



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Toxicidad y patogenicidad aguda oral del hongo  
*Paecilomyces fumosoroseus* EH-506/3 (PFCAM)

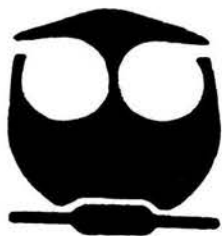
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA-  
BIOLOGA

P R E S E N T A :

GUADALUPE OLIVARES  
REDONDA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## JURADO ASIGNADO.

Presidente ABEL GUTIERREZ RAMOS

Vocal MISAEL GONZALEZ IBARRA

Secretario CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

1er Suplente MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

2do Suplente BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

### SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Laboratorio de Micología Básica  
Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor



Dra. Concepción Toriello Nájera

\_\_\_\_\_  
FIRMA:  
\_\_\_\_\_  
FECHA:  
\_\_\_\_\_  
NOMBRE:

Sustentante



Guadalupe Olivares Redonda

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

## AGRADECIMIENTOS

### **A mi asesora Dra. Conchita Toriello Nájera.**

Le agradezco la oportunidad y confianza brindada en este proyecto porque sin su ayuda no sería posible la realización de este, por su valiosa enseñanza y paciencia gracias.

A la Dra. Tere Mier por su ayuda técnica y asesoría académica así como en la revisión del manuscrito.

A mis sinodales: Abel Gutiérrez Ramos, Misael González Ibarra, Marco Antonio Becerril Flores y Berta Josefina Espinoza Gutiérrez, gracias por sus aportaciones y comentarios.

Al Dr. Marte Lorenzana por su asesoría académica en el área de Farmacología y por las facilidades para el uso del bioterio del departamento de farmacología en la facultad de medicina.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su asesoría académica en el área de histopatología así como en la interpretación de los resultados.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Guadalupe Olivares Redonda  
FECHA: 11-06-04  
FIRMA: Guadalupe O.R.

A todos los chicos del laboratorio de micología básica Biól. Hortensia Navarro, QFB. Amelia Pérez, M. En C. Gina Cavallazzi, Biól. Paty Jiménez, Biól. Elena Montoya, Biól. David Basilio y Biól Anabel, Un millón de gracias por su apoyo por su enorme ayuda por darles tantas pero tantas molestias gracias. También porque son las personas más maravillosas y por brindarme su valiosa AMISTAD los **quiero mucho** .

## **DEDICATORIAS**

**A mí padre Raymundo Olivares Morales por ser la razón de mí existir.**

**A mis Abuelitos:**

Raymundo Olivares Rivas y Elena Morales Galindo, Gracias por su valiosa ayuda y por ser como mis segundos padres, por confiar en mí ciegamente sin pedirme nada a cambio. A ti papito lindo te dedico esta tesis, porque eres la persona que más admiro y respeto, has sido mi fuente de inspiración y sobre todo porque eres un ejemplo a seguir, a enseñarme a luchar ante cualquier adversidad.

**A mi mamá:**

Isabel Redonda Fernández y Saúl Rosiles Ortiz, gracias por enseñarme el camino a seguir, a ambos un millón de gracias por su amor, cariño, apoyo y haber creído en mí.

**A mis hermanos:**

Nubia Olivares Redonda, Janeth, Saúl y Osiris, gracias por su cariño, apoyo y que siempre estemos unidos a pesar de que siempre existan los problemas.

**A mis tías:**

Araceli y María Elena Olivares Morales. Gracias por brindarme su apoyo, confianza, cariño y también por soportarme a lo largo de todo este tiempo a pesar de que tenemos caracteres distintos.

**A mí tío El General Ángel Sergio Olivares Morales:**

Mil gracias por su enorme apoyo brindado, cuando más la necesite por que sin su ayuda no sería posible la realización de este.

**A toda mi familia en general:**

Sánchez Olivares, Olivares Franco, Rivero Olivares, primos(as), sobrinos(as)  
Gracias por su apoyo brindado y por esos momentos compartidos juntos.

**A mis primos:**

Carolina, Diana, Héctor y Josué, por su amistad, cariño y confianza por compartir tantas cosas juntos, y sobre todo tener muy bonitos recuerdos .  
Gracias los quiero mucho.



**A Fabiola Vega García:**

Amiguísima y hermana, gracias por tu linda amistad, cariño y sobretodo por estar conmigo cuando más te he necesitado, por ser mi confidente y cómplice en mis locuras mil gracias por tu AMISTAD, a enseñarme a ver la vida con alegría.

**A mi amigo Sair Santamaría Jiménez:**

Gracias por tú ayuda y apoyo en toda la carrera, por estar conmigo tanto en lo académico como en lo personal y por tu AMISTAD. Durch so sehr Zeitpunkte, die und besonders für ZUNEIGUNG und FRANCHISE geteilt wurden. ich will dich gewaltig, selbst wenn unser dieses, indem sie dank toi Simpre t'on Freundschaft verschlechtern wird in mein Herz tragen wird und vergißt nie, daß dank toi er übergeht, das organisch ist.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de química), por darme la oportunidad de forjarme como profesionista.

Gracias a Dios por darme la oportunidad de estar aquí.



	Páginas
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
3. Planteamiento del problema.....	7
4. Objetivos.....	8
5. Hipótesis.....	9
6. Material y métodos.....	10
❖ Hongo.....	10
❖ Inactivación del hongo por calor.....	11
❖ Inóculo.....	11
❖ Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral.....	11
• a. Animales.....	13
• b. Coprocultivos.....	14
• c. Necropsias.....	15
• d. Cultivos para reaislamiento del hongo.....	16
• e. Estudios histopatológicos.....	16
7. Resultados.....	17
❖ Observaciones de crecimiento del hongo.....	17
❖ Inactivación del hongo por calor para su uso como testigo...	18
❖ Prueba de toxicidad y patogenicidad.....	18
• Peso de los animales.....	19

---



• Examen clínico.....	20
• Coprocultivos.....	20
• Necropsias.....	21
• Alteraciones macroscópicas.....	21
• Cultivo de órganos.....	22
• Histopatología.....	24
8. Discusión.....	30
9. Conclusiones.....	35
10. Anexo.....	36
11. Bibliografía.....	37

---



Actualmente se ha desencadenado una continua búsqueda de agentes microbianos para el control biológico de plagas, con el fin de disminuir la utilización de insecticidas químicos que deterioran el medio ambiente. El desarrollo y uso de agentes microbianos ha aumentado y por lo tanto, es necesario establecer la normatividad en relación a la bioseguridad de estos agentes.

Diversos países y organizaciones, entre ellos, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), Grupo Internacional de las Asociaciones Nacionales de Manufactura de Agroquímicos, Organización Internacional de Control Biológico, Agencia de Protección del Ambiente (EPA) de Estados Unidos, Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD) de la Unión Europea, han contribuido al desarrollo de procedimientos para el registro de plaguicidas microbianos o bioinsecticidas (Toriello, 2003). El principio en el que se basan estos procedimientos consisten en demostrar que el uso de un agente microbiano para el control de plagas (AMCP) presentará un riesgo aceptable para los consumidores de productos, para los usuarios y el medio ambiente.

Siegel (1997) parte de la propuesta formulada en 1981, por la Organización Mundial de la Salud (Anonymous, 1981) para integrar su esquema de pruebas (Fig. 1). Dicho esquema está basado en procedimientos que proponen la existencia de diferentes niveles a fin de evaluar el riesgo de un AMCP. El nivel 1 consiste en pruebas cortas de cuatro semanas o menos, evaluándose infectividad, toxicidad,



irritabilidad y alergenicidad; una sola dosis para exposición oral e inhalación, inoculación intraperitoneal, dérmica y ocular. Cuando el agente microbiano no muestra efectos dañinos en estas pruebas, se considera seguro. Si se detectara alguna duda con respecto a la persistencia del AMCP en los animales utilizados se deberán llevar a cabo las pruebas correspondientes a los niveles 2 y 3. Éstas consisten en estudios a largo plazo, exposición a dosis única y múltiples, así como la cuantificación de la toxicidad a través de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), infectividad, a través de las dosis de efectividad media ( $DE_{50}$ ) e irritabilidad.

