 49
- Mediciones de peso y grosor de orejas 49
- Diseño de la prueba del edema en la oreja del ratón (MEST) 50
- Prueba del edema en la oreja del ratón (MEST)..... 51
 - Periodo de inducción 51
 - Reto antigénico 53
- 9. Necropsias 54
- 10. Estudios histopatológicos..... 54
- 11. Resultados 55
 - Características macroscópicas 55
 - Características microscópicas 55
 - Estandarización de la anestesia en los animales 57
 - Peso de los animales 58

• Hallazgos clínicos	60
○ Alteraciones en la piel y orejas	61
○ Grosor de las orejas	62
• Histopatología	68
12. Discusión	77
13. Conclusiones	87
14. Anexo	88
• Preparación de medios de cultivo	88
• Soluciones	88
• Hoja de registro	90
• Abreviaciones	91
• Glosario	93
15. Bibliografía	94

RESUMEN

El control biológico con microorganismos surge como una alternativa para el manejo de las plagas. Los agentes microbianos se han utilizado de manera exitosa debido a su selectividad, inocuidad en mamíferos, compatibilidad con organismos benéficos y su impacto menor en el medio ambiente. La utilización de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas esta ampliamente documentada y se han llevado a cabo protocolos para evaluar su persistencia, infectividad y toxicidad. Sin embargo, no existen datos sobre la capacidad de generar sensibilización cutánea en animales, por lo que en éste trabajo nos enfocamos a determinar el potencial de los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para inducir dermatitis alérgica por contacto en ratones BALB/c, administrándolos en forma cutánea como suspensión de conidios ó como extracto antigénico fúngico mediante la prueba del edema en la oreja de ratón (Mouse Ear Swelling Test, MEST por sus siglas en inglés). Al finalizar este estudio concluimos que, ni el extracto antigénico fúngico ni la suspensión de conidios de ambos hongos utilizados pueden considerarse como sensibilizantes cutáneos en el modelo murino ensayado.

INTRODUCCIÓN

Debido al daño ambiental que ha ocasionado el uso de plaguicidas químicos y sustancias tóxicas para el control de plagas se ha propuesto el uso de agentes biológicos con la capacidad de infectar y matar selectivamente a la plaga. Sin embargo, se debe establecer la seguridad del uso de bioplaguicidas así como también el riesgo para la población que se expone repetidamente a ellos (Betz et *al.*, 1989; Siegel et *al.*, 1989; Goettel et. *al.* 1989; Siegel et *al.*, 1997; Toriello et *al.*, 1986; Toriello et *al.*, 1999; Toriello, 2003).

Por otra parte, en los últimos años la prevalencia de las enfermedades de la piel de origen alérgico se ha incrementado y con ello los costos socioeconómicos los cuales incluyen hospitalización, honorarios médicos, tratamientos farmacológicos, rehabilitación y en algunos casos compensaciones por jubilación temprana por enfermedad ocupacional ó daño permanente (Mathias, 1985). En Europa (particularmente en Dinamarca) de los 2.6 millones de personas en edad productiva, las compañías de seguros pagaron tres millones de dólares anuales entre 1991 y 1995 por concepto de compensaciones originadas por dermatitis alérgicas de contacto (Keiding, 1997). En Estados Unidos dichas compensaciones equivaldrían a 160 millones de dólares (Halkier-Sørensen, 1998). Estas cantidades representan la punta del “iceberg” de los costos relacionados con la dermatitis de contacto alérgica en el ámbito internacional.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos propone una serie de guías para ser utilizadas en la valoración de pesticidas y sustancias tóxicas cuyo objetivo es establecer su patogenicidad, persistencia, infectividad, toxicología y alergenicidad bajo criterios estrictamente homologados y así crear un consenso sobre el uso de dichas sustancias. Desde 1981 la Organización Mundial de la Salud elaboró una propuesta para evaluar la bioseguridad de un agente microbiano para el control de plagas (AMPC). Partiendo de dicha propuesta Siegel diseñó en 1987 un esquema de procedimientos en tres niveles para determinar el riesgo de un AMPC. El nivel 1 evalúa la infectividad y toxicidad del AMPC a partir de la exposición aguda al bioplaguicida. Si en este nivel el AMPC no presenta efectos adversos, se considera seguro y la probabilidad de causar algún daño al ser liberado en forma masiva será mínima. Por el contrario, si se estableciera algún riesgo en los estudios primarios, se procede a realizar las pruebas en otros niveles para determinar la dosis letal media (DL50), la dosis de efectividad media (DE50) e irritabilidad en mamíferos (figura 1). A partir de agosto de 1998 la EPA destaca la necesidad de determinar el potencial de un plaguicida para causar o facilitar reacciones de dermatitis de contacto alérgica, dentro de su perfil de toxicidad. La información obtenida a partir de las pruebas de sensibilización cutánea sirve para identificar el peligro al que se somete una población que se expone de manera repetida a dicha sustancia tóxica. (http://www.epa.gov/pesticides/guidelines/oppts_870_2600.htm).

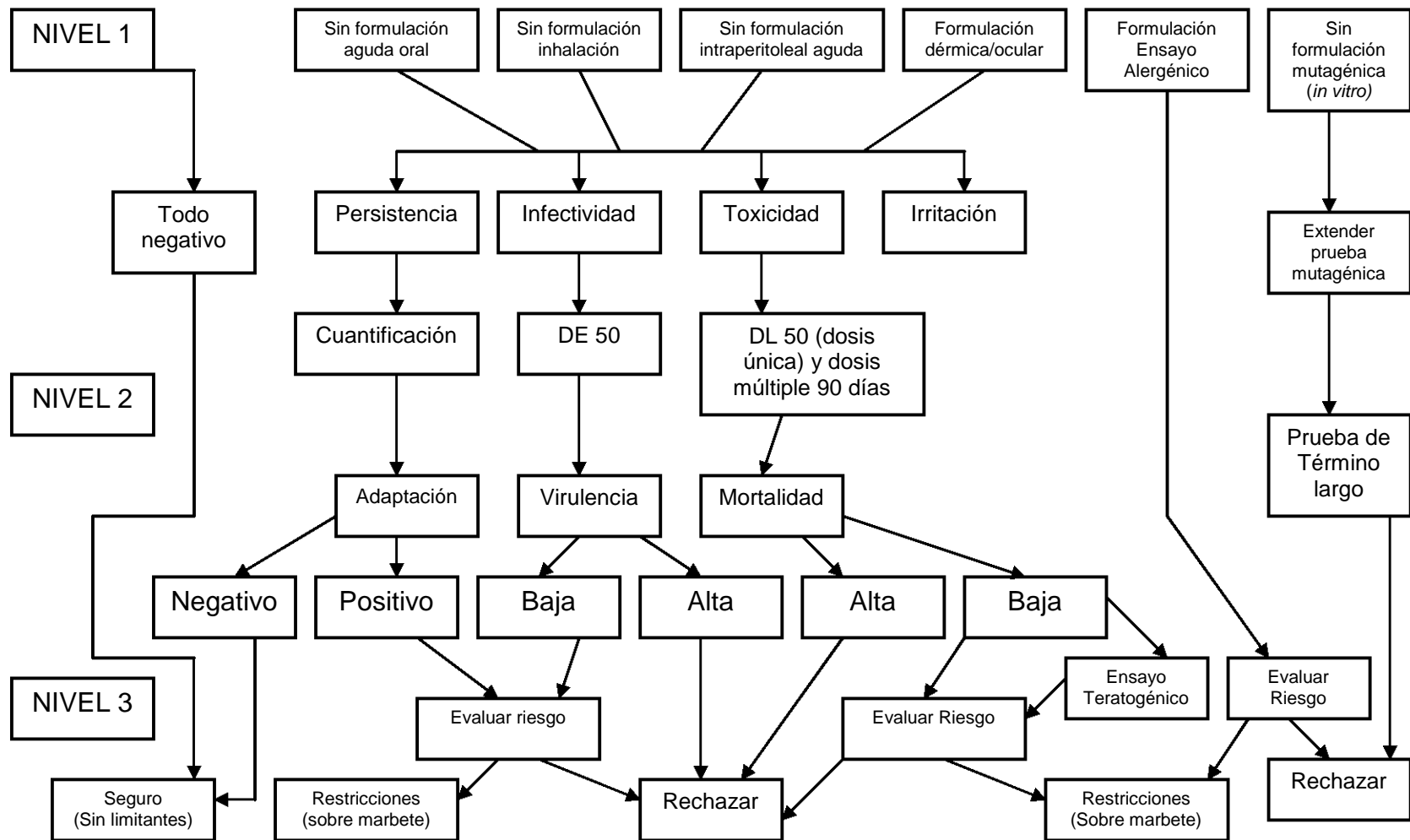


Figura 1. Esquema de pruebas para la evaluación de riesgo de un agente microbiano para el control de plagas, modificado de Siegel (1997). DE 50 = Dosis efectiva media, DL 50 = Dosis letal media.

ANTECEDENTES

El control biológico con microorganismos surge como una alternativa para el manejo de las plagas. Los agentes microbianos se han utilizado de manera exitosa debido a su selectividad, inocuidad en mamíferos, compatibilidad con organismos benéficos y su impacto menor en el medio ambiente (Siegel et al., 1997; Toriello et al., 1986; Toriello et al., 1999; Toriello, 2003).

Para que un AMPC pueda ser utilizado debe de considerarse el impacto potencial a la salud pública y al ambiente derivado de la exposición al bioplaguicida. En los humanos, la exposición puede ser directa para aquellos que mezclan, almacenan y aplican el AMPC ó indirecta en el caso del consumo de los alimentos tratados con estos plaguicidas. Por lo anterior deben de llevarse a cabo pruebas toxicológicas en animales de experimentación para establecer los efectos de la exposición aguda oral, dérmica, pulmonar, intravenosa y ocular al AMPC, además deben reportarse los incidentes por hipersensibilidad secundarios a su uso (Siegel et. al. 1997).

Se sabe que aproximadamente 500 especies de hongos son capaces de infectar a insectos, algunos infectan un amplio rango, mientras que otros son más selectivos. Los hongos entomopatógenos pertenecen, entre otros, a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Culicinomyces*, *Entomophthora*, *Nomuraea*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Leptolegnia*, *Coelomomyces*, *Lagenidium*, entre otros (Samson et. al. 1998).

Metarhizium sp. se utiliza desde el siglo XIX para el control de plagas (Samson et al., 1998). En los Estados Unidos *M. anisopliae* se utiliza como un plaguicida

microbiano para el control de cucarachas (*Peripaneta americana*, *Blatella germanica*) que son una fuente importante de alérgenos (Ward et al., 1998). También se utiliza para el control de otros insectos como la langosta (*Schistocerca gregaria*) y saltamontes (*G. tenebris*, *E. viridissima*) (Homoptera: *Acrididae*) que afectan a los cultivos de la caña de azúcar en Brasil y México, termitas (*Reticulitermes flavipes*, *E. lucifugus*) y a la gallina ciega (*Phyllophaga sp.*) (Young, 1974; Latch y Falloon, 1976; Al-Aidroos y Roberts, 1978; Ferron, 1981; Agudelo-Silva y Wassink, 1984; Riba et al., 1986; Guillespi, 1988; Samuels et al., 1989; Barson et al., 1994 y Toriello et al., 1999).

Se han llevado a cabo pruebas de seguridad de estos hongos que incluyen: la administración oral en ranas con *M. anisopliae*; la exposición oral, subcutánea, inhalada e intravenosa durante 90 días en ratas sin efectos adversos y la exposición por inhalación, intraperitoneal, subcutánea e intraocular en ratas, ratones y conejos (Austwick, 1980; Shadduck et al., 1982, Zimmermann, 1993). No se reportaron efectos adversos tras la exposición oral o intraocular y no hubo evidencia de reproducción del hongo en los tejidos de los mamíferos utilizados (Burges, 1981; Shadduck et al.1982; El-Kadi et al., 1983; Saik et al.,1990; Toriello et al. 1999b).

Las pruebas de seguridad de los hongos entomopatógenos (HE) son de vital importancia. Sin embargo, existen escasos estudios para establecer su potencial alérgico ya que estos organismos contienen componentes de origen proteico, incluyendo enzimas (proteasas y quitinasas) y por lo tanto son potencialmente

alergénicos (Ward et al., 1998; Ward et al., 2000a; Ward, 2000b; Chung et al., 2005)

De manera anecdótica se han reportado casos de sensibilización en individuos que han estado continuamente expuestos a *Metarhizium* en sus trabajos, sin embargo, los datos clínicos son escasos (Kaufmann y Bellas, 1996). Por otra parte, se han reportado los casos del deceso de un niño inmunocomprometido por una infección sistémica debida a *M. anisopliae* (Burgener et al., 1998), el desarrollo de queratitis en un hombre sano (Cepero de García et al., 1997), sinusitis en dos personas inmunocompetentes (Revankar et al., 1999) y de rinitis invasiva en un gato (Muir et al., 1998).

Aproximadamente del 80 al 90% de las dermatitis de contacto se localiza en las manos, como consecuencia de la exposición constante a un alérgeno ya sea por cuestiones laborales o en el hogar (Lantinga, et al., 1984). Meding en 1990 informó de un estudio poblacional en Gothenburg donde encontró que a lo largo de un año la prevalencia del eccema de las manos fue del 11% y los tipos más comunes fueron dermatitis irritativa (35%), dermatitis atópica (22%) y dermatitis de contacto alérgica (19%). Sin embargo la prevalencia de la dermatitis de contacto alérgica varía de hospital a hospital y de país a país debido a la falta de estandarización de criterios clínicos y métodos diagnósticos. En Dinamarca, de 431 casos de eccema de las manos, 39% correspondieron a dermatitis de contacto alérgica (Keiding, 1997). En México, se estima que la prevalencia de la enfermedad oscila entre un 5 a un 10% de la consulta dermatológica y es una de las principales causas de enfermedad laboral (Arenas, 1996).

Aspectos generales.

Se define a los hongos como organismos eucariontes, heterótrofos, macro o microscópicos, uni o pluricelulares, saprobios, parásitos, comensales, patógenos ó simbiontes. Su reproducción es sexual, perfecta o teleomórfica mediante esporas o asexual, imperfecta o anamórfica mediante conidios. La unidad funcional de los hongos son las hifas (Hawksworth, 1974).

Los hongos microscópicos son de distribución cosmopolita, crecen en cualquier sitio rico en materia orgánica, agua y temperaturas comprendidas entre 4 y 60 °C de tal manera que se desarrollan más extensamente en climas tropicales y subtropicales, desde el nivel del mar hasta 4000 m. Las especies conocidas estan agrupadas en unos 525 géneros, aunque se estima que pueden existir 1 500 000. Solo alrededor de 100 especies son necesariamente patógenas para mamíferos, vegetales, insectos así como para otros hongos (Hawksworth, 1991).

Los conidios, esporas y micelios contienen los organelos de la célula eucarionte. La pared celular esta constituida principalmente por quitina en combinación con diversos polisacáridos como: mananas, β -glucanas, galactanas, xilanas y de galactosamina, con pequeñas cantidades de lípidos, además de enzimas que regulan la síntesis de estas, que pueden ser diferentes según el grupo taxonómico al que pertenezcan. Las paredes celulares están estratificadas, constituidas generalmente por dos ó varias láminas de microfibrillas dispuestas en una materia amorfa, quedando la lámina interna adherida a la membrana protoplasmática. La membrana celular cumple con el modelo de bicapa lipídica, encontrándose dentro de esta el ergosterol. Las sustancias de reserva son

glucógeno y lípidos. Aunque carecen de clorofila, algunas especies pueden sintetizar pigmentos de diversos colores desde amarillentos, anaranjados, rojos, violetas hasta negros. Su nutrición es por absorción, debido a la liberación de enzimas conocidas como exodespolimerasas que degradan macromoléculas para que posteriormente sus fragmentos sean introducidos en la célula fúngica. Este proceso es llevado a cabo por el cuerpo vegetativo ó *soma* conocido como talo o micelio, que a su vez está constituido por múltiples filamentos ó hifas, sobre estas se desarrollan las estructuras de reproducción: esporas ó conidios. Para el aislamiento de los hongos microscópicos se utiliza el medio de cultivo universal, el agar dextrosa de Sabouraud (ADS), u otros medios que contengan la fuente básica de nutrición fúngica como el agar papa dextrosa (APD), agar papa zanahoria (APZ), que al ser medios pobres inducen la conidiogénesis. Los hongos microscópicos pueden aislarse de diferentes fuentes desde tierra hasta muestras biológicas, utilizando asa micológica por picadura en el centro del medio de cultivo. Los hongos contaminantes u oportunistas tardan en crecer de dos a tres días a una temperatura de entre 25 a 32 °C , mientras que los hongos patógenos lo hacen a 37 °C entre 7 a 30 días. Una vez transcurrido este tiempo se observa la aparición de la colonia fúngica por el anverso, apreciando las características de la superficie como son: textura, aspecto, color y forma. En el reverso, bajo el medio se determina la presencia o ausencia de pigmentos. Para conocer sus características micromorfológicas se realizan exámenes directos con azul de algodón ó hidróxido de potasio al 20%. Cuando estas características no se observan con claridad, se aplica el método del microcultivo con eritrocina,

donde se observa por microscopía en los objetivos de 10x y 40x sus formas de reproducción, tipos y modalidades de hifas así como también la presencia de estructuras especializadas.

Hongos Entomopatógenos (HE).

Este grupo de hongos tiene la capacidad de infectar selectivamente a los insectos y provocar su muerte.

El impacto que tienen actualmente es determinante debido a que pueden eliminar diversas poblaciones de plagas sin causar toxicidad en el medio ambiente; contrario a lo que ocurre con los insecticidas químicos que generan contaminación permanente e incluso resistencia de los insectos frente a estos.

La biotecnología agrícola esta enfocada a dar solución a problemas de baja producción y pérdidas económicas de cultivos provocadas por factores biológicos y químicos del campo y de esta manera enfocarse a lograr una agricultura sustentable (Tamez, 2001) con un apoyo determinante de la toxicología e inmunología clínica.

De los quince géneros de HE *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *Conidiobolus major*, *Erynia neoaphidis*, *Hirsutella thompsonii* y *Verticillium lecanii* han sido estudiados ampliamente (Toriello et al., 1986; Mier et al., 1989; Toriello et al., 1999a; Toriello et al., 1999b; Mier et al., 1994).

En México existen unas quince preparaciones agrícolas comerciales de estos HE, que contienen los conidios como ingrediente activo (Tamez, 2001).

Cuando los conidios son aplicados en el campo infectan a su hospedero a través de su adhesión a la parte externa de la cutícula del insecto, los conidios adheridos emiten tubos germinales que luego forman estructuras especializadas denominadas apresorios. Posteriormente penetran al insecto con los ganchos de penetración mediante presión y acción enzimática de proteasas y quitinasas que facilitan la digestión de la epicutícula (capa externa) y de la procutícula y epidermis (capas internas) hasta invadir el homocelo con el desarrollo subsiguiente de los cuerpos hifales y conidios para su diseminación dentro del insecto. Finalmente el hongo vuelve a salir al exterior del insecto y esporula completando así su ciclo vital (St Leger, 1986a; St leger, 1986b).

En la Tabla 1 se muestran algunos HE así como el insecto que infectan.

Agente de Biocontrol	Sugerido para el Control de
<i>Beauveria bassiana</i>	Plagas de cultivo, plagas de invernadero, broca del café (<i>Hypothenemus sp.</i>), mosquita blanca, chapulines.
<i>Metharizium anisopliae var. anisopliae</i>	Termitas, cucarachas, plagas caseras, gallina ciega, langostas y saltamontes.
<i>M. anisopliae var. acridum</i>	
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Plagas de invernadero, mosquita blanca, chicharritas (<i>Quesada gigas</i>).

Tabla 1. Hongos Entomopatógenos Comercializados en México. Modificado de Tamez, 2001.

Genero *Metarhizium* sp.

Dentro de este género se reconocen actualmente 10 clados ó variedades que corresponden a las tres especies y diversas variedades descritas anteriormente (Driver et al., 2000).

Su clasificación se basa en caracteres morfológicos y en su taxonomía molecular la cual se establece a partir de la aplicación de técnicas moleculares como RAPD-PCR, secuenciación de las regiones ITS, 28S, D3 del DNA ribosomal además de las características fenotípicas como el tamaño de los conidios y la resistencia al calor (Driver et al., 2000).

En la Tabla 2 se enuncian los taxones reconocidos morfológicamente y molecularmente de este género.

