UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la capacidad infectiva de *Fusarium* spp. a partir de aislamientos de origen vegetal, humano y animal en modelo murino (ratones BALB/c)

CONSUELO MILENA FORERO REYES

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Postgrado de Microbiología

Bogotá, Colombia

2015

Evaluación de la capacidad infectiva de *Fusarium* spp. a partir de aislamientos de origen vegetal, humano y animal en modelo murino (ratones BALB/c)

CONSUELO MILENA FORERO REYES

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

María Ximena Rodríguez Bocanegra Ph.D.

Codirector:

Jesús Alfredo Cortés Vecino Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Postgrado de Microbiología

Bogotá, Colombia

2015

A mis Padres

Las personas que me enseñaron a ser quien soy, que con su esfuerzo y perseverancia me prepararon para cumplir mis sueños…

AGRADECIMIENTOS

A mi directora la profesora María Ximena Rodríguez por su valiosa guía y colaboración durante la realización del proyecto, gracias por lo aportado personal y profesionalmente.

A Carolina González, joven investigador quien me colaboro en la realización de los ensayos, gracias por tantas risas y buenos momentos.

A los Veterinarios Manuel Góngora, Alejandro Ramírez, quienes apoyaron cada uno de los procedimientos con el modelo animal, gracias por su ayuda y por todo el conocimiento que me brindaron.

A mi codirector el profesor Jesús Cortés y al Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración en la realización de los ensayos con el modelo animal.

Al grupo de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a Juan Carlos Ospina, Jersson Ávila, Carlos Iregui quienes me brindaron su asesoría y conocimientos en todo lo relacionado a los análisis histopatológicos.

A las profesoras Melva Linares e Ivonne Gutiérrez de la Universidad Javeriana quiénes me guiaron en la evaluación superficial y los análisis estadísticos respectivamente.

A mis amigos siempre tan incondicionales, compañeros de maestría y los chicos UNIDIA quiénes me brindaron su amistad, compañía, buena energía, gratos momentos que no se olvidarán.

A mi hermana Mayrene, quien siempre me brinda su amor y apoyo incondicional.

A toda mi familia: Wil, Amy, Lulu, Juancho, Juli, Jois, Juan, quiénes siempre me han enseñado que pase lo que pase la familia es el único lazo que jamás se romperá.

A Leonardo por su constante apoyo en cada una de mis decisiones.

A Alanna por ser la mejor y mayor motivación en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
ABSTRACT	**1**
RESUMEN	**2**
1. INTRODUCCIÓN	**3**
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	**4**
3. OBJETIVOS	**6**
3.1 Objetivo general	**6**
3.2 Objetivos específicos	**6**
4. MARCO TEÓRICO GENERAL	**7**
4.1 Generalidades de hongos	**7**
4.2 Generalidades de *Fusarium*	**7**
4.3 Patógenos multihospedero	**8**
4.4 Patogenicidad de *Fusarium*	**9**
4.4.1 Patogenicidad en humanos	**9**
4.4.2 Patogenicidad en animales	**9**
4.4.3 Patogenicidad en plantas	**10**
4.5 Factores que contribuyen a la patogénesis de *Fusarium*	**11**
4.5.1 Factores asociados a plantas	**11**
4.5.2 Factores asociados a humanos y animales	**12**
5. IMPLEMENTACIÓN METODOLOGICA DE PRUEBAS DE INFECTIVIDAD EN MODELO MURINO (ratones BALB/c)	**14**
5.1 Pruebas de inmunosupresión	**14**
5.1.1 Metodología	**15**
5.1.2 Resultados y discusión	**16**
5.2 Pruebas de infectividad sistémica	**17**
5.2.1 Evaluación dosis	**17**
5.2.1.1 Metodología	**17**
5.2.1.2 Resultados y discusión	**18**
5.2.2 Vías de inoculación	**20**
5.2.2.1 Metodología	**20**
5.2.2.2 Resultados y discusión	**21**
5.3 Pruebas de exposición superficial	**24**
5.3.1 Metodología	**24**
5.3.2 Resultados y discusión	**25**

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE AISLAMIENTOS DE *FUSARIUM* spp. DE DIVERSO ORÍGEN INOCULADOS SISTÉMICA Y SUPERFICIALMENTE 27
6.1 Metodología **28**
6.1.1 Microorganismos en estudio **28**
6.1.2 Modelo de experimentación animal **28**
6.1.3 Preparación de inóculos fúngicos **29**
6.1.4 Modelo experimental **29**
6.1.5 Inmunosupresión **30**
6.1.6 Inoculación sistémica **30**
6.1.7 Exposición superficial **31**
6.1.8 Análisis histopatológicos **32**
6.1.9 Análisis estadístico **32**
6.2 Inoculación sistémica **33**
6.2.1 Resultados y discusión evaluación microbiológica **33**
6.2.2 Resultados y discusión evaluación histológica **38**
6.2.2.1 Resultados implementación de "score" **42**
6.2.3 Resultados y discusión seguimiento clínico **44**
6.2.4 Resultados y discusión mortalidad **46**
6.2.5 Análisis estadístico **49**
6.3 Exposición Superficial **50**
6.3.1 Resultados y discusión **50**
7. DISCUSIÓN 53
8. CONCLUSIONES 58
9. RECOMENDACIONES 59
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 60

ANEXOS 68

ÍNDICE DE TABLAS

Pág

TABLA 4.1 Comparación de mecanismos de infección en patógenos multihospedero **8**

TABLA 5.1 Distribución de grupos para evaluación de la inmunosupresión **15**

TABLA 5.2 Distribución de grupos para evaluación de dosis de inóculo **18**

TABLA 5.3 Distribución grupos para evaluación de vías de inoculación **20**

TABLA 5.4 Distribución grupos para evaluación de la exposición superficial **24**

TABLA 6.1 Descripción de los aislamientos de *Fusarium* spp. empleados en el estudio **28**

TABLA 6.2 Distribución de aislamientos para la inoculación sistémica **30**

TABLA 6.3 Distribución de aislamientos para la exposición superficial **30**

TABLA 6.4 Consolidado de valores de probabilidad (p valor) **34**

TABLA 6.5 Sistema de graduación de lesiones para *Fusarium* spp. **42**

TABLA 6.6 Consolidado estadístico Lambda de Wilks **50**

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág

FIGURA 5.1 Recuento absoluto de células blancas posterior a tratamiento Inmunosupresor evaluado en tres periodos de tiempo **17**

FIGURA 5.2 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con $1x10^8$conidios/ml **20**

FIGURA 5.3 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados por vía IP e IV **22**

FIGURA 5.4 Corte histológico hígado de ratón grupo control e inoculado **23**

FIGURA 5.5 Área de exposición superficial a *Fusarium* **26**

FIGURA 6.1 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inoculados con aislamientos de origen animal **33**

FIGURA 6.2 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inoculados con aislamientos de origen humano-superficial **34**

FIGURA 6.3 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inoculados con aislamientos de origen vegetal **35**

FIGURA 6.4 Resultados de recuentos (UFC/g tejido) de órganos de animales inoculados con aislamientos de origen humano-sistémico **36**

FIGURA 6.5 Resultados de la recuperación de *Fusarium* a partir de muestras sanguíneas **38**

FIGURA 6.6 Corte histológico de hígado **39**

FIGURA 6.7 Porcentaje de animales con lesión en hígado, discriminado por condición inmune y origen de los aislamientos. **40**

FIGURA 6.8 Imagen corte histológico de pulmón **41**

FIGURA 6.9 Imagen corte histológico de bazo **41**

FIGURA 6.10 Resultados de la distribución de lesiones por grado **43**

FIGURA 6.11 Características clínicas asociadas al proceso infeccioso **46**

FIGURA 6.12 Porcentajes de supervivencia en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos **48**

FIGURA 6.13 Evaluación microbiológica de la exposición superficial **51**

FIGURA 6.14 Corte histológico de piel **51**

ÍNDICE DE ANEXOS

Pág

ANEXO 5.1 Análisis de varianza y post hoc tratamientos de inmunosupresión **68**

ANEXO 5.2 Análisis de varianza de recuentos de UFC/g tejido en órganos de ratones inoculados con $1x10^8$ conidios/ml **69**

ANEXO 6.1 Criterios de punto final **70**

ANEXO 6.2 Análisis de varianza y pos hoc evaluación microbiológica por origen **72**

ANEXO 6.3 Porcentaje de animales con lesión en pulmón discriminado por condición inmune y origen de aislamiento **79**

ANEXO 6.4 Porcentaje de animales con lesión en bazo discriminado por condición inmune y origen de aislamiento **79**

ANEXO 6.5 Consolidado de análisis histopatológicos e implementación de "score" **80**

ANEXO 6.6 Formato de identificación y seguimiento del modelo animal **92**

ANEXO 6.7 Análisis factoriales por origen de aislamiento **93**

ANEXO 6.8 Análisis factoriales por aislamiento **95**

ANEXO 6.9 Plot de distribución de patrones de respuesta por aislamiento utilizando análisis de componentes (PCA) **97**

ABSTRACT

The species belonging to the genus *Fusarium* are common soil saprophytes and plant pathogens and is also frequently associated with opportunistic infections in humans, generating a high impact at an agricultural and clinical level. Given their ability to infect plants, humans and animals, the genus *Fusarium* has been proposed as a multihost model for studying simultaneus mechanisms of pathogenicity. Most fungi with ability to jump between kingdoms or so-called multihost pathogens must have certain skills to access new hosts, among some of them include the ability to grow at 37°C, the ability to modulate a wide range of pH and extensive lytic enzyme activity.

Twelve isolates of *Fusarium* spp. from diverse origin (animal, human-superficial, plant and human-systemic) were evaluated in tests of pathogenicity in BALB/c mice immunocompetent and immunosuppressed, at a microbiological and histopathological level, in addition to clinical monitoring for signs associated with infection and survival rates. For this the mice were injected intravenously with 0.1ml of a suspension of $1x10^8$ conidia/ml, making monitored daily seven days post-inoculation. Additionally, the infectivity of these isolates was evaluated by surface exposure.

Inoculation tests systemically confirmed the ability of the isolates to spread and colonize different organs, regardless of their origin or species, or immune status of the host, suggesting that these isolates have basic pathogenicity determinants required for adaptation and survival conditions and multiple hosts. Histological evaluation confirmed the presence of fungal structures in various organs assessed and describe in detail the findings associated to the tissue damage, which coincide with some reports associated with *Aspergillus* infection. Surface exposure tests not showed positive results to determine the infectivity of isolates.

The parameters evaluated in this study provide tools for understanding the dynamics of *Fusarium* infection and confirm the pathogenic characteristics necessary to form a multihost pattern.

Keywords: *Fusarium*, BALB/c mice, Inmunocompetent, Immunosuppressed, Murine Model.

RESUMEN

Las especies pertenecientes al género *Fusarium* son comunes saprófitos de suelo y patógenos de plantas, siendo también frecuentemente asociadas a infecciones oportunistas en humanos, generando un alto impacto a nivel agrícola y clínico. Dada su capacidad de infectar plantas, humanos y animales, el género *Fusarium* ha sido propuesto como un modelo multihospedero, para el estudio de mecanismos simultáneos de patogenicidad. La mayoría de hongos con capacidad para hacer saltos entre reinos o también llamados patógenos multihospedero deben tener ciertas habilidades para acceder a nuevos hospederos, entre algunas de ellas se destacan la habilidad de crecer a 37°C, la capacidad de modular un amplio rango de pH y amplia actividad enzimática lítica.

Doce aislamientos de *Fusarium* spp. de diverso origen (animal, humano-superficial, vegetal y humano-sistémico) fueron evaluados en pruebas de patogenicidad en ratones BALB/c, inmunocompetentes e inmunosuprimidos, a nivel microbiológico e histopatológico, además de realizar un seguimiento clínico de signos asociados a la infección y porcentajes de supervivencia. Para ello los animales fueron inoculados intravenosamente con 0.1ml de una suspensión de $1x10^8$ conidios/ml, haciendo un seguimiento diario siete días post-inoculación. Adicionalmente, se evaluó la capacidad infectiva de estos aislamientos por exposición superficial.

Las pruebas de inoculación a nivel sistémico confirmaron la capacidad de todos los aislamientos para diseminarse y colonizar diferentes órganos, independientemente de su origen o especie, o condición inmune del hospedero, lo que sugiere que estos aislamientos poseen determinantes de patogenicidad básicos requeridos para su adaptación y supervivencia en múltiples condiciones y hospederos. La evaluación histológica permitió confirmar la presencia de estructuras fúngicas en los diversos órganos evaluados y describir detalladamente los hallazgos asociados al daño tisular, que coinciden con algunos reportes de infección asociada a *Aspergillus*. Las pruebas de exposición superficial no mostraron resultados positivos para determinar la capacidad infectiva de los aislamientos.

Los parámetros evaluados en este trabajo brindan herramientas para el entendimiento de la dinámica de infección en *Fusarium* y confirman las características patogénicas necesarias para constituir un modelo multihospedero.

Palabras clave: *Fusarium*, Ratones BALB/c, Inmunocompetentes, Inmunosuprimidos, Modelo murino.

1. INTRODUCCIÓN

Fusarium es un hongo saprófito de amplia distribución, habitante natural del suelo y material orgánico en descomposición, comúnmente encontrado en plantas afectando una amplia variedad de cultivos. Adicionalmente, algunas especies de *Fusarium* son capaces de causar una amplia variedad de procesos infectivos en humanos y animales, que van desde lo superficial hasta lo diseminado, esta última especialmente en hospederos inmunosuprimidos. El aumento de los casos de infecciones por *Fusarium* spp. ha permitido que esté género cobre importancia e interés como patógeno humano emergente, al ser la segunda causa de infección fúngica por hongos filamentosos y a la resistencia presentada a los tratamientos antifúngicos disponibles.

Si bien, varias investigaciones han encontrado características compartidas en los procesos de infección en humanos, animales y plantas, como lo son la adhesión a diferentes tejidos y la producción de enzimas líticas que favorecen los procesos de colonización, sumado a la gran versatilidad para crecer en un amplio rango de sustratos, sus eficientes mecanismos de dispersión y evasión de la defensa inmune del hospedero, su patogenicidad continua siendo no muy bien entendida. Además, se cuenta con un bajo número de estudios que realicen aproximaciones al modelo multihospedero, brindando herramientas para el entendimiento de la dinámica poblacional de *Fusarium* en relación con sus diferentes hospederos.

En 2004, las investigaciones realizadas por Ortoneda y colaboradores sugirieron que ciertos factores de virulencia esenciales en la patogénesis de plantas son también indispensables en la patogénesis animal, al probar un aislamiento de origen vegetal de *F. oxysporum* en un hospedero mamífero. Este tipo de estudios permite evaluar la patogenicidad de hongos oportunistas, como un modelo que refleja el comportamiento de un verdadero patógeno humano, proponiéndolo como un excelente modelo de estudio de mecanismos de virulencia fúngica.

Basados en estos hechos, el presente trabajo evaluó la capacidad infectiva de *Fusarium* spp. a partir de aislamientos de diverso origen (vegetal, animal, humano-superficial y humano-sistémico) en ratones BALB/c, con el fin de contribuir al entendimiento de su patogénesis en relación con hospederos mamíferos, ya que patógenos con la capacidad para trasmitirse en diversos hospederos son de especial interés desde el punto de vista de la salud pública. Adicionalmente, este tipo de investigaciones pueden contribuir al entendimiento y mejoramiento de opciones de prevención de enfermedades causadas por este género, incluso otros patógenos oportunistas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Microorganismos con capacidad de infectar diferentes organismos (plantas, animales y humanos) y hacer saltos entre reinos, han sido definidos como "patógenos multihospedero" (van Baarlen et al., 2007). Dentro de este grupo de patógenos, *Fusarium* ha sido propuesto como un modelo de estudio de la patogénesis de plantas y animales, que lo facultarían como un patógeno de múltiples hospederos (Di Pietro and González, 2004) .

Fusarium es un género de hongos de distribución universal, ubicuos y de gran importancia económica ya que son habituales fitopatogenos (Monzón, 2000), causantes de marchitamiento vascular, pudriciones de raíz, tallos y semillas en una gran variedad de cultivos (Agrios, 2005; Roncero et al., 2003). En nuestro país la principal preocupación es la disminución de los índices de producción y calidad del producto, en cultivos de exportación como hortalizas, legumbres, frutas y ornamentales, afectados por este patógeno (Arbeláez, 2000; Perusquia-Ortiz et al., 2012).

Adicionalmente, *Fusarium* es considerado como un patógeno emergente de interés clínico, dado el creciente número de casos en los que se ha visto implicado, especialmente en pacientes inmunosuprimidos donde la forma diseminada es una de las más frecuentes (70% casos), especialmente en pacientes con leucemia aguda prolongada y profunda neutropenia (Nucci and Anaissie, 2007). Sumado a esto, el sector pecuario se ve gravemente afectado con micotoxicosis en animales seguida de la ingesta de alimentos contaminados (Desjardins and Proctor, 2007). En Colombia, trabajos realizados por el Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas y la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana, han permitido el aislamiento y caracterización de diferentes especies de *Fusarium* de diverso origen implicadas en procesos queratinolíticos sobre diferentes sustratos humanos y animales (Sarmiento and Trujillo, 2006).

Aunque los mecanismos moleculares que determinan la especificidad hospedero-patógeno no son muy bien entendidos, se han observado coincidencias entre los factores de patogenicidad en hospederos animales, humanos y vegetales, como lo son la adhesión a diferentes tejidos y penetración por actividad enzimática lítica (Di Pietro and González, 2004); pero hasta la fecha no hay reportes de estudios que evalúen aislamientos de diverso origen en hospederos de diferentes reinos y especies, por lo que se hace necesario realizar pruebas de patogenicidad cruzada que permitan una aproximación real al modelo multihospedero, posibilitando el análisis simultáneo de mecanismos de virulencia

compartidos en los múltiples hospederos y un mejor entendimiento de la dinámica de la infección (Godoy et al., 2004).

Considerando la problemática planteada y teniendo en cuenta el riesgo en el que se encuentran trabajadores de campo y todas aquellas personas en estado de inmunosupresión prolongada, la realización de pruebas de patogenicidad cruzada constituye una herramienta para la confirmación del planteamiento del modelo multihospedero y contribuye al desarrollo de posibles estrategias de control y prevención de factores de riesgo, que permitan contrarrestar el creciente número de casos reportados, especialmente en personas en estados de inmunosupresión.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad infectiva de *Fusarium* spp. a partir de aislamientos vegetales, humanos y animales en modelo murino (ratones BALB/c).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar una metodología que permita definir condiciones de inoculación (superficial e invasiva) y parámetros de inmunosupresión en ratones BALB/c.
2. Evaluar la mortalidad e invasividad de ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes inoculados de forma superficial e invasiva con *Fusarium* spp.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE HONGOS

Los hongos son microorganismos versátiles que se encuentran comúnmente en el ambiente como saprófitos en materia orgánica en descomposición colaborando con procesos naturales de los ecosistemas; sin embargo, algunas especies son fitopatógenos o causan enfermedades en humanos y animales (De Lucca, 2007; Ortoneda et al., 2004).

Respecto a su capacidad infectiva en humanos y animales, los hongos han sido clasificados en patógenos oportunistas, que son saprófitos que eventualmente pueden infectar por traumatismos o afectaciones de base en el hospedero (inmunosupresión), o patógenos verdaderos, cuyo proceso infectivo depende directamente de sus capacidades para penetrar e invadir un hospedero sano, beneficiándose de sus tejidos y nutrientes. El daño causado se da como consecuencia de la interacción patógeno-hospedero o indirectamente por la acción de factores de virulencia o actividad inmune en respuesta al patógeno (De Lucca, 2007; van Baarlen *et al*., 2007).

A nivel de hospederos vegetales, los hongos, han sido clasificados como biotrofos, necrotrofos y hemibiotrofos. Los biotrofos se desarrollan de forma intracelular, intercelular, o subcuticular, causando daños en tejidos y órganos sin ocasionar la muerte del hospedero (Mendgen and Hahn, 2002); los necrotrofos, como *Fusarium* spp., matan la célula hospedera por medio de la secreción de enzimas degradativas o fitotoxinas y se alimentan de material vegetal muerto (Horbach et al., 2011); y los hemibiotrofos inician el proceso infectivo del hospedero como un biotrofo, para luego cambiar su crecimiento a necrotrofo y finalmente ocasionan la muerte de la planta (Munch et al., 2008).

4.2 GENERALIDADES DEL GÉNERO *FUSARIUM*

El género *Fusarium* perteneciente al filo Ascomycota, está ampliamente distribuido en suelo y plantas (Wu et al., 2004), posee gran variedad de características morfológicas, fisiológicas y de cultivo, quizás por su capacidad para encontrase en diversas áreas geográficas y sustratos. Su identificación se realiza con base en las características microscópicas, como hifas hialinas septadas de 3-8µm, la producción de macroconidios y microconidios, junto con clamidosporas en algunas especies (Dignani and Anaissie, 2004; Nelson et al., 1994), y macroscópicas, como la producción de pigmentos y textura algodonosa (Nelson et al., 1994; Nucci and Anaissie, 2007). Más de cincuenta especies de *Fusarium* han sido identificadas pero de éstas solo doce han sido asociadas a infección en

humanos; *F. solani* (50% de los casos), *F. oxysporum* (20%), *F. verticilloides* (10%) y *F. moniliforme* (10%), representan las más comunes (Nucci and Anaissie, 2007).

En los últimos años algunas especies de *Fusarium* han sobresalido como patógenos asociados a una gran cantidad de procesos infectivos en humanos y animales, por lo que se han clasificado como "patógenos emergentes" (Nucci and Anaissie, 2002); definiéndose como patógeno emergente al agente causal de una enfermedad infecciosa cuya incidencia va en aumento después de su aparición, en una población hospedera nueva o en una ya prexistente. Esta condición es dada por cambios epidemiológicos de largo plazo que permiten la adaptación a nuevos hospederos (Woolhouse et al., 2005).

4.3 PATÓGENOS MULTIHOSPEDERO

Se cree que la evolución ha permitido la especialización de algunos microorganismos convirtiéndolos en patógenos de un solo hospedero, mientras otros deben explotar su habilidad inherente de encontrar y trasmitirse a especies de otros reinos conocida como capacidad multihospedero (Woolhouse et al., 2001). Esta habilidad depende de condiciones de alta diversidad genética que favorecen la evasión del sistema inmune del hospedero y facilitan su adaptación, factores de virulencia que le permiten atravesar barreras de defensa, colonizar y posteriormente producir enfermedad (van Baarlen et al., 2007). En hongos, esta habilidad es dada por la capacidad de los propágulos de adherirse y germinar en superficies de plantas y tejidos animales, adaptarse a un amplio rango de estímulos (arquitectura de superficies, ambiente y temperatura), que promueven la germinación y subsecuente infección (Gauthier and Keller, 2013).

Los tres principales mecanismos propuestos para patógenos con capacidad multihospedero en plantas y humanos son descritos en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Comparación de mecanismos de infección para patógenos multihospedero que infectan plantas y humanos. Tomado de Gauthier and Keller 2013.

MECANISMOS	PLANTAS	HUMANOS Y ANIMALES
ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN	Adherencia de propágulos a tallos, hojas y raices, entrada de propágulos a través de heridas.	Inhalación de aerosoles de propagulos, penetración traumática en piel y tejidos suaves.
GERMINACIÓN DE CONIDIOS (factores que influyen sobre la germinación)	Hidrofobicidad, dureza, humedad, densidad, inóculo, temperatura, compuestos derivados de la planta.	Termotolerancia (37°C), supresión de la respuesta inmune del hospedero, evasión de celulas inmunes.
INVASIÓN Y DESTRUCCIÓN DE TEJIDOS	Penetración a través de tejido intacto o abierto (invasión de hifas, formación de apresorio), adquisición de hierro y homeostasis, complejo proteíco "Velvet".	Captación de propagulos germinados por neumocitos, invasión del tejido intacto, adquisición de hierro y homeostasis, complejo "Velvet".

En general, los hongos con capacidad para hacer saltos entre reinos son patógenos humanos débiles, que causan infección en personas con alteraciones en su inmunidad, traumas, o han sufrido de inoculaciones iatrogénicas (Gauthier and Keller, 2013). Dentro de los microorganismos fúngicos en los que se ha establecido esta habilidad están especies de los géneros *Acremonium, Curvularia, Aspergillus, Alternaria* y *Fusarium* (Ortoneda et al., 2004; van Baarlen et al., 2007).

Dada la capacidad de *Fusarium* de infectar individuos de diferentes reinos, ha sido propuesto como un modelo "multihospedero" que brindaría herramientas al estudio de factores de virulencia simultáneos en varias clases de organismos (Ortoneda et al., 2004; van Baarlen et al., 2007).

4.4 PATOGENICIDAD DE *FUSARIUM*

4.4.1 PATOGENICIDAD EN HUMANOS

Especies de *Fusarium* causan gran variedad de infecciones en humanos, estas pueden ser divididas en superficiales y diseminadas (Dignani and Anaissie, 2004; Giraldo, 2010). La forma clínica depende del estado inmune del hospedero y la puerta de entrada de la infección (Nucci and Anaissie, 2007).

En hospederos inmunocompetentes, queratitis y onicomicosis (caracterizada por lesiones lechosas que generalmente inician como manchas blancas) son las formas más frecuentes. Aunque también han sido asociadas con menor frecuencia, infecciones por ruptura de piel, heridas abiertas, quemaduras o presencia de cuerpos extraños como lentes de contacto contaminados, en los cuales ha sido demostrada la capacidad de *Fusarium* para adherirse, formar biopelículas e incluso penetrar aquellos lentes de consistencia suave (Doczi et al., 2004; Nelson et al., 1994; Nucci and Anaissie, 2002; Sun et al., 2010).

Las infecciones diseminadas son la forma más frecuente de infección en hospederos inmunosuprimidos, especialmente en aquellos con prolongada y profunda neutropenia, como los sometidos a trasplante hematopoyético y leucemia aguda. Las manifestaciones clínicas son variadas, puede presentarse infección de cualquier órgano con mínima respuesta al tratamiento en la mayoría de casos (Dignani and Anaissie, 2004; Giraldo, 2010). Las especies implicadas con mayor frecuencia en estos procesos son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (Nucci and Anaissie, 2007; Perusquia-Ortiz *et al*., 2012).

4.4.2. PATOGENICIDAD EN ANIMALES

Aunque la asociación más frecuente de infección por *Fusarium* en animales son las micotoxicosis, en los últimos años se han reportado casos de perros con ulceraciones

cutáneas en extremidades y onicomicosis, de los cuales ha sido posible el aislamiento e identificación de *Fusarium* como agente causal de la infección (Kano et al., 2011; Namitome et al., 2011).