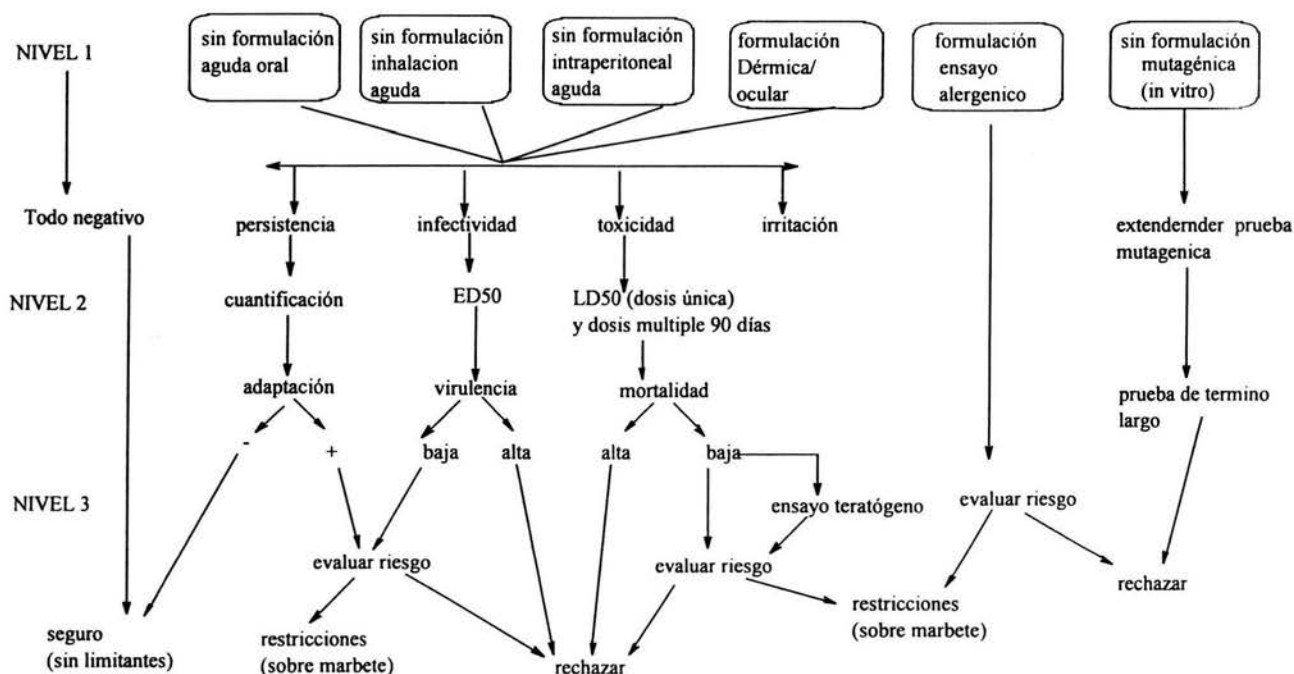


Fig. 1. Esquema de pruebas para la evaluación de riesgo de un agente microbiano para el control de plagas. Modificado de Siegel (1997).



Cuando un AMCP ha pasado las pruebas del nivel 1 sin producir efectos nocivos la posibilidad de causar problemas al ser liberado masivamente será mínimo (Siegel, 1997).

El propósito de las pruebas de bioseguridad para los mamíferos que establece la EPA 1996 ([http://www.epa.gov/pesticides/guidelines/oppts\\_885\\_3050.htm](http://www.epa.gov/pesticides/guidelines/oppts_885_3050.htm)) considera evaluar ciertos efectos toxicológicos como son: persistencia, patogenicidad, toxicología, infectividad y recientemente la alergenicidad.

Las pruebas de bioseguridad introducen al AMCP por una variedad de vías de administración, y los daños que producen en el organismo del hospedero pueden variar dependiendo de la ruta utilizada. La inmunorepuesta del hospedero dependerá en función de la infección y persistencia del AMCP. Los controles apropiados tales como el AMCP muerto son útiles para determinar si el resultado de daño de tejido es por toxicidad desencadenada por el AMCP o por una simple respuesta a cuerpo extraño.

Actualmente se han utilizado hongos entomopatógenos con éxito y seguridad como agentes de control biológico( Butt *et al.*, 2001). Burgues (1981) resume de manera elocuente la dificultad de evaluar un AMCP cuando menciona:

“ Una situación libre de no-riesgo no existe, definitivamente no, con plaguicidas químicos, e incluso con agentes biológicos, no se puede probar con certeza absoluta un resultado negativo. El registro de un químico es esencialmente, una declaración para avalar su uso, donde los riesgos son aceptables, y esto mismo debe ser aplicado para el uso de agentes biológicos”.



Este trabajo está enfocado a realizar una de las pruebas contempladas en el esquema de Siegel (1997) para evaluar la persistencia, infectividad, toxicidad e irritación de un AMCP, *Paecilomyces fumosoroseus*, en ratones de experimentación, con el objetivo de apoyar el uso de hongos entomopatógenos en el campo agrícola.



La resistencia de insectos plaga a los insecticidas químicos y la necesidad de minimizar el impacto de esas sustancias tóxicas en el ambiente demanda estrategias innovadoras y selectivas para controlar plagas agrícolas. Entre otras cosas, el control biológico es una alternativa, donde los hongos entomopatógenos ocupan un lugar importante.

Actualmente ya existen diferentes preparaciones agrícolas con ingredientes activos que son conidios de hongos entomopatógenos, como por ejemplo: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (antes *flavoviride*) para controlar poblaciones de langosta y saltamontes (Homoptera: Acrididae), *Paecilomyces fumosoroseus*, para controlar a la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) y *Verticillium lecanii*, para la áfidos (Homoptera: Aphididae) (Butt *et al.*, 2001).

En el mundo y en México, la mosquita blanca es una plaga, polífaga que ataca cultivos de relevancia económica como hortalizas, frutales y plantas ornamentales. Para esta plaga, se ha observado que el hongo *P. fumosoroseus* provoca epizootias considerables siendo un agente microbiano eficiente para su control (Jackson *et al.*, 1997).

En México, se ha visto que *P. fumosoroseus* es capaz de controlar biológicamente a la mosquita blanca (*Bemisia ssp.*, *Trialeurodes spp.*) en plantaciones de chile, tomate, frijol, calabaza y también plantas ornamentales (Sánchez *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 1999). De ahí la relevancia de llevar a cabo estudios de biología básica con este hongo, y además conocer su bioseguridad





para su registro y utilización en México. En un programa de colaboración entre UNAM, UAM-X y CNRCB se están estudiando diversos aislados de *P. fumosoroseus* EH-506/3, que pudieran ser utilizados como agente microbiano. Entre ellos, se encuentra el cultivo monospórico de *P. fumosoroseus* EH-506/3, derivado del cultivo original PFCAM del CNRCB, (depositado en la colección del Laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México) que puede ser considerado como un candidato idóneo como agente microbiano para el control de la mosquita blanca en México.

En nuestro país, se han realizado ensayos para determinar la inocuidad de diversos hongos entomopatógenos, como *Conidiobolus major*, *Erynia neoaphidis* (Toriello *et al.*, 1986), de *Hirsutella thompsonii* (Mier *et al.*, 1989), *Verticillium lecanii* (Mier *et al.*, 1994) y de *M. anisopliae var. anisopliae* (Toriello *et al.*, 1999). Todos ellos para mostrar la inocuidad de los hongos en el modelo estudiado.

En *P. fumosoroseus* no se conocen estudios de bioseguridad hasta el momento. Estudios de otras especies como *P. lilacinus* han mostrado que puede infectar invertebrados no blanco como *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae)(Goettel *et al.*, 1992). Sin embargo, otros insectos no blanco, como *Aedes aegyptii*, *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), *Tenebrio molitor*, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyrelidae) no pudieron ser infectados experimentalmente.



Ante la perspectiva de uso de los hongos entomopatógenos en el campo como micoinsecticidas, se plantea este trabajo para contribuir con los protocolos de bioseguridad del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* cepa EH-506/3, para asegurar la salud humana y de otros mamíferos.

En México no se cuenta con información acerca de la inocuidad de *Paecilomyces fumosoroseus* en mamíferos. En este trabajo nos enfocaremos a evaluar la bioseguridad de este hongo utilizando ratones, con el objeto de determinar la persistencia, patogenicidad, infectividad y toxicidad del microorganismo, mediante estudios micológicos e histopatológicos para identificar cambios y alteraciones patológicos ocasionadas por la presencia del hongo.



**OBJETIVO GENERAL:**

Demostrar la inocuidad de *Paecilomyces fumosoroseus* en ratones administrado en dosis única mediante la aplicación de la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar el medio de cultivo sólido óptimo para obtener conidios de *Paecilomyces fumosoroseus*.
2. Determinar la temperatura a la cual *Paecilomyces fumosoroseus* pierde totalmente su viabilidad.
3. Realizar la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral intragástrica en ratones CD-1.
4. Demostrar la ausencia de patogenicidad y toxicidad del hongo en ratones al ser administrado en dosis única por vía oral intragástrica.
5. Comparar los resultados de todos los estudios y observaciones de los animales inoculados con el hongo viable, hongo muerto y testigos para considerar la bioseguridad del hongo.



El hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* es inocuo, en lo concerniente a patogenicidad y toxicidad para ratones, cuando es inoculado experimentalmente por vía oral intragástrica en dosis única.



## 1. Hongo

Se utilizó el cultivo monospórico de *P. fumosoroseus* EH- 506/3 del aislado original PFCAM del CNRCB, DGSV, SAGARPA, seleccionado por ser un aislado con alta virulencia hacia la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae), con un tiempo letal medio de 2.9 días (Cavallazi *et al.*, 2002). El hongo está conservado en aceite mineral a 4 °C, en agua destilada y en agua glicerinada al 10 % en nitrógeno líquido a 196 °C, en la colección del Laboratorio de Micología Básica, Depto. De Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México.

El hongo se cultivó en medio de Sabouraud (SAB) (Bioxón México), Sabouraud con antibióticos (SABA) (Bioxón) y agar papa dextrosa (APD) a 28 °C durante 15 días para observar las características de la colonia y el crecimiento en estos medios (anexo 1: medios de cultivo).

Para la inoculación de ratones, se obtuvieron conidios del medio SABA a partir de cultivos incubados a 28 °C durante 15 días. A cada caja de Petri con SABA se le agregaron 8 mL de Tween 80 estéril al 1%, removiendo cuidadosamente los conidios con un asa micológica. La suspensión se homogeneizó en un Vortex. Los conidios se contaron en una cámara de Neubauer ajustando la suspensión a una concentración de  $2 \times 10^8$  conidios/mL para poder inocular 0.5 mL/ratón y obtener  $1 \times 10^8$  conidios/animal. Posteriormente, se centrifugó con el fin de eliminar el Tween 80 al 1 %, restituyendo éste por solución salina fisiológica estéril (SSFE).