Taxones reconocidos morfológicamente ¹	Taxones reconocidos molecularmente diez grupos (clados) ²
<i>M. album</i> (Petch)	(1) <i>M. album</i> (2) <i>M. flavoviride</i> Tipo E
<i>M. anisopliae</i> (Metsch). Sorokin var. <i>ansipoliae</i> (Metsch) Sorokin var. <i>majus</i> (Tulloch)	(3) <i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i> (4) <i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i> (5) <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> (6) <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>
<i>M. flavoviride</i> (Gams & Roszypal) var. <i>minus</i> (Rombach) var. <i>flavoviride</i> (Gams & Roszypal)	(7) <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (8) <i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> (9) <i>M. anisopliae</i> var. <i>ansipoliae</i> (10) <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>

Tabla 2. Clasificación del género *Metarhizium* sp. 1. Samson et al. (1988), Hawksworth et al. (1974), Tulloch (1976), Rombach et al. (1986), Rombarch et al. (1987) 2. Driver et al. (2000).

M. anisopliae ha sido aislado en México de *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: *Melolonthidae*) que es una plaga del maíz blanco (Villalobos, 1992) y de los escarabajos *Aeneolamia* sp. y *Prosapia simulans* (Homoptera: *Cercopidae*) que atacan a la caña de azúcar (Berlanga-Padilla et al., 1997).

M. anisopliae var. *anisopliae* (EH 479/2) fue descrito por primera vez bajo el nombre de *Entomophothora anisopliae* en 1879 por Metschnikoff y

posteriormente como *M. anisopliae* por Sorokin en 1883 (Tulloch, 1976). Presenta conidios cilíndricos verdes de 5-7 µm de largo los cuales se agrupan en cadenas columnares. Normalmente crece lentamente fuera de los rangos de temperatura de 15-32 °C. Se describió inicialmente en Rusia como patógeno de *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae). Actualmente se utiliza para el control de plagas en EU, Brasil, Australia y Filipinas (Faria et al., 2001). En Australia se ha utilizado para el control de langostas y saltamontes. En los Estados Unidos para el control de cucarachas (Ward et al., 2000).

Metarhizium anisopliae var. *acridum* (EH 502/8) presenta esporodoquios con fiálides en forma de clava (9-14 x 3-4 µm). Sus conidios son uninucleares, elipsoidales, catenulados y basipétalos de 8 x 4.5 µm. Este hongo fue inicialmente encontrado en saltamontes, escarabajos y en suelos de trabajo agrícola en Alemania (Rombach et al., 1986). Actualmente es considerado como un buen agente para el control de plagas de acrididos porque en condiciones climáticas adversas de alta temperatura y baja humedad relativa puede producir infección en dichos insectos (Goettel et al., 1997).

Metarhizium sp es utilizado en la industria agrícola por su relativa inocuidad al medio ambiente (Goettel et al., 1997). En el aspecto económico este hongo es de fácil manejo y producción (Goettel, 1997), además se pueden obtener formulaciones sencillas para esparcirse con tecnología agrícola de bajo costo y de uso común. Recientemente ha sido registrado como agente microbiológico ó esta bajo desarrollo comercial para el control biológico de diversas plagas (Butt et al., 2001).

M. anisopliae ha sido seleccionado como un organismo prototipo para desarrollar métodos alternativos para el control de plagas y bioremediación (Domsch et al. 1980; Zimmermann, 1993), así como también para estudiar su potencial alergénico (Ward et al., 1998; Ward et al., 2000).

Desde el punto de vista médico, los hongos son objeto de estudio debido a que ocasionan diversas patologías tales como micetismo, micotoxicosis, micosis y alergia (hipersensibilidad) (Arenas, 1996).

La mayoría de los hongos son detectados y destruidos en cuestión de horas por el sistema inmunitario innato gracias a la acción de fagocitos y opsoninas (Medzhitov et al., 1997; Romani et al., 1998; Mansour et al., 2002; Romani, 2002; Huffnagle et al., 2003; Marr et al., 2003). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en las células fagocíticas reconocen patrones asociados a patógenos (PAMP) y son activados por ellos (Mambula et al., 2002; Netea et al., 2002a; Akira, 2003; O'neil et al., 2003). Estos mecanismos actúan de manera inmediata y son seguidos horas después por una respuesta inflamatoria inducida tempranamente pero que no genera inmunidad permanente (Gantner et al., 2003). En la Figura 2 se representa el papel de los PRR como activadores de la inmunidad innata y adaptativa frente a hongos (Shoham et al., 2001, Wang et al., 2001; Tada et al., 2002; Tauszig-Delamasure et al., 2002; Brown et al., 2003; Jouault et al., 2003; Lebron et al., 2003; Netea et al., 2003).

Estas primeras líneas de defensa ayudan a mantener la infección bajo control sin embargo si el hongo es capaz de evadirlas, en los organismos vertebrados

se hace uso del sistema inmunitario adaptativo con la generación de células T cooperadoras efectoras (T_h), células T reguladoras (T_{reg}) y células B que atacan específicamente al patógeno e inducen células de memoria previniendo infecciones subsecuentes con el mismo microorganismo (Herring et al.,2001) Las células dendríticas captan al hongo en el sitio de infección con una interesante plasticidad funcional en el reconocimiento fúngico a través de la interacción con diferentes receptores de reconocimiento en las células dendríticas, lo que determina el modo de presentación antigénica fúngica y la naturaleza de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa mediante la acción de las células T_h (d'Ostiani et al., 2000; Claudia et al., 2002).

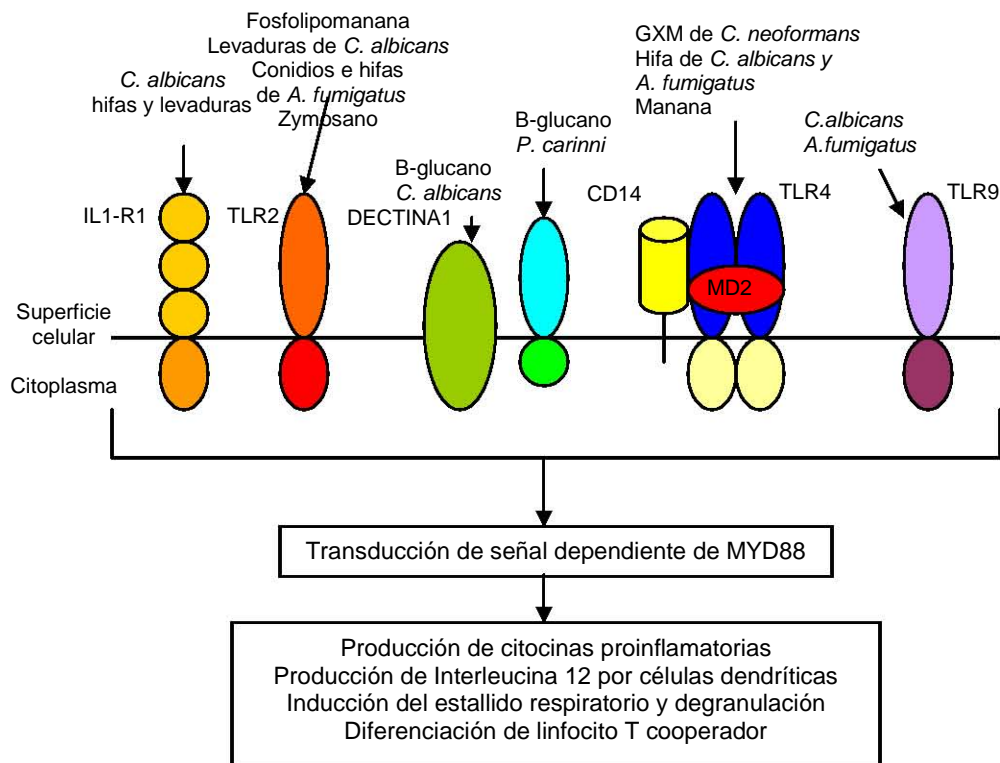


Figura 2. Papel de los PRR como activadores de la inmunidad innata y adaptativa frente a hongos. La vía principal de señalización de los PRR tras unirse a los PAMP involucra la interacción con la molécula adaptadora MYD88 (gene 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide) que se localiza en el citoplasma. La activación de MYD88 culmina en la activación y traslocación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) con la subsecuente activación genética. Modificado de Romani, 2004. GXM= glucoronoxilomanana.

Como las diferentes subpoblaciones de linfocitos T_h liberan un perfil de citocinas particular, son capaces de desencadenar señales de retroalimentación activadoras o inhibitoras para los fagocitos efectores por lo que la activación de la subpoblación apropiada de linfocitos T_h es determinante para la obtención de una respuesta inmunitaria exitosa frente al hongo (Murphy, 1989; Levitz et al., 1995; Romani, 1997, Netea et al., 2002b; Hebart et al., 2002). Las células T contrareguladoras (T_{reg}) sirven para prevenir respuestas inflamatorias excesivas y contribuyen al desarrollo de la memoria inmunológica contra los hongos (Romani, 2004).

La generación de una respuesta predominantemente $Th1$ protege contra las infecciones por hongos, es mediada por interleucina 12 (IL12) y junto con la opsonización por anticuerpos y la secreción de interferón gamma ($IFN \gamma$) e interleucina 2 (IL 2) las que estimulan la activación óptima de los fagocitos en el sitio de la infección (Huffnagle et al., 1991).

En la actualidad se sabe que los pacientes con infecciones micóticas diseminadas tienen producción defectuosa de $IFN \gamma$ y anergia en las respuestas de hipersensibilidad retardada, niveles aumentados de: citocinas de la clase 2 (interleucinas 4 y 5), inmunoglobulina E (IgE), Inmunoglobulina G4 (IgG4), inmunoglobulina A (IgA) y eosinofilia los cuales son marcadores de mal pronóstico de la enfermedad (Calich et al., 1998; Clemons et al., 2001). En los pacientes con el síndrome de hiperinmunoglobulinemia E (síndrome Hiper IgE ó de Job) existen defectos de la vía de señalización IL12/ $IFN\gamma$, entre otras

alteraciones se manifiesta con infecciones micóticas recurrentes y alergia (Savolainen et al., 1990; Faergemann, 2002; Netea et al., 2002b).

La interleucina 4 (IL4) es un determinante importante de susceptibilidad a muchas de las infecciones fúngicas (Romani, et al., 1998), puede a la par activar ó desactivar fagocitos y células dendríticas para ciertas funciones especializadas, por ejemplo puede inactivar a los fagocitos y promover la secreción de IL12 en las células dendríticas (Romani, 1999). El mecanismo más importante que demuestra la actividad inhibitoria de IL4 es su capacidad para actuar como la señal más potente para comprometer el desarrollo del linfocito hacia la subpoblación Th2 lo que favorece la aparición de alergia a hongos. En los individuos atópicos la respuesta de tipo tardío a hongos está alterada y se asocia con niveles elevados de anticuerpos antifúngicos de la clase IgE, IgA e IgG (Savolainen et al., 1990; Faergemann, 2002).

En la figura 3 se muestra un esquema general del balance de los mecanismos inmunitarios involucrados en la respuesta a las infecciones fúngicas, donde se aprecia la cooperación entre el sistema inmune innato y el adaptativo.

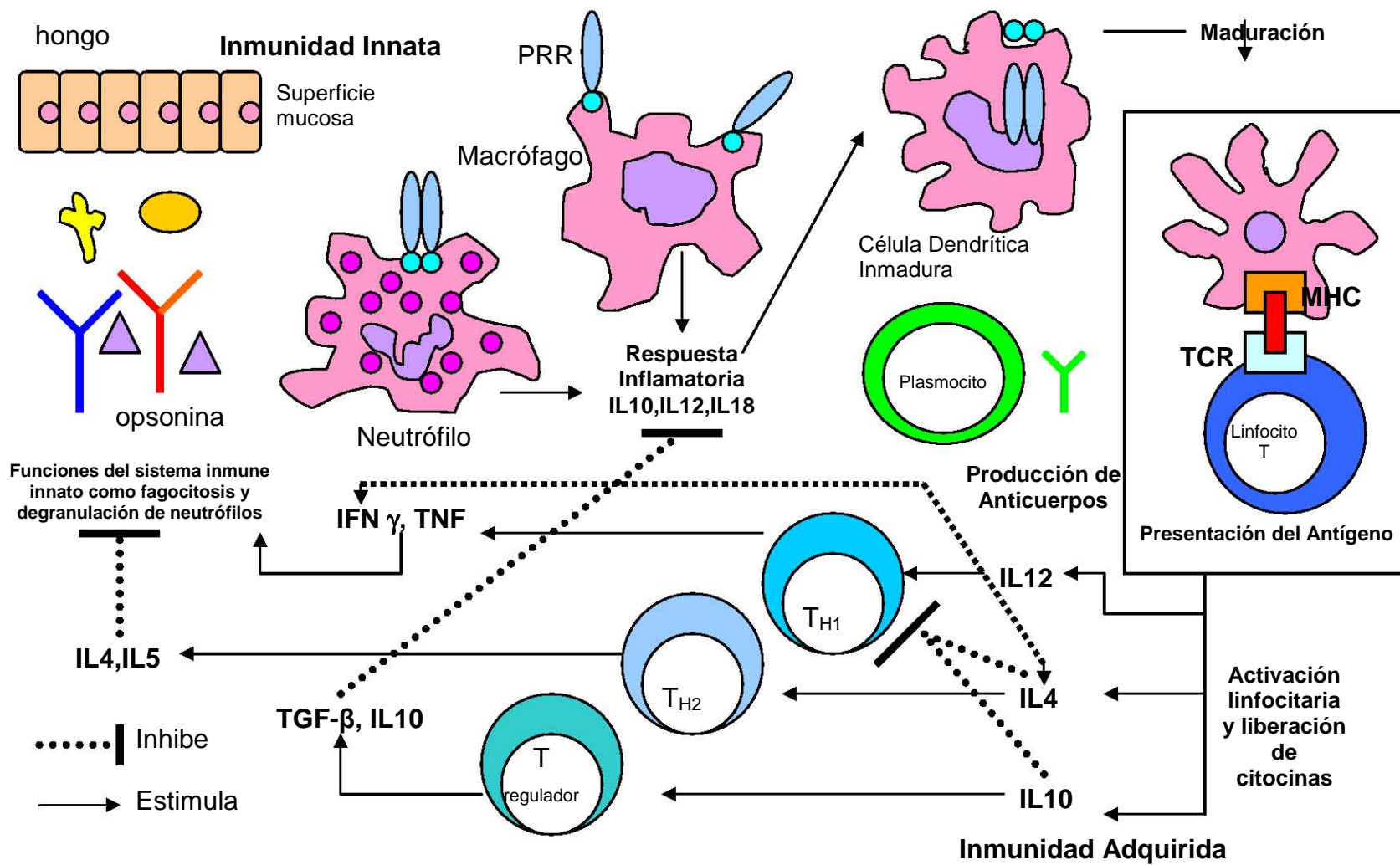


Figura 3. Respuesta inmunitaria frente a hongos. Modificado de Romani, 2004.

HIPERSENSIBILIDAD

El término de hipersensibilidad se utiliza para designar una respuesta inmunitaria aumentada, resultado del contacto constante y subsecuente con el mismo antígeno-alérgico, es de carácter individual y tiene como característica principal el generar daño tisular (Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004).

Cuando un organismo es sensibilizado, el contacto secundario con el antígeno fúngico conlleva a un refuerzo secundario de esta respuesta. No obstante, esta reacción puede ser inapropiadamente fuerte y producir daño tisular extenso si el antígeno se encuentra presente en cantidades excesivas o si el estado inmune humoral o celular está alterado (Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004).

Desde el punto de vista inmunológico el carácter antigénico se debe a la presencia de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos presentes en la célula fúngica (Neaville et al., 2005).

En general se conocen dos grupos de antígenos (Fradkin, 1980):

Corpusculares: componentes glicoprotéicos, responsables de la respuesta de hipersensibilidad inmediata, mediada por anticuerpos de clase IgE.

Metabólicos: antígenos producidos y liberados por los hongos en medios de cultivo líquidos, responsables de la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío, mediada por linfocitos Th1.

Los mecanismos inmunitarios responsables de dicha respuesta se clasifican en cuatro tipos según Gell y Coombs. Debe hacerse énfasis en que estos mecanismos están activados en la respuesta inmune que el hospedero utiliza de

manera habitual para eliminar agentes infecciosos o cualquier antígeno. (Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004).

Los hongos son capaces de provocar básicamente tres tipos de respuestas:

- a) Hipersensibilidad inmediata ó anafiláctica (Tipo I): mediada por anticuerpos de la clase IgE. Ej: rinitis alérgica, rinoconjuntivitis, rinosinusitis, asma extrínseco, dermatitis atópica y algunos casos de urticaria (Brostoff et al., 1991; Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004).
- b) Hipersensibilidad por formación de complejos inmunes (Tipo III): Mediada por anticuerpos de las clase IgG. Alveolitis alérgica extrínseca (Hay et al., 1991; Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004; Janeway et al., 2005).
- c) Hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T antígeno-específicos sensibilizados (Tipo IV): Tuberculosis, lepra, leishmaniasis, listeriosis, blastomycosis, esquistosomiasis (Barnetson et al., 1991; Roitt et al., 2003; Roitt et al., 2004).

En el presente protocolo nos enfocaremos primordialmente a la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío ó tipo IV.

Hipersensibilidad retardada (tipo IV).

En esta categoría se engloban las reacciones de hipersensibilidad que tardan más de doce horas en desarrollarse. A diferencia de los otros tipos de hipersensibilidad (mediada por anticuerpos) esta respuesta es generada por la subpoblación de linfocitos "T" cooperadores tipo 1 (Th1), responsables de las reacciones de hipersensibilidad retardada (T_dh). Estos linfocitos presentan el antígeno de

superficie CD4, producen interleucina 2 (IL 2), interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). Su activación y diferenciación se lleva a cabo tras un contacto frecuente con el antígeno ó hapteno, lo que terminará por desencadenar una respuesta inmunitaria ante el contacto subsecuente con dichas moléculas (Barnetson et *al.*, 1991; Mc Fadden 2000; Roitt et *al.*, 2003; Roitt et *al.* 2004; Boguniewicz et *al.*, 2005, Janeway et *al.*, 2005).

Los antígenos o haptenos generalmente son de carácter hidrofóbico ó lipofílico. Químicamente los antígenos son de tipo lipopolisacarido, lipoprotéico ó lipídico, mientras que los haptenos son de tipo inorgánico (Neaville et *al.*, 2005).

Histológicamente en la fase más temprana de la reacción, se observan células mononucleares perivasculares, posteriormente aparece un exudado más amplio de células mononucleares y polimorfonucleares. Finalmente los polimorfonucleares migran fuera de la lesión y dejan atrás un infiltrado mononuclear constituido por linfocitos y células de la estirpe monocito-macrófago (Roitt et *al.*, 2003).

Existen diversos tipos de respuesta de tipo retardado:

1. Hipersensibilidad por contacto.
2. Hipersensibilidad de tipo tuberculínico.
3. Hipersensibilidad granulomatosa.

Estas se diferencian entre sí por el tipo de moléculas que las inducen, el órgano de choque y las características histológicas presentes (Barnetson et *al.*,1991).

Mecanismo de sensibilización

Tras una sensibilización inicial, las células Th1 de memoria reconocen al antígeno unido a las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) en las células presentadoras de antígeno. Tras la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 liberan IL2, TNF- β e IFN γ , lo que estimula la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio. Por lo anterior, existe un incremento local de la permeabilidad de los vasos sanguíneos lo cual permite la entrada de plasma y células en este sitio ocasionando la aparición de edema (Janeway et al., 2005). Debido a que estos linfocitos Th1 antígeno específicos son raros y existe una respuesta inflamatoria discreta para atraer células a este sitio, tienen que transcurrir varias horas antes de que una célula "T" de la especificidad correcta llegue. Estas células liberan mediadores que activan a las células endoteliales locales, reclutando un infiltrado inflamatorio mediante la atracción y activación de macrófagos, los cuales migran por quimiotaxis hacia el sitio donde se encuentra depositado el antígeno, para iniciar la fagocitosis. Cada una de estas fases, involucra tiempo de tal manera que la respuesta está completamente desarrollada 24 a 48 horas después del reto antigénico (Janeway et. al. 2005).