Dentro de las micotoxinas asociadas a *Fusarium* se han descrito tres grupos principales: tricotecenos, fumonisinas y zearalenonas. Los tricotecenos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de proteínas ribosomales, presentan mayor asociación a toxicosis crónica fatal en humanos y animales. Las fumonisinas, que gracias a su mecanismo de inhibición del metabolismo de esfingolípidos, causan los más diversos efectos han sido asociadas epidemiológicamente a cáncer esofágico, defectos de nacimiento en humanos y animales, leucoencefalomalacia en caballos e inhibición de la acción de macrófagos pulmonares que impiden remoción de partículas y patógenos de circulación. Finalmente, las zearalenonas que aunque no han sido asociadas con ninguna micotoxicosis fatal, se ha comprobado tener efectos estrogénicos sobre porcinos y animales experimentales (Desjardins and Proctor, 2007; Wang and Liu, 2005).

En animales de producción como vacas, cerdos, aves de corral, terneros y equinos se han presentado brotes de síndromes hemorrágicos caracterizados por diarrea sanguinolenta, lesiones necróticas orales, gastroenteritis y hemorragias extensas; infecciones de las que se aísla con mayor frecuencia *F. sporotrichioides* y *F. poae*, los cuales producen micotoxinas durante la invernación en el campo o durante el almacenamiento de las cosechas (Mello, 1999; Nelson et al., 1994).

4.4.3 PATOGENICIDAD EN PLANTAS

Las especies de *Fusarium* son importantes patógenos de plantas (dado su impacto económico) o productores de micotoxinas contaminantes de alimentos (Di Pietro and González, 2004). En plantas, el proceso infeccioso es llevado a cabo por mecanismos de señalización que permiten sensar señales ambientales y responder con la expresión de genes que favorecen su adaptación y supervivencia (Pietro et al., 2003). Para lograr la infección con éxito, el patógeno debe regular los mecanismos de reconocimiento de señales provenientes de la raíz de las plantas, tales como: adherencia a la superficie de la raíz, diferenciación de hifas de penetración, invasión del córtex, degradación de barreras físicas y adaptación al entorno del tejido vegetal, para posteriormente completar el proceso con la secreción de factores de patogenicidad que favorecen la colonización, como lo son la producción de micotoxinas y enzimas líticas (Di Pietro and González, 2004).

La especie más común es *F. oxysporum*, causante de marchitamiento vascular, presentando más de 120 formas especiales que afectan cultivos de algodón, tabaco, tomate, melón, caña de azúcar y clavel, entre otros. La enfermedad se caracteriza por

plantas con retraso en el crecimiento, amarillamiento y marchitez que con frecuencia ocasiona la muerte de la planta (Di Pietro and González, 2004).

Otra de las especies fitopatógenas reportadas es *F. solani*, persistente en el suelo por largos periodos de tiempo gracias a la producción de clamidosporas. Los síntomas de la enfermedad asociada a esta especie son pudriciones de tallo, semillas, manchas negras en la raíz principal y raíces laterales, comenzando por la parte más cercana al suelo y amarillamiento de las hojas más bajas de la planta (Agrios, 2005; Belete, 2013).

4.5 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA PATOGÉNESIS DE *FUSARIUM*

Para establecer la infección los hongos deben adherirse, germinar, penetrar tejidos, reproducirse y evadir mecanismos de defensa del hospedero (Gauthier and Keller, 2013), el desarrollo de estos pasos es secuencial y usualmente involucra mecanismos comunes que requieren de cascadas de señalización y la expresión de genes que respondan a características propias del hospedero y su ambiente (Sexton and Howlett, 2006). En *Fusarium,* los factores que contribuyen a la patogenicidad son variados, debido a la capacidad de infectar varios hospederos; sin embargo, estos factores continúan pobremente entendidos en hospederos animales y humanos (Ortoneda et al., 2004).

4.5.1 FACTORES ASOCIADOS A PLANTAS

Los hongos patógenos de plantas deben desarrollar mecanismos que le permitan acceder al hospedero y traspasar barreras estructurales como paredes celulares. En *Fusarium* se ha identificado como uno de los principales factores de patogenicidad, la secreción de complejos enzimáticos, conocidos como enzimas degradadoras de pared celular (CWDE), que actúan en la despolimerización de cada uno de los componentes de la pared vegetal como lo son la celulosa, hemicelulosa, xilano, pectinas y ácidos galacturónicos. Además, estos complejos colaboran con procesos de penetración y ramificación dentro del tejido del hospedero, permiten la liberación de nutrientes e interfieren con la respuesta de defensa de la planta. Dentro de estas enzimas se encuentran celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y proteasas, entre otras (Di Pietro and González, 2004; Roncero et al., 2000).

Adicionalmente, se requiere de la activación de una red de cascadas de señalización que regulan la expresión de genes en respuesta a señales ambientales. Una de las rutas de señalización implicada en la patogénesis de *Fusarium* es la cascada MAPK, altamente conservada en organismos eucariotas, cuya principal función biológica es la transducción de señales, controlando así procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Di Pietro and González, 2004). Otra de las rutas, recientemente explorada en *F. oxysporum,* es el complejo Velvet, el cual contribuye en la regulación del desarrollo fúngico, al

remodelamiento de la cromátina y a la producción de metabolitos secundarios como la beauvericina (Lopez-Berges et al., 2013).

Otro de los factores de patogenicidad necesario para el establecimiento de la infección, es el pH. Las especies de *Fusarium* patógenas en plantas expresan factores de transcripción (PacC), encargados de adaptar la expresión génica al pH del medio donde se encuentran, actuando como un interruptor que activa o reprime la expresión de genes ácidos o alcalinos según la necesidad (Di Pietro and González, 2004).

Los sideróforos también han sido considerados como factores de patogenicidad, se conoce que en *F. oxysporum* su biosíntesis contribuye a mejorar la adaptación del patógeno a condiciones de privación de hierro, promoviendo el crecimiento y los procesos celulares aún, cuando el hierro exógeno es limitado (Lopez-Berges et al., 2013; Schrettl et al., 2010).

4.5.2 FACTORES ASOCIADOS A HUMANOS Y ANIMALES

La adhesión es uno de los principales mecanismos de patogenicidad fúngica ya que permite al patógeno colonizar, invadir y diseminarse en los tejidos. Se ha encontrado que moléculas específicas como fibronectina, trombina y factor G, promueven la adhesión de patógenos a la superficie de diversos tejidos, siendo esenciales para el establecimiento de la infección. En el caso de *F. oxysporum* esta capacidad ha sido sugerida, en estudios que demuestran una adhesión más eficiente de hifas a superficies recubiertas con fibronectina (Mitola et al., 2001).

Otros de los mecanismos involucrados en la patogénesis de *Fusarium,* es la activación de cascadas de señalización como MAPK y cAMP, involucradas en procesos de adherencia y degradación de tejidos. La producción de enzimas líticas como queratinasas, colagenasas, proteasas, elastasas y lipasas, que permiten hidrolizar proteínas celulares del hospedero para facilitar la invasión y necrosis del tejido, aumentar la disponibilidad de nutrientes, y ocasionar un daño activo de células o moléculas del sistema de defensa del hospedero (Gauthier and Keller, 2013; Prados-Rosales et al., 2006).

Otros factores que favorecen el establecimiento del patógeno son la temperatura y el pH. En humanos, la temperatura corporal es un elemento de protección frente a la mayoría de los hongos; sin embargo, extremidades y tejidos corneales muestran ligera reducción de la temperatura, lo que aumenta la susceptibilidad de estas zonas a infecciones fúngicas (Casadevall, 2007). En el caso de infecciones diseminadas, la adaptación a la temperatura es un requerimiento básico para el establecimiento de la infección fúngica (van Burik and Magee, 2001). Por otra parte, la regulación del pH tiene importantes implicaciones no solo a nivel de hongos fitopatógenos, en los cuales se ha definido claramente la función de

PacC, como modulador de la expresión génica. A nivel clínico la posibilidad de modular el pH permite sensar y responder adecuadamente a un amplio rango de pH, muchas veces en diferentes zonas de un mismo hospedero y evadir mecanismos de defensa (Brahm, 2006).

Los metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) mencionados anteriormente, constituyen otro de los mecanismos de patogenicidad en *Fusarium.* Dentro de estos, se destaca la fuerte actividad supresora de los tricotecenos T2, nivalenol, deoxynivalenol y algunas fumonisinas sobre médula, bazo, tejidos linfoides, timo y mucosa intestinal, produciendo citotoxicidad de linfocitos, monocitos, reducción de la función fagocítica de macrófagos y quimiotaxis de neutrófilos. Adicionalmente, los tricotecenos T2 han mostrado inhibir la agregación plaquetaria y el tiempo de protrombina (Nelson et al., 1994; Wu et al., 2004). Estas micotoxinas han mostrado tener un papel en la patogénesis de infecciones en piel. Se ha observado aumento en el eritema e induración de pieles tratadas previamente con las toxinas T2 y butenolide mostrando en la evaluación histológica engrosamiento del estrato de Malpighi, degeneración de fibrocitos e infiltración celular, lo que sugiere su contribución en el establecimiento del patógeno (Nelson et al., 1994).

5. IMPLEMENTACIÓN METODOLÓGICA DE PRUEBAS DE INFECTIVIDAD EN MODELO MURINO (ratones BALB/c)

Por décadas los animales han sido utilizados como hospederos modelo para el estudio de enfermedades humanas, especialmente especies pequeñas como *Mus musculus* han contribuido al hallazgo y entendimiento de gran número de mecanismos patogénicos a nivel sistémico y localizado (Houdebine, 2004).

Relativamente económico, fecundo y manipulable frente a otros modelos animales, el ratón dada su alta homología estructural y biológica con la humana, ha sido utilizado en estudios de infecciones fúngicas con el fin de dilucidar varias de las respuestas biológicas a estos agentes, especialmente en aquellas infecciones fúngicas oportunistas que han ganado importancia en los últimos años, como es el caso de Aspergilosis y Fusariosis (Caira et al., 2011; Kume et al., 2003).

Pruebas de patogenicidad de *Fusarium* en modelo murino han sido exitosas en investigaciones anteriores (Ahmad, 2008; Gonzalez et al., 2013), donde se ha podido demostrar la importancia de la dosis del inóculo en la determinación de la supervivencia del animal infectado y el papel de neutrófilos y macrófagos en la defensa del hospedero (Legrand et al., 1991). Sin embargo, no se ha podido determinar con claridad si *Fusarium,* utilizando mecanismos similares, puede causar enfermedad en hospederos filogenéticamente divergentes (Ortoneda et al., 2004).

Para la implementación del modelo de infección animal, fue necesaria la realización de ensayos preliminares en los cuales se evaluaron condiciones de inmunosupresión, dosis y vías de inoculación. Posteriormente, y con base en los resultados obtenidos en estos ensayos se determinaron las condiciones necesarias para el establecimiento de las pruebas de patogenicidad en el modelo murino. Los ensayos realizados son descritos a continuación.

5.1 PRUEBAS DE INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión del hospedero, en los casos de infecciones asociadas a *Fusarium* constituye un factor de riesgo que favorece la colonización y posterior diseminación del patógeno. Los hospederos humanos que presentan mayor predisposición a la diseminación por este patógeno son pacientes con enfermedades hematológicas malignas (leucemias y linfomas), neutropenias o disrupciones en piel (quemaduras y traumatismos) (Nelson et al., 1994).

Para determinar el efecto de este factor de riesgo en el favorecimiento de la infección por *Fusarium* y garantizar la inmunosupresión en el modelo animal, se realizaron ensayos de valoración de la inmunosupresión con acetato de hidrocortisona y ciclofosfamida, medicamentos que han sido previamente reportados en la literatura para tal fin (Dracott and Smith, 1979; Kitaura et al., 2009; Legrand et al., 1991; Ortoneda et al., 2004; Wu et al., 2004).

5.1.1 METODOLOGÍA

Para los ensayos de inmunosupresión se utilizaron 16 ratones BALB/c, machos y hembras de aproximadamente 8 semanas de edad, de 20 a 25 gramos de peso corporal, procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron mantenidos en una celda de microaislamiento en grupos del mismo sexo por caja, con previa adaptación a condiciones de temperatura (20°C a 24°C), humedad relativa (30% a 60%), ventilación (10 a 15 recambios por minuto), ruido controlado y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales como se describe en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Distribución de grupos experimentales utilizados para evaluación de la inmunosupresión.

Grupos Experimentales	Número de animales
Ciclofosfamida IP (200 mg/Kg)	4
Acetato de hidrocortisona IP (2.5mg/Kg)	4
Solución salina estéril	4
Testigo absoluto	4

Los medicamentos inmunosupresores se administraron en una única dosis en un rango de volumen comprendido entre 200 a 300µl según peso corporal por vía intraperitoneal, una de las vías más comunes en inmunosupresión de roedores (Lionakis et al., 2006; Yu et al., 2014).

La evaluación de los parámetros hematológicos para determinar inmunosupresión en cada grupo experimental se realizó a través del conteo total y conteo diferencial de células blancas (linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos) en sangre periférica según los procedimientos establecidos para tal fin (Aguilar, 2006; Wintrobe, 2005). Para ello una muestra de sangre de cada animal fue extraída de la vena mandibular en tres periodos de tiempo: antes de iniciar el respectivo tratamiento (0 horas), 48 horas después de recibir el tratamiento y 120 horas después de iniciado el tratamiento. Los resultados obtenidos

fueron analizados realizando comparación de medias ANOVA y análisis pos hoc con la prueba de Duncan en el programa estadístico SPP 18.

5.1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ciclofosfamida es un agente alquilante cuya acción citotóxica es llevada a cabo por el entrecruzamiento de las cadenas de DNA y RNA e inhibición de la síntesis de proteínas. En sangre periférica uno de los efectos más característico es la disminución de células blancas, que sumado a la disminución en el conteo celular de órganos como bazo y medula ósea potencian su efecto inmunosupresor (Díaz, 2008; Huyan et al., 2011; Salem et al., 2012).

Todos los animales evaluados a las 0 horas (basal) presentaron recuentos absolutos de células blancas en sangre periférica en un rango de 6500 a 13000 células/mm^3, considerados valores normales para este linaje (www.criver.com). Cuarenta y ocho horas (48h) post tratamiento, el grupo experimental tratado con ciclofosfamida mostró recuentos por debajo del rango normal (<3000 células/mm^3), valores con diferencias estadísticamente significativas (p= 0,00007) frente a los otros tratamientos (Figura 5.1) (Anexo 5.1a). Estos resultados garantizan la inmunosupresión del modelo animal tratado con ciclofosfamida 48h post inoculación. Aunque, el conteo total de células blancas del grupo tratado con ciclofosfamida continuó por debajo del rango normal 120h post tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,058) con respecto a los demás grupos experimentales para este periodo de tiempo (Anexo 5.1b).

Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones donde ratones BALB/c sufren una disminución de células blancas post tratamiento con ciclofosfamida por un periodo de 1 a 5 días, recuperándose parcialmente del día quinto al décimo (Huyan et al., 2011; Legrand et al., 1991). Cabe resaltar que las alteraciones producidas por el tratamiento con ciclofosfamida no solo se limitan a la reducción de número de células blancas en sangre periférica, bazo y medula ósea, también se conocen efectos adicionales sobre conteos de células dendríticas, células T, B y células reguladoras (T reg), alterando el microambiente celular y cinética de muchas de estas células efectoras (Huyan et al., 2011).

El grupo tratado con acetato de hidrocortisona no presento diferencias estadísticamente significativas frente a los demás grupos en ninguno de los tiempos evaluados, lo que podría ser correlacionado con los mecanismos inespecíficos y variados reportados tras el uso de corticoides, dentro de los que se destacan la destrucción celular, redistribución o inhibición de algunas de las funciones celulares; adicionalmente se conoce que la

susceptibilidad varía dependiendo la especie, clase y grado de activación de la célula afectada (Dracott and Smith, 1979).

Por su parte, los recuentos diferenciales no mostraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,169), en ninguno de los tiempos o grupos evaluados; por lo cual no fue posible demostrar la neutropenia adquirida por el medicamento inmunosupresor.

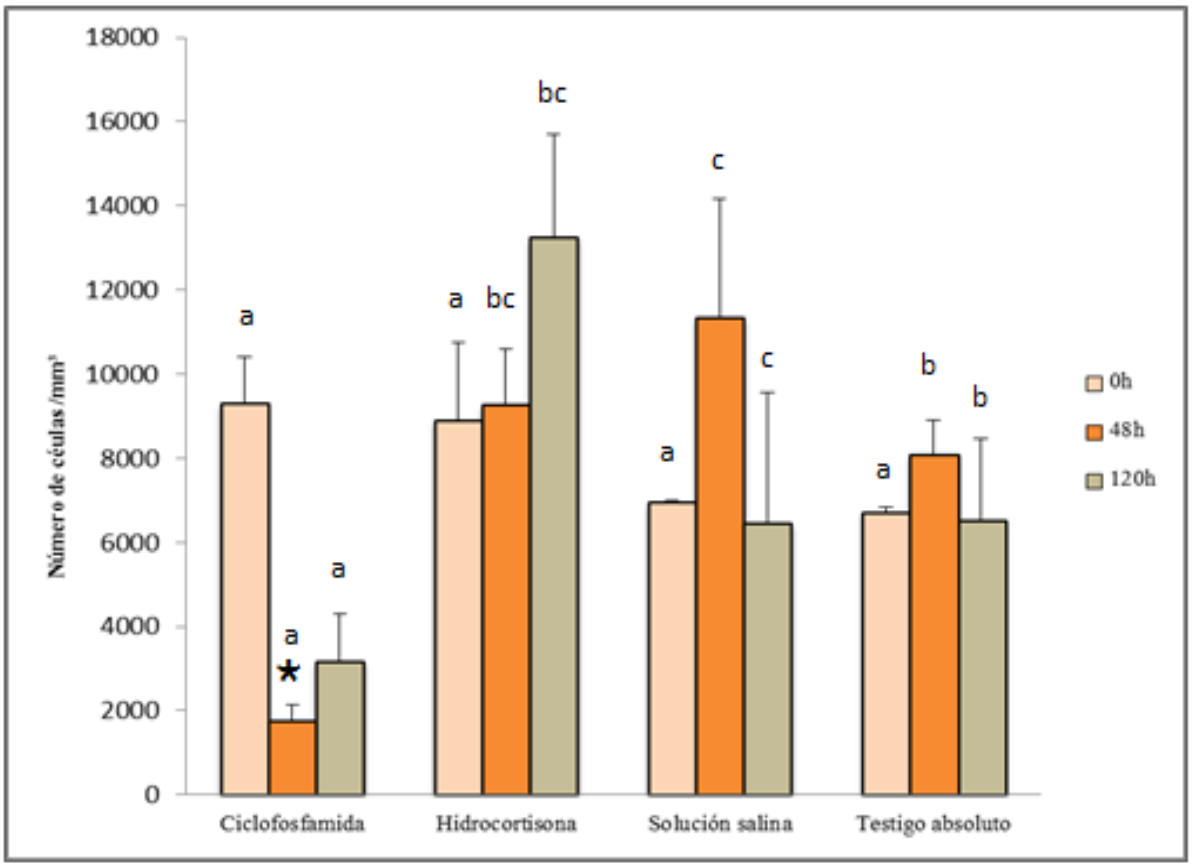


Figura 5.1 Recuento absoluto células blancas posterior al tratamiento con medicamentos inmunosupresores y en grupos control, evaluados en tres periodos de tiempo. Agrupaciones de Duncan α 0,05 (*) Tratamiento estadísticamente significativo.

5.2 PRUEBAS DE INFECTIVIDAD SISTÉMICA

5.2.1 EVALUACIÓN DOSIS

5.2.1.1 METODOLOGÍA

Con el fin de determinar la dosis adecuada de inóculo fúngico a evaluar en los ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos, se procedió a realizar un ensayo con 12 ratones comparando dos dosis de inóculo ($1x10^6$ conidios/ml y $1x10^8$conidios/ml) del

aislamiento 406 (*F. oxysporum*), perteneciente al banco de trabajo de los grupos de Enfermedades Infecciosas y Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Para ello los 12 ratones fueron distribuidos aleatoriamente (hembras y machos) en dos grupos: inmunosuprimidos (inoculados con una unica dosis de ciclofosfamida 200 mg/Kg 48h antes del reto) e inmunocompetentes, posteriormente fueron inoculados por vía intraperitoneal con una suspensión de conidios del aislamiento 406 (Tabla 5.2) en un volumen de 100 µl. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre al azar en algunos de los animales para determinar recuento de células blancas y en el caso específico de ratones inmunosuprimidos comprobar la inmunosupresión celular.

Tabla 5.2 Distribución de grupos experimentales utilizados para evaluación de dosis de inóculo.

Grupos Experimentales	Dosis de $1x10^6$ conidios/ml	Dosis de $1x10^8$ conidios/ml
	número de animales	número de animales
Ratones inmunocompetentes (IC)	3	3
Ratones inmunosuprimidos (IS)	3	3

Posteriormente, los ratones fueron monitoreados durante siete días realizando seguimiento diario de condiciones fisiológicas y de comportamiento. Finalizado este periodo de tiempo, los animales que no murieron fueron sacrificados en cámara de CO_2 (18-20 L/min), e inmediatamente se procedió a la obtención de muestras sanguíneas por punción cardiaca para hemocultivos; se realizaron necropsias para determinar lesiones a nivel macroscópico y se realizó muestreo de tejidos (hígado, bazo, pulmón, riñón y cerebro) para recuento de unidades formadoras de colonia por gramo de tejido (UFC/g tejido). La metodología de los cultivos es explicada en detalle en el numeral 6.1

5.2.1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo celular realizado a las muestras de sangre periférica tomadas al azar en animales de los diferentes grupos, comprobó en el caso de los animales tratados con ciclofosfamida una disminución en el recuento absoluto de células blancas, con lo cual confirmamos el estado de inmunosupresión. En el caso de ratones control e inmunocompetentes, los recuentos de células blancas estuvieron dentro de los rangos normales para este linaje (www.criver.com).

Los cultivos de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con $1x10^6$ conidios/ml fueron negativos después de 15 días de incubación, al igual que los hemocultivos (datos no mostrados). El seguimiento clínico y de comportamiento no mostró ninguna alteración característica, solo se observó piloerección moderada con

respuesta normal a estímulos y 100% de supervivencia. Las necropsias e histopatologías no mostraron ninguna evidencia de alteración o proceso infeccioso en curso, la tinción de Grocott fue negativa para todos los órganos evaluados.

A partir de la dosis de $1x10^8$ conidios/ml si fue posible la recuperación del patógeno en la mayoría de órganos, excepto cerebro, tanto en ratones inmunocompetentes como inmunosuprimidos, siete días post inoculación (Figura 5.2). Los recuentos de UFC/g tejido no fueron estadísticamente significativos entre ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos en ningún órgano (Anexo 5.2); tampoco fue posible reaislar el hongo de ningún hemocultivo. El seguimiento clínico si mostró diferencias en los individuos dependiendo de su estado inmune; en el caso de ratones inmunocompetentes se observó piloerección moderada y transitoria que resuelve espontáneamente, respuesta normal a estímulos y 100% de supervivencia, mientras que en ratones inmunosuprimidos se observó, además de piloerección moderada, letargia temporal, pérdida de peso y muerte de uno de los tres ratones (33,3%) 72h después de haber sido inoculado. Las necropsias no mostraron alteración macroscópica evidente en ninguno de los animales evaluados. Las histopatologías de los órganos evaluados (hígado, pulmón, bazo, riñón y cerebro), en ratones inmunocompetentes, no mostraron ningún tipo de lesión compatible con un proceso de infección fúngica y la tinción de Grocott fue negativa en todos los órganos evaluados. En el caso de ratones inmunosuprimidos, se evidenciaron cortes de pulmones congestivos con infiltrados celulares en septos alveolares, hígados congestivos con inflamación aleatoria, y tinción de Grocott positiva en el hígado de uno de los animales.

Para concluir, los casos de infección, progresión y mortalidad se presentaron únicamente con la dosis alta ($1x10^8$). Aunque en nuestro ensayo la vía de inoculación utilizada fue la intraperitoneal, estos resultados coinciden con los obtenidos en otras investigaciones (Legrand et al., 1991; Schafer et al., 2014) donde se ha podido establecer relaciones directamente proporcionales entre la dosis de inóculo, progresión y mortalidad. Es el caso concreto de los resultados obtenidos por Schafer y colaboradores (2014), quienes lograron evidenciar como dosis de inóculos de 10^6 conidios/ml inyectados intravenosamente en un volumen de 200µl, muestran una progresión de enfermedad lenta y una mortalidad (20 días post inoculación) mucho más baja a la observada con dosis mayores. Sumado a esto, se ha demostrado que *Fusarium* muestra baja virulencia en ratones, lo que implica el uso de altas concentraciones de inóculo para lograr reproducir la infección (Guarro, 2013; Odds et al., 1998), a pesar que en condiciones naturales estas exposiciones no sean comunes.