Se obtuvo una relación de 1 mL de Tween 80 al 1 % por 19 mL de SSFE. La viabilidad del hongo se determinó por medio de unidades formadoras de colonias (UFC).



## **2. Inactivación del hongo por calor**

Para evaluar las características tóxicas del hongo inactivo (cuando este no es capaz de reproducirse) se realizó la inactivación del mismo por medio del calor, manteniendo su integridad estructural. Se preparó una suspensión fúngica de  $1 \times 10^8$  conidios/mL y se probaron en temperaturas húmedas de 50, 55 y 60 °C en baño María durante 1, 2 y 3 h, para determinar el tiempo de inactivación del hongo.

## **3. Inóculo**

Se prepararon 55 mL de una suspensión de  $2 \times 10^8$  conidios/mL viables. Quince mL de esta suspensión se inactivó por calor mediante el método descrito anteriormente. Para los testigos se preparó Tween 80 al 1 % y una solución de 1 mL de Tween por 19 de solución salina fisiológica estéril (SSFE), como se determinó con anterioridad.

## **4. Prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral**

La evaluación de la prueba de toxicidad y patogenicidad aguda oral se llevó a cabo conforme a las normas establecidas por la norma oficial mexicana, NOM-70-FITO-1995, y la guía de la "Environmental Protection Agency" (EPA, USDA, 1996) USA

([http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/guidelines/oppts\\_885\\_3050.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/guidelines/oppts_885_3050.htm)).

La prueba se realizó en un periodo de 21 días, con 4 necropsias a los 3, 10, 17 y 21 días después de la inoculación (Fig. 2). La prueba se repitió tres veces.

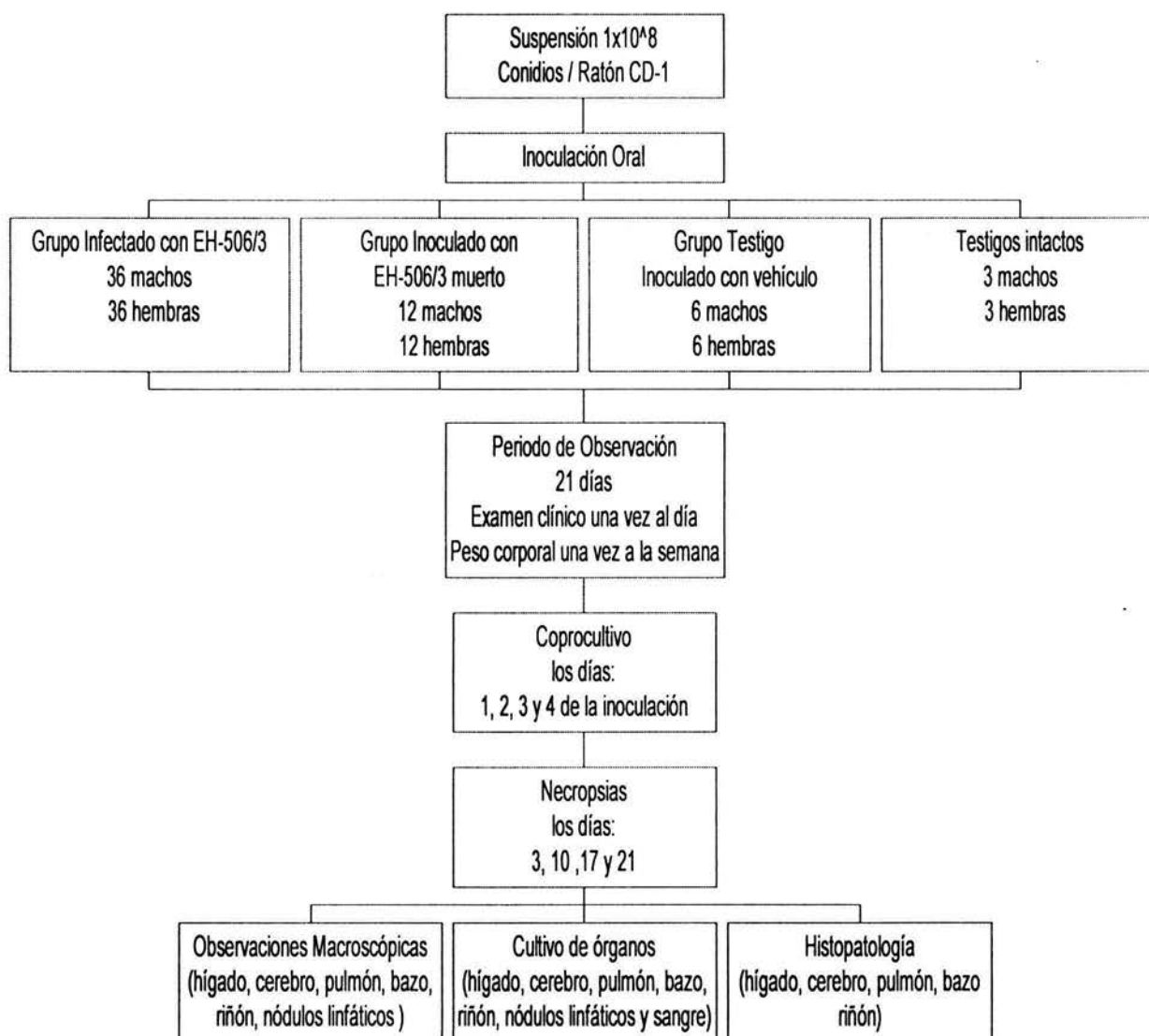


Fig. 2. Diseño general de la prueba de patogenicidad y toxicidad aguda oral .



### a. Animales

Los animales en estudio fueron ratones CD-1 del sexo masculino y del sexo femenino con las siguientes características:

- Adultos jóvenes con un peso entre 25-30 g  $\pm$  20 % del peso corporal medio
- Libres de parásitos y /o patógenos

En la prueba se utilizó un total de 114 ratones, 57 hembras y 57 machos, que se colocaron en jaulas separadas por sexo y tipo de la suspensión inoculada.

Los animales permanecieron sin alimento 24 h antes de la inoculación. A cada ratón se le inoculó 0.5 mL de la suspensión de conidios en el estómago por vía oral intragástrica utilizando una cánula. Cada uno de los grupos se dividió de la siguiente manera por ensayo (que se repitió 3 veces):

1<sup>er</sup> grupo: Infectado con suspensión fúngica viable EH-506/3 (12 hembras y 12 machos) x 3

2<sup>o</sup> grupo: Inoculado con suspensión con el hongo EH-506/3 muerto (4 hembras y 4 machos) x 3

3<sup>er</sup> grupo: Testigos ( 2 hembra y 2 macho) x 3

4<sup>o</sup> grupo: Testigo intacto (1 hembra y 1 macho) x 3. Estos ratones marcados en la oreja fueron colocados dentro de la jaula de los infectados.

Al principio de la prueba se determinaron los pesos individuales de los animales poco antes de su inoculación, luego semanalmente, en la muerte accidental si hubiese y en cada fecha de sacrificio.





Se realizó un examen clínico a todos los animales por lo menos una vez al día registrando si existen cambios en:

- a) Piel y pelo
- b) ojos y mucosas
- c) sistema respiratorio, sistemas circulatorio
- d) sistema central y sistema autónomo
- e) actividad somatomotora
- f) temblores, convulsiones
- g) Comportamiento.

#### **b. Coprocultivos**

Se realizaron coprocultivos los días 1, 2, 4 y 5 después de la inoculación de los animales. Se recogieron por cada jaula de ratones infectados y testigos aproximadamente 2 g de heces.

Las heces se procesaron de la siguiente manera: 1 g de heces por 9 mL de Tween 80 al 1%, obteniendo 2 diluciones a partir del concentrado. Se sembraron 100  $\mu$ L de la suspensión en medio de SABA, y se homogeneizaron con triángulo de vidrio. Las cajas se incubaron durante 5 días a 28 °C revisándolas cada 24 h.



**c. Necropsias**

Se realizaron necropsias a los 3, 10, 17 y 21 después del día de inoculación de los animales. Se sacrificaron en condiciones asépticas. Los animales se programaron de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 1. Número de ratones sacrificados en cada necropsia.**

Días de necropsias	Hongo viable			Hongo muerto			Testigos			Testigo intacto		
	Ensayos			Ensayos			Ensayos			Ensayos		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3	6 R	6 R	6 R	2 R	2 R	2 R	-	-	-	-	-	-
	Total = 18 ratones			Total = 6 ratones								
10	6 R	6 R	6 R	2 R	2 R	2 R	-	-	-	-	-	-
	Total = 18 ratones			Total = 6 ratones								
17	6 R	6 R	6 R	2 R	2 R	2 R	-	-	-	-	-	-
	Total = 18 ratones			Total = 6 ratones								
21	6 R	6 R	6 R	2 R	2 R	2 R	4	4	4	2	2	2
	Total = 18 ratones			Total = 6 ratones								
	24	24	24	8	8	8						
	Total = 72 ratones			Total = 24 ratones			Total = 12 ratones			Total = 6 ratones		



Durante las necropsias se realizó un examen macroscópico de los órganos que fueron estudiados: cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón, nódulos linfáticos y sangre.