El daño tisular agudo es el resultado de los productos secretados por los macrófagos activados, tales como IFN γ , hidrolasa ácida, C3a e intermediarios reactivos del oxígeno. Al no poder llevar a cabo la fagocitosis por la complejidad química del antígeno, el macrófago se transforma en una célula epitelioides, para después transformarse en una célula gigante (célula de Langhans) la cual es rodeada por linfocitos Th1 en la periferia. Histológicamente esta imagen

corresponde a un granuloma de tipo tuberculoide. La persistencia de la activación de los macrófagos es responsable de las lesiones crónicas que a menudo conducen a fibrosis como consecuencia de la acción continua de citocinas y factores de crecimiento como el de los fibroblastos (Barnetson et *al.*, 1991; Roitt et *al.*, 2003).

De forma menos frecuente, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) lisan directamente a las células diana que presentan en su superficie moléculas de la clase I del MHC asociadas a péptidos extraños sin la participación de macrófagos ó de otros organismos efectores. Una hipersensibilidad de tipo tardío más frecuente es en la que participan linfocitos Th2 frente a alergenios solubles en la que se aprecia un aumento en: producción de IgE, IL4, IL5, mastocitos y eosinófilos. Estos últimos son los que perpetúan la respuesta tardía en las enfermedades alérgicas crónicas (Barnetson et *al.*, 1991; Roitt et *al.*, 2003; Roitt et *al.*, 2004; Janeway et *al.* 2005).

DERMATITIS ALÉRGICA POR CONTACTO (DAC)

Se define como un síndrome reaccional causado por la aplicación de una sustancia en la piel (Arenas, 1996). Es una de las dermatosis mas frecuentes, constituye del 5 a 10% de la consulta dermatológica (Arenas, 1996). Los factores predisponentes o agravantes son humedad, sudoración e higiene personal deficiente, propiedades físico-químicas de las sustancias como solubilidad, radiación ultravioleta, traumatismo físico simultáneo, región anatómica, oclusión y predisposición genética como atopia. Afecta a todas las razas, la negra es la más resistente. Se observa en personas del sexo masculino y femenino, puede

presentarse a cualquier edad (Arenas, 1996; Mc Fadden 2000; Boguniewicz et al., 2005). En México, las principales causas son detergentes, níquel, medicamentos y cromo. Se origina por iatrogenias o como enfermedad ocupacional y representa del 25 a 50 % de las enfermedades laborales, especialmente en las manos (Arenas, 1996). Puede originarse por cualquier sustancia u objeto que esté en contacto directo con la piel. El mecanismo de producción es por irritante primario o por sensibilización; si interviene la luz, puede ser fototóxica ó fotoalérgica (Arenas, 1996; Mc Fadden et al., 2000; Boguniewicz et al., 2005).

En la dermatitis por contacto por irritante primario, *venenata* ó no inmunitaria no hay sensibilidad previa, la susceptibilidad es individual y puede originarse por irritantes débiles ó potentes (tóxica), ó por factores mecánicos ó físicos como frío y calor. La que sobreviene por irritantes débiles se debe a la acumulación por acción repetida y prolongada de una sustancia, la tóxica se presenta al primer contacto. En general, se produce daño celular y la sustancia se aplica por tiempo y cantidad suficientes, y de éstos depende la intensidad de la reacción (Arenas, 1996; Boguniewicz et al., 2005).

En contraste, la dermatitis alérgica por contacto (DAC) aparece en individuos con sensibilización previa y hay una fase de inducción que dura de cuatro días a varias semanas. Existen variables que deben de considerarse para que la sensibilización se lleve a cabo como la concentración del antígeno, el número de exposiciones y la exposición concomitante con otros antígenos (Arenas, 1996; Boguniewicz et al., 2005). En la actualidad se propone que la DAC es una respuesta cutánea heterogénea dependiente de las células de Langerhans y mediada por linfocitos T

(Mc Fadden 2000). La reacción mononuclear tardía depende completamente de eventos que se llevan a cabo durante la primera y segunda hora tras el reto antigénico. La producción de IgM hapteno-específica por células B1 y el complemento, activan localmente al endotelio lo que permite el reclutamiento de linfocitos T (Roitt et al., 2004). Las células de Langerhans se derivan de la médula ósea y se encuentran en el estrato germinativo de la epidermis, presentan en su superficie celular moléculas clase II del MHC, antígeno timocítico cortical CD1, Fc γ RI y RC3b entre otros receptores. Se diferencian de los demás macrófagos porque es una célula dendrítica y contienen un organelo denominado gránulo de Birbeck, que al parecer está relacionado con su capacidad de migración. Estas células llevan a cabo la captura de antígenos epicutáneos, migran por acción de la IL1 y del TNF α hacia los nódulos linfáticos y presentan antígenos a las células "Th" vírgenes (Aiba et al., 1990; Schuler et al., 1991; Cumberbatch et al., 1997; Mc Fadden 2000).

El alérgeno suele ser un hapteno (molécula de menos de 5,000 Da, lipofílica) que penetra a la epidermis, se une mediante enlaces covalentes a los residuos amino-terminal (generalmente lisina) de proteínas dermoepidérmicas (PDED) formando un antígeno completo. Este complejo hapteno-PDED es captado y procesado por las células de Langerhans presentes en la capa basal de la epidermis. Las células de Langerhans migran hacia el ganglio linfático a través de los vasos linfáticos aferentes y es en el área paracortical del ganglio donde se lleva a cabo la presentación del antígeno asociado a MHC-II. Para que la presentación antigénica se complete se necesitan de otras interacciones moleculares: CD4 presenta

afinidad por la región constante de las moléculas del MHC clase II, los LFA-1 del linfocito T interaccionan con los ICAM1 presentes en la célula de Langerhans, la molécula CD2 del linfocito T se une a la molécula LFA3 expresada en casi todas las células nucleadas y el complejo CD28/B7 es una molécula importante de adhesión para la interacción completa entre la célula de Langerhans y el linfocito T. Esto da como resultado la activación y proliferación de células Th1-dth de memoria y efectoras (CD45RO) (Picker et *al.*, 1991, Mc Fadden 2000). En la Figura 4 se esquematiza lo descrito.

La fase de desencadenamiento (elicitación) o reacción de hipersensibilidad mediada por células ocurre a las 24-48 horas tras la reexposición al antígeno-alergeno. Los linfocitos Th1-dth “de memoria” específicos, sensibilizados, reconocen al determinante antígeno-alérgico; ello conduce a la transformación blástica y proliferación clonal, con liberación de mediadores de la inflamación (IL2, IL3, MIF, IFN γ), los cuales producen la activación y reclutamiento de macrófagos y la expresión de MHC-II e ICAM-1 en queratinocitos y células endoteliales quienes a su vez liberan IL1, IL6 y GM-CSF ocasionando la activación y proliferación de linfocitos T, por lo que se puede apreciar un infiltrado linfocitario con predominio de células Th1 además de células de Langerhans, Linfocitos T CD8+ y algunos neutrófilos, monocitos y basófilos (Bergstrasser et *al.*, 1989; Mc Fadden 2000, Janeway et *al.*, 2005) (Figura 5).

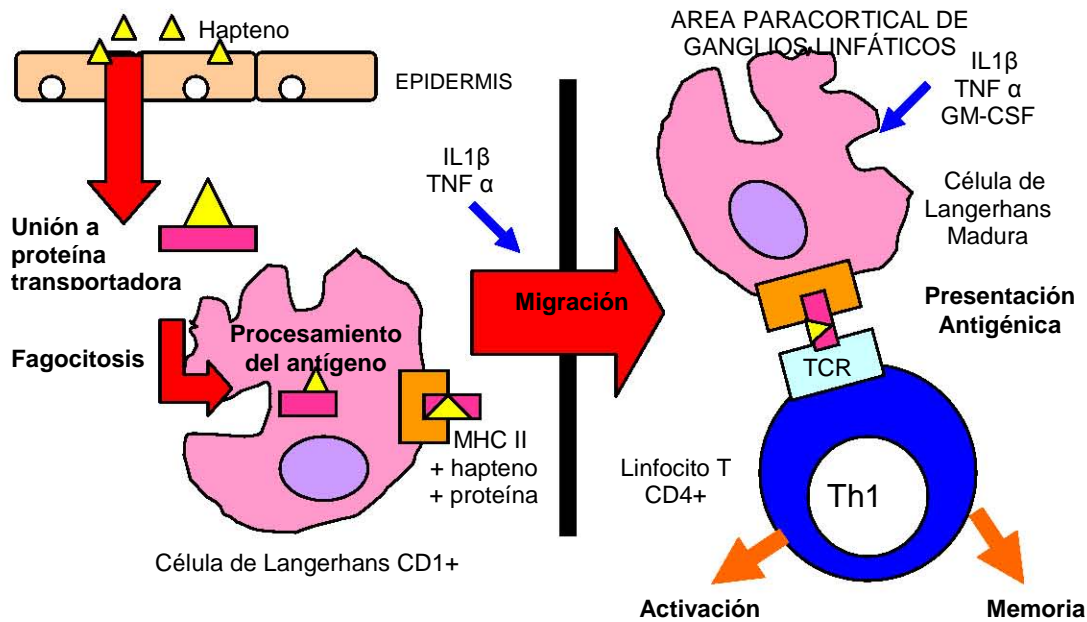


Figura 4. Fase de inducción.

Esta respuesta ocasiona la desintegración celular que histológicamente se denomina espongiosis epidérmica y se manifiesta clínicamente con la presencia de lesiones cutáneas como eritema, vesículas y eccema en el área de la piel donde se encuentra depositado el complejo antígeno-alérgico. Ocasionalmente, esta respuesta puede ser sumamente agresiva y producir lesiones cutáneas extensas e inclusive en sitios distantes a la región donde se tuvo contacto con el alérgeno (Arenas, 1996). Es importante mencionar que en estudios recientes en ratones “knock-out” se ha observado que este tipo de respuesta retardada no es mediada únicamente por citocinas de los linfocitos Th1, sino que también las respuestas Th2 pueden contribuir e incluso existen citocinas como la IL17 que no pertenecen al perfil Th1/Th2 que parecen estar involucradas en la DAC (Wang et al, 2003). La sensibilidad por contacto puede durar meses o de por vida, tanto como las células sean capaces de reconocer al antígeno o al hapteno específico.

Puede haber sensibilización simultánea a varias sustancias ó reacciones cruzadas a diversos productos relacionados. También se ha sugerido una sensibilización endógena por alérgenos orales o parenterales en especial, metales como níquel, cromo y mercurio, así como fármacos como sulfamidas, anestésicos locales y fenotiazinas (Arenas, 1996).

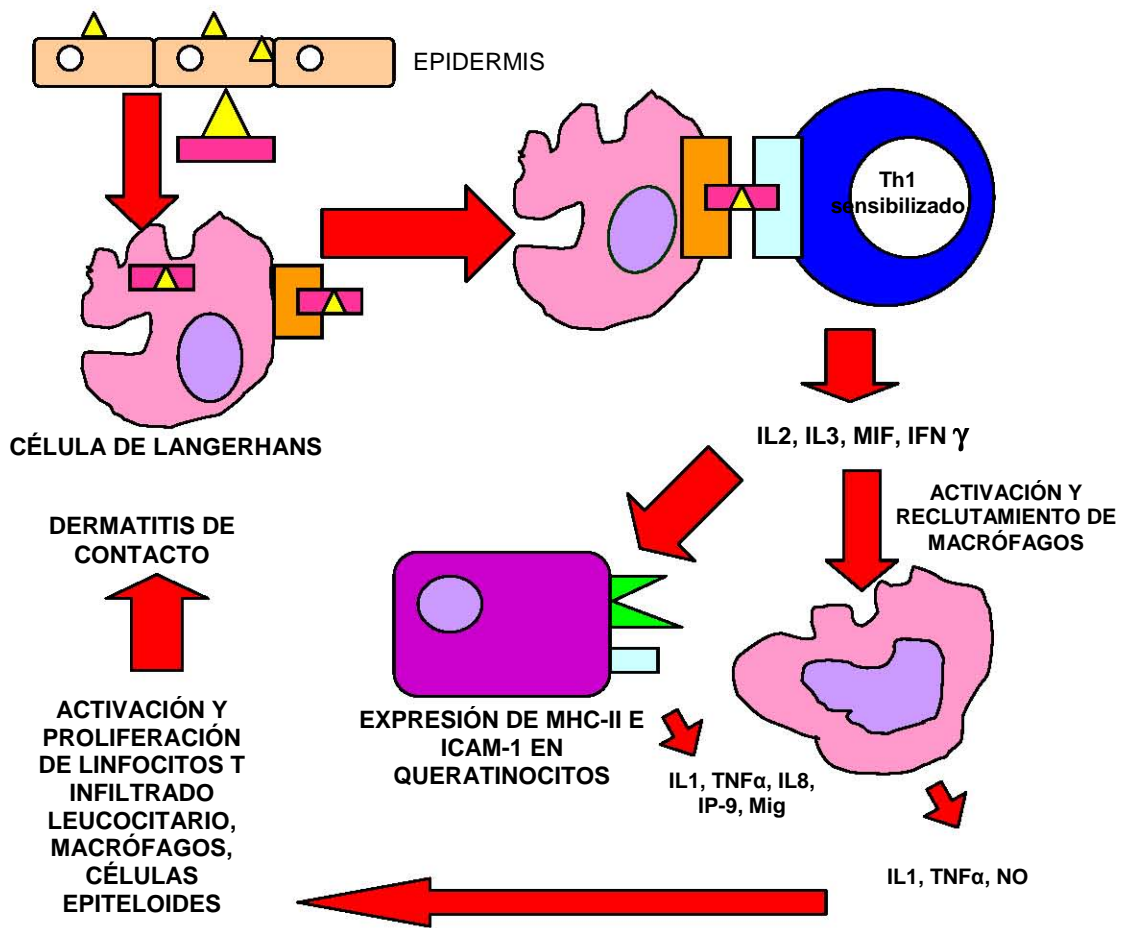


Figura 5. Fase de desencadenamiento (elicitación).

De acuerdo al tiempo de evolución la DAC se divide en aguda, subaguda y crónica. En los casos agudos las lesiones cutáneas se caracterizan por eritema,

edema, vesículas, ampollas e inclusive puede haber necrosis. Más que prurito puede haber ardor o sensación de quemadura. En la dermatitis crónica aparecen lesiones cutáneas secundarias tales como liquenificación, escamas, costras, hiperqueratosis y fisuras. En la subaguda hay una combinación de las lesiones anteriormente mencionadas. La localización de las lesiones es diversa, depende del agente causal y está en relación con la zona de contacto del antígeno-alergeno, sin embargo hay un claro predominio por las zonas de exposición, principalmente las manos (Barnetson et *al.*, 1991; Arenas, 1996; Roitt et *al.*, 2003; Boguniewicz et *al.*, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La utilización de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas esta ampliamente documentada y se han llevado a cabo protocolos para evaluar su persistencia, infectividad y toxicidad. Sin embargo, no existen datos sobre la capacidad de generar sensibilización cutánea en animales, por lo que en éste trabajo nos enfocaremos a determinar el potencial de los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para inducir dermatitis alérgica por contacto en ratones de experimentación, y así contribuir al estudio de la seguridad de los hongos entomopatógenos que serán utilizados como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para generar dermatitis alérgica por contacto en ratones BALB/c administrándolos en forma cutánea como suspensión de conidios ó como extracto antigénico fúngico mediante la prueba del edema en la oreja de ratón (Mouse Ear Swelling Test, MEST por sus siglas en inglés).

OBJETIVOS

Objetivos particulares

- 1) Estudiar macro y micromorfológicamente a los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, patógenos de la langosta (Orthoptera: *Acrididae*), con el objetivo de asegurar su identidad fúngica.
- 2) Obtener los extractos antigénicos de los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.
- 3) Realizar la prueba MEST en ratones BALB/c mediante la aplicación de una suspensión de conidios de los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.
- 4) Realizar la prueba MEST utilizando ratones BALB/c mediante la aplicación de un extracto antigénico de cada uno de los siguientes hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.
- 5) Determinar la capacidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. para provocar dermatitis alérgica por contacto.

HIPOTESIS

Los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, no son capaces de generar dermatitis alérgica por contacto en ratones BALB/c cuando son inoculados ya sea en forma de conidios o en forma de extractos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prueba de sensibilización cutánea.

Existen diferentes protocolos para identificar sustancias con potencial alergénico. Todos los protocolos comparten en esencia el siguiente fundamento: tras la exposición inicial a una sustancia problema, los animales son expuestos después de un periodo no mayor a una semana, a un reto con esa misma sustancia para determinar si se ha generado un estado de hipersensibilidad. La sensibilización se determina evaluando la reacción obtenida después del reto con la sustancia problema, comparándola con la reacción resultante de la exposición inicial a la sustancia problema durante el periodo de inducción. Los animales del estudio son expuestos a la sustancia de prueba por vía intradérmica o epidérmica. Tras un periodo de descanso (durante el cual se debe desarrollar una respuesta inmunitaria) los animales se exponen a una dosis de reto. El grado y la extensión de la reacción cutánea se comparan con la obtenida en los animales testigo que reciben el mismo tratamiento durante el periodo de inducción y posteriormente reciben el reto.

Las pruebas convencionales para la identificación de sensibilizantes potentes por contacto tienen una serie de desventajas como son: el costo, duración del estudio, número de animales, necesidad de espacios para mantener a los animales, dificultad para probar materiales pigmentados como antígenos y resultados subjetivos (eritema en la piel del cobayo) más que objetivos (Gad et al., 1985).

Prueba del edema en la oreja del ratón (MEST).

Esta prueba, fue desarrollada a principios de los ochenta como una alternativa objetiva, de bajo costo y de menor duración para la evaluación de la hipersensibilidad de contacto de tipo retardado sustituyendo ratones por cobayos (Gad et al., 1985). Su uso se ha extendido a pruebas de fotosensibilidad y fototoxicidad, como una herramienta en el estudio de agentes promotores de tumores y para evaluar diferentes materiales de prueba (productos médicos, productos industriales, contaminantes ambientales, químicos y drogas) (Stalder et al., 1985; Patrick et al., 1987; Stern et al., 1989; Kloss et al., 1992).

El MEST esta incluido dentro de la lista de las pruebas de sensibilización aceptadas por organismos reguladores.

http://www.epa.gov/pesticides/guidelines/oppts_870_2600.htm

El protocolo utilizado fue descrito por Gad en 1985. El edema puede ser detectado únicamente si el sitio de la exposición al antígeno es la piel, pero no se distingue fácilmente de su alrededor y por lo tanto no se usaba como un marcador de la respuesta de hipersensibilidad de tipo IV, sin embargo cuando se usa la oreja como un sitio de reto, la respuesta es más evidente y se puede medir con relativa facilidad (Gad, 1994).

Desde que Crowle demostró en 1959 la transferencia pasiva de la hipersensibilidad de contacto de tipo tardío en ratones, se ha generado una gran cantidad de información en un intento para comprender la respuesta en dicha especie (Crowle, 1959 a y b).

Se ha demostrado que se necesitan células derivadas del timo para inducir una respuesta de tipo tardío (Asherson y Ptak, 1968; DeSousa y Parrot, 1969), a la par los ratones se han usado para el estudio de los esteroides flourinados y los corticoesteroides lo que ha culminado en el desarrollo formal del MEST (Gad, 1994).

El diseño general del MEST se divide en tres etapas (Figura 6):

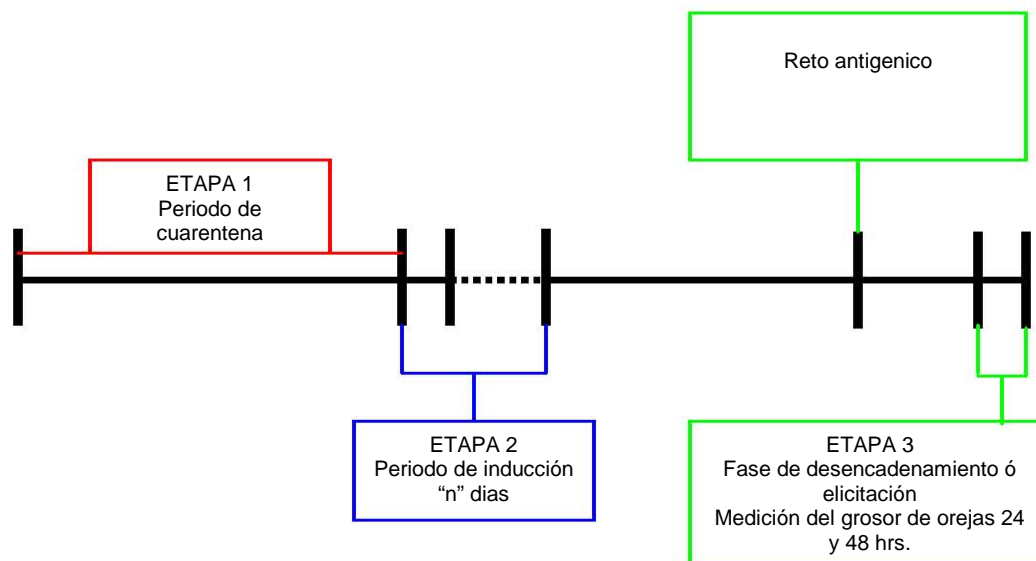


Figura 6. Esquema lineal del protocolo de la prueba de edema en la oreja del ratón (MEST).

