

ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio de la toxicidad/patogenicidad aguda pulmonar en ratas tratadas con *Metarhizium anisopliae*

Arturo Escobar^I, Marcio A. Gavas^{II}, Marcia R T C Ranzani^{II}, Cleide Caldas Costa^{II}, Ana Paula Peruca^{II}, Maria A. Figueredo^I, Carlos Bulnes^I, Ernesto Vega^I

^ICentro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu. ^{II}BIOAGRI Laboratórios Ltda., Rod, SP 127, Km 24, Piracicaba-SP, Brasil.

RESUMEN: *Metarhizium anisopliae* es un plaguicida microbiano y se clasifica como un hongo de la familia *Moniliaceae*. Este microorganismo ejerce un control efectivo sobre coleópteros de las familias *Elateridae* y *Curculionidae*. En el presente trabajo se evaluó la toxicidad/patogenicidad aguda pulmonar del producto *Metarhizium* PM (*Metarhizium anisopliae*) en ratas. Los animales fueron anestesiados e inoculados con una dosis de 10^8 conidios por animal con el microorganismo viable, inactivado por vía intratraqueal y comparado con grupos controles (vehículos y no tratados). Las observaciones clínicas y las evaluaciones del consumo de alimento y de agua se realizaron diariamente. El análisis microbiológico de los órganos y los estudios macro e histopatológicos se realizaron a los tiempos de 3, 7, 14 y 21 días. Al final del estudio, los grupos analizados no mostraron diferencias significativas en los pesos en cada tiempo de sacrificio; ningún animal murió durante el ensayo y los animales no mostraron síntomas clínicos evidentes. El estudio histopatológico mostró una respuesta inflamatoria aguda del pulmón en los tres grupos donde se realizó la aplicación intratraqueal, resultó más severa en el grupo con el microorganismo viable y disminuyó la gravedad hasta el grupo control. Estas lesiones severas disminuyeron durante el ensayo y a los 21 días se mostró una recuperación del tejido, con solo acumulaciones focales de linfocitos. No existió germinación del hongo en ninguno de los órganos analizados al final del experimento. Los resultados obtenidos no muestran patogenicidad ni toxicidad severa del producto *Metarhizium anisopliae*, cuando es administrado a las ratas en una única dosis por vía intratraqueal.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, ratas, intratraqueal, toxicidad.

Study of the acute pulmonary toxicity/pathogenicity in rats treated with *Metarrhizium anisopliae*

ABSTRACT: *Metarhizium anisopliae*, a fungus belonging to the family *Moniliaceae*, is a microbial pesticide effectively used to control coleopterans of the families *Elateridae* and *Curculionidae*. The acute pulmonary toxicity/pathogenicity of the product *Metarhizium* PM (*M. anisopliae*) was evaluated in rats. The animals were anesthetized and intratracheally inoculated with 10^8 conidia per animal of the viable and inactivated microorganism and compared with the control groups (vehicles and untreated animals). Clinical observations and evaluation of food and water intake were carried out daily. The microbiological analysis of organs and the macro and histopathological studies were carried out at days 3, 7, 14 and 21. At the end of the study, the groups did not differ in their weights at each sacrifice time; no animal died during the test or showed evident disease clinical symptoms. The histopathological examination showed an acute inflammatory response of the lung in the three groups where the intratracheal application was carried out, which was more severe in the group with the viable microorganism and decreased in severity in the control group. The severe lesions decreased during the test and, at day 21, the tissue recovery, with only focal accumulations of lymphocytes, was observed. No fungal germination was found on any of the organs examined at the end of the experiment. The results showed no pathogenicity or severe toxicity of the *Metarhizium*-based product when administered in a single dose to rats intratracheally.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, rats, intratracheal, toxicity.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los agentes de control biológico (ACB) se reconocen como una de las áreas principales de investigación y son un componente importante en las iniciativas de agricultura sostenible de varias instituciones y organizaciones para preservar los recursos naturales y el medio ambiente para las futuras generaciones (1, 2).

De manera general, los especialistas coinciden en que los hongos entomopatógenos tienen una especificidad de huéspedes, por lo que pueden considerarse inocuos para el hombre, plantas, vertebrados e invertebrados. Sin embargo, este carácter debe ser evaluado con la realización de una serie de estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (3, 4). Regulaciones de la Unión Europea y de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), exigen para la explotación comercial de estos productos, los ensayos de toxicidad/patogenicidad aguda oral y aguda pulmonar (5, 6, 7).

Existe un número considerable de hongos y bacterias antagonistas de nematodos que exhiben potencialidades para el control biológico. Dentro de los organismos evaluados, *Metarhizium anisopliae* ha demostrado ejercer un control efectivo sobre coleópteros de las Familias *Elateridae* y *Curculionidae* en numerosos experimentos de laboratorio y de campo (8, 9). Múltiples cepas de *M. anisopliae* se comercializan con la finalidad de causar enfermedades en los insectos que actúan como plagas en los diferentes cultivos; entre ellas se encuentra la cepa F52, que afecta principalmente a larvas de escarabajos (10). La EPA ha confirmado que el hongo *M. anisopliae* y sus toxinas, provenientes de la cepa F52, son seguras para el ser humano, y su toxicidad se clasifica en la categoría III (11); sin embargo, cuando las personas están inmunodeprimidas se ha reportado la infectividad del hongo (12, 13, 14).

La introducción de una nueva cepa del hongo *Metarhizium anisopliae* como ACB para su comercialización, requiere de la información toxicológica para su ubicación en el grupo de riesgo correspondiente, por lo que fue objetivo del presente trabajo obtener una información inicial sobre la evaluación de riesgo del producto, a través de la determinación de la toxicidad, patogenicidad e infectividad de *M. anisopliae* después de una sobredosis aguda pulmonar en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metarhizium PM es un producto comercializado por una empresa brasilera, aislado de la cepa IBCB-10, con una concentración de $1,76 \times 10^{10}$ por gramo de masa conidial y una viabilidad de 89,6%.