#### **d. Cultivo para reaislamiento del hongo**

Los órganos ya mencionados fueron macerados con solución salina estéril y esparcidos sobre la superficie del medio de Sabouraud con antibióticos. La otra parte de los órganos se sembró en forma directa con el mismo medio en condiciones asépticas. Se obtuvo una muestra de sangre y fue sembrada en forma directa en medio de Sabouraud. Todas las cajas se incubaron durante un periodo de 7 días a 28 °C, durante los cuales se llevaron a efecto revisiones periódicas con el objeto de verificar la presencia del hongo en dichos órganos.

#### **e. Estudios histopatológicos**

Se fijaron fragmentos de hígado, pulmón, bazo, cerebro y riñón en formaldehído amortiguado en ácido pícrico (Zamboni y De Marino, 1965) durante 24 h. Luego, los fragmentos tisulares se lavaron en amortiguador de fosfato de sodio.

Las secciones tisulares impregnadas con parafina se tiñeron usando los métodos de hemotoxilina/eosina (HE) y de nitrato de plata de metenamina de Grocott (Grocott, 1995) (este estudio se realizó en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Armando Pérez Torres).



Los resultados obtenidos se analizaron de acuerdo a las alteraciones en general, presentadas en los ratones con base en la información recabada en los exámenes clínicos, comportamiento y registro del peso de los animales, alteraciones macroscópicas en los órganos de los animales, cultivos de reaislamiento y el estudio histopatológico de los tejidos de los órganos.

### Observaciones del crecimiento del hongo

La colonia presenta un color blanco a gris rosa, y aterciopelada en los medios de cultivo de SAB, SABA y APD (Fig. 3).

El hongo *P. fumosoroseus* en medio de SABA presentó la mayor cantidad de conidios, y por lo tanto fue el medio de cultivo utilizado durante todos los experimentos.

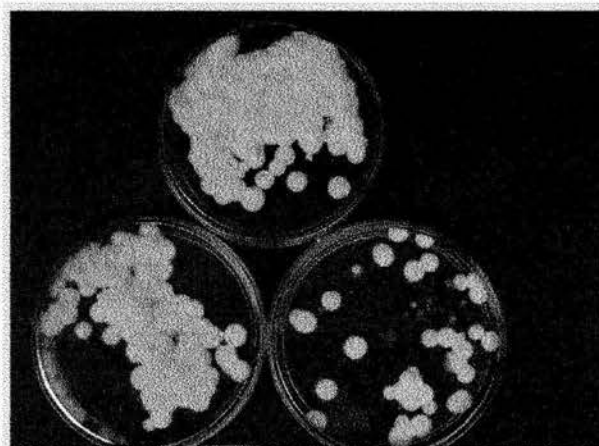
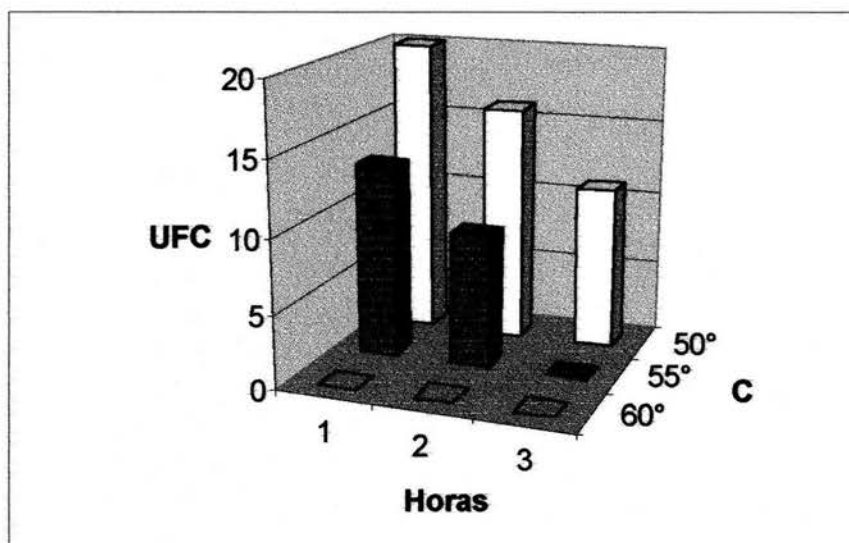


Figura 3. Colonias del hongo *P. fumosoroseus* EH-506/3 en agar de Sabouraud con antibióticos.



### Inactivación del hongo por calor para su uso como testigo

Para conocer la temperatura a la cual el hongo muere y utilizar los conidios como inóculo de hongo muerto, se realizó este ensayo. Cuando los conidios se incubaron a 50 °C, se obtuvieron 20, 16 y 11 UFC a las 1, 2 y 3 h de incubación, respectivamente. A 55 °C, 13, 9 y 0 UFC a las 1, 2, y 3 h, respectivamente. A 60 °C no se registró crecimiento (0 UFC) después de una hora de incubación. Los resultados mostraron que para matar al hongo la temperatura y tiempo adecuados fueron 60 °C y 1 hora de exposición ( Fig. 4).



**Figura 4. Inactivación de *P. fumosorosueus* EH-506/3 a diferentes tiempos y temperaturas.**

### Prueba de toxicidad y patogenicidad

Los resultados de las tres repeticiones de cada ensayo fueron similares, con algunas variaciones que se mencionarán en cada una.



### Pesos individuales

El peso de los animales fue aumentando de manera similar en todos los grupos: ratones infectados, ratones inoculados con el hongo muerto y ratones testigos. El grupo de los ratones infectados mostró un peso promedio inicial de 24.8 g (machos) y 29.4 g (hembras), y final de 38.6 g (machos) y 32.9 g (hembras). Los ratones con el hongo muerto iniciaron con un peso promedio de 24.6 g (machos), 25.1 g (hembras) y finalizaron con 38.6 g (machos) y 32.9 g (hembras). Los ratones testigos iniciaron con 26.4 g (machos) y 24.3 g (hembras), y finalizaron con 37.8 g (machos), 31.6 g (hembras) (Fig. 5).

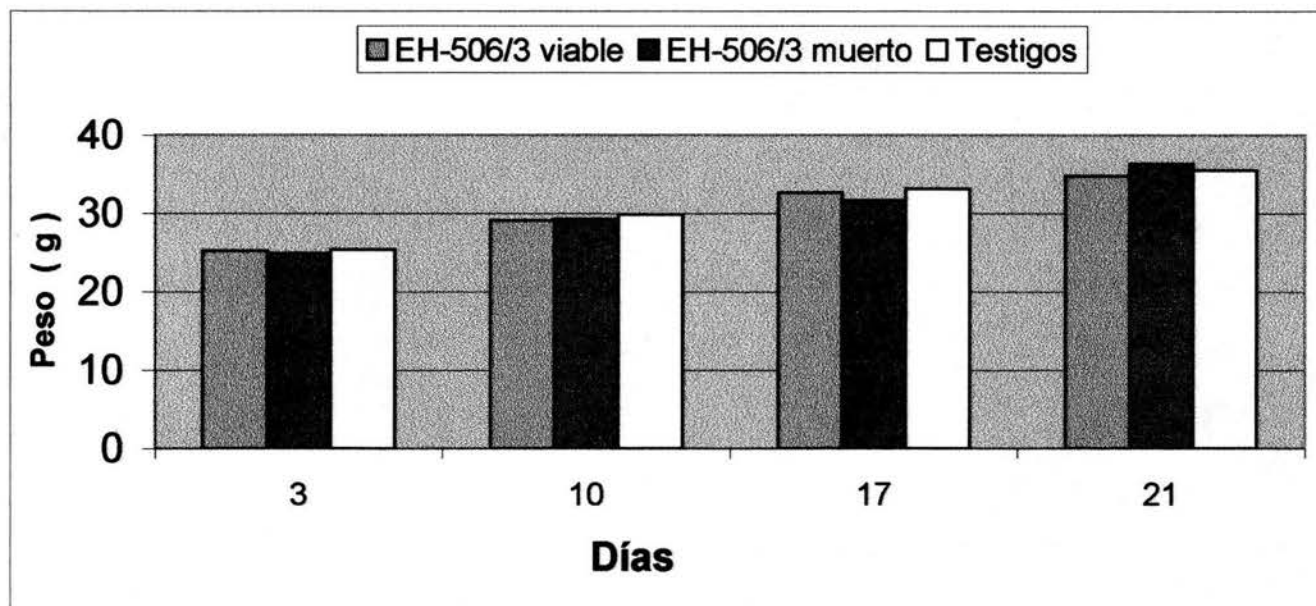


Figura 5. Peso corporal promedio total del ratón por grupo de animales inoculados durante los 21 días del experimento.