Cepas fúngicas.

Se utilizaron cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* EH 502/8 y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, EH-479/2 de aislados originales del centro nacional de referencia de control biológico (CNRCB) dirección general de sanidad vegetal (DGSV), SAGARPA. Los hongos se conservan en aceite mineral a 4 °C, en agua destilada y en agua glicerizada al 10% en nitrógeno líquido a -196 °C, en la colección de cultivos del laboratorio de Micología Básica,

Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Estudio micro y macromorfológico de los hongos entomopatógenos (HE).

Los hongos se cultivaron en medio de agar dextrosa de Sabouraud (ADS) y agar papa dextrosa (APD) a 28°C durante 7 días para realizar el estudio macroscópico de las colonias y observar su crecimiento (Goettel et al., 1997). Se realizaron microcultivos y tinción con eritrocina para cada una de las colonias sembradas en ADS y APD para la observación de la micromorfología fúngica.

Obtención de los extractos antigénicos fúngicos (EAF).

Los cultivos monospóricos de los hongos, se sembraron individualmente en el medio líquido de papa dextrosa zanahoria (PDZ) en matraces con capacidad para dos litros. Se utilizaron siete matraces por cada cepa fúngica y se incubaron a 28°C. Transcurridas 4 semanas y una vez que las colonias fúngicas abarcaron en su totalidad la superficie del medio líquido, se separaron de éste con papel filtro. La biomasa obtenida se dejó secar a temperatura ambiente durante 72 h. Posteriormente se llevó a cabo su inactivación con acetona en matraces estériles con capacidad para un litro. Cada matraz permaneció en agitación constante durante 15 min y posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 2°C durante 48 h. La biomasa obtenida por filtración se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez seca, se trituró hasta obtener un polvo fino del cual se pesó 1.0 g y se le agregó 10 ml de solución extractante de Coca débil, con el fin de que

el bicarbonato de sodio de ésta reblandeciera la pared celular de conidios y micelios y lograr que las moléculas con carácter antigénico queden solubilizadas en la solución extractante, para obtener un extracto antigénico fúngico (EAF) a una concentración primaria de 1:10 p/v (Philips, 1953; FDA, 1987; Turco, 1987; Larsen, 1991). Esta solución se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 48 h. Posteriormente se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos (solución de Evans, pH 7.0) durante 48 horas a 4 °C, en tubo de hemicelulosa con un tamaño de poro de 3000 daltones, para eliminar pequeños péptidos y pigmentos. Finalmente se mezcló con glicerina al 50%, quedando a una concentración final de 1:20 v/v que es la concentración a la cual se utilizan de manera estandarizada los extractos alérgicos para diagnóstico. El EAF fue esterilizado en equipo millipore con membrana de 0.22 µm. Cada EAF se envasó en frascos de vidrio neutro, libre de pirógenos y estériles de 60 ml, sellándolos con tapón de hule rojo y retapas de aluminio con engargoladora manual, manteniéndolos en refrigeración constante a 4 °C. Se determinó el pH final y la cantidad de proteínas totales mediante el método de Lowry para cada EAF (Lowry O, 1951).

Obtención de la suspensión de conidios viables.

Los conidios de *M. anisopliae* var. *acridum* y *M. anisopliae* var. *anisopliae* se obtuvieron a partir de cultivos en APD incubados a 28 °C durante 2 semanas. A cada tubo de ensayo se le agregaron 10 mL de Tween 80 estéril al 1%. Con un asa micológica se removieron cuidadosamente los conidios para obtener una suspensión, la cual se homogeneizó con un Vórtex. Los conidios se contaron en

una cámara de Neubauer ajustándose a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Para el periodo de inducción se utilizaron 100 μ L para una suspensión final de 1×10^7 conidios/animal. Para la fase de reto se utilizaron 10 μ L para una concentración final de 1×10^6 conidios/animal. La viabilidad de las suspensiones se determinó mediante el método de tubo germinal. Los conidios se suspendieron en solución salina y se utilizaron suspensiones “frescas” preparadas al momento del estudio, con viabilidad por arriba del 98%.

Animales.

Se utilizaron 150 ratones BALB/c, hembras, nulíparas, no preñadas, adultas jóvenes con peso superior a 15 gramos, libres de parásitos y/o patógenos. Se usaron animales hembras debido a que demuestran una conducta menos agresiva al estar en conjunto. Se mantuvieron en cajas de policarbonato con cama de virutas de pino, a temperatura ambiente de 24 ± 2 °C, con humedad constante, en una secuencia artificial de iluminación de 14 horas luz/10 horas oscuridad, suministrándoles una dieta convencional (Mouse Chow , Purina de México, México) y agua estéril *ad libitum*, en el bioterio del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se hicieron cuatro grupos: testigo positivo, testigo negativo, grupo problema 1 y grupo problema 2, identificándolos mediante tarjetas rotuladas con claves en el frente de sus contenedores (Tabla 3).

Grupo	Sustancia de prueba	
Grupo 1 (A y B) Primera parte	Oreja izquierda	Extracto antigénico fúngico
	Oreja derecha	Solución glicero-salina
Grupo 2 (C y D) Segunda parte	Oreja izquierda	Suspensión de conidios viables
	Oreja derecha	Solución salina 0.9%
Testigo positivo	Oreja izquierda	2,4 dinitrofluorobenceno
	Oreja derecha	Solución glicero-salina
Testigo negativo	Ninguna	

Tabla 3. Grupos de ratones para la prueba MEST.

Testigo positivo

Al grupo de testigos positivos se les administró 2,4 dinitrofluorobenceno (2,4 DNFB) 1:100 v/v en solución glicero-salina como control positivo, debido a su alta capacidad sensibilizante para generar dermatitis alérgica por contacto en modelos murinos. Durante el periodo de inducción se aplicaron 100 µl del control positivo en la pared abdominal del ratón. Se aplicaron 10 µl de 2,4 DNFB en la oreja izquierda y 10 µl de solución glicero-salina en la oreja derecha de cada animal, durante la etapa de reto antigénico.

Testigo negativo

Este grupo fue sometido al mismo procedimiento que el resto de los grupos estudiados, sin que se aplicaran sustancias problema.

Grupo 1 (A y B)

A estos grupos se les administró el extracto antigénico fúngico 1:20 v/v, 100 µl sobre la pared abdominal durante el periodo de inducción y 10 µl durante la etapa de reto en la oreja izquierda y 10 µl de solución glicero-salina en la oreja derecha. Al grupo 1A se le administró el extracto de *M. anisopliae var. anisopliae* (EH 479/2), mientras que al grupo 1B se le administró el de *M. anisopliae var. acridum* (EH 502/8).

Grupo 2 (C y D)

A estos grupos se les administró 100 µl de la suspensión de conidios viables a una concentración de 1×10^7 conidios/animal sobre la pared abdominal del ratón, durante el periodo de inducción y 10 µl de la suspensión de conidios a una concentración de 1×10^6 conidios/animal en la etapa de reto en la oreja izquierda y 10 µl de solución salina en la oreja derecha. Al grupo 2C se le administró la suspensión de conidios de *M. anisopliae var. anisopliae* (EH 479/2), mientras que al grupo 2D se administró la de *M. anisopliae var. acridum* (EH 502/8).

Una vez agrupados los animales, se permitió su aclimatación durante una semana para detectar cualquier animal enfermo o que presentara orejas lastimadas o con apariencia eritematosa o edematizada.

Examen clínico.

Se realizó un examen clínico a todos los animales al recibirlos y durante los periodos de inducción y reto antigénico para detectar si se registraban cambios en la piel, el pelaje, tegumentos y del comportamiento, así como también para detectar indicios de afectación al sistema nervioso (temblores ó convulsiones), enfermedad ó muerte.

Mediciones de peso y grosor de orejas.

Se anotó en unas hojas de recolección de datos especiales (ver hoja de registro en el anexo) el peso y el grosor de los animales al inicio del estudio, antes del reto antigénico y a las 24 y 48 horas tras el reto antigénico. Se utilizó una balanza digital para cuantificar el peso de los ratones. Se hicieron registros describiendo cualquier dato de irritación dérmica durante la sensibilización, desarrollo de toxicidad sistémica y muerte de animales antes de finalizar el estudio. Para la medición del grosor de las orejas se usó un micrómetro Mitutoyo calibrado con una lectura al mínimo especificado de 0.254 mm. La persona que midió el grosor de las orejas, era ciego al grupo que pertenecían los animales. Para minimizar el error en la lectura del micrómetro se permitió su estabilización térmica antes de utilizarlo. Las mediciones se llevaban a cabo teniendo al animal y al medidor en una misma posición para evitar errores de lectura por posicionamiento (Figura 7).



Figura 7. Medición del grosor de las orejas

Por último, la lectura del grosor de las orejas se llevó a cabo tres veces y se anotó el promedio como resultado final.

Diseño de la prueba del edema en la oreja del ratón (MEST).

El experimento se dividió en dos partes. Cada parte tuvo una duración de 20 días, con un periodo de cuarentena de 7 días, aplicando el inóculo respectivo durante cuatro días consecutivos (días 0, 1, 2 y 3), un reto antigénico (día 10) y necropsia (día 12). En la primera parte del experimento, las sustancias problema a probar fueron los extractos antigénicos fúngicos de cada hongo. En la segunda parte las sustancias problema a probar fueron las suspensiones de conidios. En ambos casos los ratones se utilizaron como sus propios controles y adicionalmente se utilizaron dos grupos testigo (positivo y negativo) para cada hongo tanto para la suspensión de conidios como para el extracto antigénico fúngico. El estudio se realizó por duplicado para cada hongo y sustancia problema (suspensión de conidios y extracto antigénico). El diseño general del MEST se representa en la Figura 8.

Prueba del edema en la oreja del ratón (MEST).

Periodo de Inducción

Se anestesió a los ratones por vía peritoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 1.0 ml/2.5 Kg., utilizando jeringas para insulina de 0.5 ml libres de látex (BD Ultra-Fine III 31 G x 8mm).

Tres días antes de comenzar la prueba (Día -3) se removió completamente el pelo de la región abdominal con crema de Bariflor para evitar la irritación de la piel ocasionada por dicho procedimiento y eliminar el posible sesgo.

Cada día, durante el periodo de inducción y antes de aplicar las sustancias de prueba, se rasuró la piel del abdomen del ratón con una navaja de afeitar para eliminar la capa superficial de la epidermis (estrato córneo).

En el día 0 se inyectaron intradérmicamente 0.05 ml de adyuvante completo de Freund con jeringas de insulina de 1.0 mL (BD Ultra-Fine 29 G x 13 mm) en dos regiones separadas del vientre del ratón flanqueando la línea media ventral. Este procedimiento se llevó a cabo en los grupos de prueba y los testigos.

Posteriormente se procedió a la administración tópica abdominal de las distintas sustancias problema con micropipeta.

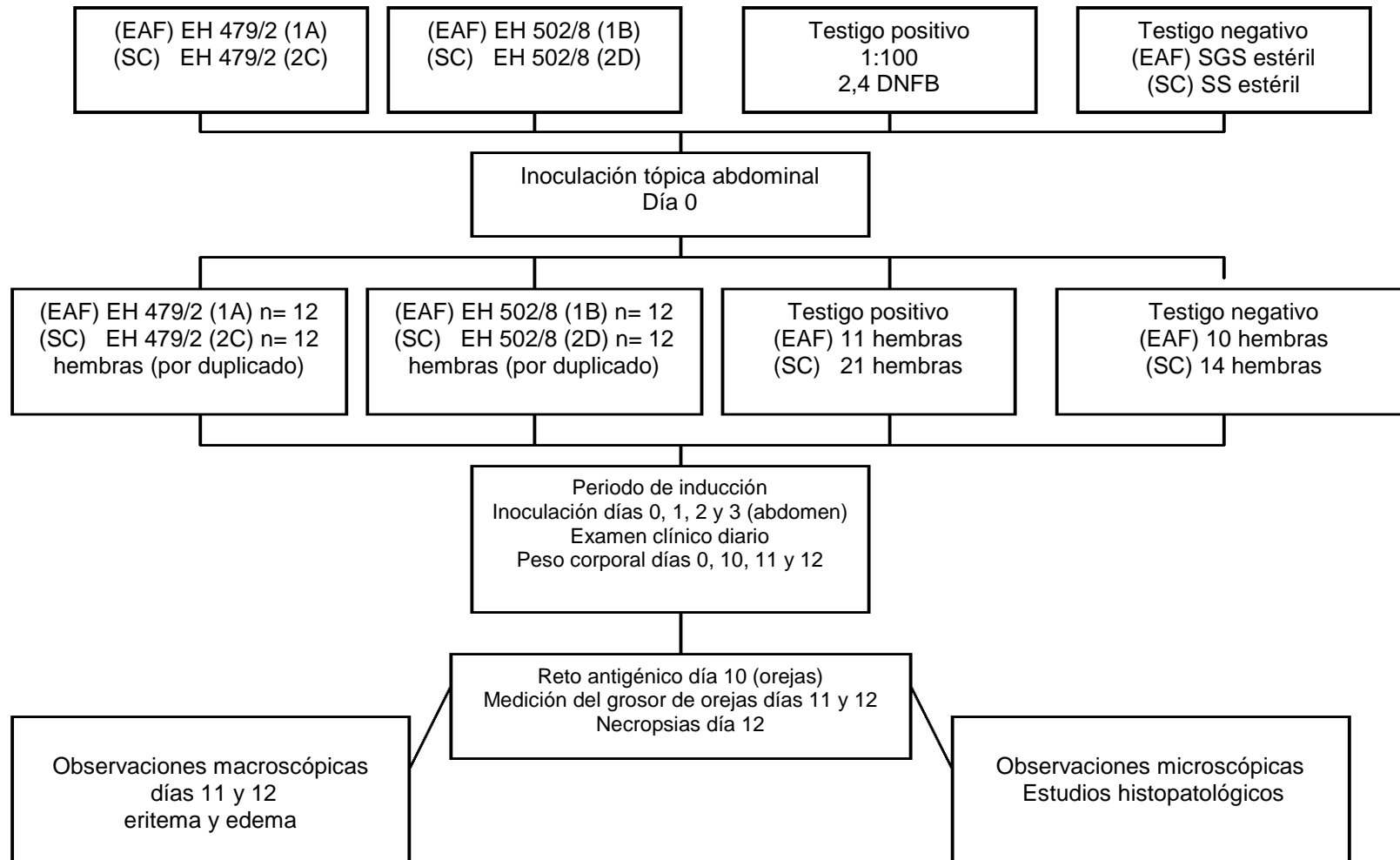


Figura 8. Diseño general del MEST. *M. anisopliae var. acridum* EH-502/8 y *M. anisopliae var. anisopliae* EH-479/2. EAF: extracto antigénico fúngico. SC: suspensión de conidios. SGS: solución glicero salina. SS: solución salina. 1A y 1B: grupos de la primera parte del estudio. 2C y 2D: grupos de la segunda parte del estudio.

En la primera parte del estudio a los grupos 1A y 1B se aplicaron los extractos antigénicos fúngicos y en la segunda parte del estudio a los grupos 2C y 2D se les aplicaron las suspensiones de conidios. A los testigos negativos no se les aplicó nada y a los testigos positivos se les aplicó 100 μL de 2,4 DNFB 1:100 en solución glicero-salina a los testigos positivos. Antes de regresar el ratón a su contenedor se esperó a que la sustancia de prueba o control aplicada a la pared abdominal seca por completo. El periodo de inducción se realizó durante cuatro días consecutivos.

Reto antigénico

Para evitar falsos positivos se midió nuevamente el peso y el grosor de las orejas el día 10 del protocolo, antes de aplicar el reto antigénico para detectar variaciones en el grosor de las orejas debidas al azar que pudieran ocurrir de manera natural entre los grupos problema y los testigos. Una vez hecha la medición, a los grupos 1A y 1B se les aplicaron 10 μL del extracto antigénico fúngico correspondiente en la oreja izquierda y 10 μL de la solución vehículo en la oreja derecha. Por otra parte, a los grupos 2C y 2D se les aplicaron 10 μL de las suspensiones de conidios correspondientes en la oreja izquierda y 10 μL de la solución vehículo en la oreja derecha. En ambos casos a los testigos negativos no se les aplicó ninguna solución en ambas orejas y a los testigos positivos se les aplicaron 10 μL de 2,4 DNFB 1:100 en la oreja izquierda y 10 μL de la solución glicero-salina en la oreja derecha. A las 24 y 48 horas posteriores al reto antigénico, los ratones se anestesiaron ligeramente para medir el grosor

de ambas orejas y registrar los datos. Los datos de peso y grosor de orejas se analizaron con la prueba de Tukey.

Necropsias.

Los ratones fueron sacrificados el día 12 mediante dislocación cervical en condiciones asépticas, se tomaron al azar tres ratones de cada grupo, se diseccionaron las orejas completas suspendiéndolas en solución de formalin al 10%, las muestras se enviaron para su estudio con el Dr. Armando Pérez Torres al Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Estudios histopatológicos.

Se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina (H-E) por ser particularmente útil para la identificación de infiltrado mononuclear en las orejas de los ratones estudiados (Stevens et *al.*, 1993). La lectura de las laminillas y su interpretación la realizó el Dr. Armando Pérez Torres quien desconocía a que grupo pertenecían.

RESULTADOS

Características Macroscópicas.

En el anverso del medio de cultivo los hongos presentaron colonias ilimitadas, secas, de aspecto polvoso. *M. anisopliae* var. *anisopliae* mostró un color verde amarillento mientras que *M. anisopliae* var. *acridum* verde olivo. En el reverso, no se apreciaron pigmentos difusibles en el medio ADS. Ambos hongos mostraron un crecimiento rápido a temperatura ambiente (Figuras 9 y 10).



Figura 9. EH 479/2 *M. anisopliae* var. *anisopliae*



Figura 10. EH 502/8 *M. anisopliae* var. *acridum*

Características Microscópicas.

Metarhizium sp. presenta micelio macrosifonado, septado, hialino, de donde nacen conidióforos eréctiles septados y dicotómicos que a su vez producen grupos de dos a tres esterigmas que generan fialoconidios ovoides de 3.5 a 9 μm (microconidios).

M. anisopliae var. *anisopliae* presenta conidios cilíndricos de aproximadamente 5 x 7 μm agrupados en columnas que nacen de las fiálides que conforman los

conidióforos provenientes de un micelio hialino, septado y macrosifonado (Figura 11).

Por su parte *M. anisopliae* var. *acidum* presenta esporodoquios con fiálides en forma de clava con conidios mononucleares, elipsoidales de aproximadamente 8 x 4 μm (Figura 12).

Las colonias sembradas en botellas de Roux con medio APD se utilizaron para la obtención de la suspensión de conidios viables, ya que este medio al ser pobre en nutrientes estimula la conidiogénesis lo que permite obtener suspensiones con una alta concentración de conidios. Para los dos hongos estudiados se obtuvieron suspensiones de 1×10^8 conidios mL, a los cuales se les determinó su viabilidad mediante el método de tubo germinal siendo ésta superior al 98%.