Preparación del microorganismo viable: Se preparó una suspensión de $2,0 \times 10^8$ conidios ml^{-1} y se colocó en una placa de Petri por un periodo de 48 h a 25°C. Seguidamente se adicionaron 2 ml de la suspensión de los conidios hidratados a un tubo estéril con 10 ml del diluyente (polisorbato 80 al 0,01%, p/v en agua) y se agitó durante cinco minutos hasta alcanzar una completa homogenización. La viabilidad se determinó por el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC ml^{-1}) empleando un medio de Batata Dextrose Agar (BDA) (Difco laboratorios) suplementado con cloranfenicol al 0.05% (Merck).

Preparación del microorganismo atenuado e inactivado: Una vez obtenido el producto viable, los conidios fueron atenuados o inactivados por autoclave. En un ciclo de 30 minutos a 121°C se obtiene un microorganismo atenuado, mientras que con dos ciclos, en las mismas condiciones, se inactiva en su totalidad (microorganismo inactivado).

Ensayo de toxicidad, infectividad y patogenicidad aguda pulmonar: Para este ensayo se utilizaron 96 ratas Wistar (*Rattus Norvegicus*) clínicamente sanas (48 de cada sexo). Las hembras fueron nulíparas y no grávidas y el peso de las ratas no excedió $\pm 20\%$ de la media del peso para cada sexo.

Los animales se colocaron individualmente en cajas de polipropileno con cobertura de malla metálica y en su interior se puso viruta de madera esterilizada (121°C por 30 minutos). Las condiciones ambientales fueron controladas manteniendo una temperatura y humedad relativa entre 22 ± 3 °C y 30 a 70%, respectivamente, acorde para la especie de roedores; se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad con una frecuencia de 12/12 horas y una ventilación de 10 a 15 cambios de aire/hora.

El suplemento de agua y comida se controló y fue de libre acceso. El pienso utilizado fue de tipo comercial paletizado (Guabi Nutrilabor; Marca: Mogiana Alimentos S.A.) para ratas (se suministró 25 g/animal/día). El agua que se utilizó fue calidad potable y la misma se acidificó con ácido clorhídrico hasta que el pH osciló

entre 3,3-3,5 (100 ml/animal/día en biberones de 500 ml con pipetas de acero inoxidable). Durante el ensayo, tanto el alimento como el agua, se esterilizaron por autoclave.

Número de animales:

Se conformaron 5 grupos experimentales:

Grupo A: 15 machos y 15 hembras, inoculados con el microorganismo.

Grupo B: 15 machos y 15 hembras inoculados con el microorganismo atenuado.

Grupo C: grupo control con 15 machos y 15 hembras inoculados con polisorbato 80 0,01%p/v.

Grupo D: grupo control no tratado, con seis machos y seis hembras, de los cuales tres de cada sexo se mantendrán en la caja de animales tratados (como control de infección de un animal a otro).

Grupo E: 15 machos y 15 hembras con el microorganismo inactivado.

La inoculación de la suspensión de conidios en los animales, previamente anestesiados, se realizó por vía intratraqueal por intubación (15), con una dosis única de 0.5ml con 10^8 UFC por animal, resuspendido en una solución de Polisorbato 80 en agua al 0,01%. La muestra inactivada mantuvo la misma concentración del inoculo.

Observación de los animales: El examen clínico de todos los animales se realizó diariamente durante 21 días; se observó si se producían cambios en los ojos, las mucosas, la piel, el sistema respiratorio, los patrones de conducta, la actividad motora y la presencia de temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma. Los animales se pesaron individualmente antes de comenzar el tratamiento y a los días 3, 7, 14 y 21. Los animales consumieron agua y comida diariamente, durante el ensayo. El sacrificio se realizó mediante la exposición con dióxido de carbono en los tiempos 0, 3, 7, 14 y 21 días postinoculación.

Para el análisis hematológico, la toma de la muestra de sangre se realizó por la vena óptica con un capilar de hematocrito, con el animal previamente anestesiado con tiopental sódico; se empleó una dosis de 50 mg/kg PC a través de la vía intraperitoneal. La sangre se recogió en tubos de 2 ml con anticoagulantes (EDTA). Se utilizó un contador electrónico de células sanguíneas (CELM CC 550) para la determinación de la serie roja y blanca. El conteo diferencial de leucocitos se realizó por microscopía óptica directa.

La evaluación de la infectividad y persistencia del microorganismo se determinó por la presencia del hongo en los órganos y fluidos biológicos de cada animal (pulmón, hígado, riñones, contenido fecal y sangre) tomando la muestra en el momento del sacrificio. En el tiempo cero se evaluó la recuperación del microorganismo en el pulmón de los tres primeros animales de cada sexo, en cada uno de los grupos. La eliminación del hongo se realizó a partir de las heces fecales de tres hembras y tres machos tratados posterior a su administración, a los tiempos de 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 240 horas.

Para el estudio morfológico, se realizó el examen macroscópico de los órganos antes mencionados con los cortes correspondientes en cada uno; los mismos se conservaron en formol neutro hasta su análisis histológico.

Método estadístico: Los datos correspondientes a los pesos fueron analizados con el programa estadísticos SAS versión 6.0 y el STATISTICA versión 5.1, aplicándose la prueba de homogeneidad de varianzas y, posteriormente, la prueba de Test de Duncan para $p < 0,05$. En el análisis de los resultados hematológicos se empleó un procedimiento no paramétrico utilizando la prueba de Kruskal Wallis y, en caso de significación, la prueba de comparación de media.