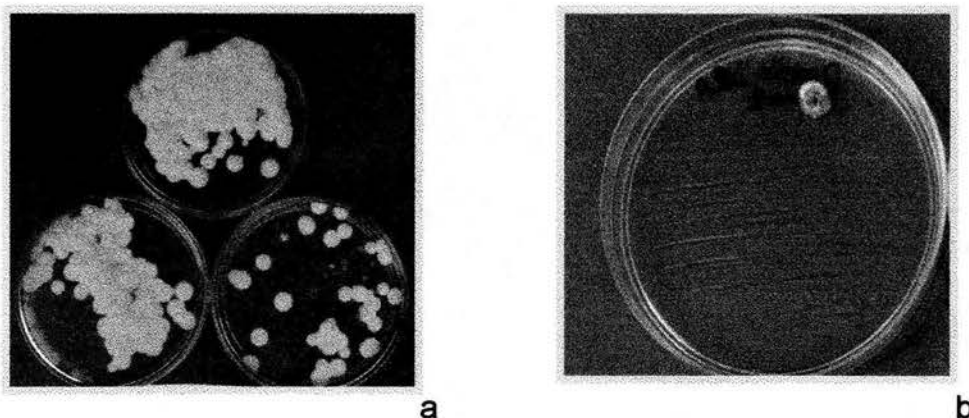


### Examen clínico

Los animales se revisaron diariamente en cada prueba. La salud en general no pareció afectarse por la inoculación de hongo, ya que no se apreciaron cambios en piel, pelo, ojos, mucosas, sistema respiratorio, sistema circulatorio, sistema nervioso central y sistema autónomo. El patrón de comportamiento fue normal.

### Coprocultivos

Se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h después de la inoculación, pero solamente a las 24 h se observó crecimiento del hongo en las cajas de cultivos. Estos cultivos positivos solamente se observaron en las heces del grupo de ratones infectados. Los demás cultivos siempre fueron negativos (Figs. 6 y 7). La viabilidad del hongo encontrada en las heces fecales de los ratones inoculados con el hongo a las 24 h correspondió a un promedio final de  $2.53 \times 10^2$  UFC/g de heces.



**Figura 6. Coprocultivos de ratones infectados a las 24 h. a) Se observan UFC de la suspensión y diluciones de las heces. b) Coprocultivo negativo de testigos.**

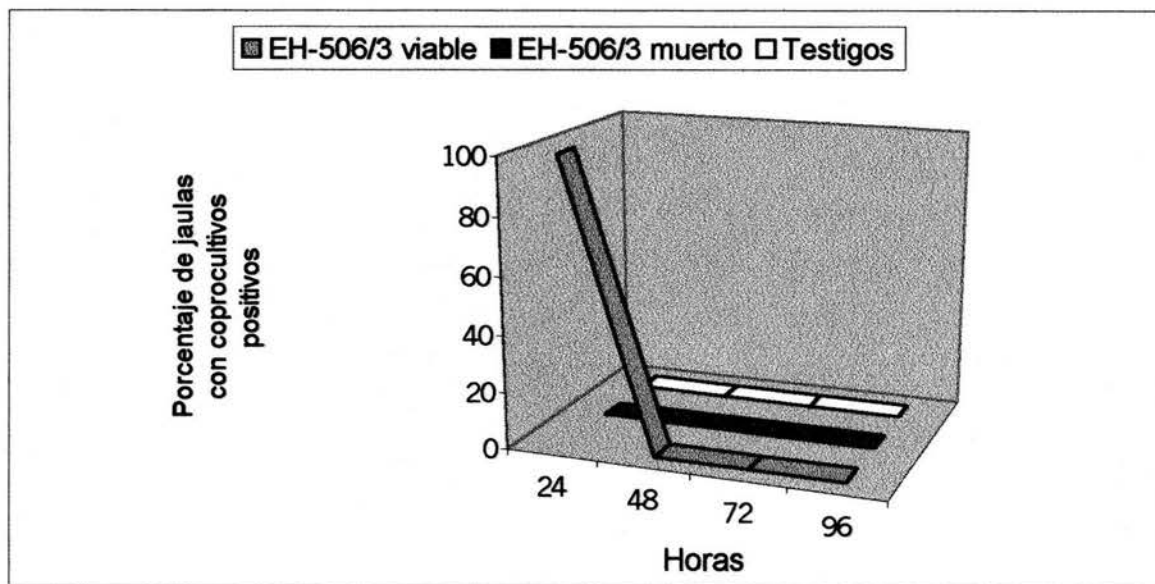


Figura 7. Porcentaje de coprocultivos positivos de los tres grupos de ratones durante las 96 h de muestreo de heces fecales.

## Necropsias

La determinación de la patogenicidad y toxicidad del hongo se llevó a cabo con base en los resultados obtenidos en las cuatro necropsias a los 3, 10, 17 y 21 días de la inoculación, en cuanto a alteraciones macroscópicas, cultivo de órganos e histopatología que se muestran a continuación, para determinar la persistencia, multiplicación, diseminación y reacciones tisulares.

### *Alteraciones macroscópicas*

Las alteraciones observadas en los órganos estudiados fueron esplenomegalia e hipopigmentación hepática. También se observó inflamación de ganglios axilares, con abscesos.





Las alteraciones macroscópicas se muestran en la Tabla 2, donde se observa que las alteraciones disminuyen conforme pasan los 21 días de las pruebas.

**Tabla 2. Cultivo de órganos positivos y alteraciones macroscópicas encontradas en los días de necropsias 3,10, 17 y 21 después de la inoculación.**

Días	Alteraciones macroscópicas											
	Cultivo de órganos positivos						Ganglio		Espleno- megalia		Hipopigmentación del hígado	
	H	B	R	C	P	S	H-V	H-M	H-V	H-M	H-V	H-M
3	0/18	0/18	1/18	0/18	3/18	0/18	7/18	0/6	0/18	2/6	8/18	2/6
10	1/18	1/18	0/18	1/18	0/18	0/18	3/18	1/6	1/18	1/6	0/18	0/6
17	2/18	0/18	1/18	1/18	1/18	0/18	4/18	0/6	2/18	0/6	1/18	0/6
21	2/18	0/18	0/18	0/18	1/18	0/18	1/18	0/6	1/18	0/6	1/18	0/6
<b>Total</b>	<b>5/72</b>	<b>1/72</b>	<b>2/72</b>	<b>2/72</b>	<b>5/72</b>	<b>0/72</b>	<b>15/72</b>	<b>1/24</b>	<b>4/72</b>	<b>3/24</b>	<b>10/72</b>	<b>2/24</b>
	(0/18)*	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)	(0/18)

H = hígado, B = bazo, R = riñón, C = cerebro, P = pulmón, S = sangre

\* = Los números dentro del paréntesis corresponde a los animales testigos

H-V = hongo viable, H-M = hongo muerto

### Cultivo de órganos

Los cultivos de los tejidos para reaislar el hongo mostraron crecimiento desde la primera hasta la última necropsia. Sin embargo, el porcentaje de los cultivos positivos son bajos, entre 0 y 6.9 % totales (Fig. 8). En todos los tejidos estudiados

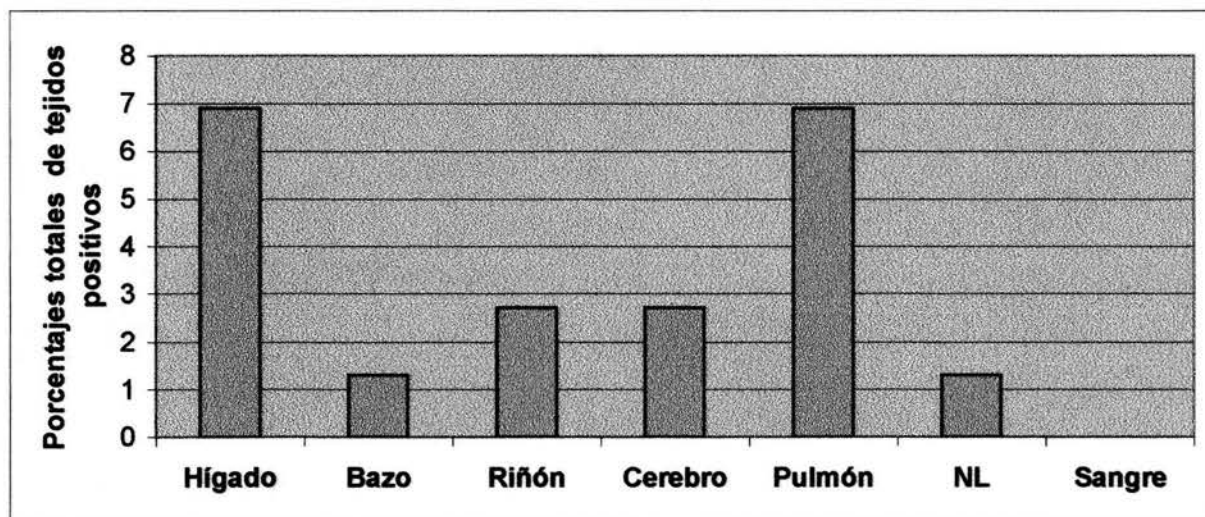


(hígado, bazo, pulmón, riñón, cerebro y nódulos linfáticos) se pudieron observar cultivos positivos del hongo inoculado, en diferentes porcentajes, los 21 días del experimento con excepción de los cultivos de sangre que siempre fueron negativos (Tabla 3). En total, los órganos que presentaron mayor porcentaje de reaislamiento del hongo fueron el hígado y pulmón, con 6.9 % cada uno ( Fig. 8).