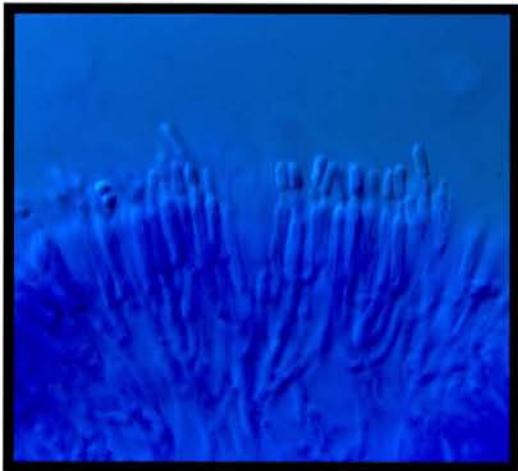


Figura 11. Micromorfología de EH 479/2 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

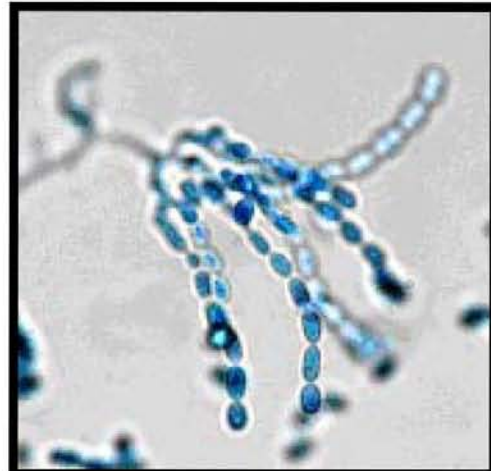


Figura 12. Micromorfología de EH 502/8 *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*

Se determinó la cantidad de proteínas totales y el pH de ambos EAF. El extracto antigénico fúngico de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (EH 479/2) tuvo una concentración de 26.5 $\mu\text{g/mL}$ y un pH de 6.90. *M. anisopliae* var. *acidum*

(EH502/8) tuvo una concentración de 34.5 µg/mL proteínas totales y un pH de 7.01.

Estandarización de la anestesia en los animales.

Debido a que el estudio necesitaba de la inmovilización completa de los animales por un periodo de tiempo por arriba de los 20 min se hizo uso del pentobarbital sódico que es un anestésico con propiedades hipnótico-sedantes de uso parenteral con una duración promedio de la anestesia general de 20 a 30 min. La desventaja de este anestésico es que tiene una ventana terapéutica muy estrecha y puede ocasionar muerte por paro cardiorrespiratorio. Para reducir este riesgo se hizo un estudio preliminar y se determinó que la dosis ideal para lograr la sedación adecuada en tiempo y relajación era de 8 µL por cada 20 g de peso (5.04×10^{-3} g de pentobarbital sódico). Previo a la anestesia cada ratón fué pesado para ajustar la dosis del anestésico en función de su peso corporal. Se registró la muerte de varios ratones a lo largo del estudio, todas atribuidas a paro cardiorrespiratorio debido a que los animales no se recuperaron de la anestesia (Tablas 4 y 5).

Grupo	N Día 0	N Día 12
EH 479/2 (Grupo 1 A)	24	20
EH 502/8 (Grupo 1 B)	24	19
Testigo Negativo	10	7
Testigo Positivo	11	8
Total	69	54

Tabla 4. Numero de ratones que concluyeron la primera parte del estudio con extractos antigénicos fúngicos.

Grupo	N Día 0	N Día 12
EH 479/2 (Grupo 2 C)	24	23
EH 502/8 (Grupo 2 D)	23	22
Testigo Negativo	14	11
Testigo Positivo	21	16
Total	82	72

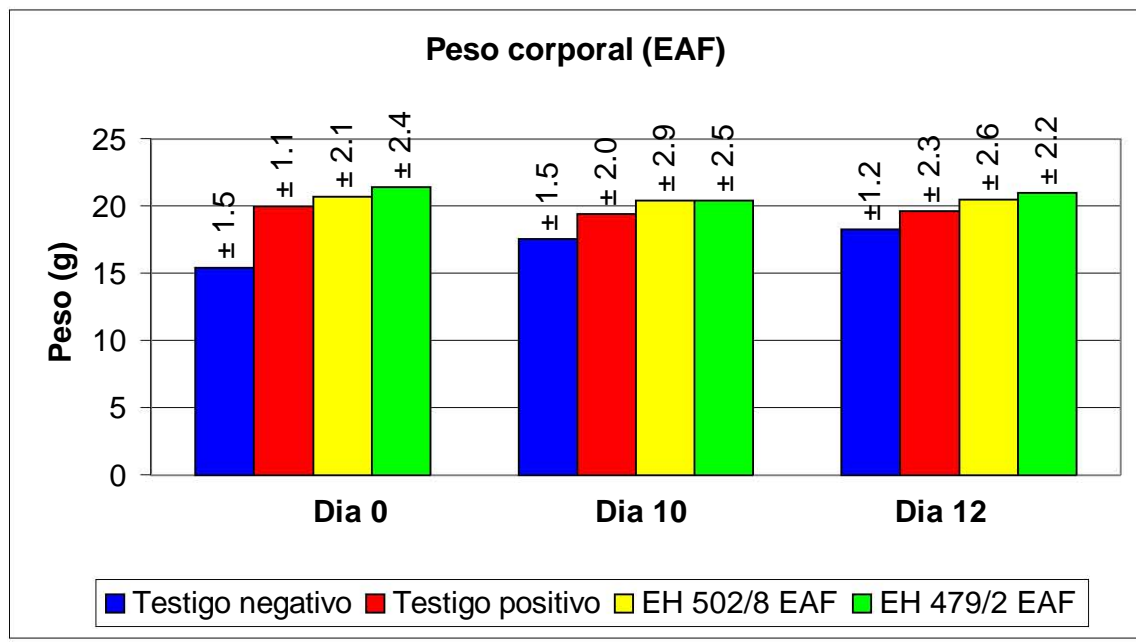
Tabla 5. Número de ratones que concluyeron la segunda parte del estudio con suspensiones de conidios.

Peso de los Animales.

Durante la primera parte del estudio, utilizando a los extractos antigénicos fúngicos como sustancias problemas, la media del peso corporal de los ratones al inicio del estudio varió de $15.45 \text{ g} \pm 1.52$ de los testigos negativos a $21.43 \text{ g} \pm 2.4$ del grupo EH 479/2. Para el día 12 del estudio la media del peso de los testigos negativos fué de $18.31 \text{ g} \pm 1.2$. La media del peso del grupo EH 479/2 fué de $20.97 \text{ g} \pm 2.2$. Estos resultados se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias ó prueba de Tukey. Se determinó que al inicio del estudio el peso de los testigos negativos tenía una diferencia significativa con respecto al peso de los demás grupos ($\alpha = 0.05$). Sin embargo, para el día del reto antigénico y al finalizar el estudio no hubo diferencia significativa entre el peso de los grupos ($\alpha = 0.05$) (Figura 13).

En la segunda parte del experimento, utilizando las suspensiones de conidios como sustancias problema, la media del peso corporal al inicio del estudio estuvo entre $15.53 \text{ g} \pm 1.2$ del grupo de testigos negativos hasta $23.20 \text{ g} \pm 2.3$ de los testigos positivos. Al final del estudio la media del peso fué de $16.77 \text{ g} \pm 1.0$ de los testigos negativos y $24.61 \text{ g} \pm 1.4$ de los testigos positivos. Al llevar a cabo el análisis estadístico con análisis de varianza y con la prueba de Tukey se apreció

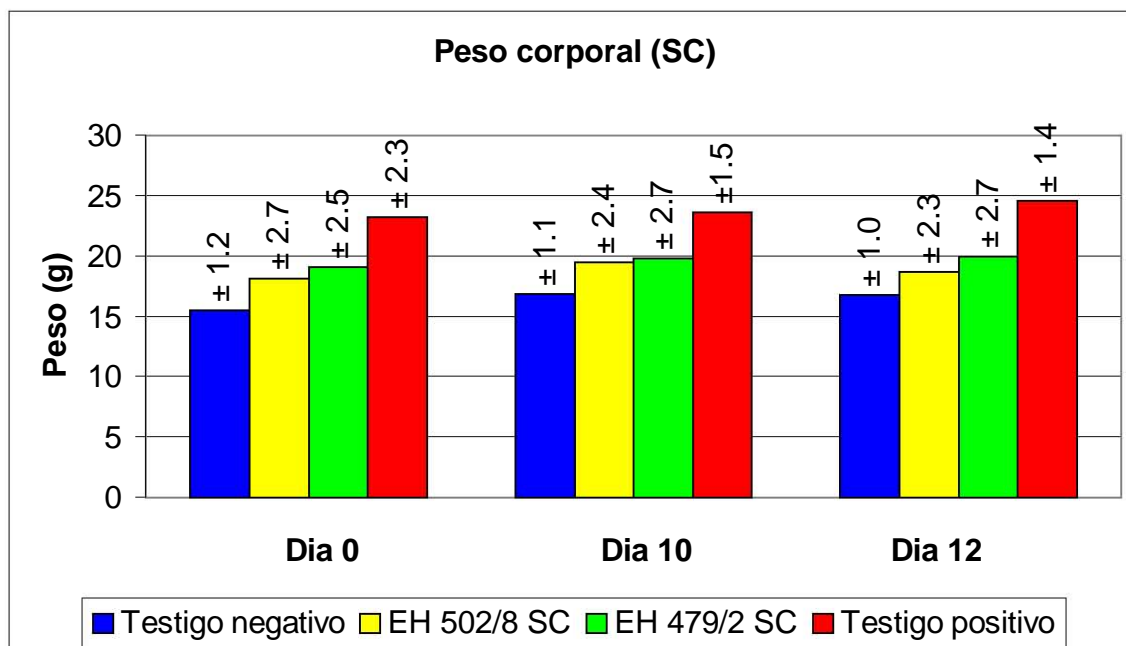
que existía una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre el peso de los testigos positivo y negativo con respecto al peso de los grupos problema. Esta diferencia no dejó de ser significativa sino hasta el último día del estudio y únicamente al comparar el grupo de testigos negativos con el grupo de *M. anisopliae* var. *acidum* (EH 502/8) y entre ambos grupos problema. El peso de los testigos positivos fué mayor que el de los demás grupos a lo largo del estudio ($\alpha = 0.05$) (Figura 14).



Grupo	Día 0 Peso (gramos) Media ± DS	Día 10 Peso (gramos) Media ± DS	Día 12 Peso (gramos) Media ± DS
Testigo negativo	15.45 a* ± 1.52	17.58 a* ± 1.55	18.31 a* ± 1.2
Testigo positivo	19.97 b* ± 1.13	19.43 a* ± 2.05	19.61 a* ± 2.3
EH 502/8 EAF	20.71 b* ± 2.11	20.42 a* ± 2.92	20.51 a* ± 2.6
EH 479/2 EAF	21.43 b* ± 2.4	20.44 a* ± 2.55	20.97 a* ± 2.2

Figura 13. Peso corporal por grupo de animales en los días 0, 10 y 12. Testigo negativo: solución glicero-salina, testigo positivo: 2,4 dinitrofluorobenceno, EH 479/2 EAF: extracto antigénico fúngico de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, EH 502/8 EAF: extracto antigénico fúngico de *M. anisopliae* var. *acidum*.

ANOVA * Comparación múltiple de medias (Tukey) ($\alpha = 0.05$). Entre los grupos con letras iguales no existe diferencia significativa.



Grupo	Día 0 Peso (gramos) Media ± DS	Día 10 Peso (gramos) Media ± DS	Día 12 Peso (gramos) Media ± DS
Testigo negativo	15.53 a* ± 1.2	16.9 a* ± 1.13	16.77 a* ± 1.0
EH 502/8 SC	18.15 b* ± 2.7	19.49 b* ± 2.4	18.72 a,b* ± 2.3
EH 479/2 SC	19.1 b* ± 2.5	19.85 b* ± 2.7	20 b* ± 2.7
Testigo positivo	23.2 c* ± 2.3	23.64 c* ± 1.5	24.61 c* ± 1.4

Figura 14. Peso corporal por grupo de animales los días 0,10 y 12 del estudio. Testigo negativo: solución salina 0.9%, testigo positivo: 2,4 dinitrofluorobenceno, EH 479/2 SC: suspensión de conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, EH 502/8 SC: suspensión de conidios de *M. anisopliae* var. *acridum*.

ANOVA, * Comparación múltiple de medias (Tukey) ($\alpha = 0.05$). Entre los grupos con letras iguales no existe diferencia significativa.

Hallazgos clínicos.

Se recibieron ratones sanos que al cabo de un periodo de cuarentena de siete días no manifestaron la presencia de parásitos externos, cambios en la apariencia de los ojos y orejas. Debido a que los animales fueron sometidos varias veces a anestesia general con pentobarbital se vigiló la aparición de cambios en el comportamiento, temblores o convulsiones en los ratones. En un estudio

preliminar, los ratones mostraron una tendencia mayor a la agresividad entre sí, por lo que se procuró que tuvieran espacio, agua y alimento suficiente y se determinó que se mantuvieran en contenedores de policarbonato en un número máximo de 5 ratones por contenedor con lo que se evitó que los animales se agredieran entre sí y se lastimaran las orejas. No se observó la presencia de temblores, convulsiones ó algún otro signo o síntoma de enfermedad en los animales a lo largo del estudio con los extractos y con las suspensiones de conidios.

Alteraciones en la piel y orejas.

Tras la depilación con crema de bariflor no se apreció el desarrollo de irritación dérmica manifestada como eritema en la piel abdominal de los ratones en ninguno de los grupos. Al final del periodo de inducción, todos los ratones de los grupos de testigos positivos presentaron huellas de rascado con descamación gruesa en la pared abdominal (Figura 15). Los ratones de los otros grupos no presentaron alteraciones en la apariencia de la piel abdominal, éstos resultados se observaron en ambas partes del estudio.



Figura 15. Huellas de rascado y descamación gruesa en los Testigos positivos al último día del periodo de inducción.

Durante la primera fase del estudio, 24 h después del reto antigénico cuatro de ocho ratones del grupo de testigo positivo desarrollaron eritema en la oreja izquierda. A las 48 h todos los ratones del grupo testigo positivo presentaron además del eritema, aumento de la vascularidad y edema en la oreja izquierda, mientras que la oreja derecha no presentaba cambios notorios en su apariencia (Figura 16). En el resto de los grupos de estudio no se observaron alteraciones aparentes en la piel abdominal ni en las orejas tras el reto antigénico: Testigo negativo (Figura 17), *M. anisopliae* var. *anisopliae* (EH 479/2) con EAF (Figura 18), *M. anisopliae* var. *acridum* (EH 502/8) con EAF (Figura 19).

En la segunda parte del estudio en las que se usaron las suspensiones de conidios como sustancias problemas (grupos 2C y 2D), no se apreciaron alteraciones aparentes en las orejas de los ratones sino hasta las 48 h tras el reto antigénico y únicamente se registró eritema y edema en la oreja izquierda de los ratones del grupo de testigo positivo de manera muy similar a lo observado en la primera parte del estudio.

Grosor de las orejas.

En la primera parte del estudio la medición basal del grosor de las orejas derechas (OD) de los ratones fue de 2.61 mm \pm 0.31 y el grosor de las orejas izquierdas (OI) fue de 2.71 \pm 0.30 (Testigo negativo: OD 2.08 mm \pm 0.39, OI 2.28 \pm 0.31; Testigo positivo: OD 2.72 mm \pm 0.25, OI 2.90 mm \pm 0.34; EH 502/8 *M. anisopliae* var. *acridum* OD 2.92 mm \pm 0.28, OI 2.86 mm \pm 0.28; EH 479/2 *M. anisopliae* var. *anisopliae* OD 2.71 \pm 0.32, OI 2.80 \pm 0.28) (Tabla 7).



Figura 16. Testigo positivo al final del estudio.



Figura 17. Testigo negativo al final del estudio.



Figura 18. Grupo 1A al final del estudio

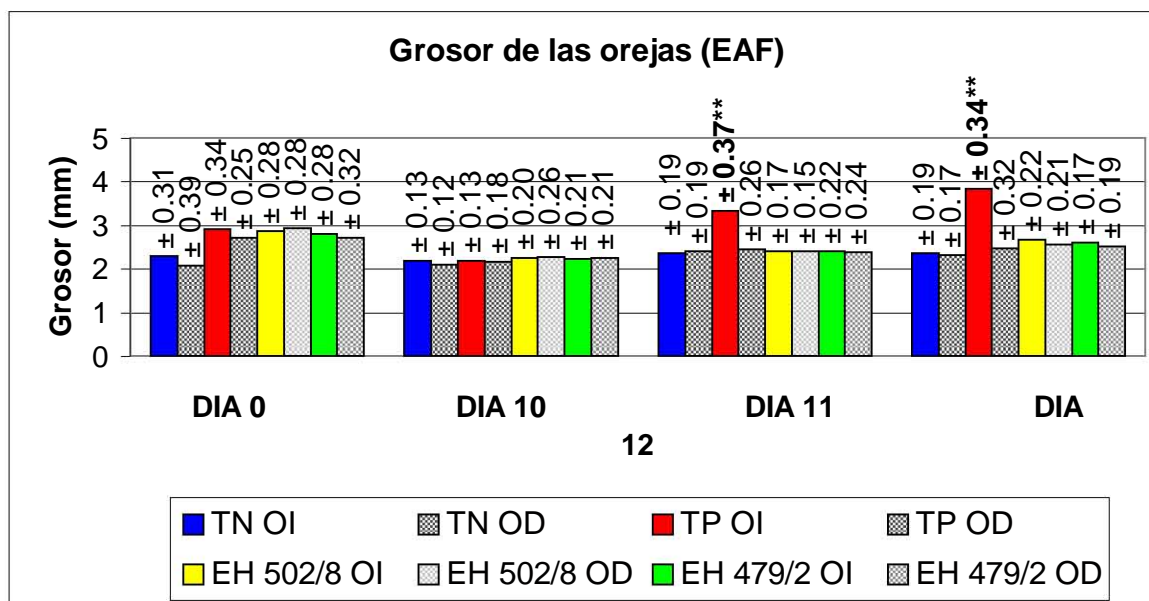


Figura 19. Grupo 1B al final del estudio.

En el día 10, antes del reto antigénico se midió el grosor de las orejas obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 20. En este día el grosor de las orejas varió de $2.1 \text{ mm} \pm 0.12$ a $2.26 \text{ mm} \pm 0.26$, sin diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p > 0.01$).

Veinticuatro horas posteriores al reto con los extractos antigénicos fúngicos los resultados del grosor de las orejas se muestran en la Figura 20, donde se puede observar que el grosor de la oreja izquierda del testigo positivo es el único dato con diferencia significativa ($p < 0.01$) entre todos los grupos.

Por último, a las 48 h posteriores al reto antigénico se observó lo mismo que en el día anterior donde solamente existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en el grosor de la oreja izquierda del testigo positivo con 2,4 DNFB (Figura 20).



Grupo	Día 0 Grosor (mm) Media ± DS	Día 10 Grosor (mm) Media ± DS	Día 11 Grosor (mm) Media ± DS	Día 12 Grosor (mm) Media ± DS
TN OI	2.28 a* ± 0.31	2.17 a* ± 0.13	2.35 a* ± 0.19	2.35 a* ± 0.19
TN OD	2.08 a* ± 0.39	2.1 a* ± 0.12	2.39 a* ± 0.19	2.32 a* ± 0.17
TP OI	2.9 b* ± 0.34	2.19 a* ± 0.13	3.33 b* ± 0.37**	3.84 b* ± 0.34**
TP OD	2.72 b* ± 0.25	2.15 a* ± 0.18	2.45 a* ± 0.26	2.47 a* ± 0.32
EH 502/8 OI EAF	2.86 b* ± 0.28	2.24 a* ± 0.20	2.4 a* ± 0.17	2.66 a* ± 0.22
EH 502/8 OD EAF	2.92 b* ± 0.28	2.26 a* ± 0.26	2.41 a* ± 0.15	2.55 a* ± 0.21
EH 479/2 OI EAF	2.8 b* ± 0.28	2.23 a* ± 0.21	2.4 a* ± 0.22	2.59 a* ± 0.17
EH 479/2 OD EAF	2.71 b* ± 0.32	2.25 a* ± 0.21	2.37 a* ± 0.24	2.52 a* ± 0.19

Figura 20. Grosor de las orejas días 0, 10, 11 y 12 del estudio. EAF: extracto antigénico fúngico, TN= testigo negativo, TP= testigo positivo, OI= oreja izquierda, OD= oreja derecha, EH 502/8= *M. anisopliae* var. *acridum*, EH 479/2= *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

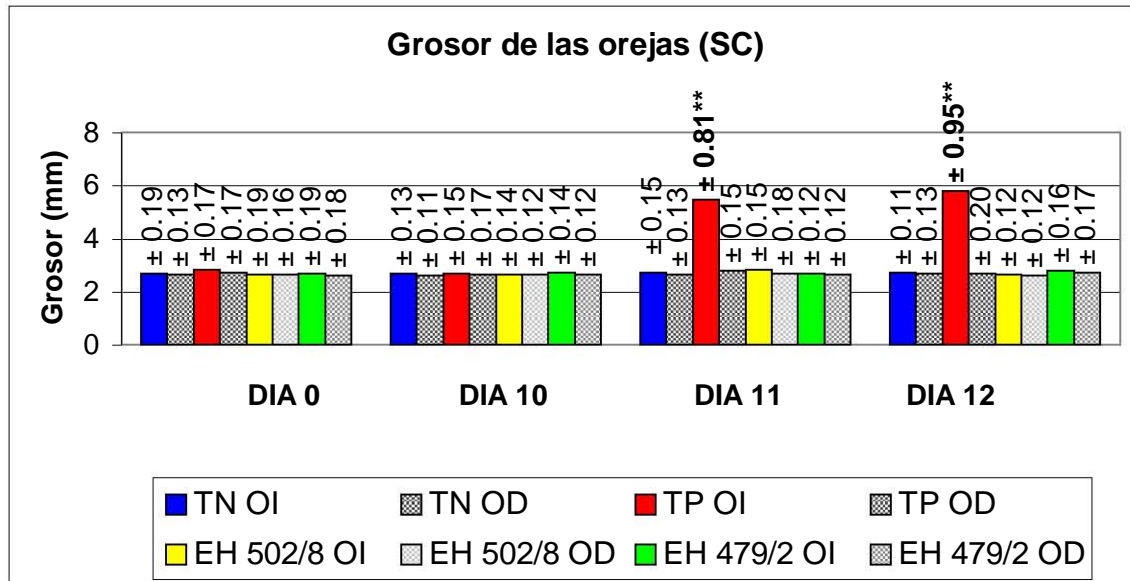
ANOVA, * Comparación múltiple de medias (Tukey) ($\alpha = 0.05$). Entre los grupos con letras iguales no existe diferencia significativa.