RESULTADOS

Evaluación del producto *Metarhizium anisopliae* PM y niveles de dosis

El producto *Metarhizium* PM tiene una concentración de $5,0 \times 10^{10}$ conidios por gramo. La caracterización físico-química de los productos ensayados presentaron un pH de 6,8 y la suspensión de conidios, donde está presente el hongo, fue de color verde. La concentración del microorganismo viable en medio con BDA y BDA con cloranfenicol fue de $2,9 \times 10^8$ y $2,1 \times 10^8$ UFC ml⁻¹, respectivamente. Los microorganismos atenuados e inactivados mostraron valores de 50 y menores de 10 UFC ml⁻¹, respectivamente.

Observación clínica de los animales

No se observaron cambios o alteraciones relevantes en el sistema nervioso central y autonómico, actividad somato motora, patrón de conducta, sistema respiratorio, ojos y membranas mucosales. Con respecto a la piel y los pelos, se observó un erizamiento generalizado en todos los grupos durante el ensayo. Un total de 10 animales mostró inapetencia durante el ensayo, indistintamente distribuida en los diferentes grupos.

Durante el tiempo de estudio se observó un incremento gradual del peso en todos los grupos del ensayo para ambos sexos. El peso de los animales osciló, a los 21 días, entre 207-356 g, con una ganancia entre 20-80 g, lo que se corresponde con el peso de ratas adultas para ambos sexos.

Los resultados obtenidos de los hemogramas de la serie roja y blanca se muestran en las Tablas 1 y 2,

respectivamente, para cada grupo y por los tiempos de sacrificios.

Evaluación microbiológica

En la Figura 1 se observa el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* a partir de los extractos de pulmones de los grupos A, B, C y E, donde fue aplicado intratraquealmente, en el tiempo cero.

TABLA 1. Valores de hemoglobina obtenidos para ratas machos y hembras al inicio y al final del ensayo de toxicidad/infectividad/ patogénicidad aguda pulmonar con *Metarhizium anisopliae*./ *Hemoglobin values obtained for male and female rats at the beginning and end of the acute pulmonary toxicity/infectivity/pathogenicity test with Metarhizium anisopliae.*

Hemoglobina (g/DL)	Tiempo Cero		Tiempo 21 días	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
GRUPO A	14,91±2,48	16,06±1,22	16,63±0,25	15,8±0,26
GRUPO B	14,91±2,48	16,06±1,22	17,73±0,50	16,67±1,36
GRUPO C	14,91±2,48	16,06±1,22	17,89±1,81	15,53±0,06
GRUPO D	14,67±1,8	14,13±11,17	16,78±0,81	16,07±0,61
GRUPO E	16,18±0,84	16,22±0,53	16,33±0,55	16,13±0,45

* no existen diferencias significativas por grupo (p<0,05)

TABLA 2. Valores hematológicos de la serie blanca obtenidos para ratas machos y hembras al inicio y al final del ensayo de toxicidad/infectividad/ patogénicidad aguda pulmonar con *Metarhizium anisopliae*./ *Haematological values for white series obtained for male and female rats at the beginning and end of the Acute pulmonary Toxicity/Infectivity/Pathogenicity test with Metarhizium anisopliae.*

Machos	tiempo Cero	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
		Tiempo 21 días				
Leucocitos mm ³	4388±1901	6700±1562	7633±1357	9766±2983	6933±1184	5830±750
Neutrófilos %	13,22±4,58	15,84±61	24,66±13,51	22±3	18,33±1,53	22±3,61
Linfocitos %	80,33±5,4	79,5±10,61	70±4,0	69,67±3,51	75,67±0,58	72,33±3,79
Monocitos%	4,89±2,26	3,66±0,58	4,33±0,58	6,0±3,3	4,0±1,0	4,33±1,53
Basófilos%	0	0	0	0	0	
Eosinófilos%		1±0	1±0	2,33±0,58	1,67±1,15	1,33±0,58
Hembras	tiempo Cero	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
		Tiempo 21 días				
Leucocitos mm ³	3128±807	6533±1000	6633±1266	6333±3028	6700±264,58	4270±900
Neutrófilos %	30,85±15	15,0±2,65	25,33±13,16	22,33±8,14	15,67±5,51	30,0±8,0
Linfocitos %	59,71±2,41	77,33±3,05	66,33±11,24	68,33±6,65	78,00±4,58	63,67±9,71
Monocitos%	8,14±2,4	4,66±0,57	5,66±0,58	6±2	4,67±1,15	4,0±1,0
Basófilos%	0	0	0	0	0	0
Eosinófilos%	1,29±0,49	2±1	2,66±2,08	3,33±0,58	1,67±1,15	2,33±2,31