**Tabla 3. Porcentaje de cultivos positivos por necropsias en los tejidos estudiados.**

Días de necropsia	Hígado	Bazo	Riñón	Cerebro	Pulmón	NL*	Sangre
3	0	0	5.5	0	16.6	0	0
10	5.5	5.5	0	5.5	0	0	0
17	11.1	0	5.5	5.5	5.5	5.5	0
21	11.1	0	0	0	5.5	0	0

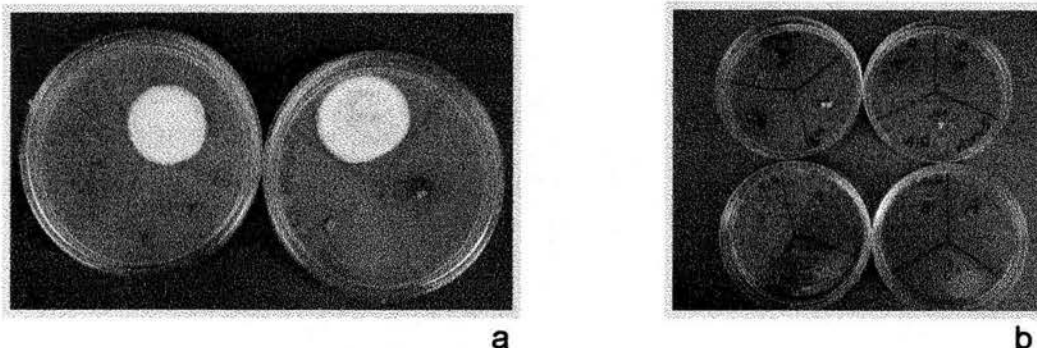
NL \*= nódulos linfáticos mesentéricos



**Figura 8. Porcentaje total de tejidos con cultivos positivos de *Paecilomyces fumosoroseus*. NL\* = nódulos linfáticos mesentéricos.**



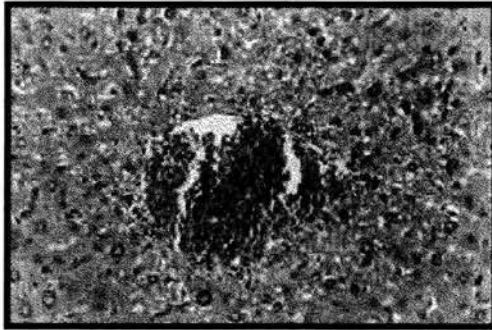
En la figura 9 se puede observar la colonia típica de *P. fumosoroseus* cubriendo el fragmento tisular o la mayor parte de él.



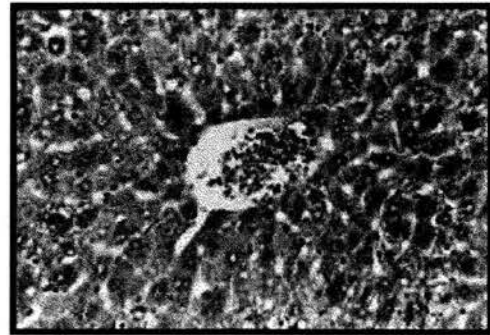
**Figura 9. Cultivos de fragmentos tisulares de ratones inoculados con el hongo viable. a) hígado con cultivo positivo. b) fragmentos tisulares con cultivo negativo.**

### Histopatología

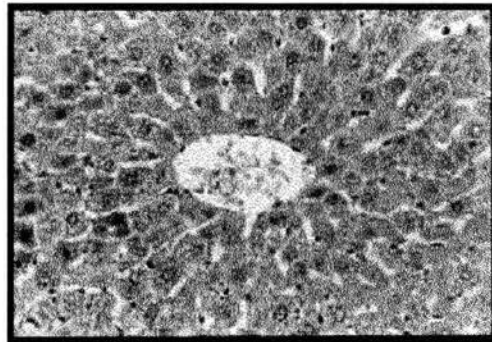
El estudio histopatológico de los órganos estudiados mostraron en general, la misma imagen normal del tejido de los órganos de los ratones testigo. En pocos casos, se observó respuesta inflamatoria, por ejemplo, en algunos ratones que mostraron inflamación en los ganglios axilares. En la mayoría de los casos, no se observó inflamación en los tejidos examinados. La Figura 10 a-c, muestra las venas centrolobulilares del hígado de un ratón inoculado con el hongo viable (Fig. 10 a), de un ratón con el hongo muerto (Fig.10 b), y de un ratón testigo (Fig.10 c), sin respuesta inflamatoria, solamente se observa el tejido normal.



a



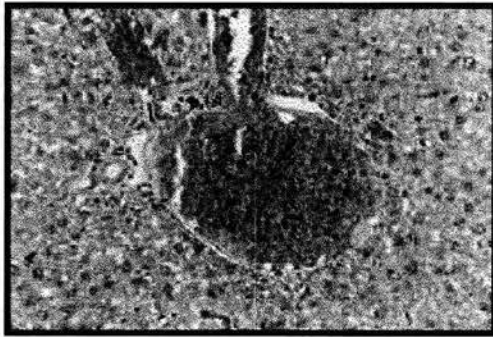
b



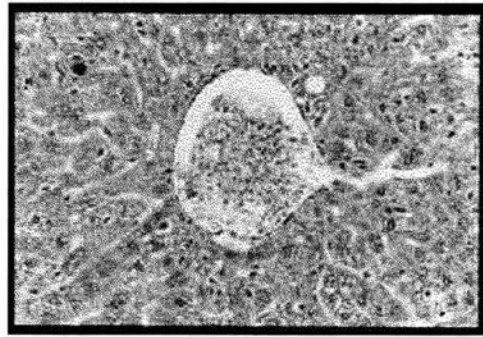
c

**Figura 10. Corte histopatológico de las venas centrolobulilares del hígado sin inflamación, de ratón inoculado con el hongo viable (a), muerto (b) y testigo (c). Tinción de HE, magnificación 100 X.**

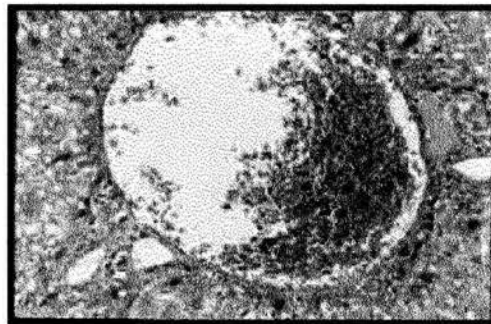
En la Figura 11, se muestran las triadas portales del hígado de un ratón inoculado con el hongo viable (Fig. 11 a), con el hongo muerto (Fig. 11 b), y de un testigo (Fig.11 c), sin respuesta inflamatoria.



a



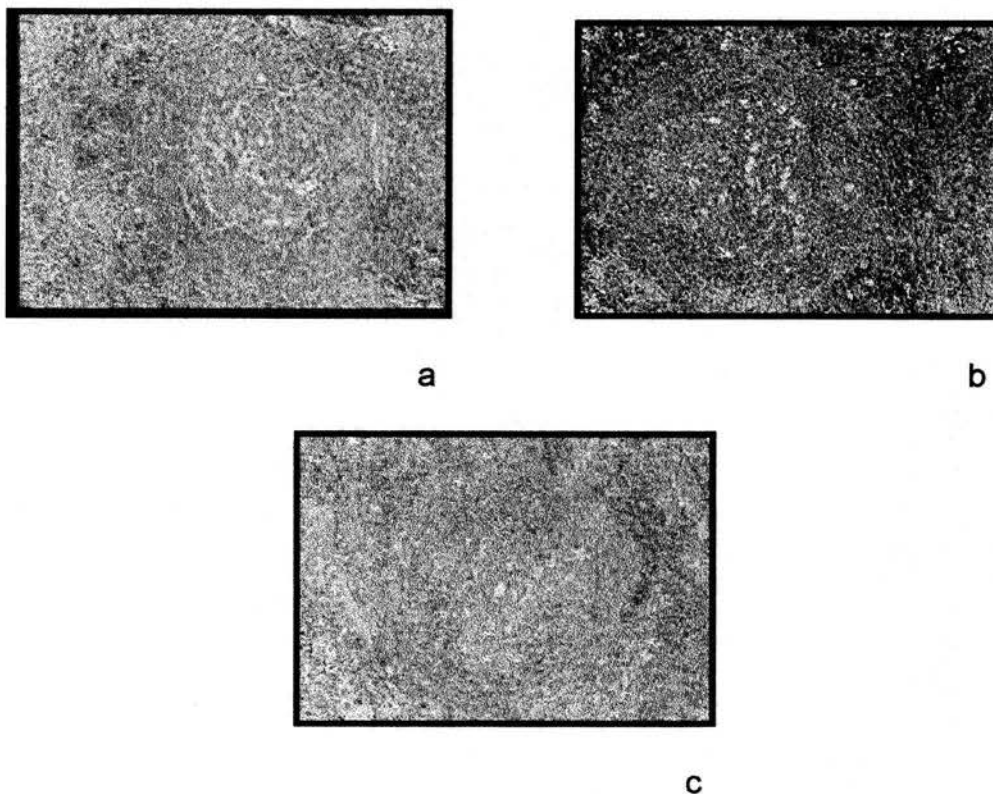
b



c

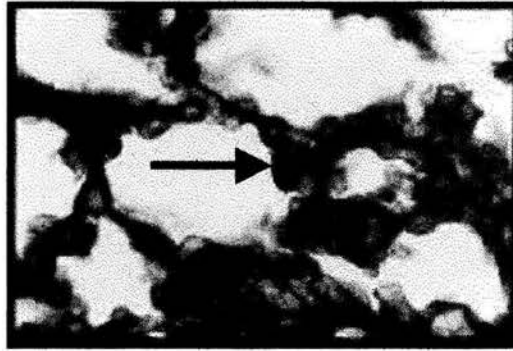
**Figura 11. Corte histopatológico de las triadas portales del hígado, sin inflamación, de ratón inoculado con el hongo viable (a), muerto (b) y testigo (c). Tinción de HE, magnificación 200X.**

En la Figura 12 se muestra la vaina linfática periarteriolar del bazo normal, con el centro germinal idéntico, lo que sugiere una activación de células T y B normales, e iguales para el tejido de ratón con hongo viable (Fig. 12 a), hongo muerto (Fig. 12 b) y testigo (Fig. 12 c).