Para la segunda parte del estudio la medición basal del grosor de las orejas derechas (OD) de los ratones fué de $2.66 \text{ mm} \pm 0.16$ y el grosor de las orejas izquierdas (OI) fué de 2.71 ± 0.18 (Testigo negativo: OD $2.64 \text{ mm} \pm 0.13$, OI 2.68 ± 0.19 ; Testigo positivo: OD $2.73 \text{ mm} \pm 0.17$, OI $2.84 \text{ mm} \pm 0.17$; EH 502/8 *M. anisopliae* var. *acridum* OD $2.65 \text{ mm} \pm 0.16$, OI $2.63 \text{ mm} \pm 0.19$; EH 479/2 *M. anisopliae* var. *anisopliae* OD 2.60 ± 0.18 , OI 2.69 ± 0.19).

En el día 10, antes del reto antigénico se midió el grosor de las orejas obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 21. En este día el grosor de las orejas varió de $2.6 \text{ mm} \pm 0.11$ a $2.7 \text{ mm} \pm 0.14$, sin diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p > 0.01$).

Veinticuatro horas posteriores al reto antigénico con las suspensiones de conidios se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 21, donde se puede observar que el grosor de la oreja izquierda del testigo positivo es el único dato con diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.01$).

Por último, en el día 12 se observó que solamente existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en el grosor de la oreja izquierda del testigo positivo con 2,4 DNFB. La descripción gráfica de estos datos se muestra en la Figura 21.



Grupo	Día 0	Día 10	Día 11	Día 12
	Grosor (mm)	Grosor (mm)	Grosor (mm)	Grosor (mm)
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
TN OI	2.68 a* ± 0.19	2.68 a* ± 0.13	2.73 a* ± 0.15	2.72 a* ± 0.11
TN OD	2.64 a* ± 0.13	2.6 a* ± 0.11	2.66 a* ± 0.13	2.67 a* ± 0.13
TP OI	2.84 a* ± 0.17	2.67 a* ± 0.15	5.48 b* ± 0.81**	5.8 b* ± 0.95**
TP OD	2.73 a* ± 0.17	2.64 a* ± 0.17	2.8 a* ± 0.15	2.69 a* ± 0.20
EH 502/8 OI	2.63 a* ± 0.19	2.66 a* ± 0.14	2.82 a* ± 0.15	2.66 a* ± 0.12
EH 502/8 OD	2.65 a* ± 0.16	2.64 a* ± 0.12	2.69 a* ± 0.18	2.62 a* ± 0.12
EH 479/2 OI	2.69 a* ± 0.19	2.7 a* ± 0.14	2.69 a* ± 0.12	2.78 a* ± 0.16
EH 479/2 OD	2.6 a* ± 0.18	2.66 a* ± 0.12	2.63 a* ± 0.12	2.73 a* ± 0.17

Figura 21. Grosor de las orejas días 0, 10, 11 y 12. SC= Suspensión de conidios
 TN= testigo negativo, TP= testigo positivo, OI= oreja izquierda, OD= oreja derecha, EH 502/8= *M. anisopliae* var. *acridum*, EH 479/2= *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

ANOVA, * Comparación múltiple de medias (Tukey) ($\alpha = 0.05$). Entre las letras iguales no existe diferencia estadísticamente significativa.

Histopatología.

Una vez terminado el estudio se sacrificaron todos los animales en condiciones asépticas mediante dislocación cervical. En ambas partes del estudio se eligieron al azar tres ratones de cada grupo para diseccionar ambas orejas y analizar la histología de los tejidos.

En la primera parte del trabajo utilizando los extractos antigénicos, los estudios histopatológicos de las orejas izquierdas de los testigos positivos revelaron la presencia de un infiltrado mononuclear de manera consistente (Figura 22) mientras que las laminillas de los cortes de las orejas derechas mostraron un aspecto histológicamente normal. El grupo de testigos negativos no mostró alteraciones en sus estudios histológicos (Figura 23).

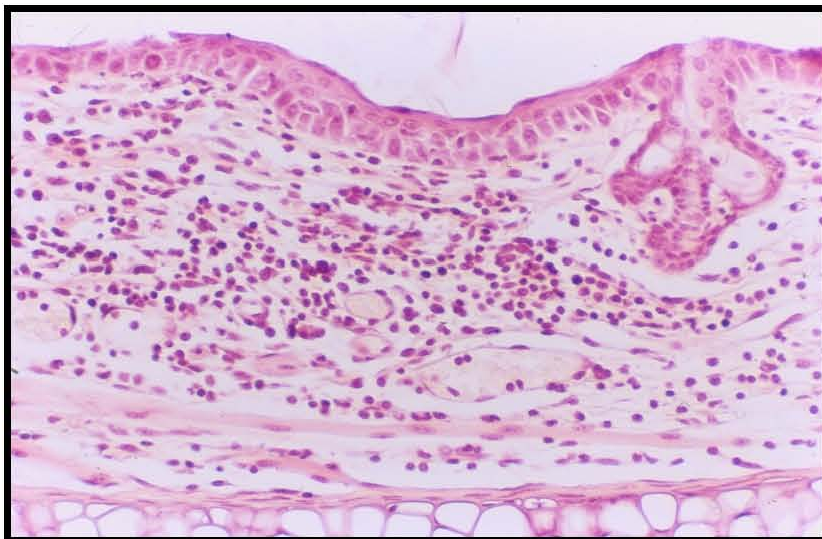


Figura 22. Corte histopatológico de la oreja izquierda del ratón R4 de los testigos positivos con infiltrado mononuclear, congestión vascular y algunos fibroblastos.

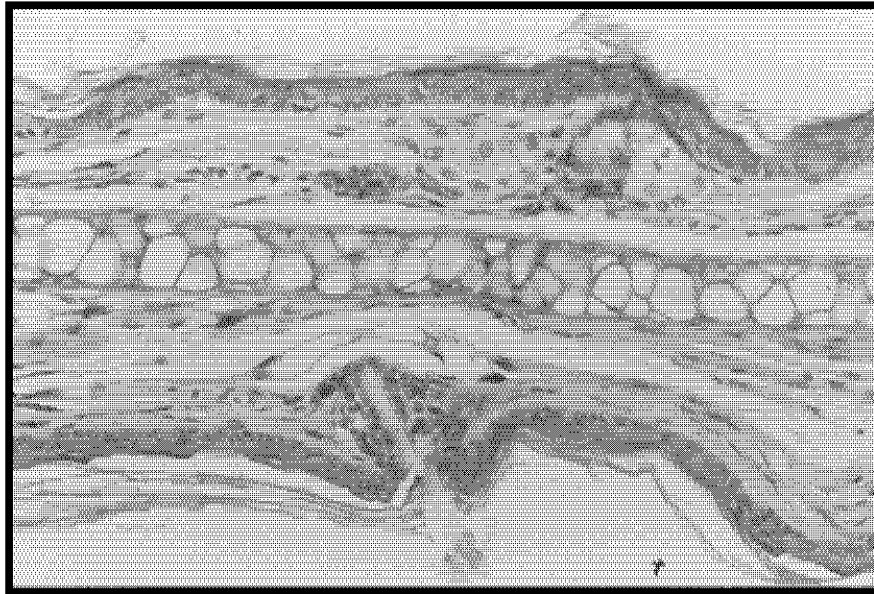


Figura 23. Corte de la oreja izquierda del ratón R2 de los testigos negativos con aspecto histológico normal

En el grupo 1A se aprecia daño con exfoliación epidérmica, adelgazamiento epidérmico, engrosamiento dérmico, separación dérmica del cartílago y algunos focos de fibrosis en ambas orejas (Figura 24). En el grupo 1B en uno de los tres ratones que fueron seleccionados para el estudio histopatológico reveló la presencia de infiltrado mononuclear en ambas orejas (Figura 25). En otro de los animales se apreció la presencia de exfoliación epidérmica con focos de fibrosis en la oreja derecha mientras que en el resto de los estudios histopatológicos el reporte fué normal. En la Tabla 8 se aprecian estos resultados.

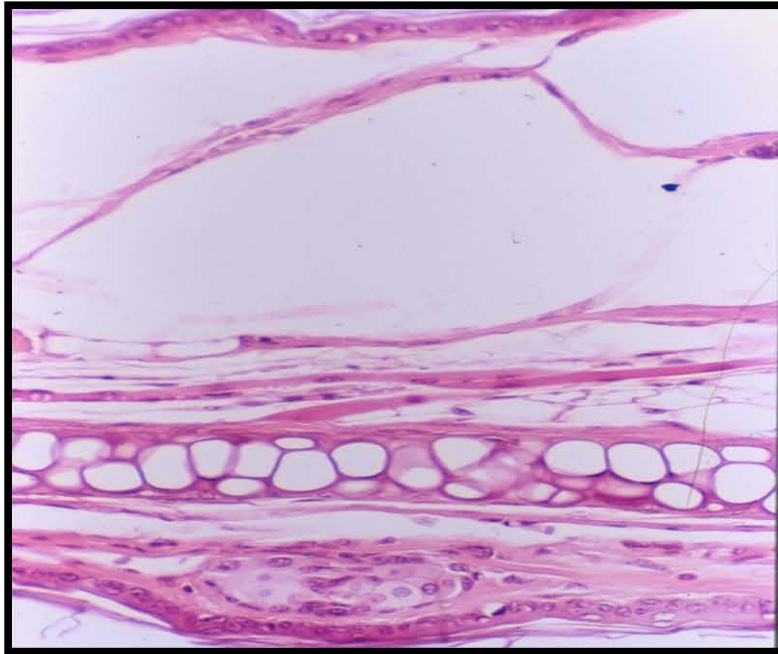


Figura 24 . Aspecto histopatológico de la oreja derecha del ratón R8 del grupo 1A en donde se aprecia daño y exfoliación epidérmica con separación dérmica del cartílago.



Figura 25. Aspecto histológico de la oreja izquierda del ratón R10 del grupo 1B con presencia de infiltrado mononuclear y exfoliación epidérmica.

Clave ratón	Grupo	Peso g	Oreja izquierda Grosor mm	Histopatología	Oreja derecha Grosor mm	Histopatología
R1	TN	16.3	2.032	Normal	2.032	Normal
R2	TN	18.3	2.540	Normal	2.540	Normal
R3	TN	18.2	2.540	Normal	2.540	Normal
R4	TP	20.6	4.064	Infiltrado mononuclear	2.794	Normal
R5	TP	20.8	4.064	Infiltrado mononuclear	2.540	Normal
R6	TP	21.1	4.064	Infiltrado mononuclear	2.540	Normal
R7	1A (EAF)	23.1	2.540	Daño y exfoliación epidérmica	2.540	Exfoliación de epidermis, focos de fibrosis resto normal
R8	1A (EAF)	19	2.286	Adelgazamiento epidérmico	2.032	Dermis engrosada, fibrosis. Aumento de fibroblastos
R9	1A (EAF)	17.3	2.540	Separación dérmica del cartílago	2.540	Fibrosis
R10	1B (EAF)	23.6	2.794	Normal escaso infiltrado mononuclear	2.794	Infiltrado mononuclear
R12	1B (EAF)	19.3	2.540	Normal	2.286	Normal
R13	1B (EAF)	25.4	2.794	Normal	2.794	Exfoliación epidérmica, fibrosis focal, aumento de fibroblastos

Tabla 8. Resultados de estudios histopatológicos. EAF= Extracto antigénico fúngico, TN= testigo negativo, TP= testigo positivo, 1B: EH 502/8= *M. anisopliae* var. *acridum*, 1A: EH 479/2= *M. anisopliae* var. *anisopliae*

En la segunda parte del estudio en el que se usaron las suspensiones de conidios como sustancias problema, los estudios histopatológicos de las orejas izquierdas revelaron un megainfiltrado unilateral (dorsal) ó bilateral (dorsal y ventral) de células mononucleares, polimorfo nucleares, algunos eosinófilos y células

cebadas, engrosamiento epidérmico, pérdida de la epidermis con algunos fibroblastos activos (Figura 26) en tanto que en las orejas contra laterales el reporte histológico fué normal.

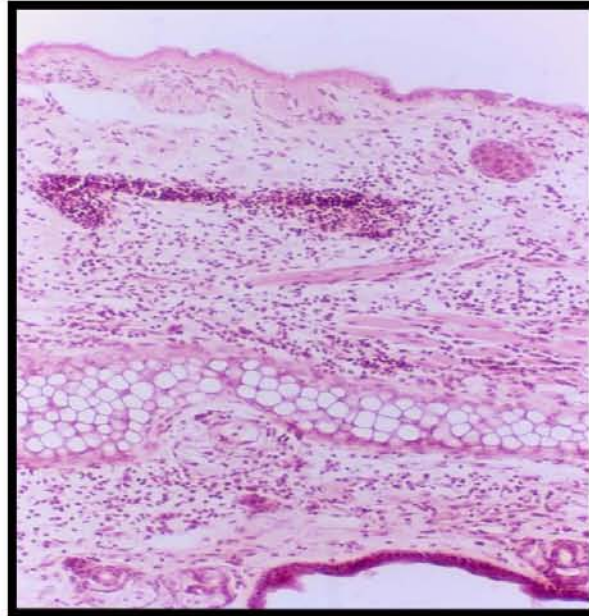


Figura 26. Aspecto histopatológico de la oreja izquierda del ratón R1 de los testigos positivos.

En los grupos de los testigos negativos (Figura 27) y 2C (Figura 28) ambas orejas presentaron un aspecto histológico normal. Sin embargo, en el grupo 2D una de las orejas izquierdas de los ratones estudiados reveló la presencia de un infiltrado mononuclear mientras que en el resto de las orejas estudiadas el reporte fue normal (Figura 29). En la tabla 9 se describen detalladamente los reportes.



Figura 27. Aspecto histológico normal de la oreja izquierda del ratón R10 del grupo de testigos negativos.

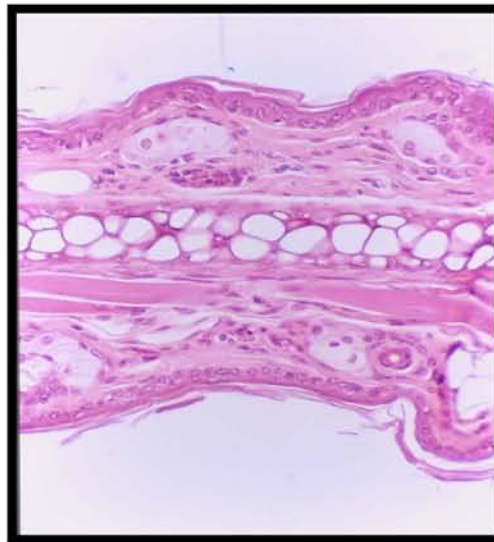


Figura 28. Aspecto histológico normal de la oreja izquierda del ratón R6 del grupo 2C.

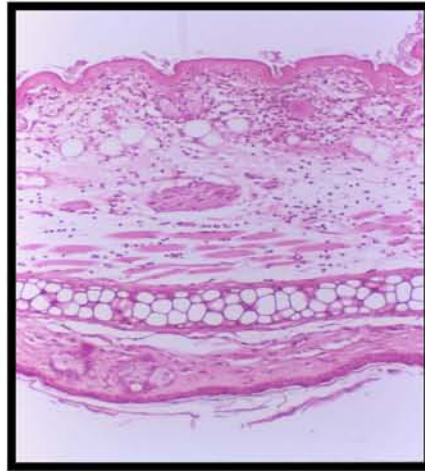


Figura 29. Aspecto histopatológico con infiltrado mononuclear y edema en la oreja izquierda del ratón R7 del grupo 2D.

Clave Ratón	Grupo	Peso g	Oreja izquierda		Oreja derecha	
			Grosor mm	Histopatología	Grosor mm	Histopatología
R1	TP	25.7	6.854	Megainfiltrado mononuclear	2.540	Normal
R2	TP	20.2	5.334	uni o bilateral con	2.794	Normal
R3	TP	22.2	6.604	mononucleares, polimorfonucleares, algunos eosinófilos y células cebadas. Engrosamiento dérmico y pérdida epidérmica.	2.794	Normal
R4	2C (SC)	23.6	2.794	Normal	2.794	Normal
R5	2C (SC)	23.4	2.540	Normal	2.794	Normal
R6	2C (SC)	21.3	2.794	Normal	2.540	Normal
R7	2D (SC)	24.9	2.794	Infiltrado mononuclear	2.540	Normal
R8	2D (SC)	16.1	2.540	Normal	2.540	Normal
R9	2D (SC)	17	2.540	Normal	2.540	Normal
R10	TN	18.8	2.794	Normal	2.540	Normal
R11	TN	17.6	2.794	Normal	2.794	Normal
R12	TN	16.8	2.794	Normal	2.794	Normal

Tabla 8. Resultados de estudios histopatológicos. SC = suspensión de conidios, TN = testigo negativo, TP = testigo positivo, 2D: EH 502/8 = *M. anisopliae* var. *acridum*, 2C: EH 479/2 = *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

En los estudios histopatológicos se lograron fotografiar distintos aspectos de la fase de desencadenamiento como la adhesión, diapédesis y migración hacia el estímulo quimiotáctico (Figura 30).

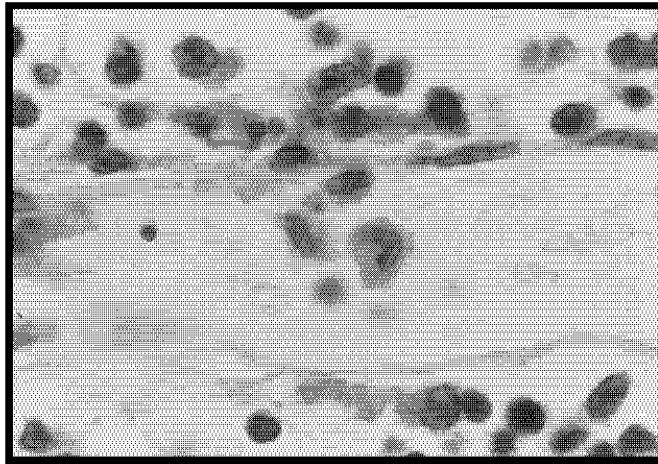


Figura 30. Adhesión, diapédesis y migración hacia el estímulo quimiotáctico.