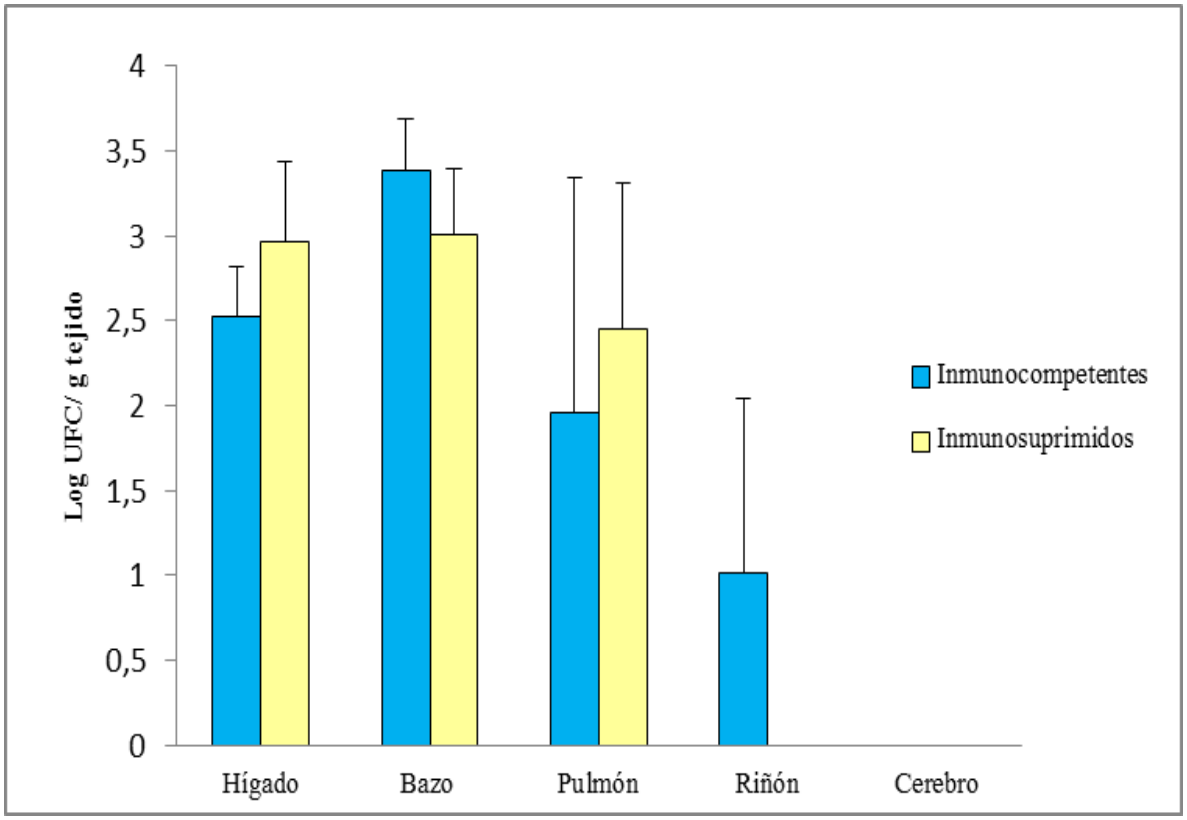


Figura 5.2 Resultados de recuentos de UFC/g tejido en órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados intraperitonealmente con una dosis de $1x10^8$ conidios/ml del aislamiento 406 (*F. oxysporum*), siete días post-inoculación.

5.2.2. VIAS DE INOCULACIÓN

5.2.2.1 METODOLOGÍA

Se probaron dos vías de inoculación: intraperitoneal e intravenosa (venal lateral de la cola), con una dosis de $1x10^8$ conidios/ml y un volumen de inyección de 100µl. Para ello fueron utilizados 28 animales, distribuidos en tres grupos experimentales (Tabla 5.3) y dos tiempos de muestreo (días tres y siete post-inoculación).

Tabla 5.3 Distribución de grupos experimentales utilizados para la evaluación de vías de inoculación, inmunocompetente (IC), inmunosuprimido (IS).

Vías de Inoculación	Tiempo de muestreo/ número de animales			
	3 días		7 días	
	IC	IS	IC	IS
Inoculación intraperitoneal (IP)	3	3	3	3
Inoculación intravenosa (IV)	3	3	3	3
Grupo control			2	2

Los parámetros evaluados comprendieron toma de muestras de sangre periférica para conteo de células blancas, seguimiento clínico y de comportamiento post inoculación, necropsias, análisis microbiológico (UFC/g tejido), hemocultivos y análisis histopatológico, todos bajo las condiciones descritas detalladamente en el numeral 6.1.

5.2.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que a partir de las dos vías de inoculación (intraperitoneal e intravenosa) y los dos tiempos de muestreo (días tres y siete post inoculación) es posible la recuperación del hongo en los diversos órganos evaluados. Adicionalmente se confirmó que la inmunosupresión fue exitosa.

Por vía intraperitoneal el seguimiento clínico realizado mostró piloerección leve, letargia temporal, baja respuesta a estímulos tanto en ratones inmunosuprimidos como inmunocompetentes. Se presentó la muerte de una hembra (16,6%) inmunosuprimida 72h post inoculación y 100% de supervivencia en animales inmunocompetentes. Las necropsias mostraron esplenomegalia moderada en el 50% de los animales inoculados por esta vía, independientemente del estado inmunológico (inmunocompetentes e inmunosuprimidos). A nivel microbiológico, la recuperación del patógeno fue posible en todos los órganos y en los diferentes periodos de muestreo, a excepción de pulmones de ratones inmunocompetentes, donde no fue posible su reaislamiento al día séptimo (Figura 5.3). Los hemocultivos fueron negativos en todos los casos y tiempos de muestreo. A nivel histológico, se evidenciaron lesiones granulomatosas en hígado en 83,3% (10) de los casos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos muestreados en ambos periodos de tiempo (3 y 7 días post inoculación). Los pulmones no presentaron alteración tisular. En el caso de animales inmunosuprimidos sacrificados tres días post inoculación, los cortes de bazo revelan lesiones granulomatosas con tinción de Grocott positivo en el 100% (3) de casos.

Los animales inmunosuprimidos inoculados por vía intravenosa presentaron piloerección moderada, pérdida de peso, letargia, postración, baja respuesta a estímulos, presentándose la muerte de tres animales (50%) 24h post inoculación. En animales inmunocompetentes se presentó piloerección moderada que resuelve espontáneamente, letargia temporal, baja respuesta a estímulos, pero no se presentó mortalidad.

Los cultivos de hígado, bazo y riñón presentaron la mayor recuperación de UFC/g tejido siete días post inoculación, aunque en el caso de pulmón y riñón la recuperación fue exclusiva en animales inmunosuprimidos (Figura 5.3), quizás obedeciendo las diversas alternativas de dispersión que ofrece el torrente sanguíneo, la circulación órgano específica, o a que la carga fúngica es gradualmente eliminada en animales con una

respuesta inmune intacta. A nivel histológico los animales inmunocompetentes mostraron hígados y pulmones con lesiones granulomatosas y necrosis para ambos tiempos de muestreo. En este mismo grupo, se evidenciaron bazos sin lesión aparente, pero con presencia de estructuras fúngicas (Grocott positivo) en todos los casos al tercer día post inoculación. En el caso de animales inmunosuprimidos todos presentaron hígados y pulmones congestivos, con lesiones granulomatosas y tinción de Grocott positiva (Figura 5.4).

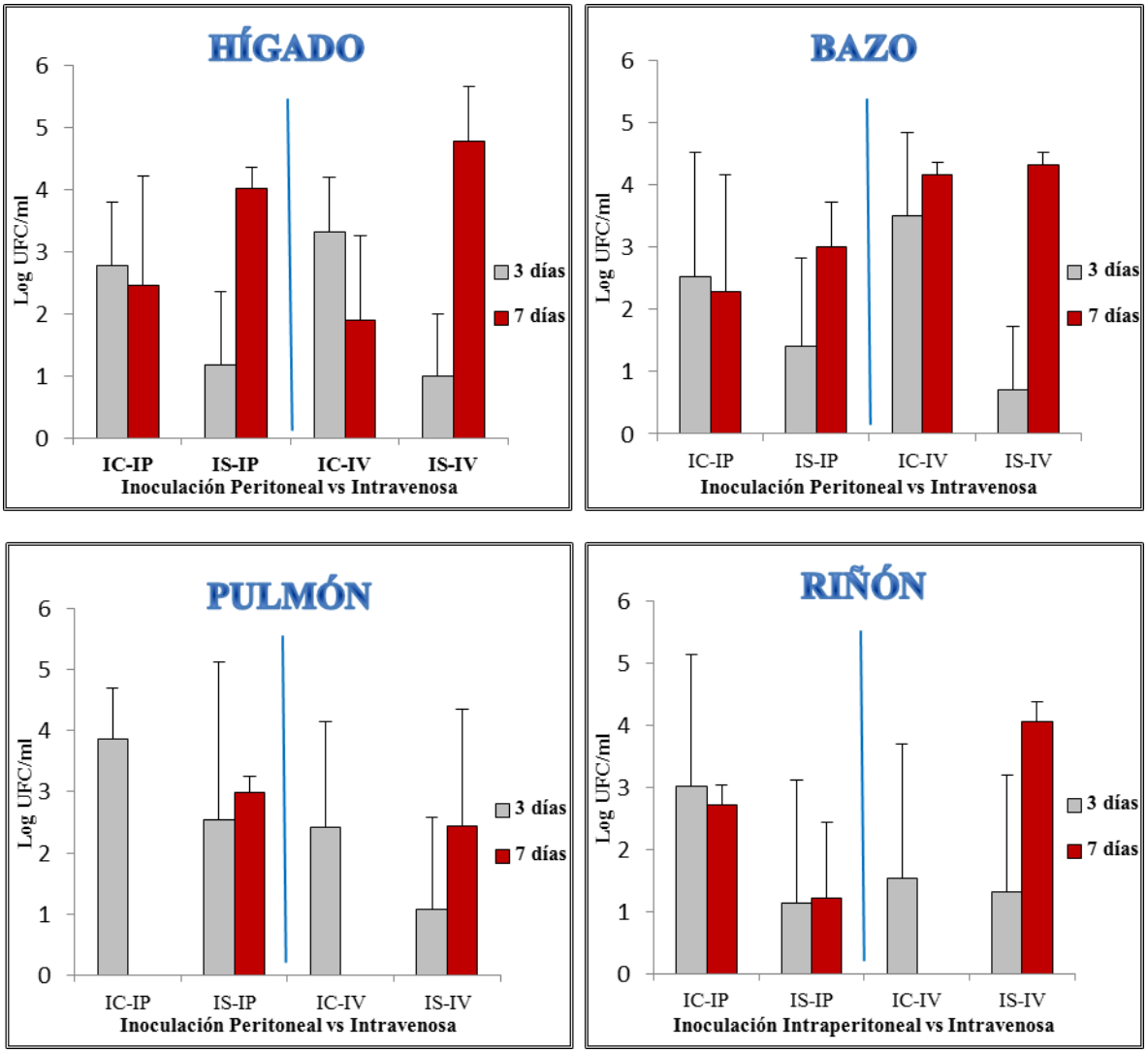


Figura 5.3 Resultados de recuentos de UFC/g tejido en órganos de ratones inmunocompetentes (IC) e inmunosuprimidos (IS) inoculados por vía intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) con $1x10^8$ conidios/ ml en dos periodos de muestreo (3 y 7 días).

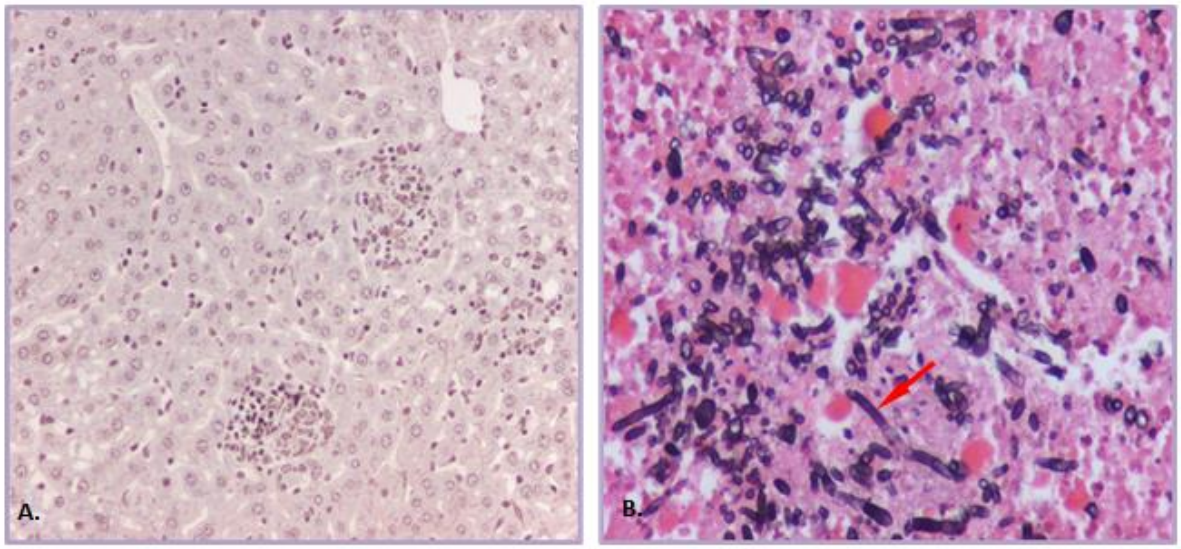


Figura 5.4 Corte histológico de hígado grupo control vs grupo inoculado. **A.** Sección de hígado de ratón grupo control siete días post inoculación intravenosa. Tinción de Grocott (200X) **B.** Sección de hígado con granuloma severo y presencia de hifas (flecha roja) en ratón inmunosuprimido inoculado con aislamiento 406 (*F. oxysporum*), 7 días post inoculación intravenosa. Tinción de Grocott (400X).

Pese a que en muchos casos la puerta de entrada de infecciones diseminadas por *Fusarium* continua siendo incierta, se han reportado como sitios de entrada tracto respiratorio (particularmente senos paranasales), tracto gastrointestinal y líneas venosas centrales (Schafer et al., 2014). A nivel experimental, se ha logrado reproducir la infección empleando varias alternativas como lo son la inoculación sinopulmonar, con la cual se han podido simular neumonías necrotizantes en animales neutropénicos (Lionakis et al., 2006). La vía intravenosa, usada para producir infecciones sistémicas, la cual ha sido probada con éxito en numerosas investigaciones (Legrand et al., 1991; Ortoneda et al., 2004; Prados-Rosales et al., 2006) y ha permitido dilucidar varios de los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo; y la vía intranasal, una de las rutas que mejor refleja la patogénesis natural de la infección humana, la cual no ha podido ser fielmente reproducida debido al inconveniente de liberar una gran cantidad de inóculo ocasionando un modelo de fusariosis pulmonar aguda, cuando en humanos la fusariosis pulmonar es subaguda y se da por exposiciones a repetición más que por exposiciones a grandes inóculos (Muhammed et al., 2012).

Aunque en este estudio probamos en un comienzo la vía intraperitoneal como una alternativa para la infección a nivel sistémico, la producción de signos clínicos, daño tisular y mortalidad fue menor a la observada por vía intravenosa en animales inmunocompetentes; adicionalmente se desconoce las ventajas o desventajas que pueda presentar frente a la vía intravenosa ya que hasta la fecha no hay reportes de modelos de infección de *Fusarium* por vía intraperitoneal. Sin embargo, se sabe que en el caso de

modelos de infección experimental para cromoblastomicosis, esta vía promueve una respuesta inmune innata más deficiente que limita la remoción del patógeno de los diversos órganos (Hohl, 2014), y dificulta el estudio de mecanismos naturales de patogenicidad. Finalmente, guiándonos por reportes existentes y partiendo de la necesidad de un modelo sistémico que nos permita comparar diversos aislamientos de *Fusarium* decidimos trabajar con la vía intravenosa para los ensayos posteriores.

5.3 PRUEBAS DE EXPOSICIÓN SUPERFICIAL

Aunque en la mayoría de casos la piel constituye una barrera natural de defensa frente a la invasión fúngica, conidios o fragmentos de micelio pueden entrar a través de puntos donde se pierde su continuidad ya sea por traumas, quemaduras o inoculación iatrogénica. Los mecanismos que promueven la adherencia fúngica a tejidos humanos no han sido bien caracterizados pero se destacan la unión vía adhesinas, interacciones hidrofóbicas e interacciones proteína-proteína (Gauthier and Keller, 2013).

Dentro de los objetivos planteados en la realización de este proyecto, se propuso evaluar por primera vez, la capacidad de aislamientos de *Fusarium* spp. para colonizar e infectar áreas dérmicas que previamente sufren una alteración (rasurado y raspado). Guiándonos por reportes existentes para pruebas cutáneas con dermatofitos (Ben-Ami et al., 2010; Hay et al., 1988; Shimamura et al., 2012) propusimos un modelo de exposición superficial en el cual se contempló la exposición directa al inóculo fúngico.

5.3.1 METODOLOGÍA

Se utilizaron 28 ratones BALB/c, machos y hembras de aproximadamente 8 semanas de edad, con un peso de 20 a 25 gramos, los cuales fueron distribuidos en tres grupos, como se indica en la tabla 5.4, realizando muestreos en cuatro periodos de tiempo (7, 14, 21 y 28 días).

Tabla 5.4 Distribución de grupos experimentales utilizados para evaluación de exposición superficial.

Grupos Experimentales	Tiempo de muestreo/ número de animales			
	7 días	14 días	21 días	28 días
Inmunocompetentes (IC)	3	3	3	3
Inmunosuprimidos (IS)	3	3	3	3
Grupo control	1	1	1	1

Los animales fueron sedados con Ketamina (50mg/Kg) y Xilazina (5mg/Kg), con el fin de realizar el procedimiento de rasurado y raspado con pumita (piedra volcánica), en la parte superior del lomo. La exposición se realizó colocando directamente sobre el área rasurada

y raspada 0.1µl de una suspensión de $1x10^8$conidios/ml del aislamiento 162 (*F. oxysporum*, proveniente de una lesión en el lomo de un canino) y se vendó con un apósito saturado con 100µl de solución salina estéril para mantener condiciones de humedad por 24h. Posterior a esto, el apósito fue retirado y se hizo seguimiento al área expuesta al inóculo durante 28 días, realizando sacrificios (cámara de CO_2 18-20L/min) los días 7, 14, 21 y 28. En los días de sacrificio se tomaron muestras de piel para cultivo e histopatología y muestras de pelo para cultivo y exámen directo con KOH al 20% suplementado con tinta Parker.

La muestra de piel obtenida de cada animal fue cortada en dos porciones una para análisis microbiológico y otra para histopatología. La porción para análisis microbiológico fue cortada en 10 partes que fueron sembradas por punción en agar Sabouraud suplementado con 50mg/l de cloranfenicol y fueron incubadas a 37°C hasta su crecimiento, o en caso contrario descartadas tras 15 días en incubación. Este mismo procedimiento se realizó con una porción de pelo, mientras la otra porción fue guardada en sobres de papel pergamino estéril hasta su observación directa.

5.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La observación diaria del área expuesta no mostró ningún rasgo clínico aparente de infección, alteración o lesión (Figura 5.5). Los cultivos de piel y pelo de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos fueron negativos en todos los tiempos de muestreo, al igual que el examen directo. El análisis histopatológico no reveló alteraciones evidentes del estrato corneo en los animales analizados.

El procedimiento experimental planteado no fue exitoso en el establecimiento de una infección reproducible. Aunque no se encontraron modelos animales de exposición superficial a *Fusarium* con que comparar, estas dificultades podrían ser atribuidas a las diferencias entre animales y humanos, la estructura de la piel (número de capas celulares y número de folículos, entre otros), el sistema inmune, los cuales estarían determinando la posibilidad de adherencia o no a la piel. Adicionalmente, se ha reportado en varios modelos animales para dermatofitos especies con mayor susceptibilidad que otras, o curaciones espontáneas que no suceden en humanos y dificultan enormemente la reproducibilidad de la patología (Shimamura et al., 2012).

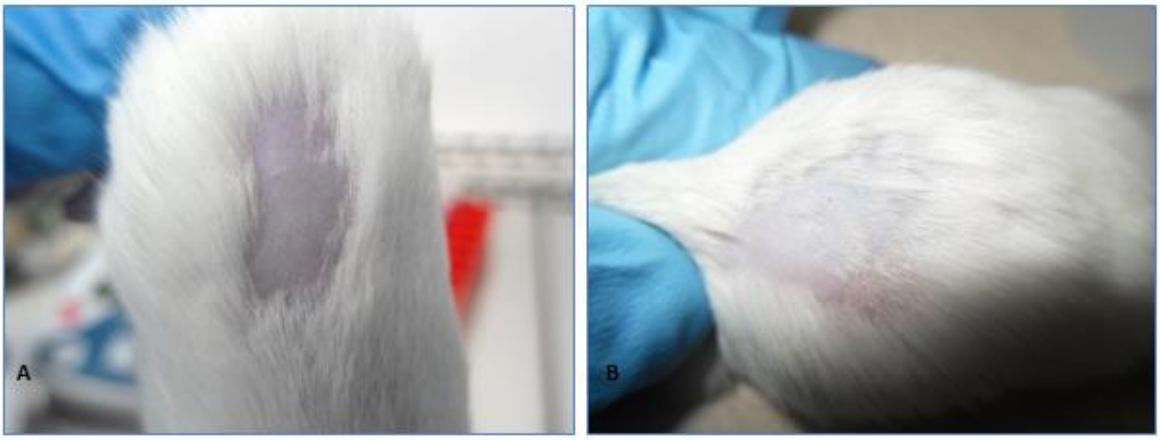


Figura 5.5 Área de exposición superficial a *Fusarium* **A.** Imagen de ratón inmunosuprimido expuesto superficialmente al aislamiento 162 (*F. oxysporum*) 24 horas post exposición; no se observa ninguna alteración macroscópica evidente **B**. Imagen de ratón inmunosuprimido expuesto superficialmente al aislamiento 162 (*F. oxysporum*) 7 días post exposición; no se observa ninguna alteración macroscópica evidente, se observa crecimiento del pelo en el área expuesta.

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp. DE DIVERSO ORIGEN INOCULADOS SISTÉMICA Y SUPERFICIALMENTE

El género *Fusarium* ha sido descrito como un patógeno oportunista, frecuentemente asociado a lesiones superficiales en piel, uñas y corneas en hospederos inmunocompetentes y en casos más severos a infecciones diseminadas en pacientes inmunosuprimidos, con una alta mortalidad (50-80%)(Dignani and Anaissie, 2004; Girmenia et al., 2000). Dentro de los factores de virulencia asociados a este género se han descrito la producción de enzimas hidrolíticas, toxinas y la capacidad de adherencia a material de plástico como catéteres y lentes de contacto (Monzón, 2005; Nucci and Anaissie, 2007; Wu et al., 2004).

La puerta de entrada de las infecciones localizadas son pequeñas lesiones producidas por traumatismos o inoculaciones iatrogénicas; Las infecciones diseminadas son la forma clínica de fusariosis más frecuente en hospederos severamente inmunosuprimidos (70% del total de casos), donde el patrón más usual es la combinación de lesiones cutáneas y cultivos de sangre positivos, con o sin compromiso de otros órganos (pulmón, senos paranasales, riñón, hígado, medula ósea, entre otros) (Nucci and Anaissie, 2007). En los casos diseminados las lesiones cutáneas se presentan particularmente en extremidades como piernas, dedos de pies, manos y cara. Estas lesiones se caracterizan por nódulos subcutáneos eritematosos múltiples, y pápulas eritematosas con necrosis central progresiva y lesiones en diana (zona central necrótica rodeada de eritema) (Monzón, 2005; Nucci and Anaissie, 2007).

El diagnóstico se realiza con base en la presentación clínica de la enfermedad. Aunque el patógeno puede aislarse de la mayoría de lugares que infecta (piel, cornea, esputo, hueso y sangre, entre otros), la piel es una importante fuente de diagnóstico en pacientes inmunosuprimidos, ya que en la mayoría de casos las lesiones en piel preceden la fungemia (5-10 días) (Dignani and Anaissie, 2004), siendo estas dos condiciones (lesiones en piel y fungemia) las más sugestivas en el diagnóstico de fusariosis en hospederos severamente inmunosuprimidos. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento del patógeno de muestras clínicas, obteniendo numerosas colonias de una misma muestra o el mismo morfotipo de diferentes muestras, y un examen directo positivo. En algunos casos se requiere de estudios histopatológicos o moleculares adicionales para su identificación (Giraldo, 2010; Nucci and Anaissie, 2007).

En el presente trabajo la capacidad infectiva de aislamientos de diverso origen de *Fusarium* fue evaluada a partir de un modelo animal de inoculación sistémica y exposición superficial; para ello se realizó recuperación del patógeno a partir del cultivo de órganos

(hígado, bazo, pulmón, riñón), en el caso de exposición superficial (piel, pelos), seguimiento clínico (signos asociados a la infección), análisis histopatológico y supervivencia de los individuos.

6.1 METODOLOGÍA

6.1.1. MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Se evaluaron 12 aislamientos del género *Fusarium* provenientes de un banco de trabajo de los grupos de Enfermedades Infecciosas y Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana, los cuales fueron aislados a partir de lesiones superficiales en humanos y animales, infecciones sistémicas en humanos y marchitamiento vascular en plantas (Tabla 6.1). La caracterización morfológica y molecular para identificación a nivel de especie fue llevada a cabo en trabajos anteriores (Linares, 2010; Vega, 2010). Estos 12 aislamientos fueron seleccionados luego de una caracterización molecular por AFLP, teniendo en cuenta las cuatro primeras combinaciones de cebadores y generando dendrogramas para cada combinación, lo que permitió la selección de los tres aislamientos más representativos de cada uno de los orígenes (Alvarado, 2014).

Tabla 6.1 Descripción de los aislamientos de *Fusarium* spp. empleados en el estudio.

ORÍGEN	CÓDIGO	ESPECIE	DESCRIPCIÓN LESIÓN DE AISLAMIENTO
ANIMAL	108	*F. solani*	Queratitis - Bovino
	161	*F. verticillioides*	Micosis superficial - Cola de canino
	162	*F. oxysporum*	Micosis superficial - Lomo de canino
HUMANO SUPERFICIAL	201	*F. sporotrichioides*	Onicomicosis
	203	*F. verticillioides*	Queratitis
	205	*F. oxysporum*	Onicomicosis
VEGETAL	310	*F. oxysporum*	Marchitamiento vascular - Haces vasculares planta de tomate
	314	*F. oxysporum*	Marchitamiento vascular - Haces vasculares planta de clavel
	319	*F. solani*	Marchitamiento vascular - Haces vasculares planta de gulupa
HUMANO SISTÉMICO	404	*F. solani*	Fungemia - Hemocultivo paciente neutropénico
	406	*F. oxysporum*	Fungemia - Hemocultivo paciente neutropénico
	409	*F. oxysporum*	Fungemia - Hemocultivo paciente neutropénico

6.1.2 MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Se utilizaron 360 ratones BALB/c, machos y hembras, de aproximadamente 8 semanas de edad, con peso corporal de 20 a 25 gramos, procedentes del Bioterio Central de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron mantenidos en una celda de microaislamiento en grupos de tres animales del mismo sexo por caja, con previa adaptación a condiciones de temperatura (20°C a 24°C), humedad

relativa (30% a 60%), ventilación (10 a 15 recambios por minuto), ruido controlado y ciclos de luz - oscuridad de 12 horas. Favoreciendo las prácticas de bienestar animal, se realizó enriquecimiento ambiental con material estéril en cada uno de los habitáculos y se establecieron criterios de punto final (Anexo 6.1) que fueron aplicados durante todo el seguimiento.