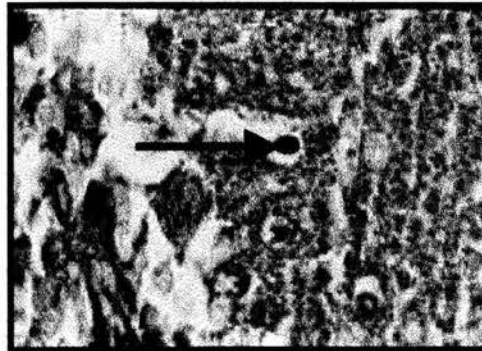


**Figura 12. Corte histopatológico de la vaina linfática periarteriolar del bazo con centros germinales idénticos, de ratón inoculado con el hongo viable (a), muerto (b) y testigo (c). Tinción de HE, magnificación 100 X**

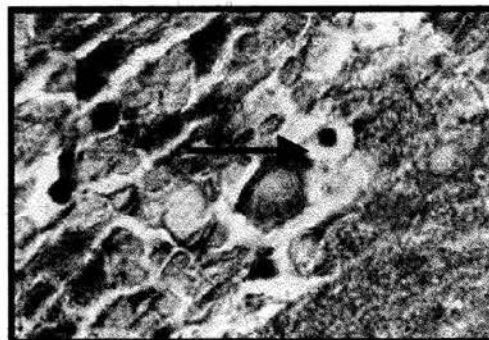
En la mayoría de los cortes examinados se observaron estructuras fúngicas en diferentes órganos de los ratones inoculados con el hongo viable y muerto, sin respuesta inflamatoria alrededor. Las estructuras fúngicas se encontraron generalmente en los intersticios del tejido. La figura 13 muestra un conidio en tejido pulmonar normal, la figura 14 muestra un cerebelo sin inflamación, la figura 15 muestra estructuras fúngicas sin reactividad del tejido nervioso alrededor, y la figura 16 muestra un conidio en tejido hepático normal.



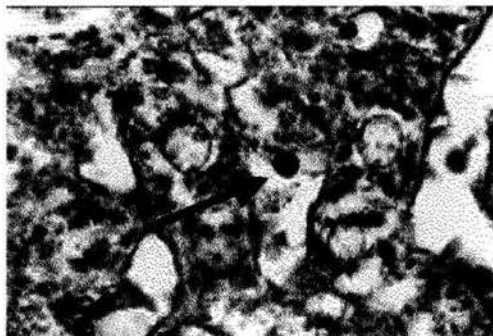
**Figura 13. Corte histopatológico de tejido pulmonar normal, de ratón inoculado con el hongo viable. La flecha indica el conidio fúngico. Tinción de Grocott, magnificación 1000 X.**



**Figura 14. Corte histopatológico de cerebelo normal, de ratón inoculado con el hongo viable. La flecha señala el conidio fúngico. Tinción de Grocott, magnificación 1000 X.**



**Figura 15. Corte histopatológico de tejido cerebral normal, sin reactividad del tejido nervioso, de ratón inoculado con el hongo viable. La flecha señala el conidio fúngico. Tinción de Grocott, magnificación 1000 X.**



**Figura 16. Corte histopatológico de tejido hepático normal, de ratón inoculado con el hongo viable. La flecha señala el conidio fúngico. Tinción de Grocott, magnificación 1000 X.**

La esplenomegalia observada en el 5.5% de los ratones inoculados con hongo viable (4 de 72) y en el 12.5% de los ratones inoculados con el hongo muerto (3 de 24) se debió a la pulpa roja congestiva con megacariocitos grandes y numerosos; sin cambios en la pulpa blanca de los centro germinales.





Recientemente el hongo *P. fumosoroseus* está registrado y está siendo desarrollado comercialmente para el control biológico de la mosquita blanca en Venezuela, Estados Unidos y México (Wraight *et al.*, 2001). La utilización de *P. fumosoroseus*, como cualquier otro agente microbiano, debe ser estrechamente monitoreado, para tomar en cuenta los riesgos a la salud que pudieran existir, en especial para los vertebrados y con consideraciones especiales a la exposición humana (Goettel *et al.*, 2001). Debido a las diferencias entre cepas, concernientes a la toxicidad (Di Paola *et al.*, 1994; Vey *et al.*, 2001) y patogenicidad (García & Gutiérrez, 1998), se llevó a cabo este trabajo con el cultivo monospórico de *P. fumosoroseus* EH-506/3 (PFCAM) de México, el cual ha mostrado una alta virulencia a la mosquita blanca (Castellanos-Moguel *et al.*, 2001; Cavallazzi *et al.*, 2002) y se está evaluando como agente microbiano en el campo agrícola.

Nuestros resultados mostraron que todos los animales utilizados fueron capaces de manejar el hongo y eliminarlo sin provocarles ningún daño. Se encontraron cultivos positivos en 15 órganos (360 muestreados) de los 72 ratones inoculados con el hongo viable durante los 21 días de duración de la prueba. En contraste, Hartmann *et al.* (1979) y Shakira *et al.* (2000), no reportan cultivos positivos de órganos de los ratones inoculados oralmente con *P. fumosoroseus*. Sin embargo, nuestros resultados si coinciden con éstos últimos autores en que tanto los animales inoculados con el hongo viable, como con el hongo muerto por calor y animales testigo no mostraron diferencias en cuanto al peso de los ratones, y consumo de alimento y agua. En trabajos previos, con otros hongos



entomopatógenos, *Erynia neoaphidis*, *Conidiobolus coronatus* (Toriello *et al.*, 1986), *Hirsutella thompsonii* (Mier *et al.*, 1989) y *Verticillium lecanii* (Mier *et al.*, 1994), inoculando ratones y cobayos por vía subcutánea e intraperitoneal, no se logró reaislar los hongos de ningún órgano. Estas diferencias en cuanto al reaislamiento del hongo, podría ser explicada por la tolerancia a temperaturas altas de *P. fumosoroseus* EH-506/3, como se observó en la curva de viabilidad a diferentes temperaturas (Fig. 4). Esta curva mostró todavía 20 UFC después de la incubación de la suspensión fúngica durante 1 h a 50 °C, 13 UFC después de 1 h a 55 °C, y aún 9 UFC después de 2 h a 55 °C.

Las alteraciones anatomopatológicas más frecuentes encontradas fueron hipertrofias de los ganglios axilares, esplenomegalia e hipopigmentación del hígado tanto en los ratones inoculados con hongo viable como con el hongo muerto por calor. En reportes previos con otros hongos patógenos de insectos (Toriello *et al.*, 1986, Mier *et al.*, 1989, 1994), las alteraciones encontradas fueron nódulos, abscesos y adherencias superficiales en el hígado, y el estudio histopatológico reveló una reacción a cuerpo extraño. Esta reacción nunca se encontró en la histopatología de los órganos estudiados en nuestro trabajo, pero las imágenes de los conidios en el hígado, bazo, pulmón, cerebro y riñón, sugieren que el microorganismo puede persistir, pero no multiplicarse. La ausencia de conidios con tubos germinativos apoyan esta sugerencia. Las estructuras fúngicas observadas en los órganos muestreados sugieren que el hongo penetró al



intestino, se diseminó por vía hematógica a todos los órganos, sin causarle ningún daño al hospedero.

La hipopigmentación del hígado observada al tercer día de la inoculación con el hongo viable y muerto por calor, probablemente es debida al tránsito fúngico en los sinusoides hepáticos que pudieran interrumpir el flujo sanguíneo. La vaina linfática periarteriolar del bazo, con centros germinales idénticos en los animales inoculados con el hongo viable, muerto por calor y testigos (Figs 12 a-c), sugieren que no existen diferencias en cuanto al desafío antigénico y a la activación normal de células T y B.

Por otro lado, se ha informado que otras especies del género *Paecilomyces*, como *P. lilacinus*, provoca infecciones cutáneas en humanos, en individuos inmunosuprimidos e inmunocompetentes (Itin *et al.*, 1998; Gutiérrez-Rodero *et al.*, 1999). Sin embargo, las infecciones fúngicas en humanos causadas por especies de *Paecilomyces* son muy raras, y generalmente ocurren en pacientes adultos con la respuesta inmune comprometida o después de implantes de cuerpos extraños (Ranjan Nayak *et al.*, 2000; Kunstyr *et al.*, 1997). En otra especie oportunistas de *Paecilomyces*, como *P. lilacinus*, puede ocurrir lo que se ha observado en hongos entomoftorales. Por ejemplo, *Erynia neoaphidis* y *Conidiobolus major* son patógenos de insectos, y al ser inoculados en ratones y cobayos, se ha demostrado su inocuidad (Toriello *et al.*, 1989). Sin embargo, otra especie, *Conidiobolus coronatus*, es causante de la rinoentomoftoromicosis en humanos (Kwon Chung & Bennet, 1992) y al ser inoculado en ratones y cobayos, desarrolla



hifas fúngicas rodeadas de una reacción eosinofílica denominada de "Splendore-Hoepli" en los tejidos estudiados (López-Martínez *et al.*, 1978), misma reacción tisular encontrada en los pacientes con rinoentomofotoromicosis.