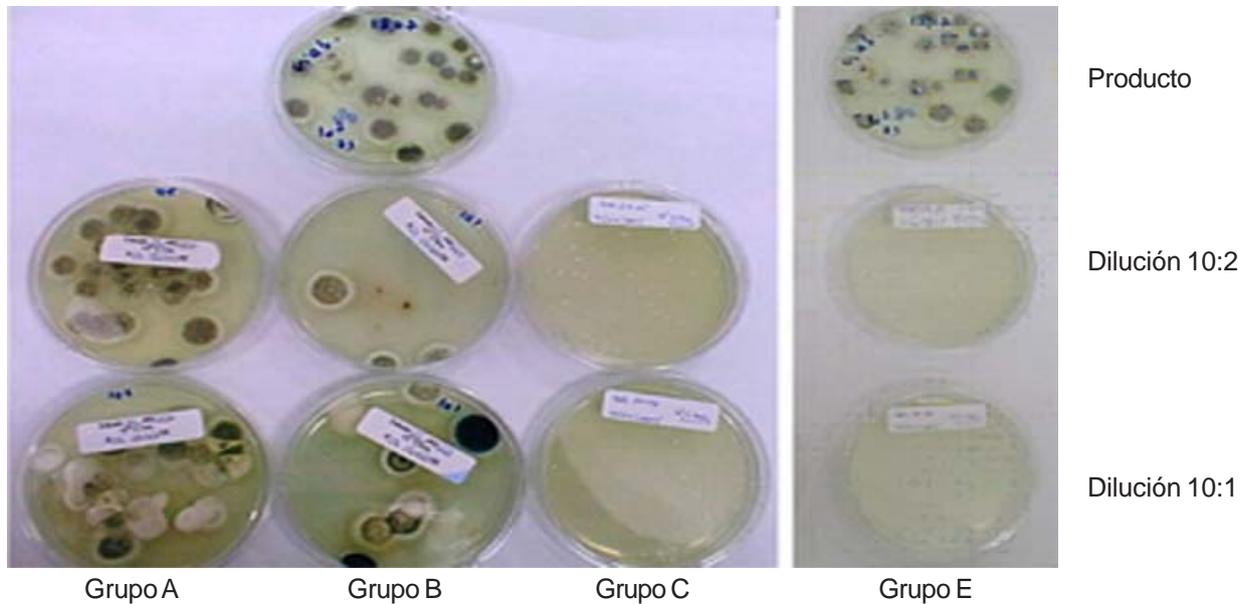


FIGURA 1. Presencia de *Metarhizium anisopliae* en los extractos de pulmones de los grupos A, B, C y E aplicado intratraquealmente en el tiempo cero. / Presence of *Metarhizium anisopliae* applied intratracheally at time 0 in lungs extracts of the groups A, B, C and E.

Leyenda: En la primera fila se encuentra el Producto técnico; de izquierda a derecha por columna en las filas dos y tres:

- 1-Grupo A: *Metarhizium anisopliae* viable.
- 2-Grupo B: *Metarhizium anisopliae* atenuado.
- 3-Grupo C: Vehículo empleado, Polisorbato 80 (0,01% p/v).
- 4- Grupo E: *Metarhizium anisopliae* Inactivado.

Se obtuvo un recobrado de *Metarhizium anisopliae* en el pulmón en el tiempo cero de $6,98 \pm 1,84 \cdot 10^6$, mientras que en el producto atenuado, el recobrado fue $1,96 \pm 1,32 \cdot 10^2$. Este último resultado corroboró que con la aplicación de un solo ciclo no se alcanzó el 100% de inactivación. Los pulmones de los animales correspondientes al grupo donde se aplicó dos ciclos de 30 minutos a 121°C se corroboró que *Metarhizium anisopliae* se inactivó el 100%.

En la dinámica puntual de la excreción del hongo *Metarhizium anisopliae* en los tiempos de sacrificio, se observó que, después de los tres y siete días de aplicado el producto, no aparece microorganismo viable en los extractos de los pulmones en los grupos A y B. La eliminación de *Metarhizium anisopliae* en las heces presentó el máximo de excreción entre 12 y 24 h para la mayoría de los animales del grupo A (Figura 2) y después de 96 h no existió crecimiento del hongo.

De un total de 450 muestras entre órganos y fluidos biológicos, correspondientes a los 90 animales en estudio, se halló la presencia del *Metarhizium anisopliae* viable en 15 muestras (pulmones, riñones y contenido fecal) entre tres y siete días.

Evaluación patológica

El análisis macroscópico en los diferentes grupos de ensayos mostró, de forma generalizada, lesiones severas con hemorragia en los pulmones de la mayoría de los animales de los grupos donde se aplicó el producto directamente. También se encontró riñones pálidos en algunos de los animales y placas peyers en el intestino delgado. Los resultados obtenidos por microscopia corroboran los resultados encontrados en la necropsia, donde los órganos más afectados en el estudio fueron el pulmón y el bazo. Un resumen de las lesiones microscópicas y el grado de afectación de cada grupo del ensayo se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

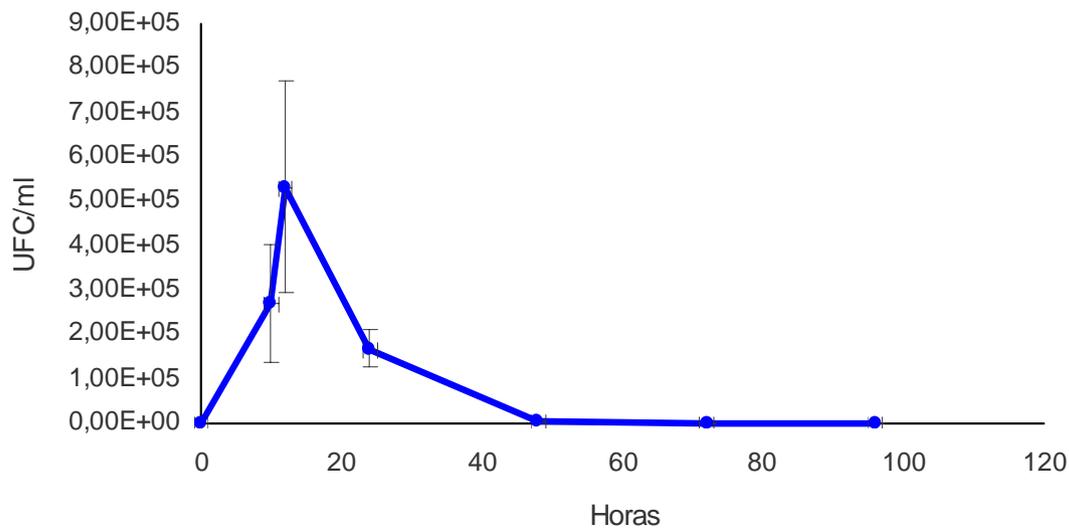


FIGURA 2. Dinámica de aclaramiento del *Metarrhizium anisopliae* en heces de ratas (grupo A)./ *Clearance dynamics of Metarrhizium anisopliae in feces of rats (group A).*

DISCUSIÓN

Evaluación del producto *Metarrhizium PM* y niveles de dosis

Las características técnicas del producto *Metarrhizium PM* ($5,0 \times 10^{10}$ conidios por gramos y un poder germinativo de $76,8 \pm 1,7\%$) están dentro de las especificaciones de calidad del mismo, que puede oscilar hasta el 15% del valor del mismo.