El protocolo experimental realizado fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, antes del sometimiento del proyecto al patrocinador. Posteriormente, se diligenció un Formato General de Aplicación de Uso de Animales (FUA) que fue revisado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Pontificia Universidad Javeriana.

6.1.3 PREPARACION DE INÓCULOS FÚNGICOS

La recuperación de los aislamientos de *Fusarium* spp. provenientes de un banco de conservación en papel filtro, se realizó en agar papa dextrosa (PDA) incubando a 30°C, durante ocho días. Trascurrido este tiempo las cajas fueron raspadas con solución salina estéril para posteriormente filtrar la suspensión con gasa estéril y finalmente concentrar la suspensión de conidios por centrifugación 5000 rpm por 10 min. La concentración de conidios fue ajustada a $1x10^8$conidios/ml por conteo en cámara de Neubauer. La confirmación de la viabilidad del inóculo se hizo por siembra de diluciones seriadas en placas de PDA e incubación a 30°C por 48 horas.

6.1.4 MODELO EXPERIMENTAL

El modelo experimental planteado comprendió la evaluación de doce aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de un modelo de infección sistémica y un modelo de exposición superficial, en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

Para la evaluación se distribuyeron grupos de doce animales, machos y hembras, (seis individuos inmunocompetentes y seis inmunosuprimidos), tratados con cada uno de los aislamientos de *Fusarium* spp. Pero debido al número de aislamientos a evaluar, los ensayos fueron fragmentados en tres montajes para el modelo sistémico (Tabla 6.2) y el modelo de exposición superficial (Tabla 6.3). Cada montaje comprendió la evaluación de cuatro aislamientos (uno de cada origen) escogidos aleatoriamente y un grupo control para un total de 60 animales por montaje.

Tabla 6.2 Distribución de aislamientos para la evaluación sistémica.

		ORÍGEN	MONTAJE 1	MONTAJE 2	MONTAJE 3
INOCULACIÓN SISTÉMICA	ANIMALES INMUNOCOMPETENTES	ANIMAL	6	6	6
		HUMANO- SUPERFICIAL	6	6	6
		VEGETAL	6	6	6
		HUMANO-SISTÉMICO	6	6	6
		GRUPO CONTROL	6	6	6
		TOTAL	**30**	**30**	**30**
	ANIMALES INMUNOSUPRIMIDOS	ANIMAL	6	6	6
		HUMANO- SUPERFICIAL	6	6	6
		VEGETAL	6	6	6
		HUMANO-SISTÉMICO	6	6	6
		GRUPO CONTROL	6	6	6
		TOTAL	**30**	**30**	**30**

Tabla 6.3 Distribución de aislamientos para la evaluación superficial.

		ORÍGEN	MONTAJE 1	MONTAJE 2	MONTAJE 3
EXPOSICIÓN SUPERFICIAL	ANIMALES INMUNOCOMPETENTES	ANIMAL	6	6	6
		HUMANO- SUPERFICIAL	6	6	6
		VEGETAL	6	6	6
		HUMANO-SISTÉMICO	6	6	6
		GRUPO CONTROL	6	6	6
		TOTAL	**30**	**30**	**30**
	ANIMALES INMUNOSUPRIMIDOS	ANIMAL	6	6	6
		HUMANO- SUPERFICIAL	6	6	6
		VEGETAL	6	6	6
		HUMANO-SISTÉMICO	6	6	6
		GRUPO CONTROL	6	6	6
		TOTAL	**30**	**30**	**30**

6.1.5 INMUNOSUPRESIÓN

Los animales fueron inmunosuprimidos con una única inyección intraperitoneal de 200 mg/Kg de Ciclofosfamida, 48 horas antes de la infección con los aislamientos fúngicos (Ortoneda et al., 2004; Ruiz-Cendoya et al., 2008; Ruiz-Cendoya et al., 2011).

6.1.6 INOCULACIÓN SISTÉMICA

Una dosis de 0.1ml de $1x10^8$conidios/ml de los diferentes aislamientos de *Fusarium* (12 aislamientos) fue inoculada a nivel sistémico (vena lateral de la cola) en cada uno de los animales inmunosuprimidos e inmunocompetentes de cada grupo. Los animales fueron monitoreados por siete días, tiempo en el cual se verificó diariamente (rondas mañana y

tarde) condiciones fisiológicas, comportamiento y todos aquellos posibles signos asociados a la infección (respuesta a estímulos, presencia o ausencia de signos faciales de dolor, secreción de porfirinas y piloerección, entre otros).

Después de trascurrido este tiempo, los animales que no murieron, fueron sacrificados en cámara de CO_2 (18-20L/min) e inmediatamente se procedió a la obtención de muestras sanguíneas para la realización de hemocultivos, posteriormente se realizaron necropsias y muestreo de tejidos (hígado, bazo, pulmón y riñón) para recuento de UFC/g tejido. Este protocolo se basó en el procedimiento propuesto por Ortoneda y colaboradores (2004), con algunas modificaciones que son descritas detalladamente en el numeral 6.1.

Las muestras de sangre obtenidas de cada animal por punción cardiaca fueron colectadas en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml que contenían caldo BHI, luego se incubaron a 30°C por 72 h, posterior a la fase de pre-enriquecimiento en BHI se hizo un pase a agar Sabouraud, suplementado con 50mg/L de Cloranfenicol, y se incubaron a 37°C por 15 días, revisando diariamente el desarrollo de colonias fúngicas.

Los órganos fueron removidos asépticamente y cortados en dos porciones iguales. Una porción fue trasferida a un recipiente con formol bufferado (10%) para los análisis histopatológicos y la otra mitad de cada órgano fue transferida a tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, donde fueron pesados. Posteriormente, la porción del órgano fue homogenizada en 300 µl de solución salina estéril con ayuda de un macerador mecánico; se realizaron diluciones seriadas del homogenizado de cada órgano, sembrando 100 µl en placas de agar Sabouraud, suplementado con Cloranfenicol 50mg/L, y se incubó a 37°C hasta su crecimiento, o en caso contrario descartadas tras 15 días en incubación. El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) fue calculado como el logaritmo de UFC/gramo de tejido.

6.1.7. EXPOSICIÓN SUPERFICIAL

Para las pruebas de exposición superficial, los animales fueron sedados con Ketamina (50mg/Kg) y Xilazina (5mg/Kg), con el fin de realizar el procedimiento de rasurado y raspado con pumita (piedra pómez) en la parte superior del lomo. La exposición se realizó colocando directamente sobre el área rasurada y raspada 0.1ml de una suspensión de $1x10^8$conidios/ml de los diferentes aislamientos y se vendó con un apósito saturado con 0.1ml de solución salina estéril para mantener condiciones de humedad por 24h. Posterior a esto, se hizo seguimiento al área expuesta al inóculo durante siete días con el fin de evidenciar cualquier alteración del estrato corneo; transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 (18-20L/min), tomando una muestra de piel para cultivo e histopatología y muestras de pelo para cultivo y exámen directo con KOH al 20%

suplementado con tinta Parker. Se consideró tomar muestras de escamas de piel para directo, pero no fue posible su obtención ya que tras siete días de seguimiento el área había sido nuevamente cubierta por pelo.

La muestra de piel obtenida de cada animal fue cortada en dos porciones, una para análisis microbiológico y otra para histopatología. La porción para análisis microbiológico fue cortada en 10 partes, las cuales fueron sembrados por punción en Agar Sabouraud, suplementado con 50mg/L de Cloranfenicol, y fueron incubadas a 37°C hasta su crecimiento, o en caso contrario descartadas tras 15 días en incubación. Este mismo procedimiento se realizó con una porción de pelo, mientras la otra porción fue guardada en sobres de papel pergamino estéril hasta su observación directa.

Considerando que *Fusarium* es un hongo comúnmente encontrado en el ambiente, se realizaron cultivos ambientales a la sala de experimentación y los habitáculos de los animales, evitando informar falsos positivos.

Para la lectura de los cultivos de piel y pelo y teniendo en consideración la característica ambiental de *Fusarium,* se empleó el criterio de informar como positivo solo aquellos cultivos donde 6 o más puntos de siembra (de 10) tuvieran crecimiento, de lo contrario fueron informados como negativos.

6.1.8 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS

La mitad de cada órgano (hígado, bazo y pulmón) fijada en formaldehido bufferado al 10% y embebida en parafina, fue procesada y examinada por el grupo de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, siguiendo los protocolos ya establecidos para tal fin (Bancroft, 2002), realizando tinción básica de hematoxilina-eosina (HE). Adicionalmente, se realizó tinción especial de plata metamina de Grocott (Grocott, 1955) en busca de estructuras fúngicas.

6.1.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 18, realizando análisis de varianza (ANOVA) por origen de aislamiento y por cada uno de los aislamientos entre animales inmunocompetentes versus inmunosuprimidos; pruebas post hoc, con el fin de determinar diferencias en tratamientos o estado inmune. Adicionalmente, para integrar los parámetros evaluados en el modelo de infección sistémica, se realizó un análisis factorial utilizando el programa Design Expert versión 8 y un análisis multivariado (PCA) utilizando el programa MATLAB versión 13.

6.2 INOCULACIÓN SISTÉMICA

6.2.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN EVALUACIÓN MICROBIOLOGÍCA

Todos los aislamientos evaluados tuvieron la capacidad de diseminarse en hospederos inmunocompetentes e inmunosuprimidos, al realizar el análisis de varianza por origen (con los tres aislamientos de un mismo origen), para todos los orígenes se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) (Anexo 6.2). Sin embargo, al realizar los análisis de varianza por aislamiento (inmunocompetentes versus inmunosuprimidos), solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en casos particulares como se describirá a continuación.

Dentro de los aislamientos de origen animal tenemos los aislamientos, 108 (*F. solani*), 161 (F. *verticillioide*s), 162 *(F. oxysporum*), el único que mostró diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$), entre animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos en todos los órganos evaluados fue el aislamiento 108 (Figura 6.1); los aislamientos 161 y 162 no mostraron diferencias significativas en ninguno de los órganos evaluados (Tabla 6.4).

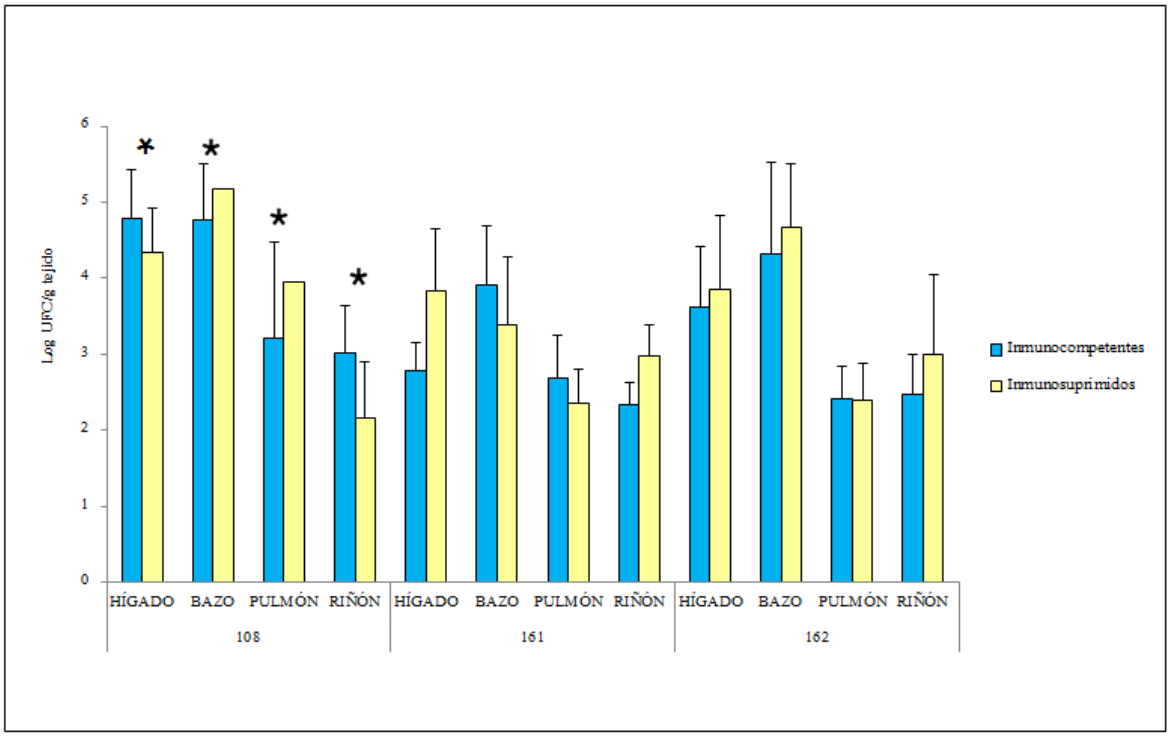


Figura 6.1 Resultados de recuentos UFC/g tejido de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con aislamientos de origen animal: 108 (*F. solani*), 161 (*F. verticillioides*), 162 (*F. oxysporum*). (*) Órganos con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.4 Consolidado de valores de probabilidad (p valor) del análisis de varianza (ANOVA) realizado para los recuentos de UFC/g tejido de animales inmunocompetentes versus inmunosuprimidos, por órgano y aislamiento.

Origen	ANIMAL			HUMANO - SUPERFICIAL			VEGETAL			HUMANO - SISTÉMICO		
Órgano/ Aislamiento	**108**	**161**	**162**	**201**	**203**	**205**	**310**	**314**	**319**	**404**	**406**	**409**
HÍGADO	0,0063	0,7982	0,6734	0,0287	0,6585	0,7290	0,1083	0,0856	0,4051	0,1351	0,0128	0,2756
BAZO	0,0017	0,6763	0,6018	0,5707	0,3207	0,4982	0,0364	0,2372	0,9986	0,3409	0,1422	0,5867
PULMÓN	0,0145	0,1903	0,2994	0,0042	0,8530	0,4713	0,8778	0,1783	0,2703	0,0879	0,1158	0,4013
RIÑÓN	0,0098	0,3514	0,3596	0,1601	0,4345	0,1402	0,1240	0,3409	0,1645	0,3409	0,8363	0,4258

Por su parte el grupo de aislamientos de origen humano-superficial, correspondientes al aislamiento 201 (*F. sporotrichioides*), 203 (*F. verticillioides*) y 205 (*F. oxysporum*), mostraron una tendencia de mayor recuperación en órganos de animales inmunosuprimidos (Figura 6.2), sin embargo el único aislamiento en el que se lograron establecer diferencias estadísticamente significativas entre animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos fue el aislamiento 201 (*F. sporotrichoides*), con un p valor en hígado y pulmón de 0,028 y 0,004, respectivamente.

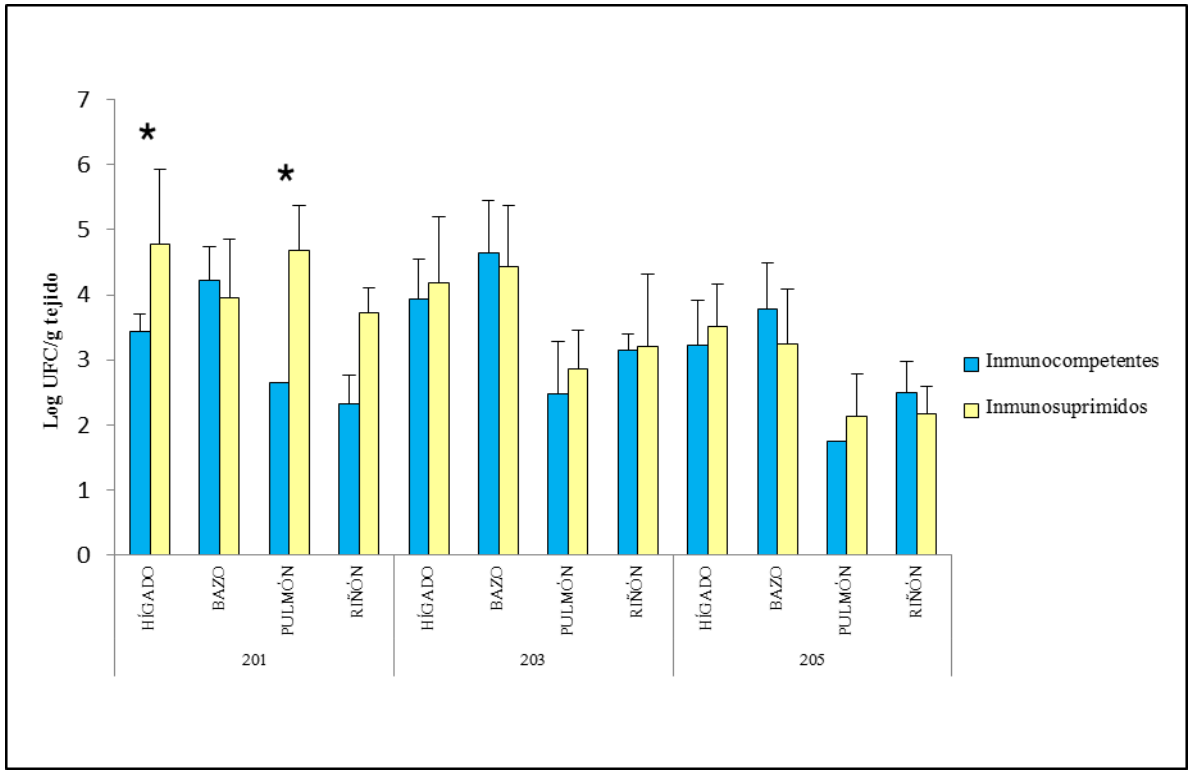


Figura 6.2 Resultados de recuentos UFC/g tejido de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con aislamientos de origen humano- superficial: aislamientos 201 (*F. sporotrichioides*), 203 (*F. verticillioides*) y 205 (*F. oxysporum*).). (*) Órganos con diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 6.3 se observa el comportamiento de los aislamientos de origen vegetal correspondientes a *F. oxysporum* (310 y 314) y *F. solani* (319). Aunque se observa una tendencia de mayor recuperación en animales inmunosuprimidos y en el caso específico del aislamiento 314 la recuperación fue exclusiva en hígado, pulmón y riñón de animales con esta condición inmune, no fue posible establecer diferencias significativas (p>0,05) entre animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos para ninguno de los aislamientos de este origen, excepto en bazo del aislamiento 310 (*F. oxysporum*) con un p valor de 0,036 (Tabla 6.4).

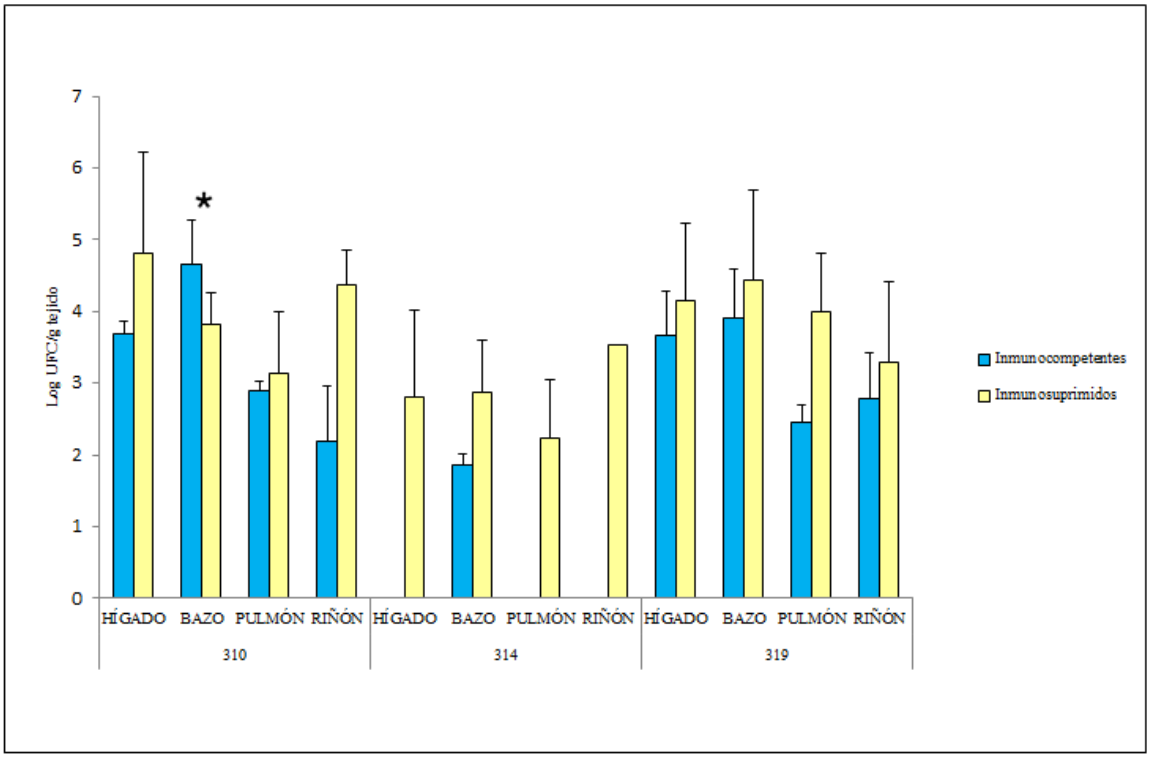


Figura 6.3 Resultados de recuentos UFC/g tejido de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con aislamientos de origen vegetal: 310, 314 (*F. oxysporum)*, 319 (*F. solani*). (*) Órganos con diferencias estadísticamente significativas.

Los aislamientos de origen humano-sistémico 404 (*F. solani*), 406 y 409 (*F. oxysporum*) mostraron mayor recuperación en animales inmunosuprimidos, exceptuando bazo de los aislamientos 404 y 406. Las cargas fúngicas encontradas en los animales inoculados con el aislamiento 404, fueron las más bajas en comparación con los otros dos aislamientos del mismo origen (Figura 6.4). El único aislamiento que mostró diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos fue el 406 (*F. oxysporum*) en hígado (p=0,012) (Tabla 6.4).

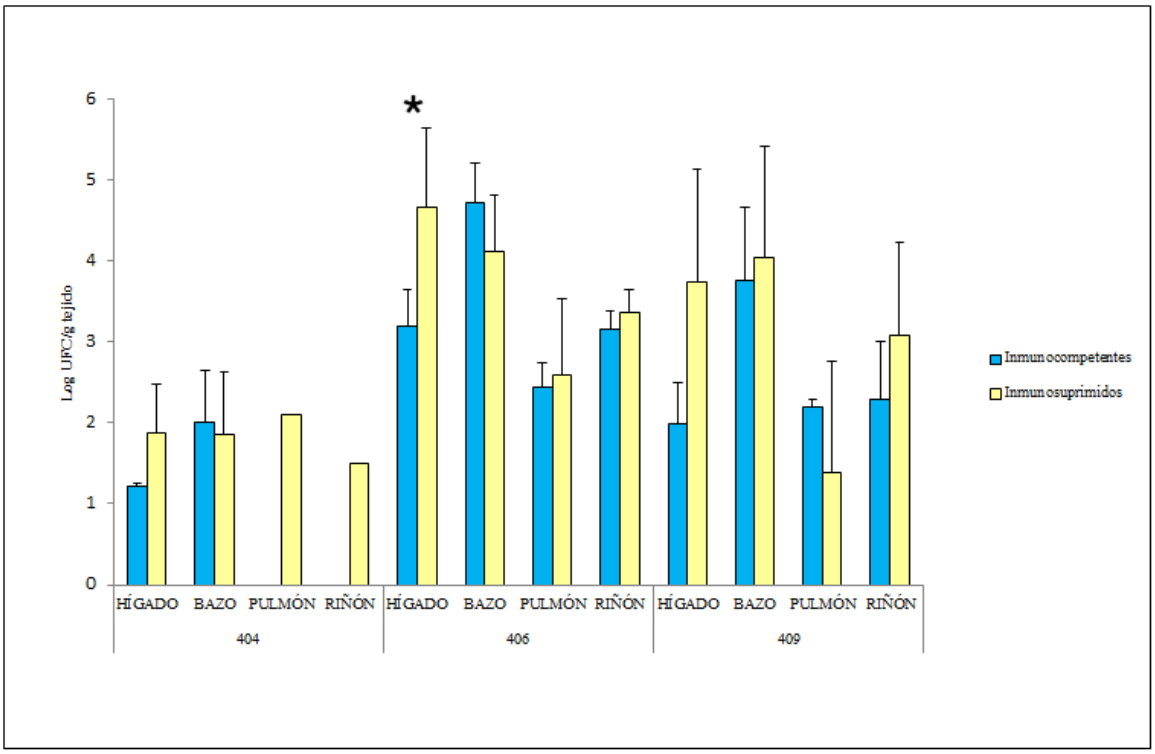


Figura 6.4 Resultados de recuentos UFC/g tejido de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con aislamientos de origen humano-sistémico: 404 (*F. solani*), 406 y 409 (*F. oxysporum*). (*) Órganos con diferencias estadísticamente significativas.

Aunque se establecieron diferencias significativas en la carga fúngica de algunos órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos inoculados con los aislamientos 108 (*F. solani*), 201 (*F. sporotrichoides*), 310 (*F. oxysporum*) y 406 (*F. oxysporum*), con los otros ocho aislamientos no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Por el contrario se observó en algunos casos animales inmunocompetentes con cargas fúngicas mayores o muy similares a las observadas en animales inmunosuprimidos, cuando lo esperado era una menor carga fúngica dada su condición inmune. Los resultados obtenidos concuerdan con las investigaciones de Schafer y colaboradores (2014), quienes reportan cargas fúngicas en animales inmunocompetentes tratados con *F. oxysporum,* similares o levemente más bajas a las encontradas en animales inmunosuprimidos cuatro días post infección, y que para el día once continúan relativamente altas en órganos como bazo.

Además de la habilidad para diseminarse y colonizar diferentes órganos, cabe resaltar la importancia de la persistencia de estructuras fúngicas encontradas en los diferentes órganos de animales inmunocompetentes siete días post inoculación. Se sabe que dentro de las características del género *Fusarium* se destaca la capacidad de formar estructuras

de resistencia llamadas clamidosporas (Nelson et al., 1994), las cuales posibilitarían la permanencia y posterior desarrollo en condiciones de susceptibilidad del hospedero (Schafer et al., 2014). Sumado a esto, se conoce que los aislamientos evaluados presentan esta capacidad, como fue confirmado en el trabajo de Linares (2010); quien logro describir en estos aislamientos la producción de clamidosporas en cultivos de una semana lo que posibilita enormemente la producción de estas estructuras debido al estrés sufrido por el patógeno al ser inoculado sistémicamente.