DISCUSIÓN

Metarhizium anisopliae se utiliza desde el siglo antepasado para el control de plagas y en México se utiliza para el control de termitas, cucarachas, gallina ciega, langosta y saltamontes (Tamez et. al. 2001). Salvo los estudios realizados por Ward et. al. en 1998 y 2000 en donde se ha estudiado a *Metarhizium anisopliae* como desencadenante de respuestas de hipersensibilidad de tipo inmediato (Tipo I, mediada por IgE) en la vía aérea y pulmonar de ratones BALB/c, no existen reportes sobre la capacidad de este hongo para generar respuestas de hipersensibilidad tardía en modelos murinos.

El estudio resulta de suma importancia para completar el perfil de bioseguridad de un agente biológico para el control de plagas.

Para el diseño del protocolo nos basamos en la guía para la evaluación de la capacidad de generar sensibilización cutánea de un plaguicida hecha por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos y publicada en 1998. En la guía se considera a la dermatitis alérgica por contacto como una reacción cutánea mediada por mecanismos inmunológicos ante una sustancia específica y se utiliza como sinónimo de sensibilización cutánea (EPA OPPTS 870.2600 Skin Sensitization, 1998). Dentro de las pruebas de tamizaje para la detección de sensibilizantes cutáneos con capacidad moderada a fuerte están la prueba del nódulo linfático local (auricular) y la prueba del edema en la oreja del ratón.

Elegimos la prueba del edema en la oreja del ratón por ser un protocolo de bajo costo, corta duración, que utiliza cantidades mínimas de las sustancias de

prueba y las de control y con la capacidad de medir objetiva y cuantitativamente una respuesta de hipersensibilidad retardada, además de que si se realiza en forma apropiada tiene un bajo nivel de falsos negativos y presenta una especificidad cercana al 100% (Gad et al. 1986; Stern et al. 1989; Thorne et al. 1991), por lo que provee una base mas precisa para identificar sustancias potencialmente peligrosas para los humanos (Gad, 1994). Otra ventaja es que si se desarrolla DAC con esta prueba, la sustancia problema se puede catalogar como un sensibilizante potencial y no es necesario conducir estudios posteriores en cobayos (EPA OPPTS 870.2600 Skin Sensitization, 1998).

En este protocolo se decidió probar dos sustancias problema: conidios viables y extractos antigénicos fúngicos. Los conidios viables son el ingrediente activo de los preparados comerciales actualmente disponibles en el mercado de plaguicidas y a los que se exponen de manera directa las personas que se encargan de almacenar, distribuir y aplicar el hongo a los cultivos agrícolas sobre todo si no se tienen las medidas de seguridad pertinentes para su manipulación. La concentración de las suspensiones de conidios que se eligieron para trabajar están fundamentadas en las experiencias previas obtenidas durante el estudio de la toxicidad y patogenicidad de éste y otros hongos entomopatógenos (Mier et al. 1989, Mier et al. 1994, Toriello et al., 1986, Toriello et al. 1999a; Toriello, 2003; Toriello et al. 2005, Mier et al. 2005).

Los hongos son reconocidos como una causa importante de enfermedades alérgicas. Se ha demostrado que las proteasas en los extractos de hongos interaccionan con células epiteliales, induciendo la producción de citocinas

proinflamatorias. Los alérgenos fúngicos más estudiados pertenecen a *Alternaria alternata* (*Alt a 1*, glicoproteína de 14 Kd), *Cladosporium herbarum* (*Cla h 1*, Ag 32 de 13 Kd), *Aspergillus fumigatus* (*Asp f 1*) entre otros. También se ha demostrado que las enolasas que son enzimas necesarias para la glucólisis y la gluconeogénesis, son antígenos fúngicos muy conservados y se han obtenido a partir de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Saccharomyces cerevisiae* y de *Candida albicans*. Por lo anterior, podemos inferir que tanto las hifas como los conidios son potencialmente alérgicos debido a que cumplen con las características necesarias para ocasionar reacciones de hipersensibilidad. Son partículas relativamente complejas, con diversos componentes moleculares de los cuales solo una parte resultan antigénicos. Cuando se identifican estos componentes antigénicos específicos, usualmente son proteínas con algunas subunidades de carbohidratos y tienen un peso molecular de 10,000 a 40,000 Da y su antigenicidad está determinada por su tamaño, configuración espacial y por sus componentes. Por lo que las reacciones de hipersensibilidad fúngica pueden desencadenarse en función de los patrones de exposición a los conidios e hifas las cuales pueden estar en altas concentraciones en espacios abiertos (Ej. visitando una granja o caminando por el bosque) o durante los periodos de máximo crecimiento del hongo (Ej. Veranos y otoños húmedos y calientes). Es bien sabido que algunas ocupaciones predisponen a los trabajadores a un elevado riesgo de exposición a los hongos (Ej. granjeros, recolectores de fruta y trabajadores de molinos de papel, entre otros) con el consiguiente riesgo de desarrollar reacciones de hipersensibilidad (Neaville 2005). Por todo lo anterior,

en este estudio se decidió trabajar con extractos fúngicos obtenidos a partir de conidios y micelio y se determinó que su concentración de proteínas totales fuera superior a los 20 µg/mL como lo determinan los estándares internacionales. Sin embargo, se hizo una modificación del vehículo al utilizar solución glicero salina en lugar de solución de acetona/aceite de oliva 4:1 (v/v) (Okamura, et *al.*, 2003) ya que dicho vehículo puede causar irritación dérmica por las propiedades químicas de la acetona. Por lo mismo se determinó el pH de los extractos, siendo el de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de 6.90 y el de *M. anisopliae* var. *acridum* de 7.01, en este rango de pH no se genera irritación dérmica local.

Como lo indican las guías de la EPA se hizo un registro individualizado de los pesos de los animales a lo largo del estudio. Como puede apreciarse en las gráficas de peso a lo largo del estudio tanto en la primera como en la segunda parte se observó un incremento ponderal discreto el cual puede explicarse por dos razones: la primera por el estrés al cual se someten los animales al ser anestesiados durante cuatro días consecutivos y en segunda debido a que el tiempo del estudio es muy breve y no se alcanza a apreciar un incremento ponderal significativo.

Con respecto a las diferencias del peso observadas en ambas partes del estudio pensamos que pueden deberse al azar ya que los ratones se asignaron de manera aleatoria a cada grupo. Por otra parte, consideramos que deben tenerse medidas más estrictas desde el bioterio para asegurar una mayor homogeneidad

en el peso de los ratones, siendo el peso superior a los 20 gramos el ideal para llevar a cabo un estudio como este.

Como en cualquier protocolo que utiliza animales es muy importante asegurarse de que éstos tengan el espacio, alimento y agua suficiente para evitar conductas agresivas (aspecto de suma importancia en este estudio debido a que las orejas de los animales deben de permanecer intactas para poder llevar a cabo la lectura del edema en las mismas). Se sugiere un número máximo de cinco ratones por contenedor, la cepa debe ser singénica. Si bien es cierto que de manera tradicional se prefiere el uso de cobayos para llevar a cabo estudios de alergia, en la actualidad se sabe que existen varias cepas de ratones útiles para llevar a cabo estos estudios (Gad et al. 1986). Otros autores han establecido la utilidad de la cepa BALB/c como modelo animal para pruebas de alergia (Renz et al., 1992; Murali et al., 1993) motivo por el cual se prefirió ésta cepa (Ward et al., 1986, Gad et al. 1986, Ward et al. 2000, Sailstad et al. 2003). El sexo femenino se eligió por tender a conductas menos agresivas cuando se agrupan (Gad et al. 1994).

Los animales se observan durante al menos una semana antes de empezar el estudio para detectar cualquier signo de enfermedad y se separan del grupo aquellos que muestren falla para crecer (determinada por su peso). De igual manera no se aceptan animales con alteraciones en una o ambas orejas. Los animales se agrupan con un máximo de cinco por caja procurando un mínimo de 10 ratones para los grupos testigos y un mínimo de cinco para los grupos

problema. Las cajas deben estar perfectamente identificadas mediante rótulos ó tarjetas (Gad, 1994).

Debido a que los ratones no se marcan de manera individual, deben ser manejados de uno en uno para cada paso del procedimiento y así evitar confusiones o intercambio en los grupos de animales (Gad, 1994).

A pesar de que con la dilución 1:100 (1.0 g de 2,4 DNFB en 100 ml de solución glicero salina) se obtuvieron datos de irritación dérmica al final del periodo de inducción, se consideró esta dilución como la óptima para el testigo positivo ya que en un estudio preliminar la dilución 1:1000 (1.0 g de 2,4 DNFB en 1000 ml de solución glicero salina) no logró sensibilizar a este grupo (Gad, 1994).

La aplicación intradérmica del adyuvante completo de Freund se llevó a cabo para detectar a los sensibilizantes con capacidad leve a moderada ya que potencia la respuesta inmunitaria y sirve como depósito para las moléculas con capacidad antigénica (Gad, 1994). La remoción del estrato córneo de la epidermis es un paso muy importante para incrementar la absorción percutánea y por tanto incrementar la sensibilidad del estudio, por lo que se recomienda hacerlo previo a la colocación tópica abdominal de la sustancia de prueba durante el periodo de inducción (Gad, 1994).

Durante la primera parte del estudio y al finalizar el periodo de inducción fallecieron 15 ratones y en la segunda parte 10 ratones a causa de paro cardiorrespiratorio por una sobredosis de anestesia. Se aseguró que cada grupo problema contara con un mínimo de diez ratones y que cada testigo contara con un mínimo de 5 ratones para efectos del análisis estadístico (Gad, 1994).

Se recomienda que se utilicen para la administración de la anestesia peritoneal jeringas para insulina libres de látex de 0.5 mL (BD Ultrafine III 31 G x 8 mm) para evitar traumatizar la pared abdominal, perforar los intestinos del animal y debido a que el látex es un alérgeno por excelencia.

Debido a que nuestras variables eran de tipo cuantitativo continuo se decidió hacer un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias, con la finalidad de asegurar un análisis más preciso de los resultados y poder establecer las asociaciones pertinentes.

Los ratones de cada grupo se tomaron como sus propios controles y a su vez se compararon con los testigos positivos y los testigos negativos.

Para la primera parte del trabajo se determinó que al inicio del estudio había una diferencia significativa entre el peso y el grosor de ambas orejas del testigo negativo con respecto de los demás grupos, sin embargo, para el día 10 no había ya diferencias significativas intra e intergrupos, por lo que la variación inicial de los resultados puede atribuirse a la falta de práctica en el uso del micrómetro ya que las lecturas se llevaron a cabo desconociendo los grupos. Se observó que a las 24 y a las 48 horas posteriores al reto antigénico, aumentó el grosor de las orejas izquierdas del testigo positivo lo que clínicamente se observó como un aumento en la vascularidad, edema y eritema de esa oreja sobre todo al finalizar el estudio. La diferencia en el grosor de las orejas izquierdas de los testigos positivos fue significativa intra e intergrupos con lo que se aseguró la correcta realización del estudio. Al finalizar el trabajo se pudo

concluir que el peso del ratón no influye en el grosor de las orejas y que existe cierta asimetría intragrupo que tampoco tiene significado estadístico. En todos los casos el valor alfa fue igual a 0.05.

Utilizando las suspensiones de conidios (2ª parte), a pesar de que existen discrepancias entre los pesos de los grupos de ratones estos no influyen en el grosor de las orejas. También existe asimetría del grosor de la oreja derecha con respecto de su oreja contralateral al inicio y antes de aplicar el reto antigénico sin que exista repercusión estadística. Para el día 11 y el día 12 del estudio existe una diferencia significativa entre el grosor de la oreja izquierda con respecto de su oreja contralateral entre los testigos positivos y con respecto de los demás grupos lo que asegura la correcta realización del estudio. Al igual que en la primera parte se aprecian las características clínicas de edema, eritema y aumento de la vascularidad en las orejas izquierdas de los controles positivos. Estos resultados son consistentes con lo observado utilizando los extractos antigénicos fúngicos.

Con respecto a los estudios histopatológicos se apreciaron infiltrados monocitarios característicos de la respuesta de hipersensibilidad de tipo IV en las orejas izquierdas de los testigos positivos en ambas partes del estudio; mientras que en ambos testigos negativos no se apreciaron alteraciones histológicas.

En la primera parte del estudio los grupos 1A y 1B (EAF) presentaron alteraciones tales como exfoliación y adelgazamiento epidérmico que puede explicarse por la limpieza y el rascado que los ratones hacen a sus orejas de

manera habitual. La separación dérmica pudiera explicarse por un aplastamiento excesivo de la oreja al llevar a cabo la medición con el micrómetro, situación que no se aprecia en los grupos 2C y 2D (SC) en los cuales el resultado histológico es prácticamente normal.

Debe de notarse la presencia de infiltrado mononuclear en dos de los ratones tratados con *M. anisopliae* var. *acridum*. A partir de estos resultados proponemos que se someta a los conidios e hifas a un pretratamiento con bicarbonato de sodio al 0.275 %, para reblandecer su pared celular y facilitar la salida de antígenos fúngicos lo que permitiría una mayor penetración de éstas moléculas a nivel epi e intracutáneo, para incrementar la concentración del antígeno fúngico y así optimizar el proceso de sensibilización, aún a expensas de la viabilidad de las cepas fúngicas ya que el objetivo de nuestro trabajo es establecer la capacidad que tienen estos hongos para generar reacciones de hipersensibilidad más que el estudio de su infectividad.

Por otro lado, al hacer el análisis estadístico no se demuestra una diferencia significativa entre el grosor de la oreja izquierda con su oreja contralateral en el grupo de los ratones tratados con *M. anisopliae* var. *acridum*.

A partir de los resultados histopatológicos del grupo testigo positivo en la segunda parte del estudio donde se observan eosinófilos y mastocitos, es posible que exista la participación de linfocitos Th2 que son característicos en la respuesta tardía que se presenta en los padecimientos alérgicos de tipo crónico.

En términos generales se podría concluir que ni el EAF ni la SC de ambos hongos utilizados pueden considerarse como sensibilizantes cutáneos en el modelo murino ensayado.

CONCLUSIONES

Con el método antes descrito se demostró que ambas especies de *Metarhizium* estudiadas no tuvieron la capacidad para inducir una respuesta de dermatitis alérgica por contacto en ratones BALB/c.

A partir de los hallazgos histológicos y conforme a lo sugerido por la EPA de los Estados Unidos se propone la realización de un protocolo de sensibilización en cobayos (Ej. Prueba de maximización en cobayos [GPMT] ó test de Buehler) antes de catalogar a estos hongos entomopatógenos como no sensibilizantes cutáneos.

ANEXOS

Preparación de medios de cultivo.

Medio de saboraud (Bioxon)

Agar	15.0 g
Dextrosa	40.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Peptona de caseína	50.0 g
Agua c.b.p	1.0 litro

Medio agar papa dextrosa (APD)

Se pesaron 300 g de papa blanca natural, se pelaron y cortaron finamente, se colocaron en un recipiente con un litro de agua destilada y se calentaron hasta hervir, se filtró para desechar la papa y obtener un extracto. Se aforó a un litro con agua destilada agregándole 15 g de agar y 20 de glucosa.

Medio líquido de papa zanahoria dextrosa (PZD)

Se pesaron 20 g de zanahoria y 20 g de papa blanca natural, se pelaron y cortaron finamente, se colocaron en un recipiente con un litro de agua destilada y se calentaron hasta hervir, se filtró para desechar la papa y la zanahoria y obtener un extracto. Se aforó a un litro con agua destilada agregándole 20 de dextrosa.

Soluciones.

Solución de Evans (Amortiguadora de Fosfatos) pH = 7.0 +/- 0.2

Cloruro de sodio (NaCl)		5.0 g
Ácido Fénico (C ₆ H ₆ O)		4.0 g
Fosfato de sodio dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O)		1.4 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)		0.3 g
Agua inyectable	c.b.p.	1000 mL

Disolver todos los componentes de la fórmula en un matraz Erlenmeyer, determinar pH, aforar a un litro y filtrar con membrana Millipore de 0.20 µm.

Solución de Coca débil (Salino fenolada pH = 7.2)

Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Ácido fénico (C ₆ H ₆ O)	4.0 g

Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)		2.7 g
Agua inyectable	c.b.p.	1000 mL

Disolver todos los componentes de la fórmula en un matraz Erlenmeyer, determinar pH y filtrar con membrana Millipore de 0.20 µm. Envasar en frasco color ámbar estéril de 1000 mL. Esta solución se descompone con la luz.

Solución Glicero Salina (SGS)

Cloruro de sodio (NaCl)		9.0 g
Ácido fénico (C ₆ H ₆ O)		4.0 g
Glicerina		500.0 mL
Agua destilada		500.0 mL

Disolver todos los componentes de la fórmula en agua destilada en un matraz Erlenmeyer y agregar la glicerina. Agitar hasta homogenizar la solución. Esterilizar.

Solución Salina al 0.09%

Cloruro de sodio (NaCl)		9.0 g
Agua destilada		1000.0 mL

Disolver el cloruro de sodio en agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Agitar hasta homogenizar la solución. Esterilizar.

Hoja de registro

GRUPO		HONGO	
FECHA	DIA DEL PROTOCOLO	CONIDIOS CONCENTRACIÓN	EXTRACTO CONCENTRACIÓN
RATON	PESO (g)	GROSOR DE OREJAS	
		OREJA IZQUIERDA	OREJA DERECHA
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
11.			
12.			
13.			
14.			
15.			
16.			
17.			
18.			
19.			
20.			
21.			
22.			
23.			
24.			
25.			
26.			
27.			
RATONES MUERTOS	RATONES RECUPERADOS	TOTAL DE RATONES	
OBSERVACIONES			

Abreviaciones

ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
AMPC	Agente microbiano para el control de plagas
ANOVA	Análisis de varianza
APD	Agar papa dextrosa
CD	Cluster of differentiation.
C3a	Fracción 3a del complemento
DAC	Dermatitis alérgica por contacto
DE50	Dosis efectiva media
DL50	Dosis letal media
DNFB 2,4	Dinitrofluorobenceno 2,4
EAF	Extracto antigénico fúngico
EPA	Environmental protection agency. Agencia de protección ambiental
FC γ R1	Receptor for IgG Fc fragment. Receptor de tipo 1 para el fragmento cristizable de la inmunoglobulina G
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPMT	Guinea Pig Maximization Test. Prueba de maximización en el cobayo.
GXM	Glucuronoxilomanana
HE	Hongo entomopatógeno
ICAM 1	Intercellular adhesion molecule-1. Molécula de adhesión celular de tipo 1.
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL1 R	Receptor para interleucina 1
LFA	Lymphocyte functional antigen. Antígeno funcional linfocitario
MEST	Mouse ear swelling test. Prueba del edema en la oreja del ratón
MHC	Major histocompatibility complex. Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Macrophage migration inhibitory factor. Factor inhibitorio de la migración de macrófagos
MYDD88	Myeloid differentiation primary response gene 88. Gene 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
NF κ B	Nuclear Factor κ B. Factor de transcripción nuclear κ B.
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns. Patrones moleculares asociados a patógenos.
PDED	Proteína dermoepidérmica
PDZ	Papa dextrosa zanahoria, medio líquido de
PRR	Pattern recognition receptors. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos

RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA- Polimerase chain reaction. ADN polimórfico amplificado al azar mediante la reacción en cadena de la polimerasa
RC3b	Receptor para la fracción C3b del complemento
SC	Suspensión de conidios
SGS	Solución glicero-salina
SS	Solución salina
T _h	Linfocito T cooperador
T _{h1}	Linfocito T cooperador de tipo 1
T _{h2}	Linfocito T cooperador de tipo 2
T _r	Linfocito T regulador
T CD8+	Linfocito T citotóxico
Tdth	T cell of delayed type hypersensitivity. Linfocito T de respuesta de hipersensibilidad retardada.
TNF	Tumor necrosis factor. Factor de necrosis tumoral
TLR	Tool like receptor. Son un tipo de receptores de patrones de reconocimiento (PRR's)

Glosario

METODO DE LOWRY Es una técnica para llevar a cabo la cuantificación de proteínas totales contenidas en una sustancia problema (Lowry et al, 1951).

PRUEBA DE MAXIMIZACIÓN EN COBAYOS. Guinea pig maximization test (GMPT) por sus siglas en inglés. Es una prueba desarrollada en 1969 por Magnusson y Kligman para determinar la capacidad de una sustancia para desarrollar sensibilización por contacto. Durante el periodo de inducción la vía de administración es intradérmica, se utiliza adyuvante completo de Freund y se coloca un parche oclusivo. El reto se lleva a cabo mediante la colocación de la sustancia problema mediante parche oclusivo. Para más detalles consultar bibliografía. (Magnusson et al., 1969).