Con el empleo de un medio de Batata Dextrosa Agar suplementado con y sin cloranfenicol presentó el mismo poder germinativo, sin diferencia significativa ($p < 0,05$). El empleo de este medio de cultivo con cloranfenicol ha sido usado por otros estudios para la identificación de *Metarrhizium spp.* para evitar el crecimiento bacteriano durante el cultivo de tejidos (16,17).

El protocolo de la EPA plantea que se debe usar un grupo inactivado al 100% para corroborar los mecanismos de acción que pueda provocar la toxicidad del agente estudiado. En nuestro caso, la primera variante empleada en la inactivación mostró no ser efectiva, ya que mantuvo la viabilidad del hongo en un valor de 50 UFC ml^{-1} ; esto se confirmó, además, en los estudios de eliminación, por lo que fue necesario hacer dos ciclos de 30 minutos a 121°C para lograr el 100% de inactivación. La presencia de microorganismo viable, después del primer ciclo de inactivación, puede ser debido a tolerancia térmica del hongo. En un estudio

realizado con un hongo entomopatógeno (*Paecilomyces fumosoroseus*) empleando diferentes variantes de inactivación, se informó que después de 2 horas a 55°C , aparecen 9 UFC (18); en otros estudios donde se utilizan diferentes condiciones de luz e incubación con cepas de *Metarrhizium anisopliae* y *Aspergillus nidulans*, tampoco se alcanzó el 100% de inactivación (19).

A pesar de que la concentración del producto era muy baja (0,001%) con respecto al valor inicial, este se mantuvo en el diseño y se denominó *Metarrhizium anisopliae* atenuado (MA- atenuado o grupo B), mientras que el grupo inactivado al 100% lo denominamos MA inactivado (grupo E). El grupo del microorganismo viable (grupo A) presentó la concentración exigida para este tipo de ensayo; sin embargo, en el vehículo (grupo C) no había presencia de hongo en su formulación.

En otros estudios donde se evalúan productos biológicos, se obtienen las conidias a partir del medio en una solución de Polisorbato 80 al 1% y antes de la inoculación en el animal, la suspensión de conidias es centrifugada y el residuo sólido se resuspende en una solución salina estéril para su inoculación (16, 20). En nuestro caso se empleó directamente la solución de Polisorbato al 0,01%, ya que en estudios preliminares donde se aplicó el vehículo, los animales a las 72 horas estaban totalmente recuperados del proceso de estrés al cual fueron sometidos durante la inoculación.

TABLA 3. Resumen de lesiones microscópica de cada grupo del ensayo de infectividad /toxicidad /patogenicidad aguda pulmonar en ratas tratadas con *Metarhizium anisopliae*./ *Summary of the microscopic lesions in each group of the acute pulmonary toxicity/ infectivity /pathogenicity test in rats treated with Metarhizium anisopliae.*

Grupo	Tiempo de sacrificio Día 3	Tiempo de sacrificio Día 7
A	Pulmón: Bronconeumonía intersticial (4/5) Bazo: Hiperplasia linfoidea (2/5) y congestionado Hígado: Degeneración vascular difusa (1/5) Intestino: Hiperplasia linfoidea y Placas Peyer`s (1/5)	Pulmón: Bronconeumonía intersticial (5/6) y Granulomatosa (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea (1/6) Intestino: Hiperplasia linfoidea y Placas Peyer`s (1/6)
B	Pulmón: Bronconeumonía intersticial (3/6), Peribronquitis con neumonía intersticial focal (2/6) e hiperplasia linfoidea Bazo: Hiperplasia linfoidea (5/6) Hígado: Ectasia focal (1/6) Intestino: Hiperplasia linfoidea y placas Peyer`s (1/6)	Pulmón: Peribronquitis con neumonía focal (5/6) e neumonía intersticial severa (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea (5/6) Hígado: Ectasia focal (1/6) y congestionado (1/6) Riñón: Nefrosis progresiva con mineralización focal (1/6) Intestino: Hiperplasia linfoidea y placas Peyer`s (1/6)
C	Pulmón: Peribronquitis focal pequeña (5/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea (5/6) Hígado: Ectasia focal (2/6) Intestino: Hiperplasia linfoidea y placas Peyer`s (1/6)	Pulmón: Peribronquitis focal pequeña (2/6), Neumonía intersticial ligera (1/6) y Bronconeumonía purulenta (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea (6/6) Hígado: Ectasia focal (3/6) y hematopoyesis extramedular (2/6) Intestino: Inflamación catarral (1/6)
D	NS	NS
E	NS	NS
Grupo	Tiempo de sacrificio Día 14	Tiempo de sacrificio Día 21
A	Pulmón: Bronconeumonía intersticial focal (5/6) Foco peribronquial intersticial y fibrosis focal con abundantes neutrófilos (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (1/6) Riñón: Hidronefrosis (1/6)	Pulmón: Bronconeumonía intersticial ligera (5/6), con inflamación granulomatosa (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (2/6) Riñón: Hidronefrosis (1/6) Intestino: Enteritis catarral
B	Pulmón: Bronconeumonía peribronquial intersticial con abundantes linfocitos (4/6), Neumonía purulenta con absceso (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (5/6)	Pulmón: Bronconeumonía peribronquial intersticial (6/6) con abundante linfocitos (3/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (4/6)
C	Pulmón: Peribronquitis focal fibrosa (1/5), linfocitos (3/5) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (2/5)	Pulmón: Peribronquitis focal, linfocitos (4/6), Bronconeumonía purulenta (1/6) Bazo: Hiperplasia linfoidea ligera (3/6), Riñón: Hiperplasia renal tubular simple, (1/6)
D	Pulmón: Peribronquitis focal linfocitos (4/6), Bronquiolititis purulenta mucosa (1/6) Intestino: Hiperplasia y placas Peyer`s (2/6)	Pulmón: Peribronquitis focal, linfocitos (1/6)
E	NS	Pulmón: Bronconeumonía intersticial con inflamación granulomatosa (3/6), Bronconeumonía peribronquial intersticial (2/6); Bronconeumonía intersticial (1/6)