En conclusión, pudimos establecer que todos los aislamientos independientemente de su origen tienen la habilidad de diseminarse y colonizar diferentes órganos, aunque no se pudieron establecer comportamientos por origen o especie; estos resultados apoyarían el planteamiento realizado por Ortoneda y colaboradores (2004), quienes sugieren que cepas con esta capacidad contienen determinantes básicos de patogenicidad, requeridos para causar infección en un hospedero mamífero, ya que aunque los determinantes de virulencia pueden variar entre diferentes sistemas patógeno-hospedero, las vías de señalización y control de la patogenicidad son marcadamente conservadas (Guarro, 2013). Es el caso de PacC, constituyente de un sistema de señalización intracelular de numerosos hongos filamentosos, que responde al pH ambiental regulando la expresión de genes de manera dual: como un activador de la expresión de genes alcalinos y como un represor de la expresión de genes ácidos (Caracuel et al., 2003; Penalva and Arst, 2002). Adicionalmente, se cree que en casos de fusariosis invasiva contribuye a la adaptación del patógeno al microambiente corneal y al crecimiento adaptativo dentro del tejido estromal facilitando la invasión (Hua et al., 2010; Prados-Rosales et al., 2006). Una posible explicación de esta actividad, es la diferencia de rangos de pH de tejidos del hospedero infectado, neutro a alcalino en animales hasta ligeramente ácidos en plantas (Pietro et al., 2003); posibilitando la oportunidad de que aislamientos de origen animal y humano puedan infectar plantas o viceversa, como fue planteado en el trabajo de caracterización enzimática realizado por Alvarado (2014), quien confirmó la presencia de enzimas líticas asociadas como factores de patogenicidad en la degradación de componentes de pared vegetal, sugiriendo su rol como potenciales fitopatógenos.

Por otra parte, la recuperación de *Fusarium* a partir de muestras sanguíneas incubadas en caldo BHI y trasferidas a agar Sabouraud fue posible en 11 (7,63%) de 144 animales; de estos 11 casos nueve se encontraban en condición de inmunosupresión (IS) y dos en condición de inmunocompetencia (IC): aislamiento 161 (3 IS, 1 IC), aislamiento 203 (2 IS ,1 IC), aislamiento 319 (2 IS), aislamiento 406 (2 IS) (Figura 6.5).

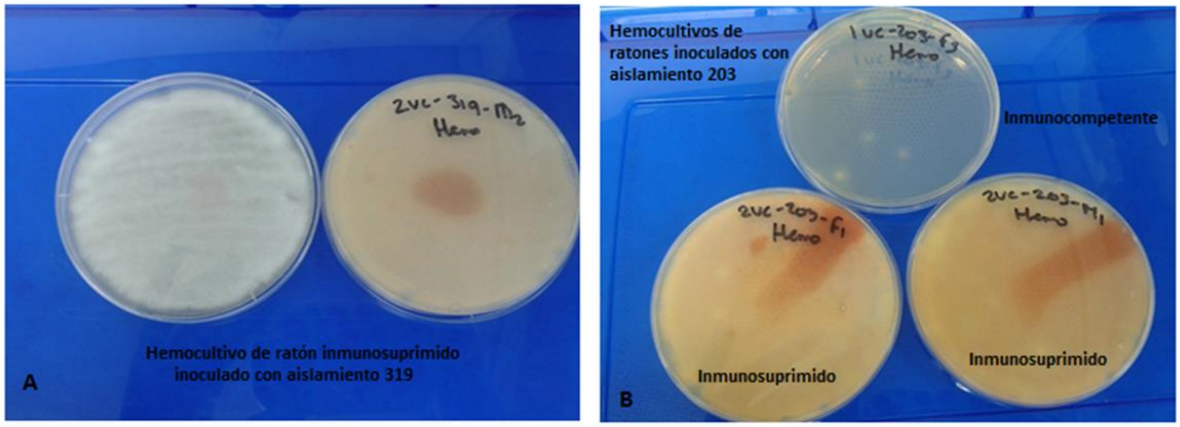


Figura 6.5 Recuperación de *Fusarium* a partir de muestras sanguíneas, preincubadas en caldo BHI. **A.** Hemocultivo de ratón inmunosprimido inoculado con el aislamiento 319 (origen-vegetal) **B.** Hemocultivo de ratónes inmunocompetentes e inmunosprimidos inoculados con el aislamiento 203 (origen-humano superficial).

Pese a que la recuperación de *Fusarium* a partir de muestras sanguíneas fue de tan solo el 10% de los casos, este porcentaje aunque mucho más bajo coincide con reportes a nivel clínico donde es posible su recuperación a partir de hemocultivos de pacientes con fusariosis diseminada (aproximadamente 40% de los casos) (Nucci and Anaissie, 2007). Se cree que la posibilidad de recuperación a partir de muestras sanguíneas, se basa en su capacidad para producir estructuras parecidas a levaduras que facilitan su diseminación y crecimiento en el torrente sanguíneo, por lo que el aislamiento a partir de muestras sanguíneas constituye una prueba de valor diagnóstico y predictor de rápida diseminación, mucho más cuando se trata de descartar otras infecciones por hongos filamentosos como *Aspergillus*, infección en la cual la recuperación es mínima y con el que muchas veces es confundida la infección (Boutati, 1997; Dignani and Anaissie, 2004; Nucci and Anaissie, 2007).

6.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Dada las similitudes morfológicas que comparte *Fusarium* con otros hongos filamentosos como *Aspergillus*, caracterizados en ambos casos por hifas hialinas septadas, ramificadas de ángulo agudo que invaden fácilmente vasos sanguíneos causando trombosis y colapso tisular (Schafer et al., 2014), se hace necesaria la descripción de los hallazgos histológicos encontrados en el modelo animal de infección diseminada planteado en este estudio, con el fin de contribuir a mejorar el entendimiento del proceso infeccioso evidenciado en órganos humanos, dando a conocer una conducta biológica probable.

La evaluación histológica mostró al hígado como el órgano más afectado en el proceso infeccioso, independientemente del origen del aislamiento o la especie de *Fusarium* o

estado inmune del hospedero. En general, los hígados evaluados mostraron lesiones granulomatosas de grado variable (definiéndose granuloma como un agregado organizado de células mononucleares, macrófagos, linfocitos y neutrófilos con o sin necrosis) (Stergiopoulou et al., 2007), degeneración hepatocelular, congestión generalizada, focos necróticos, acompañado en la gran mayoría de casos de hifas intralesionales (Figura 6.6).

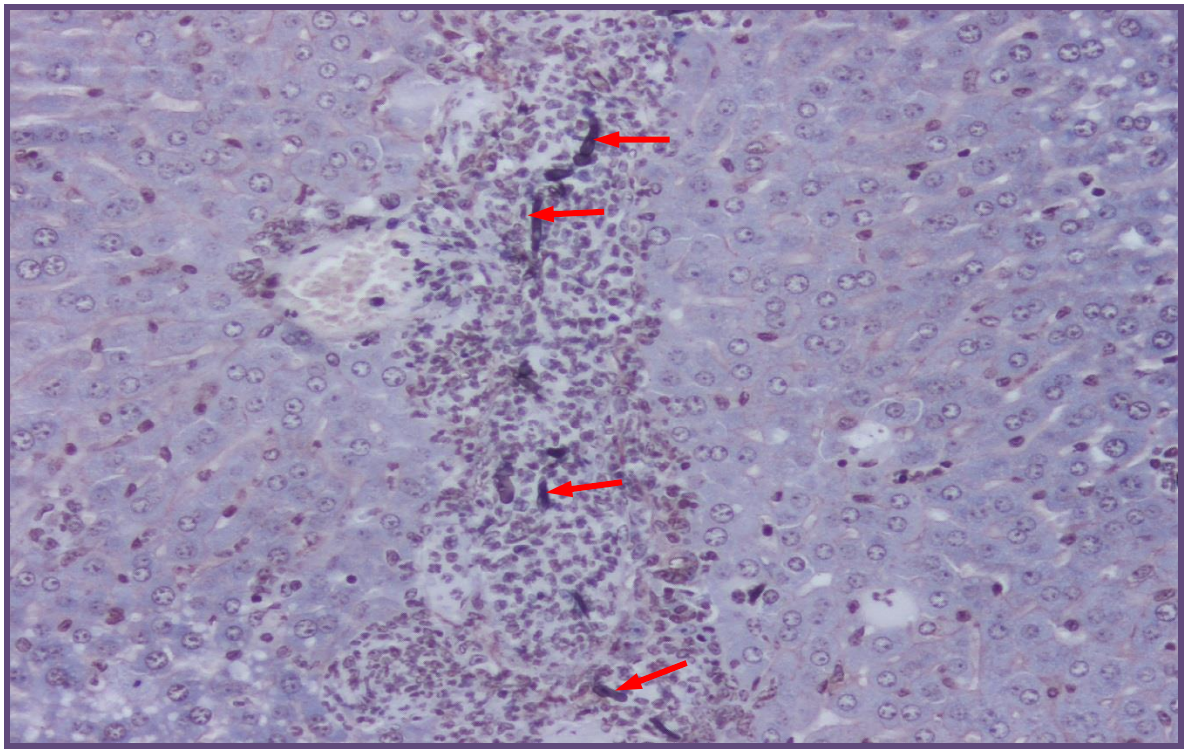


Figura 6.6 Corte histológico de hígado. Sección de hígado con granuloma severo y presencia de hifas intralesionales (flecha) en ratón inmunocompetente inoculado con aislamiento 108 (*F. solani*) 7 días post inoculación. Tinción de Grocott (200X).

Como lo muestra la figura 6.7 los aislamientos de origen humano-superficial produjeron los mayores porcentajes de lesión en hígado, seguidos del aislamiento 162 y 310 en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos; cabe resaltar que el aislamiento 201 (*F. sporotrichioides*) ocasiono únicamente lesión en animales inmunocompetentes y no se evidencio ningún tipo de lesión en animales inmunosuprimidos.

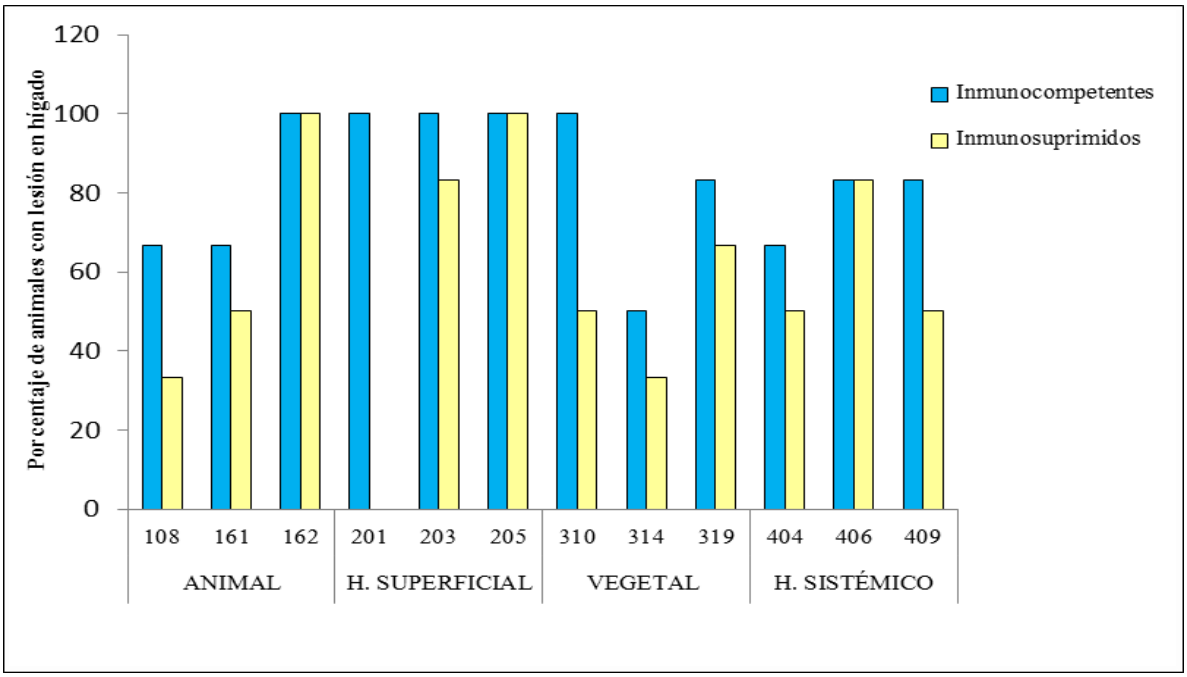


Figura 6.7 Porcentaje de animales con lesión en hígado, discriminado por condición inmune y origen de los aislamientos.

Los pulmones presentaron afectación tisular caracterizada por granulomas con necrosis, hemorragias, congestión generalizada y presencia de hifas intralesionales (Figura 6.8), en animales inmunosuprimidos principalmente (Anexo 6.3). Rasgos que también han sido descritos en otros estudios (Ortoneda et al., 2004), donde se ha sugerido la insuficiencia respiratoria por obstrucción del flujo sanguíneo en capilares intersticiales como causa de muerte en animales inoculados con conidios de *Fusarium oxysporum*. En el caso de hialohifomicosis fusarial humana, también se ha reportado invasión endovascular y trombosis como rasgo característico de la infección (Legrand et al., 1991).

A nivel de bazo, se evidenciaron granulomas (leves a moderados) con respuesta linfoide variada (Figura 6.9), en solo cinco casos fue posible la detección de estructuras fúngicas (Grocott positivo). Particularmente, con la inoculación de aislamientos de origen sistémico, no se produjo ningún tipo de lesión en este órgano (Anexo 6.4). Aunque se ha reportado la presencia en este órgano de microconidos sin germinar, tras la infección con *F. oxysporum* (Schafer et al., 2014), así como un aumento en la actividad celular y la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-17) en otras infecciones filamentosas (Mirkov et al., 2011), se desconoce hasta qué punto estos factores estarían contribuyendo a evitar el daño severo del tejido en infecciones por *Fusarium.*

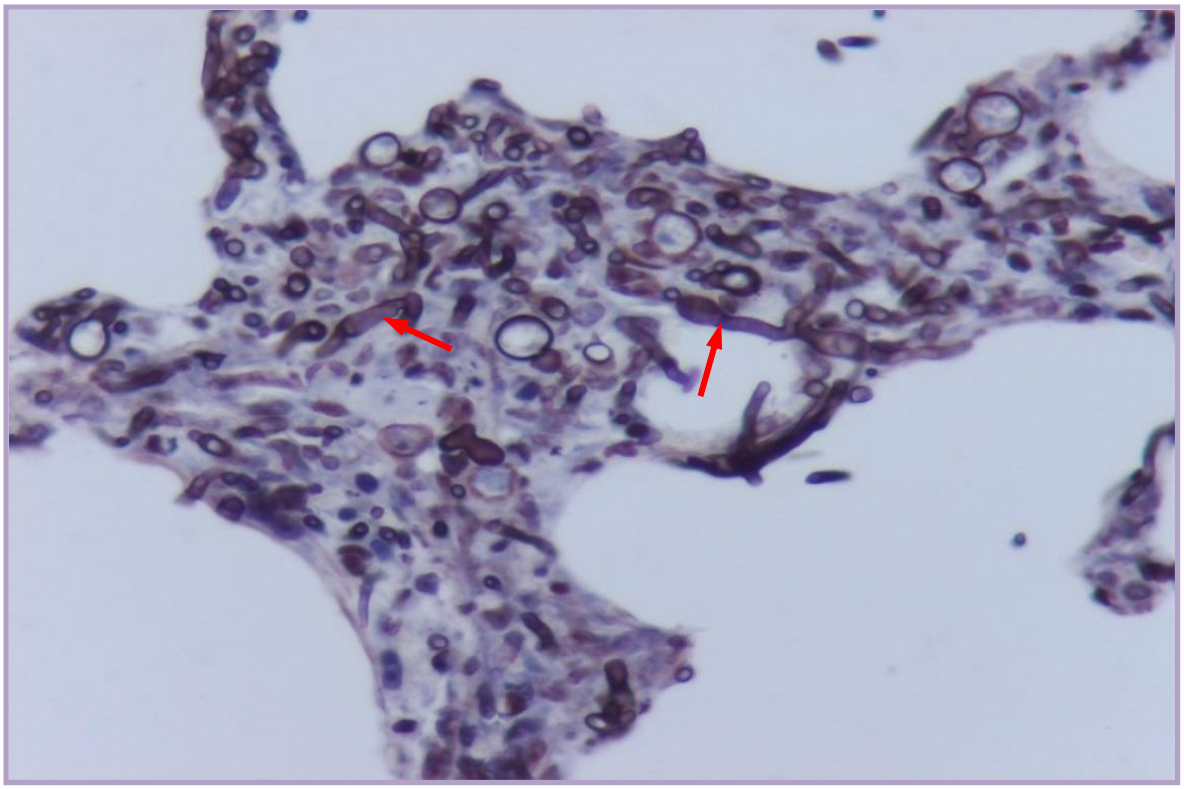


Figura 6.8 Corte histológico de pulmón. Sección de pulmón con presencia de hifas, en ratón inmunosuprimido inoculado con el aislamiento 406 (*F. oxysporum)* 7 días post inoculación. Tinción de Grocott (400X).

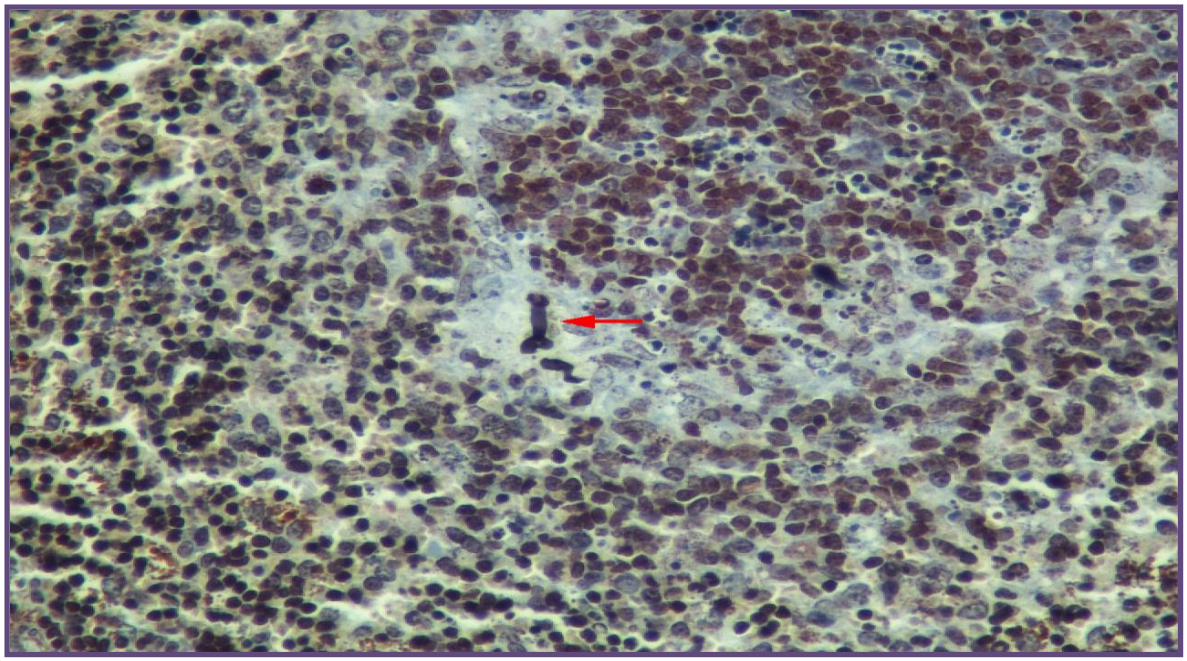


Figura 6.9 Corte histológico de bazo. Sección de bazo con granuloma leve y presencia de hifas intralesionales (flecha) en ratón inmunosuprimido inoculado con aislamiento 201 (*F. sporotrichoides*) 7 días post inoculación. Tinción de Grocott (400X).

6.2.2.1 RESULTADOS IMPLEMENTACIÓN SCORE

Los hallazgos histológicos encontrados en los diversos ensayos realizados, permitieron la implementación de un sistema de graduación de lesiones (score) asociado al proceso infeccioso en cada uno de los órganos; lo que permitió su abordaje no solo desde lo descriptivo sino también desde lo numérico. Para ello, todos los resultados histopatológicos fueron tabulados con base al score implementado gracias a la colaboración del laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional (Anexo 6.5). Los parámetros tenidos en cuenta para la implementación del score fueron: tipo de lesión, distribución de la lesión, grado de necrosis y tinción de Grocott (negativo o positivo); estos parámetros fueron evaluados en cada uno de los órganos, dando una calificación de 0 a 3 a cada uno, para posteriormente asignarle un grado de lesión (Tabla 6.5).

Tabla 6.5 Sistema de graduación de lesiones inducidas experimentalmente por *Fusarium* spp.

GRADO DE LA LESIÓN	
Puntuación 1	Lesión inflamatoria granulomatosa con grado de lesión tisular leve (caracterizado como +).
Puntuación 2	Lesión inflamatoria granulomatosa con grado de lesión tisular moderada (caracterizado como ++).
Puntuación 3	Lesión inflamatoria granulomatosa con grado de lesión tisular severa (caracterizado como +++).

DISTRIBUCIÓN DE LA LESIÓN	
Puntuación 1	Lesión única, definida como lesión focal tisular.
Puntuación 2	Lesión múltiple (más de una), definida como lesión multifocal tisular

NECROSIS ASOCIADA A LESIÓN	
Puntuación 0	Ausencia de necrosis asociada.
Puntuación 1	Necrosis tisular leve (caracterizada como +).
Puntuación **2**	Necrosis tisular moderada (caracterizada como ++).
Puntuación **3**	Necrosis tisular severa (caracterizada como +++).

COLORACIÓN DE GROCOTT	
Puntuación 0	Negativa
Puntuación 1	Positiva

GRADO FINAL

Grado 1: puntuación total 2, 3, 4

Grado 2: puntuación total 5, 6

Grado 3: puntuación total 7, 8, 9

La figura 6.10 muestra los resultados obtenidos con la implementación del score en la evaluación histológica. Se observan lesiones grado tres (3) exclusivamente en órganos de animales inmunosuprimidos, lesiones grado uno (1) y dos (2) en bazo equitativamente en animales inmunocompetentes, en inmunosuprimidos equitativamente grado dos (2) y tres (3); mientras que en hígado se observa un mayor porcentaje de lesiones grado uno (1) en animales inmunocompetentes y grado dos (2) en inmunosuprimidos.

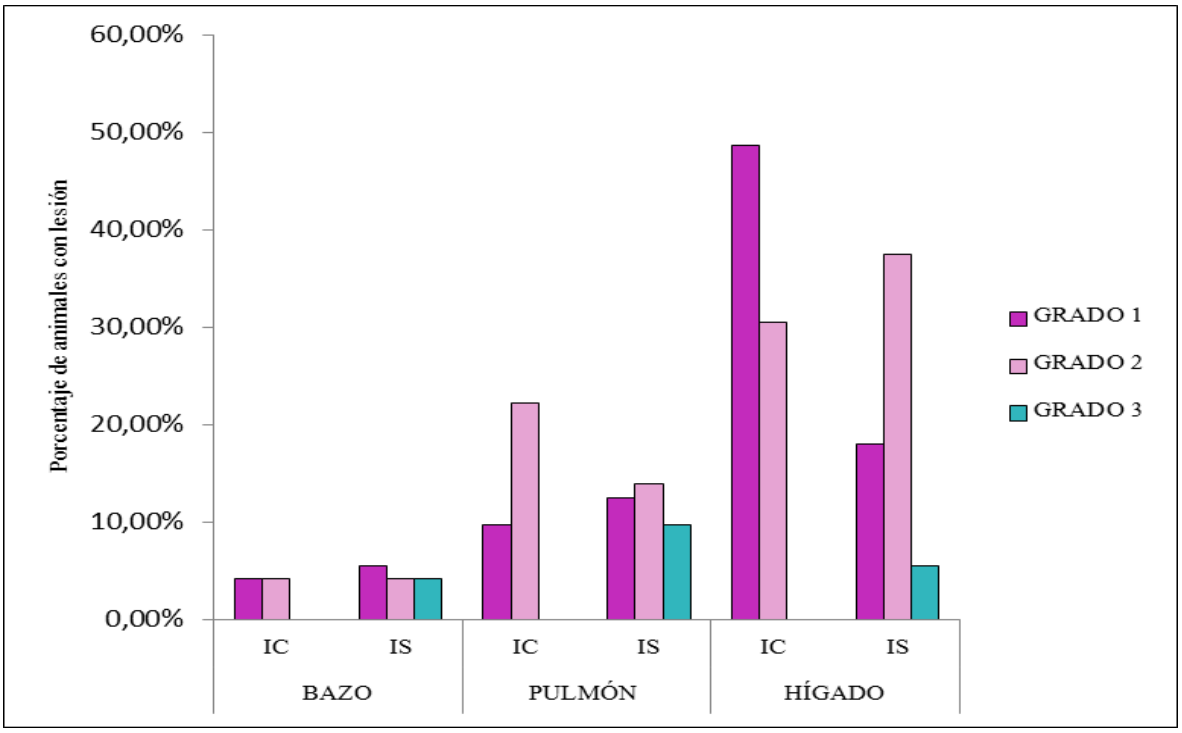


Figura 6.10 Resultados distribución de lesiones por grado. Porcentaje de animales con lesión grado uno (1), dos (2) y tres (3), en los diferentes órganos evaluados. (IC) inmunocompetente, (IS) inmunosuprimido.

Los resultados obtenidos con la evaluación histológica nos permitieron confirmar la presencia de estructuras fúngicas en hígado, pulmón y bazo (en menor proporción) de hospederos mamíferos inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Estos hallazgos son consistentes con reportes histológicos de otras evaluaciones de infección diseminada por *Fusarium*, todos caracterizados por la presencia de estructuras fúngicas, material necrótico, invasión endovascular y trombosis; muchos de estos hallazgos podrían asemejarse a los observados en hialohifomicosis fusarial humana, con la que se comparte también el involucramiento multiórgano visto en el modelo animal (Legrand et al., 1991; Ortoneda et al., 2004). Sin embargo, no existen reportes donde se describa claramente las lesiones inducidas por *Fusarium* en los diferentes órganos, las aproximaciones más

cercanas se dan con la descripción de efectos histopatológicos posteriores a la infección con *Aspergillus* con el que se comparte la mayoría de similitudes morfológicas (Sidransky et al., 1972), o por exposición a alimentos contaminados con micotoxinas en animales de laboratorio. Estas aproximaciones han revelado en el caso de tricotecenos bazos con un elevado número de células pro-inflamatorias, una intensa destrucción del área cortical y medular del riñón, así como la destrucción, desorganización y perdida de funcionalidad del hígado como resultado de la intensa toxicidad (Alexa et al., 2013). Pese a que estos resultados no son comparables con los nuestros, sugerimos que muchas de las lesiones observadas en modelos de micotoxicosis podrían llegar a presentar homología con los hallazgos de infección diseminada, dada la capacidad del hongo de producir estos metabolitos que sumado a sus propiedades angiotropicas y angioinvasivas (Fan et al., 2010) contribuirían a la trombosis y necrosis tisular.