Por definición, *P. fumosoroseus* es un entomopatógeno porque es capaz de producir daño en el hospedero, o sea una enfermedad en el insecto. Sin embargo, podemos plantear las preguntas ¿es esta especie un patógeno de mamíferos? ¿Es virulenta para los ratones (o sea que tiene la capacidad relativa para producir daño en el ratón)? Si se revisan los atributos microbianos de virulencia concernientes a este hongo cuando se inocula oralmente al ratón como en este trabajo, la respuesta sería que *P. fumosoroseus* no es un patógeno murino ya que no le causa daño al ratón. Uno de los atributos microbianos de virulencia, la toxicidad, no se manifestó en este hongo, ya que tanto los conidios viables como los muertos por calor se observaron en tejido totalmente normal como se muestran en las Figs. 13, 14 y 15, a pesar que se han reportado toxinas (beauvericina) y otros metabolitos secundarios como beauverolides y ácido piridina-2,6-dicarboxílico de *P. fumosoroseus* (Di Paola *et al.*, 1994; Roberts, 1981; Vey *et al.*, 2001). Otros atributos de virulencia, como la multiplicación tisular del microorganismo, la persistencia en el tejido del hospedero causando daño, y la adherencia tisular nunca se observaron en los ratones inoculados. De acuerdo al concepto de daño al hospedero, en la cual la interacción hospedero/microorganismo está caracterizada por la cantidad y calidad del daño al



hospedero, y la virulencia está definida como la capacidad relativa de un microorganismo para causar daño en un hospedero (Casadevall & Pirofski, 1999; Casadevall & Pirofski, 2000; Casadevall & Pirofski, 2001), *P. fumosoroseus* EH-506/3 no es patógeno o tóxico en el modelo murino utilizado.



- ❖ El medio de cultivo Sabouraud con antibióticos (SABA), mostró ser el medio óptimo para obtener la mayor cantidad de conidios de *P. fumosoroseus*, utilizado durante los experimentos.
  
- ❖ El hongo *Paecilomyces fumosoroseus* es termoresistente hasta la temperatura de 55 °C donde aún exhibió algunas UFC.
  
- ❖ *Paecilomyces fumosoroseus* EH-506/3 demostró inocuidad para los ratones de la cepa CD-1 al ser inoculados por vía oral intragástrica.

**Preparación de medios de cultivo**

A ) Medio de Sabouraud con antibióticos (Bioxón): Utilizado para el cultivo del hongo y obtención de la suspensión de conidios.

- Dextrosa	20 g
- Peptona de caseína y carne	10 g
- Cicloheximida	50 mg
- Cloranfenicol	500 mg
- Agar	15 g
- Agua	1 litro

B) Medio de Sabouraud (Bioxón): Utilizado para el reislamiento del hongo en caso de obtenerlo a partir de los órganos en estudio.

- Agar	15 g
- Dextrosa	40 g
- Peptona de carne	5.0 g
- Peptona de caseína	50 g
Agua c. b. p	1 litro

C) Medio de agar papa dextrosa (APD): Utilizado para observar las características del hongo.

Se preparó el medio con papa natural de la siguiente manera:

Se pesaron 300 g de papa, se pelaron y cortaron en cuadritos, se colocaron en un recipiente con 1 L de agua destilada y se calentaron hasta hervir. Se filtró para desechar la papa y obtener el extracto de papa. Se aforó con agua destilada agregándole 15 g de agar y 20 g de glucosa.



- ❖ Anonymous, 1981. Mammalian safety of microbial control agents for vector control: a WHO Memorandum Bull. WHO 59:857-863.
- ❖ Butt T M, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction. En: Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- ❖ Casadevall A, Pirofski L. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect. Immun. 67: 3703-3713.
- ❖ Casadevall A, Pirofski L. 2000. Host-pathogen interactions: the basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection, and disease. Infect. Immun. 68: 6511-6518.
- ❖ Casadevall A, Pirofski L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. J. Infect. Dis. 184:337-344.
- ❖ Castellanos- Moguel J, Cruz- Camarillo R, Aranda E, Mier T, Berlanga- Padilla A, Toriello C. 2002. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) sobre *Trialeurodes vaporariorum* y actividad enzimática de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* de México. In: Memorias del Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. pp.67-69.
- ❖ Cavallazzi-Vargas G, Basilio-Hernández D, Reyes-Montes M, Aranda E, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2002. Determinación de la virulencia por medio del tiempo letal medio (TLM) de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* de México en mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). In: Memorias del XXV Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Hermosillo, Sonora, nov. 14-15. pp. 144-146.





- ❖ Di Paola R, Nena S, Fornelli F, Moretti A, Logrieco A, Caiaffa M F, Bottalico A, Tursi A, Macchia L. 1994. Cytotoxicity of beauvericin on human B-lymphocyte cells lines. *Allergy Clin. Immunol. News* 2: 256.
- ❖ García J, Gutiérrez A. 1998. Impacto de *P. fumosoroseus* contra la mosca blanca *B. tabaci* en Quintana Roo. En XXI Congreso Nacional de Control Biológico. SAGAR. Tamaulipas, México. Nov 5-6. pp. 189-192.
- ❖ García- Juárez M, Ramírez C, Rivera F, Mier T. 1999. Evaluación en campo de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (West) (Homoptera: Aleyrodidae) en un cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rev. Mex. Mic.* 15:1-9.
- ❖ Goettel M S, Hajek A E, Siegel J P, Evans H C. 2001. Safety of Fungal Biocontrol Agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International, U.K., pp. 347-375.
- ❖ Goettel S M, Poprawski J T, Vandenberg D J, Li Z, Roberts D W. 1989. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents, pp. 218-219. In: Laird M, Lacey L A, Davidson E W. (eds.), *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press, Florida.
- ❖ Grocott R G. 1995. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori methenamine silver nitrate technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 25: 975-979.
- ❖ Gutiérrez-Rodero F, Moragon M, Ortiz de la Tabla V, Mayol M J, Martín C. 1999. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases* 18: 814-818.



- ❖ Hartmann G C, Wasti S S, Hendrickson D L. 1979. Murine safety of two species of entomogenous fungi, *Cordyceps militaris* (Fries) Link and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. Applied Entomology and Zoology 14, 217-220.
- ❖ Itin P H, Frei R, Lautenschlager S, Buechner S A, Surber C, Gratwohl A, Widmer A F. 1998. Cutaneous manifestation of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. J. Amer. Acad. Dermatol. 39: 401-409.
- ❖ Jackson M A, McGuire M R, Lacey A L, Wraight P S. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospore of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101:35-45.
- ❖ Kwon-Chung K J, Bennett J E. 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.
- ❖ Kunstyr I, Jelinek F, Bitzenhofer U, Pittermann W. 1997. Fungus *Paecilomyces*: a new agent in laboratory animals. Lab. Anim. 31: 45-51.
- ❖ López-Martínez R, Toriello C, Mier T, Ximénez-García C, Martínez A, Fernández-Díez J. 1978. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. Mycopathologia 66: 59-65.
- ❖ Mier T, Pérez J, Carrillo-Farga J, Toriello C. 1989. Study on the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. Entomophaga 34: 105-110.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



- ❖ Mier T, Rivera M, Rodríguez Ponce P, Carrillo Farga J, Toriello C. 1994. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 36: 107-111.
- ❖ Ranjan-Nayak D, Balakrishnan R, Nainani S, Siddique S. 2000. *Paecilomyces* fungus infection of the paranasal sinuses. Int. J. of Pediatr. Otorhinolaryngology 52: 183-187.
- ❖ Roberts D W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges, H.D. (Ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, N.Y., pp. 441-463.
- ❖ Sánchez A, Geraud-Pouey F, Esparza D. 1997. Biología de la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y potencial para desarrollar sus poblaciones sobre cinco especies de plantas hospederas. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 14: 193-206.
- ❖ Shakira Q, Naheed A, Maryam M, Qureschi Z A, Yazdana M R. 2000. Effects of entomopathogens on albino mice. Pakistan J. Scient. Industr. Res. 43: 42-45.
- ❖ Siegel J P. 1997. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals, pp.325-335. In: Lacey L. (Eds), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, New York.
- ❖ Toriello C. 2003. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete). Vedia 9-10: 107-113.



- ❖ Toriello C, Hernández Ibáñez J M, López-Martínez A, López- González L, Mier T, Carrillo J, Latgé J P. 1986. The pathogenic fungi of the spittlebug in México. III. Innocuity of *Erynia neophidis* and *Conidiobolus major* in experimental animals. *Entomophaga* 31: 371-376.
- ❖ Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez-Jacobo A, Mier T. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. *Rev. Mex. Mic.* 15: 123-125.
- ❖ Vey A, Hoagland R E, Butt T M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, TM, Jackson C, Magan N, (eds.). *Fungi as Biocontrol Agents*, CAB International, UK, pp. 311-346.
- ❖ Wraight S P, Jackson M A, de Kock S L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, TM, Jackson C, Magan, N, (eds.). *Fungi as Biocontrol Agents*, CAB International, UK, pp. 253-287.
- ❖ Zamboni L, De Marino C. 1965. Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35: 148A.