NS: no sacrificio

TABLA 4. Resumen del número de animales y el grado de la lesión en los pulmones por grupo y tiempo de sacrificio./ *Summary of the number of animals and degree of lung injury per group and sacrifice time.*

GRUPOS	Día 3	Día7 s	Día14	Día 21
A	5***	6***	3* 2**	5*
B	2* 2**	3*	4* 1**	5* 1**
C	3*	1*	1*	1*
D	NS	NS	1*	
E	NS	NS	NS	2* 4**

NS: no sacrificio *** Severa ** Moderada * Ligera

Total de animales sacrificados por grupo: 6 por día de sacrificio

Evaluación clínica y síntomas de toxicidad

Al final del estudio, en los pesos de los animales de cada uno de los grupos ensayados no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). El consumo de alimento y agua para la especie *Norvegicus* osciló entre 15-30 g/a/d y 24-60 ml/a/d, respectivamente, independiente del grupo, lo que corresponde con esta especie (21).

Durante el estudio, todos los animales presentaron erizamiento, incluso los controles que no fueron tratados, por lo que este síntoma no se debe al producto, sino a un estado general de estrés de los animales.

A los 21 días no existió diferencia significativa en la hemoglobina de ninguno de los grupos (Tabla 1). Al no existir anemia, el resto de las variables de la serie roja, hematocrito, concentración de hemoglobina corpuscular media, entre otros, no se expresaron porque carecen de importancia desde el punto de vista de interpretación diagnóstica.

El resultado de los leucogramas muestra, que no hay diferencia significativa ($p < 0,05$) para cada uno de los indicadores, al inicio y al final del ensayo, por grupo de análisis. Existió una leucopenia de forma generalizada en los grupos A, B y C hasta los 7 días (datos no mostrados); a partir de ese tiempo hay una recuperación de los valores de leucocitos. Lo mismo sucede con los linfocitos, donde al final del ensayo existe un incremento en la mayoría de los grupos para cada sexo, lo que demuestra que existe un proceso recuperativo en los animales. No sucede así con los monocitos, que durante todo el ensayo los valores en porcentaje están por encima del valor de referencia (machos 0-0,65/0,1; hembras 0-1,8/1; (22, 23) pero esta alteración ya estaba presente al inicio del experimento. Los eosinófilos aumentaron en el tiempo, lo cual da una idea de un proceso alérgico en los animales que pue-

de ser debido a la presencia de histamina liberada por la degradación de mastocitos presente en los pulmones, producto de un cuadro neumónico. Otros estudios han demostrado que los mastocitos presentan un rol principal en los estados alérgico e hipersensibilidad en procesos donde está implicado una inflamación crónica (24, 25).

La leucopenia y la alteración del indicador de monocitos ya estaba presente en los animales al inicio del experimento, como se demostró en el tiempo cero de sacrificio, lo que podemos decir que la presencia del hongo *Metarrhizium anisopliae* no afectó los valores hematológicos de la serie roja y blanco durante el ensayo.

Evaluación microbiológica

Los aislados el hongo en los diferentes extractos de pulmones (Fig. 2) correspondieron con la morfología descrita para *M. anisopliae*, donde las colonias son inicialmente blancas y en el tiempo estas se tornan de un color verde oscuro; estos resultados coincidieron con los obtenidos en otros medios elaborados a partir de Sabouraud dextrose agar (14).

Los resultados del recobrado de *M. anisopliae* en los pulmones en el tiempo cero post inoculado, mostraron valores en el orden de 10^6 UFC g^{-1} ; este bajo recobrado se debe al proceso de extracción del hongo que se realizó de forma manual hasta lograr un homogenado semi sólido; sin embargo, se observó bien la presencia del hongo en los diferentes grupos ensayados.

A los tres y siete días de post inoculado, el hongo en los pulmones, ya no había presencia del hongo viable en los grupos A y B, esto concuerda con los resultados obtenidos en la eliminación del microorganismo en las heces donde a las 190 horas ya se había elimi-

nado totalmente. El máximo de excreción del microorganismo en los animales oscila entre las 12 y 24 horas. Estudios realizados de toxicidad patogenicidad aguda oral para este microorganismo, después de las 24 horas, no presentó más excreción (20). Otro microorganismo entomopatógeno, donde se ha evaluado la toxicidad por vía oral a las 24 horas, presentaba un promedio de recobrado en las heces en el orden de 10^2 UFC g^{-1} (26). En nuestro caso, el valor medio de recobrado en las heces fue $1,6 \times 10^5$ UFC g^{-1} , muy superior al encontrado por ellos; esto puede ser debido al sistema de muestreo empleado y la forma de aplicación.

No se encontró la presencia del microorganismo en ninguno de los órganos y fluidos biológicos analizados a partir de los 14 días en los animales tratados, ni en los animales centinelas que se encontraban junto con los tratados para estudiar posible infectividad de un animal a otro. En todo el estudio solo se encontró el microorganismo viable en dos muestras de riñones en los tiempos de tres y siete días y en todos los pulmones de esos sacrificios. Estos resultados se encuentran dentro de los niveles de aclaramiento del microorganismo encontrado por otros autores y no existe replicación del mismo. Un estudio realizado con *M. anisopliae* por vía oral reportó un solo animal que murió con replicación del hongo en el pulmón, el hígado y el nódulo linfoide de un total de 72 animales inoculados (20). Otros estudios, donde evaluaron hongos entomopatógenos por vía oral e intraperitoneal, mostraron bajos porcentajes de órganos con presencia del microorganismo sin replicación del mismo (16, 26, 27).