6.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN (SEGUIMIENTO CLÍNICO)

El seguimiento de las características clínicas asociadas al proceso infeccioso en el modelo animal comprendió la observación del comportamiento y condiciones fisiológicas, mediante el uso de un formato de identificación de signos de dolor, distres y disconfort (Anexo 6.6); adicionalmente, con la ayuda del médico veterinario, fueron establecidos los criterio de punto final (Anexo 6.1) que fueron aplicados durante el seguimiento de los animales.

Se encontraron desviaciones de comportamiento asociadas con dolor, como contracciones musculares, arqueamiento de lomo (Figura 6.11A), renuencia al movimiento y conducta de agrupamiento con baja respuesta exploratoria, en el 70% (101 animales) de los animales inmunosuprimidos, con mayor severidad en las primeras 72 horas y no siendo asociados con ningún aislamiento en particular. En animales inmunocompetentes estas alteraciones fueron menos evidentes y severas presentándose en solo el 17.36% de los individuos (25 animales) 72 horas post inoculación.

En cuanto a condiciones fisiológicas se evidenció piloerección severa que fue disminuyendo a lo largo del periodo de seguimiento, tanto en animales inmunosuprimidos como inmunocompetentes. Pérdida de peso, disminución del diámetro ocular (Figura 6.11B), secreción ocular (Figura 6.11C), taquipnea y pelaje seco fue un patrón observado en 70% de animales inmunosuprimidos (101 animales); adicionalmente se presentaron dos casos de animales con heces secas adosadas al orificio anal, que podrían estar o no asociadas al proceso infeccioso y la presencia de abultamientos en la cola en un lugar diferente al sitio de inoculación (Figura 6.11D) en cinco animales. En animales inmunocompetentes estas alteraciones fisiológicas fueron esporádicas (<20%), de menor

severidad y rápida evolución. No se encontraron diferencias en sexo (machos y hembras), como un factor predisponente para el desarrollo de la infección.

Es importante considerar que muchas de las alteraciones anteriormente descritas en animales inmunosuprimidos pueden ser potenciadas por el medicamento inmunosupresor, ya que como ha sido mencionado, seguido a la inyección de ciclofosfamida los animales presentan letargia, pelaje de mala calidad, renuencia a actividad exploratoria, piloerección y disminución en la ingesta de comida y bebida, síntomas que desaparecen del día tercero a cuarto post inmunosupresión (Li et al., 2011).

Dentro de las condiciones fisiológicas descritas (pérdida de peso, secreción ocular, taquipnea y protuberancias en la cola), cabe la pena señalar la importancia de la descripción de la secreción ocular y las protuberancias en la cola (en un lugar diferente al sitio de inoculación), como una condición propia del proceso infeccioso inducido por la inoculación de *Fusarium*, no solo observada en nuestro estudio sino también corroborada en trabajos recientes, donde ha sido posible determinar la diseminación del hongo hasta el globo ocular y la presencia de protuberancias o áreas necróticas en la cola de los animales, en ambos casos conteniendo estructuras fúngicas (Schafer et al., 2014), estas protuberancias en la cola de los animales asemejarían abultamientos cutáneos descritos en pacientes con infecciones cutáneas por *Fusarium* (Nucci and Anaissie, 2007). Aunque en nuestro estudio no se realizó la confirmación de la presencia del hongo en las estructuras y tejidos del ojo, ni en las protuberancias observadas en la cola de los animales, los signos presentados por los animales nos conducen a especular, que posiblemente varios de los aislamientos utilizados en este trabajo, también tuvieron la capacidad de diseminarse y acceder a estas estructuras.

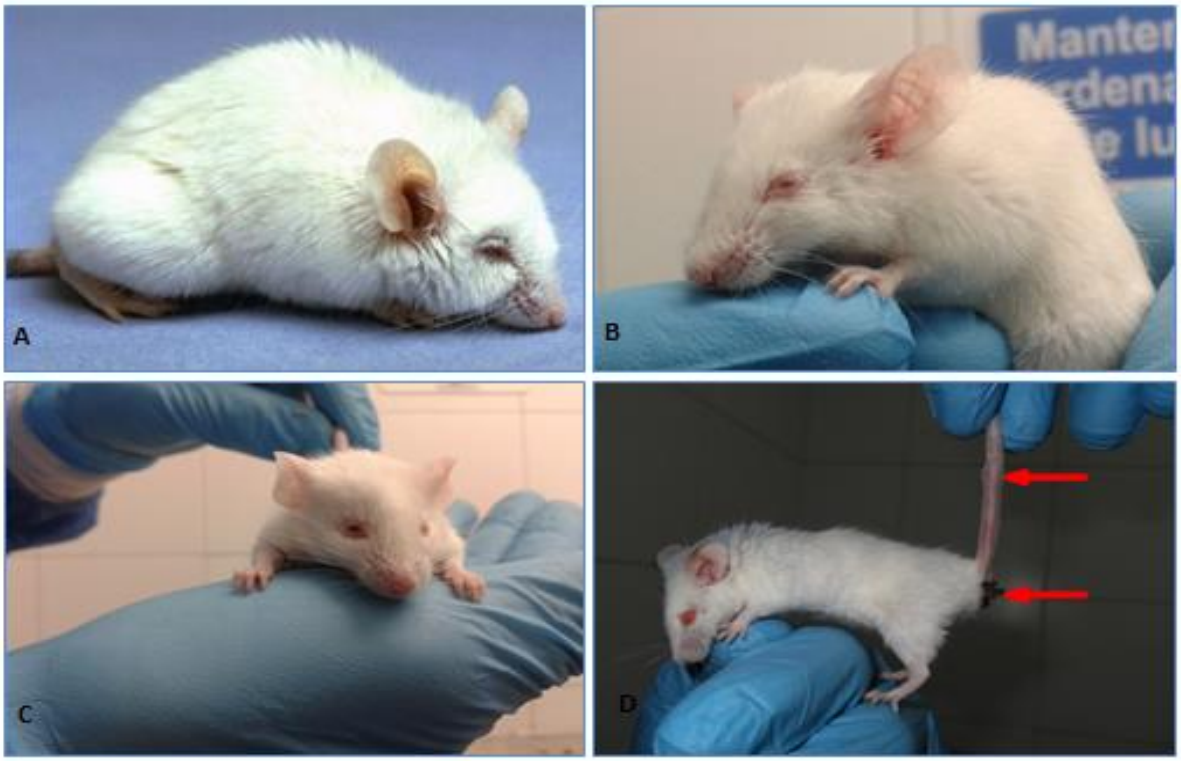


Figura 6.11 Características clínicas asociadas al proceso infeccioso. **(A)** Animal con arqueamiento de lomo, piloerección, disminución del diámetro ocular y renuencia al movimiento. **(B)** Animal con disminución del diámetro ocular. **(C)** Secreción y disminución del diámetro ocular asociado a la secreción de porfirinas. **(D)** Heces secas adosadas al orificio anal y protuberancia en la cola del animal.

6.2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN (MORTALIDAD)

El porcentaje de supervivencia de animales infectados sistémicamente con los aislamientos de *Fusarium spp.* fue evaluado durante siete días post infección. Se observó mortalidad de los animales solamente con cinco de los doce aislamientos evaluados, los restantes siete presentaron 100% de supervivencia.

Dentro de los aislamientos que provocaron la mortalidad de los animales se encuentran los aislamientos 108 (*F. solani*) de origen animal con un porcentaje de supervivencia en animales inmunocompetentes de 33,4%, mientras que para animales inmunosuprimidos de 84,4% (Figura 6.12A), 201 (*F. sporotrichioides*) de origen humano con 0% supervivencia en animales inmunosuprimidos (Figura 6.12B), 310 (*F. oxysporum*) de origen vegetal con 33,4% de supervivencia en animales inmunosuprimidos (Figura 6.12C), 319 (*F. solani*) de origen vegetal con 50% de supervivencia en animales inmunosuprimidos (Figura 6.12D) y 409 (*F. oxysporum*) de origen humano con 50% de en animales inmunosuprimidos (Figura 6.12E).

El aislamiento 108 (*F. solani*) además de ser el único aislamiento que mostró diferencias significativas ($p<0,05$) en los recuentos de UFC/g tejido de todos los órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos, fue el único aislamiento capaz de causar la muerte del 76.6% de los animales inmunocompetentes, lo que probablemente refleje un aumento en la virulencia de esta especie, reportada en hospederos mamíferos como el hombre (Nelson et al., 1994; Nucci and Anaissie, 2007), en el que frecuentemente se le ha asociado a infecciones en individuos inmunosuprimidos e inmunocompetentes (Ahmad, 2008).

A excepción del aislamiento 108, que tuvo un comportamiento más agresivo en animales inmunocompetentes (mortalidad del 76.6%), estos resultados nos permiten confirmar que la mortalidad está directamente relacionada con el estado inmune del hospedero. Aunque la mortalidad en nuestro estudio fue baja en comparación a otros estudios de infección diseminada, donde se alcanzan tasas de 90% o más (Legrand et al., 1991; Mayayo et al., 1999; Ortoneda et al., 2004), hay que recalcar que el esquema de inmunosupresión utilizado en este estudio fue transitorio (unica dosis), lo que disminuye notablemente las tasas de mortalidad. Así lo demuestran estudios de pacientes con infección diseminada, donde la mortalidad en individuos inmunosuprimidos alcanza un 100% cuando los pacientes no alcanzan a recuperarse de la neutropenia o continúan con tratamientos inmunosupresores por largos periodos de tiempo, en contraste al 30% observado en pacientes que dejan de cumplir con estas dos condiciones (Galimberti et al., 2012); lo que nos hace pensar que gracias a esta inmunosupresión transitoria algunos de los animales tratados con ciclofosfamida lograron recuperarse gradualmente.

La impresión diagnóstica de los veterinarios sugiere el fenómeno septicémico ocasionado por el transito del patógeno por vía sanguínea, acompañado del colapso, daño de la red vascular y falla multiorganica como posible causa de muerte.

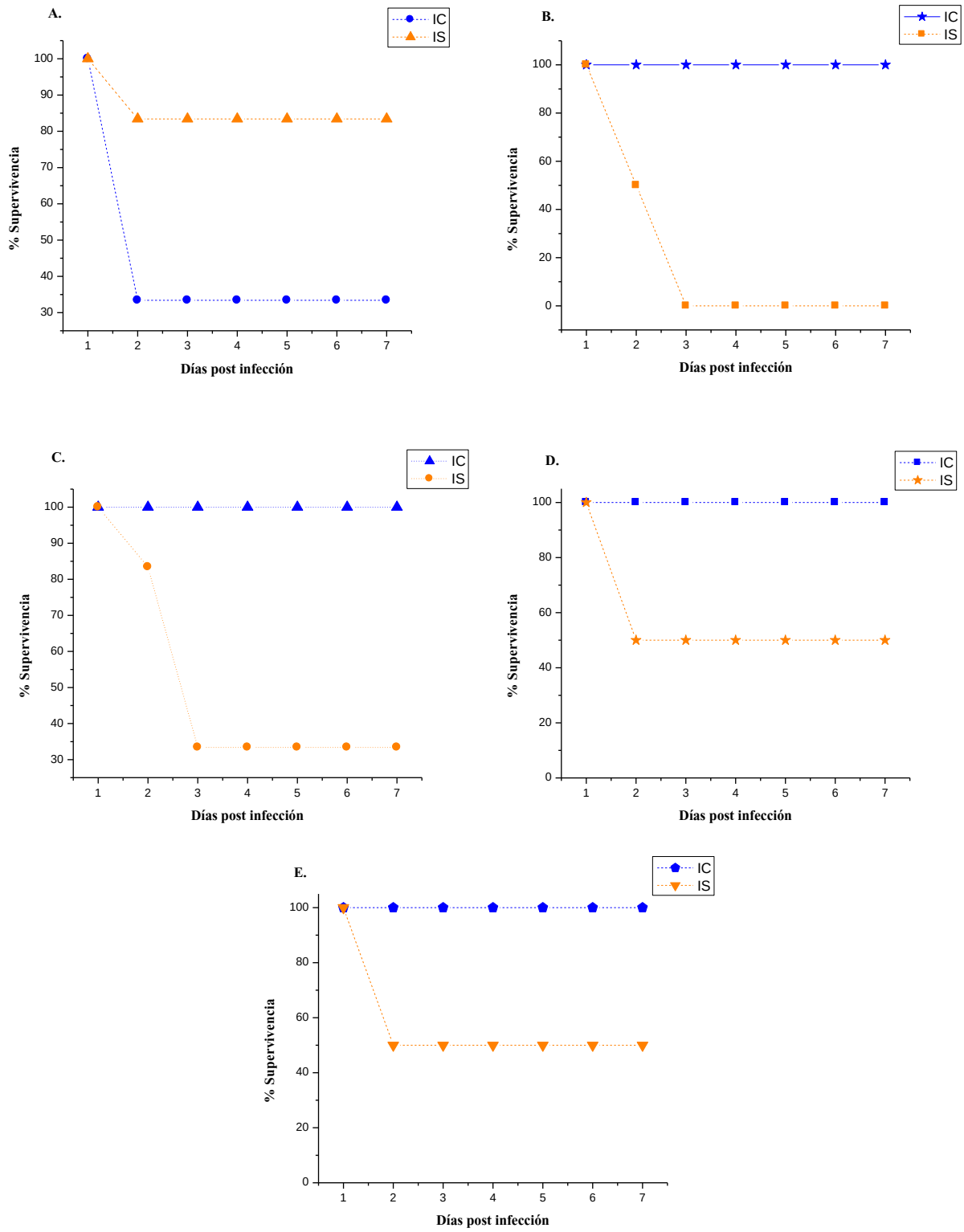


Figura 6.12 Porcentaje de supervivencia en animales inmunocompetentes (IC) versus inmunosuprimidos (IS) inoculados con los aislamientos **A**. 108 (*F. solani*), **B.** 201 (*F. sporotrichoides*), **C.** 310 (*F. solani*), **D.** 319 (*F. solani*), **E.** 409 (*F. oxysporum*)

6.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para integrar los parámetros evaluados (microbiológico, histológico y mortalidad) se realizaron dos análisis estadísticos. Un análisis factorial utilizando el programa Design Expert versión 8 (DX8) y un análisis multivariado (PCA) utilizando el programa MATLAB versión 13. En ambos casos las variables de respuesta evaluadas fueron: recuento UFC/g en hígado (R1), recuento UFC/g en bazo (R2), recuento UFC/g en pulmón (R3), score histopatológico en bazo (R4), score histopatológico en pulmón (R5), score histopatológico en hígado (R6) y mortalidad (R7).

Para el análisis factorial se tuvieron en cuenta tres factores: origen de aislamiento de *Fusarium* spp. (animal - serie 100, humano superficial - serie 200, vegetal - serie 300 y humano sistémico - serie 400), estado inmune del hospedero (ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos) y sexo del hospedero (machos y hembras). Con este análisis, solo se observó significancia para el origen y el estado inmune con la variable de respuesta R4 (score histopatológico de bazo) (Anexo 6.7).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó un segundo abordaje del análisis factorial, evaluando al igual que el anterior tres factores, pero en lugar del origen del aislamiento, se evaluaron los 12 aislamientos sin categorizarlos. Se encontró significancia para el modelo y estado inmune en el recuento UFC/g en hígado (R1), recuento UFC/g en bazo (R2) y score histopatológico en pulmón (R5). Para la variable mortalidad (R7) hubo significancia para el modelo, aislamiento y estado inmune (Anexo 6.8).

Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para cada uno de los aislamientos comparando entre animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos incluyendo las siete variables de respuesta evaluadas para el análisis factorial: recuento UFC/g en hígado (R1), recuento UFC/g en bazo (R2), recuento UFC/g en pulmón (R3), score histopatológico en bazo (R4), score histopatológico en pulmón (R5), score histopatológico en hígado (R6), porcentaje de mortalidad (R7) (Anexo 6.9). Este análisis por medio del criterio de lambda de Wilks, mide las desviaciones que se producen dentro de cada grupo respecto a las desviaciones totales, si su valor es próximo a 0 la variabilidad total dependerá de las diferencias entre grupos, siendo estas variables las que más diferencian o discriminan a los grupos, si por el contrario su valor se aproxima a 1 los grupos están mezclados y la variable carece de capacidad discriminante.

No fue posible hacer el análisis para todos los aislamientos ya que las variables score histopatológico en bazo (R4) y mortalidad (R7) no cumplían el criterio de variabilidad exigido por el programa para poder ejecutarlo, por ello fueron eliminadas según el caso.

Los resultados mostraron que en los aislamientos 108, 201, 310, 319 y 409, la variable que permite la diferenciación entre grupos (discriminatoria) es el porcentaje de mortalidad. Para los otros aislamientos no se encontró una variable de respuesta común con capacidad discriminante, observándose variables de respuesta diferentes para cada aislamiento (Tabla 6.6), tampoco fue posible establecer una asociación del comportamiento de las variables de respuesta según origen u especie de los aislamientos de *Fusarium* spp. Con estos resultados podemos concluir que no hay una tendencia que nos permita explicar el comportamiento de los aislamientos en función de patogenicidad, por el contrario cada aislamiento presentó un comportamiento particular.

Tabla 6.6 Consolidado de resultados análisis de componentes principales (PCA) estadístico lambda de Wilks para cada uno de los aislamientos.

ESTADISTICO LAMBDA DE WILKS							
AISLAMIENTO	R1(RCTO HÍGADO)	R2(RCTO BAZO)	R3(RCTO PULMÓN)	R4(SCORE BAZO)	R5(SCORE PULMÓN)	R6(SCORE HÍGADO)	R7(MORTALIDAD)
108	0,45765	0,35764	0,53467	0,87595	0,52213	0,81579	0
161	0,99315	0,98184	0,83514	NA	0,80478	0,92826	NA
162	0,98150	0,97179	0,89303	0,90909	0,81538	0,94118	NA
201	0,60530	0,96678	0,42403	0,82524	0,96727	0,04000	0
203	0,97968	0,90157	0,99640	NA	0,98330	0,98333	NA
205	0,98747	0,95294	0,94693	0,76667	0,90909	0,74747	NA
310	0,76277	0,63175	0,99752	0,80000	0,96831	0,72519	0
314	0,73323	0,86348	0,82670	NA	0,99187	0,99656	NA
319	0,92976	1,00000	0,88012	0,90909	0,81781	0,95908	7,18614E-32
404	0,79096	0,73655	0,90909	NA	0,99882	0,99908	NA
406	0,52240	0,79759	0,77126	NA	0,98634	0,82877	NA
409	0,88261	0,96941	0,92865	NA	0,78954	1,00000	0

* NA (No Aplica).

6.3 MODELO DE EXPOSICIÓN SUPERFICIAL

6.3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento del área cutánea expuesta al inóculo no mostró alteraciones macroscópicas evidentes en ninguno de los animales; por el contrario, se observó un área de apariencia y tonalidad normal.

La evaluación microbiológica comprendió el cultivo de piel y cultivo y examen directo de pelo, así como el cultivo del habitáculo de cada animal. El cultivo de piel fue negativo en el 100% de los casos (Figura 6.13), al igual que los cultivos de los habitáculos, mientras el cultivo de pelo fue positivo en 12 animales (8,3% de los casos) (4 inmunocompetentes, 8

inmunosuprimidos), correspondientes a la exposición con los aislamientos 162, 203, 205, 319, 404, 406 y 409. El examen directo fue negativo en el 100% de los casos.

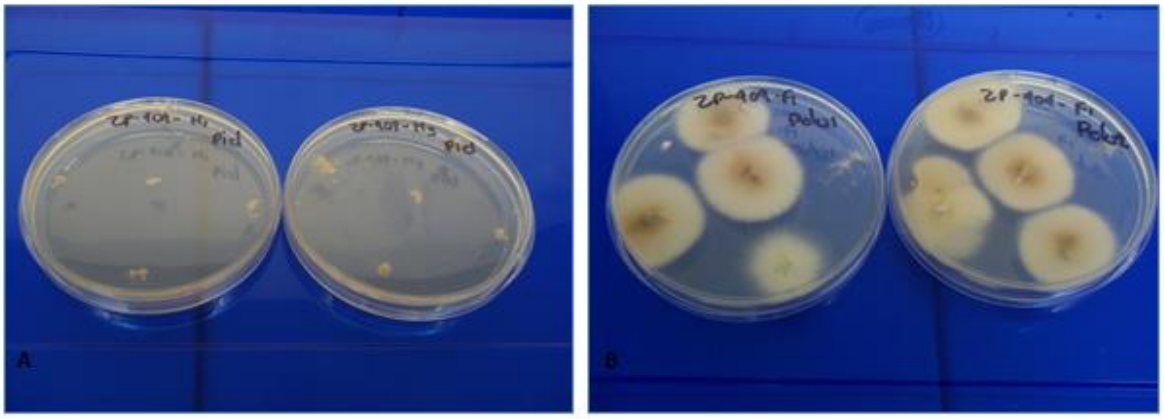


Figura 6.13 Evaluación microbiológica de la exposición superficial **A.** Cultivo de piel ratón inmunosuprimido expuesto al aislamiento 404 (*F. oxysporum*) **B.** Cultivo de pelo de ratón inmunosuprimido expuesto al aislamiento 404 (*F. oxysporum*).

La evaluación histológica no mostró alteraciones evidentes del estrato corneo, por el contrario los resultados mostraron tejidos cutáneos con arquitectura normal sin cambios celulares o estructurales evidentes (Figura 6.14).

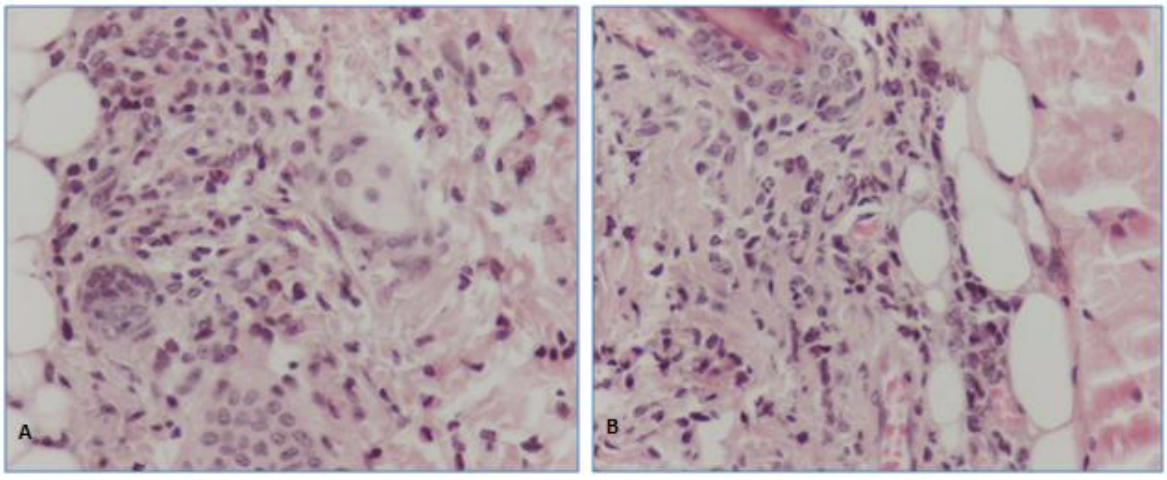


Figura 6. 14 Corte histológico de piel. **A**. Sección de piel de ratón grupo control arquitectura normal Tinción Hematoxilina-Eosina (HE) (400X). **B**. Sección de piel de ratón inmunosuprimido inoculado con el aislamiento 404 (*F. solani*) arquitectura normal y leve infiltrado celular. Tinción Hematoxilina-Eosina(HE) (400X).

El modelo de exposición superficial planteado pretendió evaluar la capacidad de los diferentes aislamientos de *Fusarium,* para colonizar e infectar un área expuesta que

previamente ha sido sometida a un proceso de pérdida de continuidad (rasurado y raspado) en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Nuestra investigación mostró que el modelo animal usado no permite determinar la capacidad de estos aislamientos para causar infección, ya que no se pudieron establecer asociaciones entre signos, evaluación microbiológica, exámen directo y evaluación histopatológica. Los cultivos positivos de pelo, podrían indicar restos de estructuras fúngicas que quedan expuestas a partir del inóculo, pero sin capacidad patogénica aparente. Con estos resultados se hace necesaria la búsqueda de alternativas y modelos de infección cutáneo para hongos no dermatofitos, que brinden información válida sobre la dinámica de la infección y sus posibles implicaciones en la fusariosis diseminada, ya que aunque varios estudios han sugerido el poder tóxico de algunas micotoxinas como los tricotecenos sobre dermis y epidermis (Bhavanishankar et al., 1988), junto con la habilidad de crecer e invadir sustratos queratinizados (Richardson, 2000), los mecanismos que le permiten a estos hongos acceder a la piel continúan siendo desconocidos (Hay, 2007).

7. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de microorganismos patógenos con capacidad de hacer saltos entre reinos o también llamados multihospedero es cada vez más frecuente, sin embargo el conocimiento total de las dinámicas que permiten a un patógeno cruzar barreras de diferentes reinos aún no son del todo claras. Se cree que un gran número de requerimientos son necesarios, entre estos se destacan los altos niveles de diversidad genética, las abundantes oportunidades de trasmisión entre especies (contacto frecuente y cercano), sumado a la habilidad de evasión de la respuesta inmune y la adaptación a nuevas condiciones tanto del hospedero como del entorno (van Baarlen et al., 2007; Woolhouse et al., 2005), siendo la manifestación de la enfermedad el resultado de la interacción entre el microorganismo, el hospedero y el medio ambiente.

En el presente estudio evaluamos aislamientos de *Fusarium* spp. de diverso origen (animal, humano superficial, humano sistémico y vegetal) en un modelo animal (ratones BALB/c), con el fin de contribuir al entendimiento de su patogénesis en un hospedero mamífero, y su papel como posible patógeno multihospedero, dada la habilidad de causar infección en varios hospederos.