RAPD-PCR. Random amplification of polymorphic DNA. AND polimórfico amplificado al azar. Es una variante de la técnica de la PCR, prácticamente idéntica a la PCR con cebado aleatorio, en la que se utilizan múltiples copias de un único cebador en condiciones poco rigurosas. El cebador inespecífico se une a muchos sitios del genoma, y los fragmentos obtenidos son el resultado de la amplificación de regiones cercanas del ADN plantilla, flanqueadas por dos copias del cebador, orientadas en la dirección correcta. Esta técnica puede utilizarse para la identificación de microorganismos con fines de diagnóstico clínico y epidemiológico.

SECUENCIACION DE REGIONES Procedimiento analítico que permite determinar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de una hebra de ADN ó ARN.

TEST DE BUEHLER Es una prueba desarrollada en 1965 por Buehler para determinar la capacidad de una sustancia para desarrollar sensibilización por contacto. Durante el periodo de inducción la vía de administración es epidérmica mediante un parche oclusivo, al igual que el reto. Para más detalles consultar bibliografía. (Buehler, 1965).

BIBLIOGRAFIA

1. Betz F, Forsyth S, Stewart W. 1989. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in North America, pp. 4-9. En: Safety of Microbial Insecticides. Laird M, Lacey L, Davidson E (Eds), CRC Press, USA.
2. Siegel J, Shadduck J. 1989. Safety of microbial insecticides to vertebrates humans, pp 102-112. En: Safety of Microbial Insecticides. Laird M, Lacey L, Davidson E (Eds), CRC Press, USA.
3. Goettel M, Poprawski J, Vandenberg J, Li Z, Roberts W. 1989. Safety to Nontarget Invertebrates of Fungal Biocontrol Agents, pp 210-224. En: Safety of Microbial Insecticides. Laird M, Lacey L, Davidson E (Eds), CRC Press, USA.
4. Siegel J. 1997. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals, pp. 325-335. En: Lacey (Eds), Manual of Techniques in Insects Pathology. Academic Press, New York.
5. Toriello C, Hernández Ibáñez J, López-González L, Mier T, Carrillo J, Latgé J. 1986. The pathogenic fungi of the spittlebug in México. III Innocuity of *Ernya neophidis* and *Conidiobolus major* in experimental animals. Entomophaga 31: 371-376.
6. Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez-Jacobo A, Mier T. 1999a. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (METSCH) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp (Homoptera: Cercopidae) en México. Rev. Mex. Mic. 15: 123-125.
7. Toriello C. 2003. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete). Vedia 9-10:107-113.
8. Mathias C, The cost of occupational skin disease. Arch Dermatol 1985; 121: 332-334.
9. Keiding L. Asthma, allergy and other types of hypersensitivity in Denmark and the development 1987-1994. Copenhagen: Danish Institute for Clinical Epidemiology (DICE). 1997
10. Halkier-Sørensen L. Occupational skin diseases: reliability and utility of the data in the various registres; the course from notification to compensation and the costs. Contact Dermatitis 1998; 39: 71-78.

11. Samson R, Evans H, Latgé J. 1988. Taxonomy of entomopathogenic fungi, pp. 5-16. En: Atlas of Entomopathogenic Fungy. Samson R, Evans H, Latgé J (Eds). Springer-Verlag.
12. Ward M, Sailstad D, Selgarde M. Allergic responses to the biopesticide *Metarhizium anisopliae* in Balb/c mice. Toxicol Sci 1998; 45:195-203.
13. Young E. The epizootiology of two pathogens of the coconut palm rhinoceros beetle. J Invertebr Pathol 1974; 24: 82-92.
14. Latch y Faloon. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. Entomophaga 1976; 21:39-48.
15. Al-Aidroos K, Roberts D. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. Can J Genet Cytol 1978; 20: 211-219.
16. Ferron. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*, pp. 465-482. En: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Burgess (Eds). Academic Press, New York.
17. Agudelo-Silva F, Wassik H. Infectivity of a Venezuelan strain of *Metarhizium anisopliae* to *Aedes aegypti* larvae. J Invertebr Pathol 1984; 43: 435-436.
18. Riba G, Keita A, Soares G, Ferron P. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as patogens of mosquito larvae. J Am Mosq Control Assoc 1986; 2: 469-473.
19. Gillespie A. 1988. Use of fungi to control pests of agricultural importance, pp. 37-60. En: Biological Control Systems. Burge (Ed). Manchester Univ.
20. Samuels K, Pinnock D, Allsopp P. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metshnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a biological control agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera: Stratiomyidae). J Aust Entomol Soc 1989; 28: 69-74.
21. Barson G, Renn N, Bywater A. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly *Musca dosmestica* a pest of intensive animals units. J Invertebr Pathol 1984; 43: 435-436.
22. Austwick P. 1980. The pathogenic aspects of the use of fungi. The need for risk analysis and registration of fungi, pp. 91-102. En: Environmental Protection and Biological Forms of Control of Pests Organisms, vol 31. Ludholm B, Stackerud M (Eds). Ecology Bulletin. Stockholm.
23. Shadduck J, Roberts D, Lause S. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: preliminary results. Environ Entomol 1982; 11:189.

24. Zimmerman G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Sci* 1993; 37: 375-379.
25. Burges H. 1981. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides, pp. 737-767. En: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Burges H (Ed). Academic Press. London.
26. El-Kadi M, Xará L, De Matos P, Da Rocha J, De Oliveira D. 1983. Effects of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice. *Environ Entomol* 1983; 12: 37-42.
27. Saik J, Lacey L, Lacey C. 1990. Safety of microbial insecticides to vertebrates Domestic animals and wildlife, pp.115-134. En: *Safety of Microbial Insecticides*. Laird M, Lacey L, Davidson E (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL.
28. Toriello C, Navarro-Barranco H, Almengor M, Mier T. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala. *Rev Mex Mic* 1999b; 15: 119-121.
29. Ward M, Madison S, Andrews D, Sailstad D, Gaveta S, Selgrade M. Comparison of respiratory responses to *Metarhizium anisopliae* extract using two different sensitization protocols. *Toxicology* 2000a; 147: 133-145.
30. Ward M. Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Toxicology* 2000b; 143:141-154.
31. Chung Y, Coates N, Viana M, Copeland L, Vesper S, Selgrade M, Ward M. Dose-dependent allergic responses to an extract of *Penicillium chrysogenum* in Balb/c mice. *Toxicology* 2005; 209: 77-89.
32. Kaufman G, Bellas T. Occupational allergy to *Metarhizium*. *Transpacific allergy and immunology/research abstracts*. *Allergy Asthma Proc* 1996; 17:166. [Abstract]
33. Burgner D, Eagles G, Burgess M, Procopis P, Rogers M, Muir D, Pritchard R, Hocking A, Priest M. Disseminated invasive infection due to *Metarhizium anisopliae* in an immunocompromised child. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1146-1150.
34. Cepero de García M. Arboleda M, Barraquer F, Gose E. Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 361-363.

35. Revankar S, Sutton D, Sánchez S, Rao J, Zervos M, Dashti F, Rinald M. *Metarhizium ansiopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. J Clin Microbiol 1999; 37: 195-198.
36. Mur D, Martin P, Kendall K, Malik R. Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due to *Metarhizium anisopliae*. Med Mycol 1998; 36: 51-54.
37. Lantinga H, Nater J, Coenrads P. Prevalence, incidence and course of eczema on the hands and forearms in a sample of the general population. Contact Dermatitis 1984; 10: 135-139.
38. Meding B. Epidemiology of hand eczema in an industrial city. Acta Derm Venereol 1990; 70: 1-43.
39. Arenas R. 1996. Dermatitis por contacto, pp. 33-40. En: Dermatología, Atlas Diagnóstico y tratamiento 2ª Edición. Rivera B (Ed). McGraw-Hill Interamericana. México.
40. Hawksworth D. 1974. Mycologist's Handbook. An Introduction to the Principles of Taxonomy and Nomenclature in the Fungi and Lichens. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
41. Hawksworth D. The fungal dimension of biodiversity magnitude, significance and conservation. Mycol Res 1991; 95: 641-665.
42. Tamez P, Galán L, Medrano H, García C, Rodríguez C, Gómez R, Tamez-Guerra R. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL 2001; 4: 143-152.
43. Mier T, Pérez J, Carrillo-Fraga J, Toriello C. Study of the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. Entomophaga 1989; 34: 105-110.
44. Mier T, Rivera M, Rodríguez P, Carrillo F, Toriello C. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. Rev Lat AMER Microbiol 1984; 36: 107-11.
45. St. Leger R, Charnley A, Cooper R. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. J Invertebr Pathol 1986a; 48: 85-95.
46. St. Leger R, Cooper R, Charnley A. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. J Gen Microbiol 1986b; 132: 1509-1517.

47. Driver F, Milner R, Trueman J. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* 2000; 104: 134-150.
48. Tulloch M. The genus *Metarhizium*. *Trans Br Mycol Soc* 1976; 66: 407-411.
49. Rombach M, Humber R, Roberts D. *Metarhizium favoviride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 1986; 27: 87-92.
50. Rombach M, Humber R, Evans H. *Metarhizium album* a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. *Transactions of the British Mycological Society* 1987; 37: 37-45.
51. Villalobos F. The potential of entomopathogens for the control of white grub pest of corn in Mexico, pp. 253-260. En: *Use of Pathogens in Scarab Pest Managment*. Jackson T, Glare T (Eds). Intercept, Andover.
52. Berlanga-Padilla A, Hernández-Velázquez V, Graza G. 1997. *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin para el control microbiano de la mosca pinta *Aeneolamia* sp. *Memorias XX Congreso Nacional de Control Biológico, México*, pp. 51-53.
53. Faria M, Magalhães B. O uso de fungos entomopatogênico no Brasil. *Biotechnol Ciênc Desenvol* 2001; 22: 18-21.
54. Goettel M, Inglis G, 1997. Fungi: Hypomicetes, pp. 213-249. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lacey L (Ed). Academic Press, San Diego.
55. Butt T, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction-Fungal biological control agents: problems and potential, pp. 1-9. En: *Fungi as Biocontrol Agents*. Butt T, Jackson C, Magan N (Eds). CAB International.
56. Domsch K, Gams W, Anderson T. 1980. *Compendium of soil fungi*, pp.413-415. Academic Press. London.
57. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system recognition. *Cell* 1997; 91:295-298.
58. Romani L, Kaufmann S. Immunity to fungi. *Res Immunol* 1998; 149: 281-493.
59. Mansour M, Levitz S. Interactions of fungi with phagocytes *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 359-365.
60. Romani L. 2002. Fungal pathogenesis. *Principles and Clinical Applications*, pp. 401-432. Calderone R, Cihlar L (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York.

61. Huffnagle G, Deepe G. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 344-350.
62. Marr K. Differential role of MyD88 in macrophage mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun* 2003; 71: 5280-5286.
63. Mambulla S, Sau K, Henneke P, Golenbock D, Levitz S. Toll-Like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 2002; 277: 39320-39326.
64. Netea M. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002a; 185: 1483-1489.
65. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 5-11.
66. O'Neil L, Fitzgerald K, Bowie A. The toll-like receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003; 24: 286-290.
67. Gantner B, Simmons R, Canavera S, Akira S, Underhill D. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003; 197: 1107-1117.
68. Shoham S, Huang C, Chen J, Golenbock D, Levitz S. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166: 4620-4626.
69. Wang J. Involvement of CD 14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 2001; 69: 2402-2406.
70. Tada H. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor α by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 503-512.
71. Tauszig-Delamasure S, Bilak H, Capovilla M, Hoffman J, Imler J. *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature Immunol* 2002; 3: 91-97.
72. Brown J. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J Exp Med* 2003; 197: 1119-1124.

73. Jouault T. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J Infect Dis* 2003; 188: 165-171.
74. Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper A. *Pneumocystis carinii* cell wall β -glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 25001-25008.
75. Netea M. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of Toll-like receptor 4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 2003; 188: 320-326.
76. Herring A, Huffnagle G. 2001. En: *Immunology of Infectious Diseases*, pp. 127-137. Kaufmann S, Sher A, Ahmed R (Eds). ASM Press. Washington D.C.
77. d'Ostiani C. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 2000; 191: 1661-1674.
78. Claudia M. The interaction of fungi with dendritic cells: implications for T_H immunity and vaccination. *Curr Mol Med* 2002; 2: 507-524.
79. Murphy J. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol* 1989; 2: 360-367.
80. Levitz S, Mathews H, Murphy J. Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today* 1995; 16: 387-391.
81. Romani L. The cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 484-490.
82. Netea M, Stuyt R, Kim S, Van der Meer J, Kullberg B, Dinarello C. The role of endogenous interleukin (IL)-18, IL-12, IL-1 β and tumor necrosis factor α in the production of interferon γ induced by *Candida albicans* in human whole-blood cultures. *J Infect Dis* 2002b; 185: 963-970.
83. Hebart H. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 2002; 100: 4521-4528.
84. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 11-23.
85. Huffnagle G, Yates J, Lipscomb M. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 1991; 173: 793-800.

86. Calich V, Vaz C, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Res Immunol 1998; 149: 407-417.
87. Clemons K, Stevens D. Overview of host defense mechanisms in systemic mycoses and the basis for immunotherapy. Seminar Respir Infect 2001; 16: 60-66.
88. Savolainen J, Koivikko A, Kalimo K, Nieminen E, Viander M. IgE, IgA and IgG antibodies and delayed skin response towards *Candida albicans* antigens in atopics with and without saprophytic growth. Clin Exp Allergy 1990; 20: 549-554.
89. Faergemann J. Atopic dermatitis and fungi. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 545-563.
90. Roitt I, Delves P. 2003. Hipersensibilidad, pp. 367-398. En: Inmunología Fundamentos 10a Edición. Roitt I, Delves P (Eds). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
91. Roitt I, Delves P. 2004. Hypersensitivity, pp. 322-348. En: Roitt's Essential Immunology. Tenth edition. Reprinted. Roitt I, Delves P (Eds). Blackwell Science. USA.
92. Neaville W, Bush R, Ausdenmoore R, Lierl M. 2005. Aeroalergenos, pp. 44-55. En: Alergia e Inmunología. Adelman D, Casale T, Corren J (Eds). Marbán. Madrid.
93. Fradkin, V. (1980): Alergenos de hongos, pp 71-80. En: Alergenos. Fradkin V. Ed. MIR. Moscu.
94. Brostoff J, Hall T. 1991. Hipersensibilidad: Tipo I, pp. 19.1-19.20. En: Inmunología 2ª Edición. Roitt I, Brostoff J, Male D (Eds). Salvat. Barcelona.
95. Hay F. 1991. Hipersensibilidad: Tipo III, pp. 21.1-21.9. En: Inmunología 2ª Edición. Roitt I, Brostoff J, Male D (Eds). Salvat. Barcelona.
96. Barnetson R, Gawkrödger D. 1991. Hipersensibilidad Tipo IV, pp. 22.1-22.9. En: Inmunología 2ª Edición. Roitt I, Brostoff J, Male D (Eds). Salvat. Barcelona.
97. Janeway C. 2005. Allergy and Hypersensitivity, pp.517-555. En: Immunobiology, The immune system in health and disease. 6th edition. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchick M (Eds). Garland Science Publishing. New York.

98. Mc Fadden J. 2000. Immunology of Allergic Contact Dermatitis, pp. 213-222. En: Allergic Skin Disease. A multidisciplinary approach. Leung D, Greaves M (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York.
99. Boguniewicz M, Beltrani V. 2005. Dermatitis atópica y dermatitis de contacto, pp. 165-186. En: Alergia e Inmunología. Adelman D, Casale T, Corren J (Eds). Marbán. Madrid.
100. Aiba S, Katz S. Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cells. J Immunol 1990; 145: 2791.
101. Schuler G. 1991. Epidermal Langerhans Cells. CRC Press. Boca Raton.
102. Cumberbatch M, Dearman R, Kimber I. Langerhans cells migration requires signals from both TNF alpha and interleukin 1 beta for migration. Immunology 1997; 92: 388-395.
103. Picker L, Kishimoto T, Smith C. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. Nature 1991; 349: 796-799.
104. Bergstrasser P. 1989. Sensitization and elicitation of inflammation in contact dermatitis, pp. 219-246. En: Immune Mechanisms in Cutaneous Disease. Norris D (Ed). Marcel Dekker. New York.
105. Wang B, Esche C, Mamelak A, Freed I, Watabe H, Sauder D. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 5: 381-389.
106. Gad S, Dunn B, Dobbs D. 1985. Development of alternative dermal sensitization test: Mouse Ear Swelling Test (MEST), pp. 539. En: In Vitro Toxicology. Goldberg A (Ed). Proceedings of 1984 John Hopkins Symposium.
107. Stalder J, Karol M. Use of dose-response data to compare the skin sensitizing abilities of dicyclohexylmethane-4,4'-diisocyanate and picryl chloride in two animal species. Toxicol Appl Pharmacol 1985; 78: 445.
108. Patrick E, Burkhalter A, Maibach H. 1987. Mouse ear assays as models for studying mechanisms of chemically induced irritation, pp. 86. En: Models in Dermatology. Vol 3. Krager, Basel.
109. Stern M, Brown T, Brown R, Munson A. Contact hypersensitivity response to isophorone diisocyanate in mice. Drug Chem Toxicol 1989; 12: 287.

110. Kloss M, Mc Afee J, Mandel J, Mac Donald J. An in vivo method for the assessment of drug induced phototoxicity using the mouse ear. *Toxicol Methods* 1992; 1: 252.
111. Gad S. The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990's. *Toxicol* 1994; 93: 33-46.
112. Crowle A. Delayed hypersensitivity in mice: Its detection by skin tests and its passive transfer. *Science* 1959a; 130, 159.
113. Crowle A. Delayed hypersensitivity in several strains of mice studies with six different tests. *J Allergy* 1959b; 30: 442.
114. Asherson G, Ptak W. Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* 1968; 15: 405.
115. DeSousa M, Parrot D. Induction and recall in contact sensitivity, changes in skin and draining lymph nodes of intact and thymectomized mice. *J Exp Med* 1969; 130: 671.
116. Philips, G. 1953. Preparation of allergenic extracts for testing and treatment. pp 365-397. En: *A manual of clinical allergy*. Sheldom J, Lovel R, Mathews K. Ed WB Saunders Co. USA.
117. FDA. 1987. Protocol for real time stability studies of allergenic extracts. Off. of Biologics Research and Review Center for Drugs and Biologics.
118. Turco S, King R. 1987. *Sterile Dosage Forms: their preparations and clinical applications*, pp 10-23 y 330-341. 3rd Ed. Lea & Fabiger. Philadelphia, PA. USA.
119. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-267.
120. Stevens A, Lowe J. 1993. Glosario de técnicas y tinciones, pp. 369-370. En: *Texto y Atlas de Histología*. Stevens A, Lowe J (Eds). Mosby/Doyma Libros. Madrid.
121. Gad S, Dunn B, Dobbs D, Reilly C, Walsh R. Development and validation of an alternative dermal sensitization test. The mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 84: 93.
122. Thorne P, Hawk C, Kaliszewski S, Guiney P. The non-invasive mouse ear swelling assay. I. Refinements for detecting weak contact sensitizers. *Fund Appl Toxicol* 1991; 17: 790.

123. Toriello C, Pérez A, Burciaga A, Navarro H, Pérez A, Lorenzana M, Mier T. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005; En prensa.
124. Mier T, Olivares G, Navarro H, Perez A, Lorenzana M, Perez A, Toriello C. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005; 88: 103-111.
125. Okamura T, Morimoto M, Yamane G, Takahashi S. Langerhan's cells in the murine oral mucosa in the inductive phase of delayed type hypersensitivity with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 188-194.
126. Renz H, Smith H, Henson j, Ray B, Irvin C, Gelfand E. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1127-1138.
127. Murali P, Kumar A, Choi H, Bansal N, Fink J, Kurup V. *Aspergillus fumigatus* antigen induced eosinophilia in mice is abrogated by anti-IL5 antibody. *J Leukocyte Biol* 1993; 53: 264-267.
128. Sailstad D, Ward M, Boykin E, Selgarde M. A murine model for low weight chemicals: differentiation of respiratory sensitizers (TMA) from contact sensitizers (DNFB). *Toxicology* 2003; 194: 147-161.
129. Magnusson B, Kligman A. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 1969; 52:268-276.
130. Buehler E. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol.* 1965; 91: 171-177.