Evaluación patológica e histopatológica

Los resultados obtenidos por microscopia muestran que los órganos más afectados en el estudio fueron el pulmón y el bazo, lo que corrobora los resultados hallados en la necropsia. Algunos animales mostraron lesiones en otros órganos pero en menor grado (Tabla 3). Las muestras de pulmón de los grupos A, B, y C mostraron una respuesta inflamatoria aguda que fue severa en el grupo A y fue disminuyendo la gravedad hasta el grupo C. Es posible observar, además, cómo van disminuyendo también el desarrollo de estas lesiones con el tiempo de sacrificio hasta culminar en los 21 días.

La lesión pulmonar se caracterizó por una bronconeumonía intersticial, con engrosamiento de los septos alveolares debido a la acumulación de macrófagos, linfocitos, algunos neutrófilos de forma general (28). Se produjo una hiperplasia de los neumocitos tipo II que ocupaban la luz alveolar apareciendo como células grandes con citoplasma claro.

Numerosas células de diversos tipos aparecieron en los bronquios y bronquiolos, los cuales estaban afectados también por la infiltración de células inflamatorias en la periferia, intersticio y epitelio (29). Focos de granulomas característicos, sin necrosis, fueron observados, algunos con presencia de células gigantes y otros con células y cuerpos extraños dentro de los cuales se observaron estructuras fagocitadas. Esta respuesta se produjo por la entrada de sustancias extrañas al órgano de una forma directa a través del uso de la vía intratraqueal, no solamente por la aplicación del hongo, ya fuera activado o atenuado, sino también por el contenido de grasa del vehículo, lo que se manifestó por gran número de macrófagos con aspecto espumoso. Estos resultados (Tabla 4) nos dan la posibilidad de apreciar cómo van evolucionando esas lesiones pulmonares hacia la reparación, donde en un inicio fueron severas. Esta seguridad en la descripción es posible por la reducción de esas áreas neumónicas hasta el nivel peribronquial para quedar ya a los 21 días en solo acumulaciones focales de linfocitos (30).

Pocos animales mostraron escasa proliferación de tejido conectivo cuando se sacrificaron a los 14 y 21 días, lo cual puede sugerir que los animales lograron una reparación del tejido dañado, aunque se observaron granulomas que sí se corresponden con inflamación proliferativa de tipo específica. Se describe que no necesariamente estos tipos de neumonías intersticiales progresan a la forma crónica, pero en este caso existían estructuras fúngicas, cuerpos extraños y grasas, introducidas en el aparato respiratorio que generaron el desarrollo de esos granulomas como mecanismos de defensa (30).

Algunos animales del grupo B (3 animales) y grupo C (2 animales) presentaron contaminación bacteriana, apreciable por la presencia de neumonía purulenta bien definida. Estos resultados pueden estar relacionados con problemas inmunológicos individuales en los animales, que permitió la entrada de agentes bacterianos a nivel pulmonar y desencadenar ese cuadro. En este sentido algunos autores (31) plantean la participación de microorganismos propios de la flora normal que colonizan la mucosa bronquial y el parénquima pulmonar y llegan a desarrollar estos cuadros neumónicos si las defensas orgánicas se encuentran dañadas.

La presencia de hemorragia en los pulmones de los animales tratados con el microorganismo viable e inactivado puede estar relacionada con la forma de sacrificio. Muy pocos estudios evalúan la infectividad, toxicidad y patogenicidad aguda pulmonar de agentes microbianos, lo que no permite hacer un análisis crítico.

co; sin embargo, múltiples ensayos de agentes químicos en forma de aerosol, suspensión o líquidos se han desarrollado para evaluar la toxicidad pulmonar, y en la mayoría provocan procesos inflamatorios que culminan en neumonía (32, 33, 34, 35, 36).

Analizando de forma integral los resultados clínicos, microbiológicos e histopatológicos, el producto *Metarhizium* PM no mostró signos de toxicidad aguda, ni infectividad, ni patogenicidad en el modelo empleado de una dosis única intratraqueal en ratas al término del mismo, existiendo una recuperación de los daños pulmonares. Otros estudios realizados con cepas diferentes de *Metarhizium anisopliae*, evaluando un ensayo de toxicidad patogenicidad aguda oral en ratones (20), corroboran el carácter no tóxico de este hongo para ser empleado como ACB en el tratamiento de las cigarras en la caña de azúcar. Si consideramos que los tratamientos químicos convencionales son altamente tóxicos y afectan el medio ambiente, el uso de ACB en los programas de control de plagas es una alternativa mucho más favorable para el medio ambiente.

REFERENCIAS

- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn.* 2007;17(9):879-920.
- Meyling NV, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *BiolControl.* 2007;43(2):145-155.
- Goettel M, Hajek A, Siegel JP, Evans H. Safety of fungal biocontrol agents, In: Butt T.M.M Jackson C and Magan N. (Eds) *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International United Kingdom 2001:347-375.
- Hall R, Zimmermann G, Vey A. Guide lines for the registration of entomogenous fungi as insecticides, *Entomophoga*, In: Springer Netherlands Editor. *BioControl.* 1982;27:121-127.
- COSAVE, Comité de Sanidad Vegetal del Cone Sur-Sección. IV- Control biológico 4.2. Requisitos para el registro de agentes de control biológico microbiano, productos técnicos microbianos y productos microbianos formulados. 1997. (consultado 2014). Disponible en: <http://www.cnpma.embrapa.br/biocontrol/legislacao/cosave/pstand42.html>.
- Official Journal of the European Communities (OJEC), (homepage on the internet) Commission Directive 2001/36/EC of 16 May 2001 (amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market), (Updated 05/03/2008, consultado 2014). Disponible en: http://europa.eu.int/eur-ex/pri/en/oj/dat/2001/l_164/l_16420010620en00010038.pdf.
- EPA, Microbial Pesticide Test Guidelines OPPTS 885, 3000 Background-Mammalian Toxicity/Pathogenicity/Infectivity, United States Environmental Protection Agency-Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101)-EPA712-C-96-314 1996, (Updated 09-26-2008, consultado 2014). Disponible en: http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/885_Microbial_Pesticide_Test_Guidelines/Series/885-3000.pdf.
- Contreras J, Mendoza JE, Martinez-Aguirre MR, Garcia-Vidal L, Izquierdo J, Bielza P. Efficacy of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol.* 2014;107(1):121-124.
- Zayed A, Soliman MM, El-Shazly MM. Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol.* 2013;50(4):796-803.
- Butts E. Biopesticide Fact Sheet, EPA's biopesticides, US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT (homepage on the internet) Biopesticide Fact Sheet, EPA's biopesticides (Updated 2003, consultado 2014). Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
- EPA. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT (homepage on the internet) *Metarhizium anisopliae* strain f52 (PC code 029056) MRID#448447-11 (Updated 2005, consultado 2014). Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides> 2005.