Los resultados obtenidos en la evaluación microbiológica, mostraron cómo los doce aislamientos de *Fusarium* spp. poseen la capacidad de colonizar y diseminarse a diversos órganos, no solo en hospederos inmunosuprimidos sino también en hospederos inmunocompetentes, lo que contribuye a reforzar el planteamiento hecho por Ortoneda y colaboradores (2004) y Di Pietro y González (2004), quienes sugieren que aislamientos con esta capacidad poseen determinantes de patogenicidad básicos requeridos para colonizar e infectar múltiples hospederos. Aunque no se pudieron establecer comportamientos por origen de aislamiento o especie, estos resultados confirman la gran versatilidad del género *Fusarium* para adaptarse a condiciones cambiantes, ofrecidas por cada uno de sus múltiples hospederos.

Dentro de los factores que favorecen la adaptación y supervivencia del patógeno dentro del hospedero, se destacan la temperatura, disponibilidad de oxígeno, concentraciones de iones, disponibilidad de nutrientes y pH, los cuales se asocian a patogenicidad.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes en el crecimiento de los hongos, estudios *in vitro* han demostrado que especies de *Fusarium* se adaptan muy bien a diferentes rangos de temperatura (Xiangming, 2007), y en el caso de formas diseminadas en modelos animales, la temperatura juega un papel fundamental en la adaptación del microorganismo a las células de los tejidos (van Burik and Magee, 2001).

Pese a que en este trabajo no se evaluaron estas condiciones de adaptación, el trabajo realizado por Linares (2010), muestra el comportamiento de los aislamientos evaluados en este estudio frente a diferentes temperaturas; allí se evidencia que los aislamientos de origen vegetal, crecen igualmente a 28°C y 37°C, lo que estaría permitiendo no solo la adaptación a cultivos de diferentes pisos térmicos, sino además brindaría la capacidad de adaptación a altas temperaturas como la corporal. En el caso de aislamientos de origen humano-sistémico también se logró evidenciar su fácil adaptación a altas temperaturas (40°C), condición característica solo para aislamientos de este origen, que por el contrario no pudo ser evidenciada en aislamientos de origen humano–superficial, animal o vegetal. Esta condición de termotolerancia explica la adaptación de las especies de *Fusarium* aisladas a partir de procesos sistémicos para sobrevivir a temperaturas que oscilan entre 38°C a 40°C (Perez, 2000), asociadas a cuadros febriles de pacientes inmunosuprimidos. La termotolerancia se encuentra relacionada con la presencia de proteínas hidrofóbicas en la pared celular de los conidios que protegen al hongo del estrés térmico y favorecen la adhesión a las células del hospedero (Ying, 2004). Se sabe que en roedores la temperatura corporal es regulada por la temperatura ambiental, gracias a su capacidad termoneutral que varía dependiendo la especie, la cepa y la edad. Este rango termoneutral comparado con el humano oscila entre 29°C a 34°C. Sin embargo, en roedores la fiebre es definida como una elevación controlada de la temperatura corporal, pero no se compara con los rangos de temperatura de fiebre reportados para humanos (Hoyt, 2004). Esta diferencia en rangos de temperatura dificulta asociar el proceso infeccioso a un aumento en la temperatura corporal del animal, comparable con los procesos febriles que cursan los humanos y afirmar una adaptación de los aislamientos a estas temperaturas.

La adaptación a un amplio rango de pH es otro factor que contribuye a la supervivencia del patógeno dentro del hospedero, ya que permite reconocer y responder adecuadamente a las diferentes condiciones ambientales (Hogan et al., 1996) y modular la respuesta inmune del hospedero. En el trabajo de Linares (2010), se muestra claramente la habilidad de los aislamientos de *Fusarium* spp. para crecer en un amplio rango de pH, al no presentar diferencias de crecimiento cuando crecen a pH 4, 7, y 9, independientemente del origen del hospedero. Adicionalmente se confirmó que el 100% de los aislamientos son ureasa positivos en medio sólido y líquido. Se ha reportado que procesos celulares como la regulación de actividades enzimáticas y síntesis de proteínas están asociadas al pH intracelular (Brahm, 2006), es allí donde el microorganismo debe sobrevivir a la respuesta inmune del hospedero modulando el pH dentro del fagolisosoma de pH ácido a pH alcalino, condición que se ha sugerido ser modulada por la acción enzimática de la ureasa (Eissenberg et al., 1997), lo que muestra su gran versatilidad y constituye una condición favorable para adaptarse y causar enfermedad en múltiples hospederos.

Otros factores determinantes en el proceso de patogenicidad de *Fusarium* son las enzimas hidrolíticas. Según la caracterización enzimática llevada a cabo por Alvarado (2014), los 12 aislamientos de *Fusarium* independientemente de su origen poseen la capacidad de producir enzimas líticas (amilasas, celulasas, xylanasas, β-Glucosidasas y pectinasas), determinantes en los procesos de patogenicidad en plantas, ya que permiten degradar importantes constituyentes de la pared celular vegetal, aún más en el caso de patógenos como *Fusarium*, que carecen de estructuras especializadas de penetración (Al-Najada, 2012). En el caso de hospederos humanos y animales, las lipasas (fosfolipasas y esterasas) tienen un importante papel en la nutrición fúngica así como en el daño en la membrana celular del hospedero lo cual puede promover daño celular y/o exposición de receptores para facilitar la adherencia e invasión fúngica (Ishida, 2012). El trabajo realizado por (Castillo, 2013), determinó actividad lipolítica, fosfolipasa y esterasa en todos los aislamientos de *Fusarium* independientemente del origen o la especie. Se ha sugerido que la actividad esterasa puede estar asociada a la adherencia de células de mamíferos y precisamente el aislamiento 108 (*F. solani*), procedente de una infección en un bovino, presentó los mayores niveles para esta actividad.

Los resultados de caracterización enzimática, llevada a cabo por Alvarado (2014), podrían ser correlacionados como factores de patogenicidad en el caso específico del aislamiento 404 (*F. solani*), el cual presentó la más baja recuperación de este origen (humano-sistémico), a partir de cultivos de órganos, no presentó mortalidad en los ratones inmunosuprimidos y al mismo tiempo reportó niveles bajos para todas las enzimas líticas evaluadas, comportamiento contradictorio al esperado ya que al ser un aislamiento de origen humano-sistémico se esperaba una mayor patogenicidad en el modelo murino. Lo que nos permite sugerir que hay una posible asociación entre el perfil enzimático y la habilidad para diseminarse y colonizar un hospedero.

La habilidad de estos aislamientos como potenciales fitopatógenos también fue evaluada y comprobada mediante un modelo de infección vegetal (Alvarado 2014). Allí se evidenció que los aislamientos humano-superficiales muestran valores de necrosis y avance del patógeno dentro del rango promedio, lo cual también se vio reflejado en su actividad enzimática. Por su parte los aislamientos de origen humano-sistémico, presentaron comportamientos particulares, como el del aislamiento 406 (*F. oxysporum*) que mostró los mayores niveles de actividad celulolítica y xilanolítica, además de los mayores valores en necrosis y avance del patógeno en modelos como gulupa. En el caso del aislamiento 406, en el modelo animal, también fue posible evidenciar su buena recuperación a partir de los cultivos de órganos de animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Por otro lado, el comportamiento particular del aislamiento 108 (*F. solani*) llama la atención, en el modelo vegetal mostró un bajo nivel de actividad enzimática, la cual se vio reflejada en el

modelo de infección en gulupa. Sin embargo, en el modelo de infección sistémico, presentó los mayores niveles de recuperación a partir de cultivos de bazo e hígado para aislamientos de este origen (animal) y adicionalmente ocasionó la muerte de cinco de seis animales inmunocompetentes. Teniendo en cuenta esto, hay que resaltar que *Fusarium* cuenta con otros factores de patogenicidad como son las micotoxinas, además de mecanismos de defensa frente a la respuesta inmune del hospedero, que estarían contribuyendo a potenciar su capacidad patogénica.

Aunque son escasos los reportes detallados de la evaluación histológica de órganos en modelos de infección animal por *Fusarium*, se ha observado como rasgo común la afección de múltiples órganos, al igual que en casos de infección diseminada en humanos (Legrand et al., 1991). Las aproximaciones más cercanas a análisis histopatológicos relacionados con *Fusarium* se centran en *Aspergillus* y la exposición a alimentos contaminados con micotoxinas en animales de laboratorio. Se ha reportado que inoculaciones intravenosas de conidios de *Aspergillus fumigatus* en ratones BALB/c muestran una progresiva eliminación de la carga fúngica en órganos como pulmón e hígado, este último caracterizado por microabscesos compuestos comúnmente de neutrófilos (Mirkov et al., 2011). En el caso de micotoxinas, en estudios con tricotecenos se observan bazos con un elevado número de células pro-inflamatorias, una intensa destrucción, desorganización y pérdida de funcionalidad del hígado como resultado de la intensa toxicidad; en nuestro caso el hígado también fue el órgano más afectado. Especulamos que muchas de estas lesiones pueden ser ocasionadas por acción de metabolitos relacionados con la síntesis de micotoxinas, observada en los aislamientos 203, 310 y 406 (*F. oxysporum*) (Bosigas, 2014).

Además de la capacidad de colonizar y lesionar diferentes órganos de animales inmunocompetentes, hay que resaltar la importancia de la persistencia de estructuras fúngicas en los tejidos siete días post inoculación, capacidad que posiblemente se dé como resultado del desarrollo de estructuras de resistencia (clamidosporas), las cuales han sido encontradas hasta 16 días post infección en tejidos de animales inmunocompetentes inoculados con *F. oxysporum* (Schafer et al., 2014).

Así mismo, dentro de las condiciones fisiológicas descritas en el modelo animal hay que señalar la importancia de la descripción de secreciones oculares y la presencia de protuberancias y áreas necróticas en la cola, diferentes al sitio de inoculación (vena lateral de la cola), similares a las reportadas en pacientes con lesiones cutáneas (Nucci and Anaissie, 2007; Schafer et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que estos aislamientos también tienen la capacidad de diseminarse y acceder libremente a otras estructuras cuando son inoculados intravenosamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten hacer una aproximación al modelo multihospedero, ya que confirman la capacidad básica de todos los aislamientos de *Fusarium* spp. para diseminarse y causar lesión en los tejidos de un hospedero mamífero, independientemente de su origen o especie, o condición inmune del hospedero. Sin embargo, no se pudo concluir una tendencia que explicara el comportamiento de los aislamientos en función de patogenicidad, basados en el análisis estadístico; por el contrario, cada aislamiento presentó un comportamiento particular. Este mismo comportamiento se presentó en el análisis estadístico realizado para el modelo de infección vegetal (Alvarado 2014).

Finalmente, aunque el modelo de exposición superficial planteado no permitió determinar la capacidad de los aislamientos para causar infección, es necesaria la búsqueda de alternativas y modelos que brinden información válida sobre la dinámica de infección en la piel y sus posibles implicaciones en la fusariosis diseminada. También es necesario evaluar diferentes condiciones para estos ensayos de patogenicidad, pues los aislamientos evaluados tienen el potencial para establecer infecciones cutáneas dado que se ha confirmado su actividad queratinolítica en sustratos de origen humano y animal (pelo humano, canino y casco bovino) (Gómez, 2011; Gracia-Rodriguez, 2008).

8. CONCLUSIONES

- Todos los aislamientos de *Fusarium* spp., independientemente de su origen o especie, poseen la habilidad para diseminarse y colonizar diferentes órganos de ratones BALB/c, después de una inoculación sistémica.

- Aunque no se lograron establecer comportamientos por origen o especie, todos los aislamientos poseen determinantes de patogenicidad básicos (adaptación a temperatura, pH, enzimas, entre otros), requeridos para causar infección en el modelo mamífero evaluado.

- Todos los aislamientos poseen la capacidad de permanecer en hospederos inmunocompetentes siete días post-inoculación, lo que sugiere la resistencia del patógeno a ser fagocitado o lisado en el fagolisosoma.

- La evaluación histológica permitió la caracterización del comportamiento invasivo de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en los órganos evaluados, representando un importante avance en el entendimiento de la infección.

- El seguimiento clínico del modelo animal permitió la descripción de signos asociados a la infección que generalmente no se reportan, pero que deben ser descritos para ser comparados con los reportados en infecciones humanas.

- No se encontraron diferencias en sexo como un factor predisponente para la adquisición de la infección por *Fusarium*.

- Los parámetros evaluados brindan herramientas para el entendimiento de la dinámica de infección en *Fusarium* spp. y confirman las características patogénicas necesarias para constituir un modelo multihospedero.

- El modelo animal de exposición superficial no permitió determinar la capacidad de los aislamientos de *Fusarium* spp. para causar infección, ya que no fue posible establecer asociaciones entre los criterios evaluados.

9. RECOMENDACIONES

- Identificar y caracterizar genes que se encuentren asociados a patogenicidad en todos los aislamientos, con el fin de evidenciar su posible papel en el proceso patogénico en los diferentes hospederos.

- Realizar pruebas de patogenicidad con mayor tiempo de seguimiento con el fin de obtener datos más claros de evolución y resolución en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

- Se debe tener en cuenta que dado el carácter filamentoso del género *Fusarium*, la evaluación microbiológica deberá ser apoyada por métodos moleculares que complementen y den una apreciación más eficiente de cargas fúngicas en órganos, ya que el conteo de UFC no refleja con exactitud el número de células viables en hongos filamentosos como *Fusarium*.

- Relacionar los resultados del presente estudio con los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en modelo vegetal para confirmar el planteamiento de posible modelo multihospedero.

- Realizar investigaciones en modelos animales, donde se evalué respuesta inmune celular y perfiles de producción de citoquinas, en animales inmunosuprimidos e inmunocompetentes, con el fin de obtener información sobre el papel del sistema inmune en la defensa del hospedero.

- Buscar alternativas en modelos de infección cutánea para hongos no dermatofitos, que brinden información sobre la dinámica de la infección y sus posibles implicaciones en la fusariosis diseminada.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (2005). Plant Pathology, 5 edición. Academic Press, San Diego. U.S.A.

Aguilar, J.V.a. (2006). Manual de Tecnicas de Laboratorio en Hematología Book *3 Edición*, 89-126.

Ahmad, s. (2008). development of a nested PCR assay for the detection of Fusarium solani DNA and its evaluation in the diagnosis of invasive fusariosis using an experimental mouse model. Mycoses *53*, 40-47.

Al-Najada, A. (2012). Characterizacion of polygalacturonases from fruit spolaige *F. oxysporum* and *Aspergillus tubingensis* African Journal of Biotechnology *11 (34)*, 8527-8536.

Alexa, E., Dehelean, C.A., Poiana, M.A., Radulov, I., Cimpean, A.M., Bordean, D.M., Tulcan, C., and Pop, G. (2013). The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. Chemistry Central journal *7*, 99.

Alvarado, A. (2014). Caracterización molecular por AFLP y evaluación de factores de patogenicidad de *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas como herramientas para el planteamiento de un modelo multihospedero. trabajo de Grado de Maestria, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, 158p.

Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana *17*, 11-22.

Bancroft, J. (2002). Theory and practice of histological techniques Book *5 edición*.
Belete, E. (2013). Associations of biophysical factors with faba bean root rot (fusarium solani) epidemics in the northeastern highlands of Ethiopia. Crop Protection *52*, 39-46.

Ben-Ami, R., Lewis, R.E., Leventakos, K., Latge, J.P., and Kontoyiannis, D.P. (2010). Cutaneous model of invasive aspergillosis. Antimicrobial agents and chemotherapy *54*, 1848-1854.

Bhavanishankar, T.N., Ramesh, H.P., and Shantha, T. (1988). Dermal toxicity of Fusarium toxins in combinations. Archives of toxicology *61*, 241-244.

Bosigas, L. (2014). Evaluación de la producción de micotoxinas, tricotecenos, fumonisinas y zearalenonas en Fusarium spp. aisladas de aislamientos humanos, animales y plantas. Trabajo de Grado Programa de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana.

Boutati, E.A.a.E.L. (1997). Fusarium, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. Blood *1 90 (3)*, 999-1008.

Brahm, S. (2006). Molecular Pathogenesis of Fungal Infections. Principles of Molecular Medicine, Second Edition *95*, 920-933.

Caira, M., Trecarichi, E.M., Tumbarello, M., Leone, G., and Pagano, L. (2011). Uncommon yeast infections in hematological patients: from diagnosis to treatment. Expert review of anti-infective therapy *9*, 1067-1075.

Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M.I., Di Pietro, A., and Ramos, J. (2003). pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na+ -ATPase Ena1 in Fusarium oxysporum. Eukaryotic cell *2*, 1246-1252.

Casadevall, A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. Fungal biology reviews *21*, 130-132.

Castillo, c. (2013). Evaluación de la actividad lipolítica en aislamientos de *Fusarium spp*. y aplicación de interes nutricional de lipasas microbianas. Trabajo de Grado Programa de Microbiología Industrial y Nutrición y Dietética , Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, 70p.

De Lucca, A.J. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. Rev Iberoam Micol *24*, 3-13.

Desjardins, A.E., and Proctor, R.H. (2007). Molecular biology of Fusarium mycotoxins. Int J Food Microbiol *119*, 47-50.

Di Pietro, A., and González, M. (2004). *Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos. Temas de actualidad SEM 37:36-37:13.

Díaz, C. (2008). Mecanismos de acción de fármacos inmunosupresores. Revista Chilena de Reumatología *24(2)*, 73-88.

Dignani, M.C., and Anaissie, E. (2004). Human fusariosis. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases *10 Suppl 1*, 67-75.

Doczi, I., Gyetvai, T., Kredics, L., and Nagy, E. (2004). Involvement of Fusarium spp. in fungal keratitis. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases *10*, 773-776.

Dracott, B.N., and Smith, C.E. (1979). Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. Immunology *38*, 429-435.

Eissenberg, L.G., Moser, S.A., and Goldman, W.E. (1997). Alterations to the cell wall of Histoplasma capsulatum yeasts during infection of macrophages or epithelial cells. The Journal of infectious diseases *175*, 1538-1544.

Fan, Y., Willems, L., Leboeuf, C., Li, W., Lacroix, C., Robin, M., Socie, G., Ribaud, P., Verneuil, L., and Janin, A. (2010). Skin Microvascular Thrombosis in Fusarium Infection in Two Early Biopsied Cases. Case reports in dermatology *2*, 76-81.

Galimberti, R., Torre, A.C., Baztan, M.C., and Rodriguez-Chiappetta, F. (2012). Emerging systemic fungal infections. Clinics in dermatology *30*, 633-650.

Gauthier, G.M., and Keller, N.P. (2013). Crossover fungal pathogens: the biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. Fungal genetics and biology : FG & B *61*, 146-157.

Giraldo, C. (2010). Infección diseminada por Fusarium spp. en un paciente con anemia aplásica Revista Asociación Colombiana de Dermatología *18*, 225-232.

Girmenia, C., Pagano, L., Corvatta, L., Mele, L., del Favero, A., and Martino, P. (2000). The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. Gimema Infection Programme. Br J Haematol *111*, 272-276.

Godoy, P., Cano, J., Gene, J., Guarro, J., Hofling-Lima, A.L., and Lopes Colombo, A. (2004). Genotyping of 44 isolates of Fusarium solani, the main agent of fungal keratitis in Brazil. J Clin Microbiol *42*, 4494-4497.

Gómez, A. (2011). Evaluación de la actividad queratinolitica en pelo de Fusarium spp. asociados a procesos patógenicos en humanos, animales y plantas. Trabajo de Grado Programa de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, 33p.

Gonzalez, G.M., Marquez, J., Trevino-Rangel Rde, J., Palma-Nicolas, J.P., Garza-Gonzalez, E., Cecenas, L.A., and Gerardo Gonzalez, J. (2013). Murine model of disseminated fusariosis: evaluation of the fungal burden by traditional CFU and quantitative PCR. Mycopathologia *176*, 219-224.

Gracia-Rodriguez (2008). Evaluación de la actividad queratinolítica de *Fusarium* aislados de lesiones en plantas, animales y humanos. Trabajo de Grado Programa de Bacteriología, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, 125p.

Grocott, R.G. (1955). A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. American journal of clinical pathology *25*, 975-979.

Guarro, J. (2013). Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology *32*, 1491-1500.

Hay, R.J. (2007). Fusarium infections of the skin. Current opinion in infectious diseases *20*, 115-117.

Hay, R.J., Calderon, R.A., and Mackenzie, C.D. (1988). Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. British journal of experimental pathology *69*, 703-716.

Hogan, L.H., Klein, B.S., and Levitz, S.M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. Clinical microbiology reviews *9*, 469-488.

Hohl, T.M. (2014). Overview of vertebrate animal models of fungal infection. Journal of immunological methods *410*, 100-112.

Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W., and Deising, H.B. (2011). When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. Journal of plant physiology *168*, 51-62.

Houdebine, M. (2004). The Mouse as an animal model for human diseases. The Laboratory Mouse *capitulo 6*, 97-110.

Hoyt, R. (2004). Mouse Physiology. The Laboratory Mouse *capitulo 2*, 67-69.

Hua, X., Yuan, X., Di Pietro, A., and Wilhelmus, K.R. (2010). The molecular pathogenicity of Fusarium keratitis: a fungal transcriptional regulator promotes hyphal penetration of the cornea. Cornea *29*, 1440-1444.

Huyan, X.H., Lin, Y.P., Gao, T., Chen, R.Y., and Fan, Y.M. (2011). Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. International immunopharmacology *11*, 1293-1297.

Ishida, K. (2012). Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by Fusarium isolates. Braz J Med Biol Res *45(5)*.

Kano, R., Maruyama, H., Kubota, M., Hasegawa, A., and Kamata, H. (2011). Chronic ulcerative dermatitis caused by Fusarium sporotrichioides. Medical mycology *49*, 303-305.

Kitaura, K., Kanayama, K., Fujii, Y., Shiobara, N., Tanaka, K., Kurane, I., Suzuki, S., Itoh, T., and Suzuki, R. (2009). T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science *58*, 159-168.

Kume, H., Yamazaki, T., Abe, M., Tanuma, H., Okudaira, M., and Okayasu, I. (2003). Increase in aspergillosis and severe mycotic infection in patients with leukemia and MDS: comparison of the data from the Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan in 1989, 1993 and 1997. Pathology international *53*, 744-750.

Legrand, C., Anaissie, E., Hashem, R., Nelson, P., Bodey, G.P., and Ro, J. (1991). Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model. The Journal of infectious diseases *164*, 944-948.

Linares, M. (2010). *Fusarium* spp. un modelo para el análisis de patógenos multihospedero. Trabajo de Grado de Maestria, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, 193p.

Lionakis, M.S., Chamilos, G., Lewis, R.E., Wiederhold, N.P., Raad, II, Samonis, G., and Kontoyiannis, D.P. (2006). Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. Antimicrobial agents and chemotherapy *50*, 294-297.

Lopez-Berges, M.S., Hera, C., Sulyok, M., Schafer, K., Capilla, J., Guarro, J., and Di Pietro, A. (2013). The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of Fusarium oxysporum on plant and mammalian hosts. Molecular microbiology *87*, 49-65.

Mayayo, E., Pujol, I., and Guarro, J. (1999). Experimental pathogenicity of four opportunist Fusarium species in a murine model. J Med Microbiol *48*, 363-366.

Mello, J.P.F.D. (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health welfare and productivity. Animal Feed Science and Technology *80*, 183-205.

Mendgen, K., and Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Trends in plant science *7*, 352-356.

Mirkov, I., Stojanovic, I., Glamoclija, J., Stosic-Grujicic, S., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., and Kataranovski, M. (2011). Differential mechanisms of resistance to sublethal systemic Aspergillus fumigatus infection in immunocompetent BALB/c and C57BL/6 mice. Immunobiology *216*, 234-242.

Mitola, G., Escalona, F., and Ledesma, A. (2001). Queratinolisis causada por hongos no dermatófitos aislados de una tenería y un matadero en Maracaibo-Venezuela: Revisión de la expresión morfológica. Kasmera *29(2)*, 1-21.

Monzón, A. (2000). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Control Calidad SEIMC.

Monzón, A. (2005). Infecciones Causadas por el Genero *Fusarium*. Control Calidad SEIMC, 1-6.

Muhammed, M., Feldmesser, M., Shubitz, L.F., Lionakis, M.S., Sil, A., Wang, Y., Glavis-Bloom, J., Lewis, R.E., Galgiani, J.N., Casadevall, A*., et al.* (2012). Mouse models for the study of fungal pneumonia: a collection of detailed experimental protocols for the study of Coccidioides, Cryptococcus, Fusarium, Histoplasma and combined infection due to Aspergillus-Rhizopus. Virulence *3*, 329-338.

Munch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N., and Deising, H.B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of Colletotrichum species. Journal of plant physiology *165*, 41-51.

Namitome, K., Kano, R., Sekiguchi, M., Iwasaki, T., Kaneshima, T., and Nishifuji, K. (2011). Isolation of Fusarium sp. from a claw of a dog with onychomycosis. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science *73*, 965-969.

Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. Clinical microbiology reviews *7*, 479-504.

Nucci, M., and Anaissie, E. (2002). Cutaneous infection by Fusarium species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis *35*, 909-920.

Nucci, M., and Anaissie, E. (2007). Fusarium infections in immunocompromised patients. Clinical microbiology reviews *20*, 695-704.

Odds, F.C., Van Gerven, F., Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M.S., Ghannoum, M.A., Lancaster, M.V., Pfaller, M.A., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., and Walsh, T.J. (1998). Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. Antimicrobial agents and chemotherapy *42*, 282-288.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I., Mayayo, E., and Di Pietro, A. (2004). Fusarium oxysporum as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect Immun *72*, 1760-1766.

Penalva, M.A., and Arst, H.N., Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR *66*, 426-446, table of contents.

Perez, J. (2000). Diagnostico histopatológico de micosis en patología veterinaria. Revista Iberoamericana de Micología *25(1)*, 35-40.

Perusquia-Ortiz, A.M., Vazquez-Gonzalez, D., and Bonifaz, A. (2012). Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. J Dtsch Dermatol Ges *10*, 611-621; quiz 621-612.

Pietro, A.D., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., and Roncero, M.I. (2003). Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular plant pathology *4*, 315-325.

Prados-Rosales, R.C., Serena, C., Delgado-Jarana, J., Guarro, J., and Di Pietro, A. (2006). Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of Fusarium oxysporum on mammalian hosts. Microbes and infection / Institut Pasteur *8*, 2825-2831.

Richardson, M. (2000). Model system for the study of dermathofhite and no dermathofite invasion of human keratin Revista Iberoamericana de Micología, 115-121.