12. Burgner D, Eagles G, Burgess M, Procopis P, Rogers M, Muir D, et al. Disseminated invasive infection due to *Metarrhizium anisopliae* in an immunocompromised child. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1146-1150.
13. Jani B, Rinaldi M, Reinhart W. An unusual case of fungal keratitis: *Metarrhizium anisopliae*. *Cornea.* 2001;20(7):765-768.
14. Revankar SG, Sutton DA, Sanchez SE, Rao J, Zervos M, Dashti F, et al. *Metarrhizium anisopliae* as a Cause of Sinusitis in Immunocompetent Hosts. *J Clin Microbiol.* 1999;31(1):195-198.
15. Kastl S, Kotschenreuther U, Hille B, Schmidt J, Gepp H, Hohenberger W. Simplification of rat intubation on inclined metal plate. *Adv Physiol Educ.* 2004;28:29-32.
16. Mier T, Olivares-Redonda G, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana M, Pérez-Torres A, et al. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;88(2):103-111.
17. Fernandes EK, Keyser CA, Chong JP, Rangel DE, Miller MP, Roberts DW, Characterization of *Metarrhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity, *J Appl Microbiol.* 2010;108(1):115-128.
18. Cantone F, Vandenberg J. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res.* 1998;102:209-215.
19. Gonzales FP, da Silva SH, Roberts DW, Braga GU. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarrhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(3):653-61.
20. Toriello C, Perez-Torres A, Burciaga-Diaz A, Navarro-Barranco H, Perez-Mejía A, Lorenzana-Jimenez, M, Mier T. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotox Environ Safe.* 2006;65(2):278-287.
21. University of Wisconsin-Milwaukee. Animal Specific Training: Rats (*Rattus norvegicus*) (Updated June 17, 2008 by SAK, consultado 2014). Disponible en: <http://www.uwm.edu/Dept/EHSRM/ACP/MANUAL/rat.pdf>.
22. Mitruka B, Rawnsley H, Clinical Biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and Normal Human (2nd edition), 1981, Masson Pub, USA (New York). p.413.
23. Teixeira M, Chaguri L, Carissimi A, Souza NL, Mori CM, Gómez V, et al. Hematological and biochemical profiles of rat (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2000;37(5).
24. Tomioka M, Goto T, Lee TDG, Bienenstock J, Befus AD. Isolation and characterization of lung mast cells from rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Immunol.* 1989;66(3):439-444,
25. Xu X, Zhang D, Zhang H, Wolters PJ, Killeen NP, Sullivan BM, et al. Neutrophil histamine contributes to inflammation in mycoplasma pneumonia. *J Exp Med.* 2006;203(13):2907-2917.
26. Mier T, Rivera F, Rodriguez-Ponce M, Carrillo-Farga J, Toriello C. Infectivity of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in mice and guinea pigs. *Rev Latinoam Microbiol.* 1994;36(2):107-111.
27. Shakira Q, Naheed A, Maryam M, Qureschi A, Yazdana M. Effect of entomopathogens on albino mice. *Park J Sci Ind Res India.* 2000;43:42-45.
28. Greaves P, Histopathology of preclinical Toxicity Studies. Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, 2nd Edition, Elsevier. United Kingdom. 2000:203-213.
29. Echegoyen A, Puras A, Boldú J. Bronquiolitis obliterante con Neumonía en organización, a propósito de un caso que debutó con Síndrome constitucional. En: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 1998;21(3). (Updated 2008, consultado 2014). Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol21/n3/notas2.html>.

30. Carlton W, McGavin M. Thompsons Special Veterinary Pathology. 2nd ed, Mosby Year Book (Ed.). St. Louis, 1995:152-153.
31. Bosque G, Valdesoiro L, Asensio de la Cruz O, Tardío E. Pulmón en el paciente inmunodeprimido, AEP, Asociación Española de Pediatría (Updated 2003, consultado 2014). Disponible en: <http://www.aeped.es/protocolos/neumologia/13.pdf>: pp:345-354.
32. Tsai S, Liu B, Liao J, Wang J, Hwang J, Wang S, et al. Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol.* 2003;186(3):205-216.
33. Pauluhn J. Inhalation toxicity of 1,6-hexamethylene diisocyanate homopolymer (HDI-IC) aerosol: results of single inhalation exposure studies. *Toxicol Sci.* 2000;58(1):173-181.
34. Rao CY, Brain JD, Burge HA, Reduction of Pulmonary Toxicity of *Stachybotrys chartarum* Spores by Methanol Extraction of Mycotoxins. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(7):2817-2821.
35. Ulich T, Fann M, Patterson P, Williams J, Samal B, Del CJ, et al. Intratracheal injection of LPS and cytokines, V, LPS induces expression of LIF and LIF inhibits acute inflammation. *Am J Physiol.* 1994;267(4 Pt 1): 442-446.
36. Young S, Robinson V, Barger M, Whitmer M, Porter D, Frazer D, et al. Exposure to particulate 1-->3-beta-glucans induces greater pulmonary toxicity than soluble 1-->3-beta-glucans in rats. *J Toxicol Environ Heal A.* 2003;66(1):25-38.

Recibido: 5-5-3014.

Aceptado: 27-8-2014.