Roncero, M.I., Di Pietro, A., Ruiz-Roldan, M.C., Huertas-Gonzalez, M.D., Garcia-Maceira, F.I., Meglecz, E., Jimenez, A., Caracuel, Z., Sancho-Zapatero, R., Hera, C.*, et al.* (2000). Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of Fusarium oxysporum. Rev Iberoam Micol *17*, S47-53.

Roncero, M.I., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., Garcia-MacEira, F.I., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Calero, F., Delgado-Jarana, J., Roldan-Rodriguez, R., Martinez-Rocha, A.*, et al.* (2003). *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 87-98.

Ruiz-Cendoya, M., Marine, M., and Guarro, J. (2008). Combined therapy in treatment of murine infection by Fusarium solani. The Journal of antimicrobial chemotherapy *62*, 543-546.

Ruiz-Cendoya, M., Pastor, J., and Guarro, J. (2011). Combined therapy against murine-disseminated infection by Fusarium verticillioides. Mycopathologia *171*, 171-175.

Salem, M.L., Al-Khami, A.A., El-Nagaar, S.A., Zidan, A.A., Al-Sharkawi, I.M., Marcela Diaz-Montero, C., and Cole, D.J. (2012). Kinetics of rebounding of lymphoid and myeloid cells in mouse peripheral blood, spleen and bone marrow after treatment with cyclophosphamide. Cellular immunology *276*, 67-74.

Sarmiento, C., and Trujillo, M. (2006). Estandarización e Implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.(Tesis pregrado en Bacteriología) Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá.

Schafer, K., Di Pietro, A., Gow, N.A., and MacCallum, D. (2014). Murine model for Fusarium oxysporum invasive fusariosis reveals organ-specific structures for dissemination and long-term persistence. PloS one *9*, e89920.

Schrettl, M., Ibrahim-Granet, O., Droin, S., Huerre, M., Latge, J.P., and Haas, H. (2010). The crucial role of the Aspergillus fumigatus siderophore system in interaction with alveolar macrophages. Microbes and infection / Institut Pasteur *12*, 1035-1041.

Sexton, A.C., and Howlett, B.J. (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. Eukaryotic cell *5*, 1941-1949.

Shimamura, T., Kubota, N., and Shibuya, K. (2012). Animal model of dermatophytosis. Journal of biomedicine & biotechnology *2012*, 125384.

Sidransky, H., Epstein, S.M., Verney, E., and Horowitz, C. (1972). Experimental visceral aspergillosis. The American journal of pathology *69*, 55-70.

Stergiopoulou, T., Meletiadis, J., Roilides, E., Kleiner, D.E., Schaufele, R., Roden, M., Harrington, S., Dad, L., Segal, B., and Walsh, T.J. (2007). Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. American journal of clinical pathology *127*, 349-355.

Sun, Y., Chandra, J., Mukherjee, P., Szczotka-Flynn, L., Ghannoum, M.A., and Pearlman, E. (2010). A murine model of contact lens-associated fusarium keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci *51*, 1511-1516.

van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W., and Thomma, B.P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? FEMS Microbiol Rev *31*, 239-277.

van Burik, J.A., and Magee, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annual review of microbiology *55*, 743-772.

Vega, D. (2010). Identificación y caracterización enzimática y molecular de aislamientos de Fusarium spp. de lesiones en animales, humanos y plantas. Trabajo de grado de Maestría Facultad de Ciencias pontificia Universidad Javeriana, 149p.

Wang, X.Y., and Liu, X.M. (2005). [Molecular genetics on fumonisin-producing strains of Fusarium verticillioides]. Wei Sheng Yan Jiu *34*, 248-251.

Wintrobe, B. (2005). Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas Book 2 Edición *capitulo 13, 14*, 155-190.

Woolhouse, M.E., Haydon, D.T., and Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. Trends Ecol Evol *20*, 238-244.

Woolhouse, M.E., Taylor, L.H., and Haydon, D.T. (2001). Population biology of multihost pathogens. Science *292*, 1109-1112.

Wu, T.G., Keasler, V.V., Mitchell, B.M., and Wilhelmus, K.R. (2004). Immunosuppression affects the severity of experimental Fusarium solani keratitis. The Journal of infectious diseases *190*, 192-198.

Xiangming, X. (2007). Effects of fungal interactions among Fusarium head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. Int J Food Microbiol *119* 67-71.

Ying, S. (2004). Effects of fungal interactions among Fusarium head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. J Appl Microbiol *97*, 323-331.

Yu, Q., Nie, S.P., Wang, J.Q., Liu, X.Z., Yin, P.F., Huang, D.F., Li, W.J., Gong, D.M., and Xie, M.Y. (2014). Chemoprotective effects of Ganoderma atrum polysaccharide in cyclophosphamide-induced mice. International journal of biological macromolecules *64*, 395-401.

ANEXO 5.1 ANALISIS DE VARIANZA Y POST-HOC TRATAMIENTOS DE INMUNOSUPRESIÓN

A. Prueba de homogeneidad de varianza y post hoc (Duncan) para recuento absoluto de células 48h post tratamiento.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,932	3	12	,077

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	203970672,76	3,0	67990224,3	19,1	0,0000733
Intra-grupos	42759566,02	12,0	3563297,2		
Total	246730238,78	15,0			

	VAR00001	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan	**1.** Ciclofosfamida	4	1758,33		
	4. Testigo Absoluto	4		8066,67	
	2. Acetato de Hidrocortisona	4		9256,25	9256,25
	3. Solución salina	4			11329,17
	Sig.		1,000	,390	,146

B. Prueba de homogeneidad de varianza y post hoc (Duncan) para recuento absoluto de células 120h post tratamiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,39E+08	3	7,96E+07	3,282	0,058
Intra-grupos	2,91E+08	12	2,43E+07		
Total	5,30E+08	15			

	VAR00002	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan	**1.** Ciclofosfamida	4	3161,0833	
	4. Testigo Absoluto	4	6491,6667	6491,6667
	3. Solución salina	4	10691,6667	10691,6667
	2. Acetato de Hidrocortisona	4		13233,3333
	Sig.		0,061	0,09

ANEXO 5.2 ANALISIS DE VARIANZA DE RECUENTOS DE UFC/g DE TEJIDO EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON 1X10^8 conidios/ml

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
HIGADO	Inter-grupos	,294	1	,294	1,252	,326
	Intra-grupos	,939	4	,235		
	Total	1,233	5			
BAZO	Inter-grupos	,210	1	,210	1,150	,344
	Intra-grupos	,729	4	,182		
	Total	,938	5			
PULMÓN	Inter-grupos	,367	1	,367	,184	,690
	Intra-grupos	7,980	4	1,995		
	Total	8,348	5			
RIÑÓN	Inter-grupos	3,387	1	3,387	4,281	,107
	Intra-grupos	3,165	4	,791		
	Total	6,552	5			

ANEXO 6.1 CRITERIOS DE PUNTO FINAL

Adaptación de escala UMPS (University Melbourne Pain Score) para la identificación de cuadros severos de pérdida de bienestar. Esta escala es cuantificable, en caso de presentar puntajes UMPS de 14 o más, los animales deberán ser retirados del estudio y se les practicara la eutanasia con toma de muestras si es el caso. La escala será aplicada a los animales que muestren signos adversos en cualquier fase del estudio posterior a la exposición sistémica o dérmica. Los investigadores aplicaran la escala con previo entrenamiento y evaluación del veterinario de la unidad.

CATEGORIA	DESCRIPCION	PUNTAJE
General		
Actividad	Come	0
	Duerme	0
	Vigilia	1
Aspecto general	Normal	0
	Anormal	2
Agrupamiento	Agrupamiento total	0
	Agrupamiento parcial	0
	Dispersión	1
Estatus mental	Alerta	0
	Deprimido	1
	Estuporoso	2
	Comatoso	2
Respuesta a estímulos	Hiperexcitable	2
	Aumentada	1
	Normal	0
	Disminuida	1
	Ausente	2
Piloerección	Normal	0
	Leve	1
	Moderada	1
	Severa	2
Heces	Secas	1
	Normales	1
	Pastosas	1
	Semiblandas	1
	Líquidas	2
Consumo de alimento	Alto	0
	Medio	1

	Bajo	2
Humedad oronasal	Ausente	1
	Normal	0
	Aumentada	1
Sistema neurológico	Incoordinación	1
		2
		3
	Fasiculaciones	1
	Músculares	2
		3
	Ataxia	1
		2
		3
	Tremores	1
	Musculares	2
		3
Incontinencia urinaria-fecal	Ausente	0
	Presente	2
Secreciones oculares	Normal	0
	Epifora	1
	Sero sanguinolenta	2
Sistema respiratorio		
Secreciones bronquiales	Ausente	0
	Presente	1
Estertores	Ausente	0
	Presente	2
Sibilancias	Ausente	0
	Presente	2
Sonidos bronquiales	Presente	0
	Ausentes	1
Disnea	Inspiratoria	1
	Espiratoria	1
	Mixta	2
Patrón respiratorio	Normal	0
	Anormal	2
Sistema circulatorio	Rosadas	0
Membranas mucosas	Pálidas	1
	Congestionadas	2
Palpación cardiaca (ritmo)	Normal	0
	Anormal	2

ANEXO 6.2 ANALISIS DE VARIANZA Y POST HOC EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA POR ORIGEN DE AISLAMIENTO

AISLAMIENTOS DE ORIGEN ANIMAL (108, 161, 162)

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
HIGADO	Inter-grupos	40,643	5	8,129	4,014	0,007
	Intra-grupos	60,756	30	2,025		
	Total	101,399	35			
BAZO	Inter-grupos	66,653	5	13,331	5,915	0,001
	Intra-grupos	67,616	30	2,254		
	Total	134,269	35			
PULMÓN	Inter-grupos	25,332	5	5,066	3,25	0,018
	Intra-grupos	46,761	30	1,559		
	Total	72,093	35			
RIÑÓN	Inter-grupos	17,984	5	3,597	1,922	0,12
	Intra-grupos	56,135	30	1,871		
	Total	74,119	35			

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Hígado)	2108	6	1,44332		
	2161	6	2,55347	2,55347	
	1161	6	2,78422	2,78422	
	1162	6		3,61592	3,61592
	2162	6		3,85917	3,85917
	1108	6			4,77926
	Sig.		0,133	0,156	0,191

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Bazo)	2108	6	0,86195	
	2161	6		2,82884
	1161	6		3,25451
	1162	6		4,31981
	2162	6		4,67077
	1108	6		4,76907
	Sig.		1	0,052

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Pulmón)	2108	6	0,65831		
	1162	6	1,31089	1,31089	
	2161	6	1,97292	1,97292	1,97292
	2162	6	2,12681	2,12681	2,12681
	1161	6		2,68147	2,68147
	1108	6			3,21082
	Sig.		0,071	0,091	0,126

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Riñón)	2108	6	1,08611	
	1161	6	1,16948	
	1162	6	1,78459	1,78459
	2161	6	1,98583	1,98583
	2162	6	2,64685	2,64685
	1108	6		3,0119
	Sig.		0,086	0,166

AISLAMIENTOS DE ORIGEN HUMANO - SUPERFICIAL (201, 203, 205)

ANOVA						
		Suma de cuadrados	**Gl**	**Media cuadrática**	**F**	**Sig.**
HIGADO	Inter-grupos	25,851	5	5,17	3,372	0,016
	Intra-grupos	45,992	30	1,533		
	Total	71,842	35			
BAZO	Inter-grupos	37,441	5	7,488	3,105	0,022
	Intra-grupos	72,351	30	2,412		
	Total	109,792	35			
PULMÓN	Inter-grupos	56,917	5	11,383	6,028	0,001
	Intra-grupos	56,656	30	1,889		
	Total	113,574	35			
RIÑÓN	Inter-grupos	20,474	5	4,095	2,635	0,043
	Intra-grupos	46,616	30	1,554		
	Total	67,09	35			

	GRUPOS	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**		
			1	**2**	**3**
Duncan (Hígado)	2205	6	2,33767		
	1205	6	2,6891	2,6891	
	1201	6	3,43881	3,43881	3,43881
	1203	6		3,94348	3,94348
	2203	6		4,18518	4,18518
	2201	6			4,78612
	Sig.		0,156	0,063	0,094

	GRUPOS	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**		
			1	**2**	**3**
Duncan (Bazo)	2205	6	1,70202		
	1205	6	2,52424	2,52424	
	2203	6		3,69055	3,69055
	2201	6		3,95235	3,95235
	1201	6		4,22513	4,22513
	1203	6			4,64033
	Sig.		0,366	0,092	0,343

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Pulmón)	1205	6	0,29006	
	1201	6	0,44058	
	2205	6	0,70934	
	2203	6	1,91258	
	1203	6	2,07056	
	2201	6		3,90775
	Sig.		0,052	1

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Riñón)	2205	6	1,01896	
	1201	6	1,93799	1,93799
	1205	6	2,07593	2,07593
	1203	6		2,62547
	2201	6		3,10668
	2203	6		3,21586
	Sig.		0,175	0,122

AISLAMIENTOS DE ORIGEN VEGETAL (310, 314, 319)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
HIGADO	Inter-grupos	102,214	5	20,443	16,175	0,00
	Intra-grupos	37,915	30	1,264		
	Total	140,129	35			
BAZO	Inter-grupos	61,763	5	12,353	7,362	0,00
	Intra-grupos	50,335	30	1,678		
	Total	112,098	35			
PULMÓN	Inter-grupos	31,533	5	6,307	2,718	0,039
	Intra-grupos	69,61	30	2,32		
	Total	101,144	35			
RIÑÓN	Inter-grupos	62,98	5	12,596	6,991	0,00
	Intra-grupos	54,052	30	1,802		
	Total	117,032	35			

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Hígado)	1314	6	0,0000		
	2314	6		1,4025	
	1319	6			3,6681
	1310	6			3,6756
	2319	6			4,1533
	2310	6			4,8070
	Sig.		1,0000	1,0000	0,1183

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Bazo)	1314	6	0,9276		
	2314	6	1,9117		
	2310	6		3,8265	
	1319	6		3,9032	
	2319	6		3,9050	
	1310	6		4,6446	
	Sig.		0,1982	0,3275	

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Pulmón)	1314	6	0,0000		
	2314	6	0,7477	0,7477	
	1319	6	1,6309	1,6309	1,6309
	1310	6	1,9359	1,9359	1,9359
	2310	6		2,0864	2,0864
	2319	6			2,8790
	Sig.		0,0512	0,1744	0,2051

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Duncan (Riñón)	1314	6	0,0000		
	2314	6	0,5900		
	1310	6	1,0900		
	1319	6		2,7762	
	2310	6		2,9149	
	2319	6		3,5593	
	Sig.		0,1940	0,3489	

AISLAMIENTOS DE ORIGEN HUMANO – SISTÉMICO (404, 406, 409)

ANOVA						
		Suma de cuadrados	**Gl**	**Media cuadrática**	**F**	**Sig.**
HIGADO	Inter-grupos	69,557	5	13,911	11,079	,000
	Intra-grupos	37,669	30	1,256		
	Total	107,225	35			
BAZO	Inter-grupos	63,236	5	12,647	9,195	,000
	Intra-grupos	41,263	30	1,375		
	Total	104,499	35			
PULMÓN	Inter-grupos	23,876	5	4,775	2,330	,067
	Intra-grupos	61,473	30	2,049		
	Total	85,349	35			
RIÑÓN	Inter-grupos	42,859	5	8,572	5,439	,001
	Intra-grupos	47,280	30	1,576		
	Total	90,139	35			

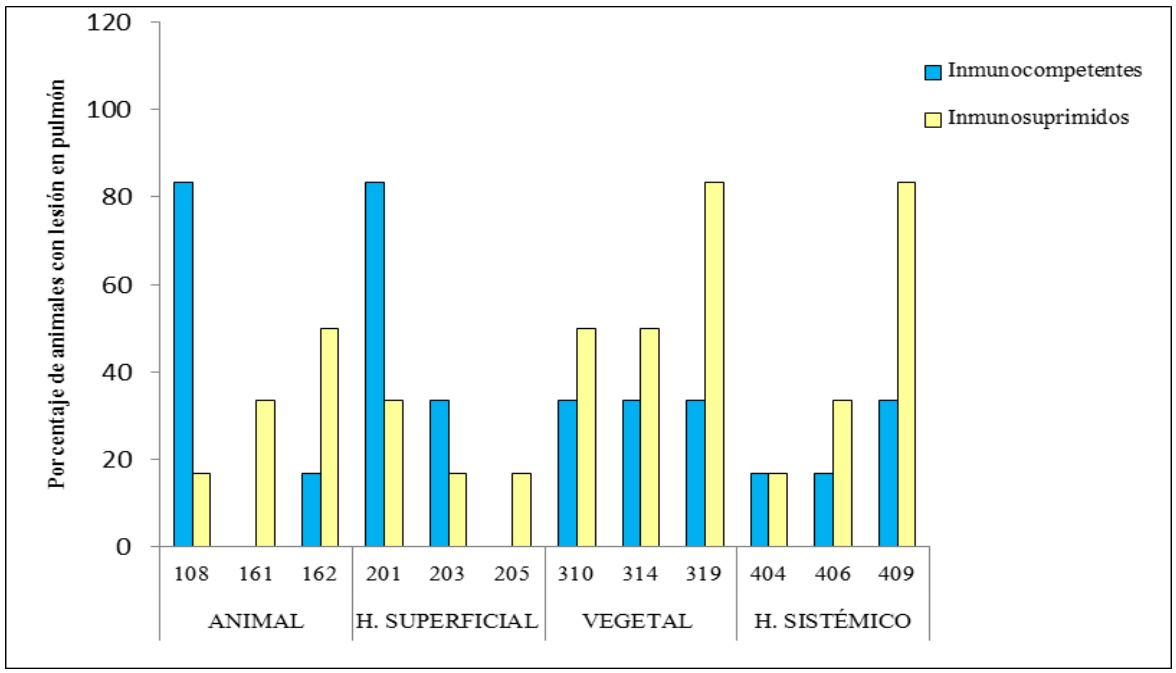
	GRUPOS	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**			
			1	**2**	**3**	**4**
Duncan (Hígado)	1314	6	0,4039			
	2314	6	1,2476	1,2476		
	1310	6		2,1143	2,1143	
	1319	6			3,1128	
	2310	6			3,1852	
	2319	6				4,656399
	Sig.		0,2021	0,1904	0,1276	1

	GRUPOS	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**		
			1	**2**	**3**
Duncan (Bazo)	2404	6	0,9321		
	1404	6	1,9987		
	1409	6		3,5054	
	2409	6		4,0431	
	2406	6		4,1197	
	1406	6		4,7184	
	Sig.		0,1257	0,1109	

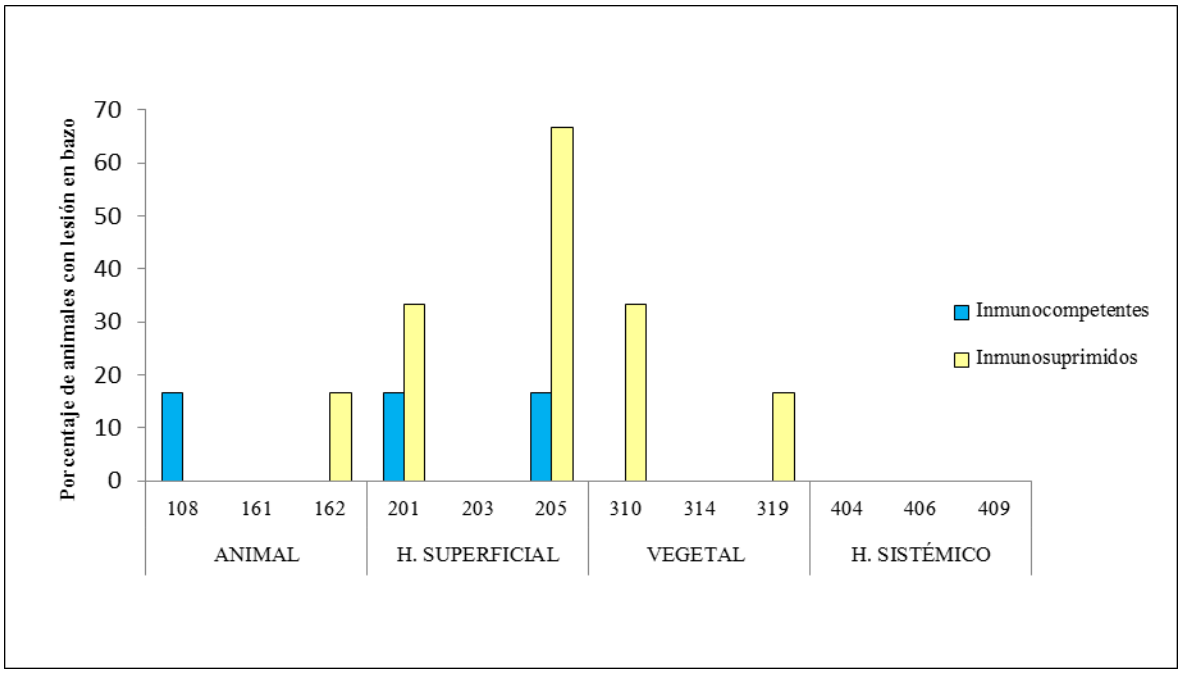
	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Pulmón)	1404	6	0,000	
	2404	6	0,349	0,349
	1406	6	0,811	0,811
	1409	6	1,101	1,101
	2409	6		2,109
	2406	6		2,151
	Sig.		0,234	0,059

	GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan (Riñón)	1404	6	0,000	
	2404	6	0,248	
	1409	6	0,763	
	2409	6	1,538	1,538
	1406	6		2,628
	2406	6		2,798
	Sig.		0,060	0,110

ANEXO 6.3. PORCENTAJE DE ANIMALES CON LESIÓN EN PULMÓN DISCRIMINADO POR CONDICIÓN INMUNE Y ORIGEN DE AISLAMIENTO



ANEXO 6.4. PORCENTAJE DE ANIMALES CON LESIÓN EN BAZO DISCRIMINADO POR CONDICIÓN INMUNE Y ORIGEN DE AISLAMIENTO



ANEXO 6.5. CONSOLIDADO DE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS E IMPLEMENTACIÓN DE SCORE

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
108 IC	1VC-108-F1	BAZO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Mod/mul	6	2
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Leve/mul	5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Leve/mul	5	2
	1VC-108-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Leve/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Leve/mul	6	2
	1VC-108-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Leve/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Severo	Multifocal	pos		6	2
	1VC-108-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-108-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Leve/mul	5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-108-M3	BAZO	SIN LESIONES				Leve/mul	1	1
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Leve/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Leve/mul	6	2
108 IS	2VC-108-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-108-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Leve	4	1
	2VC-108-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-108-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Leve	5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-108-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Leve/mul	5	2
	2VC-108-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
161 IC	1VC-161-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	lev/mul	4	1
	1VC-161-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-161-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-161-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-161-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-161-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
161 IS	2VC-161-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	focal	pos	Lev/focal	4	1
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-161-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-161-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-161-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	focal	pos		3	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	focal	neg		2	1
	2VC-161-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-161-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
162 IC	1VC-162-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-162-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	focal	neg		3	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-162-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	1VC-162-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-162-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
	1VC-162-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
162 IS	2VC-162-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	focal	neg		3	1
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-162-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-162-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Lev/mul	5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-162-M1	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
	2VC-162-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-162-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
201 IC	1VC-201-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	1VC-201-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	focal	neg		2	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-201-F3	BAZO	Granuloma	Leve	focal	neg		2	1
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-201-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg		4	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-201-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Severo	Multifocal	pos		6	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-201-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	focal	neg		3	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
201 IS	2VC-201-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-201-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-201-F3	BAZO	SIN LESIONES				Lev/mul	1	1
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-201-M1	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-201-M2	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-201-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
203 IC	1VC-203-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-203-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	focal	neg		3	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-203-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-203-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-203-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	focal	neg	Mod/focal	5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-203-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
203 IS	2VC-203-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-203-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-203-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-203-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-203-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-203-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
205 IC	1VC-205-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	1VC-205-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-205-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	1VC-205-M2	BAZO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul grocot pos	5	2
	1VC-205-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-205-M4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	focal	neg	Lev/focal	4	1
205 IS	2VC-205-F1	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	lev/mul	5	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
	2VC-205-F2	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	lev/mul	5	2
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	lev/mul	5	2
	2VC-205-F3	BAZO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	lev/mul	4	1
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-205-M2	BAZO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	2VC-205-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
	2VC-205-M4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
310 IC	1VC-310-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-310-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-310-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-310-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Severo	focal	pos		5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
	1VC-310-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	1VC-310-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg		4	1
310 IS	2VC-310-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-310-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-310-F3	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-310-M1	BAZO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-310-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Lev/mul	5	2
	2VC-310-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
314 IC	1VC-314-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
	1VC-314-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-314-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-314-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
	1VC-314-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-314-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
314 IS	2VC-314-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-314-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-314-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-314-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	SIN LESIONES				Mod/mul con Grocott pos	2	1
	2VC-314-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
	2VC-314-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
319 IC	1VC-319-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-319-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-319-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Mod/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	1VC-319-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	lev/mul	5	2
	1VC-319-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	neg	Lev/mul	5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-319-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	neg		3	1
319 IS	2VC-319-F1	BAZO	Granuloma	Leve	Focal	pos		3	1
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-319-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos		4	1
	2VC-319-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Focal	neg	Lev/focal	3	1
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-319-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Severo	Multifocal	pos	Seve/mul	9	3
		HÍGADO	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-319-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-319-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
404 IC	1VC-404-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	lev/mul	4	1
	1VC-404-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Severo	Multifocal	neg	lev/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	1VC-404-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-404-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-404-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-404-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	lev/mul	4	1
404 IS	2VC-404-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	2VC-404-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-404-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-404-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
	2VC-404-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-404-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
406 IC	1VC-406-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg		3	1
	1VC-406-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg	Lev/mul	4	1
	1VC-406-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-406-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Focal	pos		4	1
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-406-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-406-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Focal	neg		2	1
406 IS	2VC-406-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-406-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-406-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
	2VC-406-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
	2VC-406-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Mod/mul	7	3
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
	2VC-406-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2

Estado inmune	Código	Órgano	Lesión	Grado de lesión	Distribución	Grocott	Necrosis	Total	GRADO
409 IC	1VC-409-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	neg		3	1
	1VC-409-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-409-F4	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos		4	1
	1VC-409-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	leve	Focal	neg		2	1
		HÍGADO	Granuloma	leve	Focal	neg		2	1
	1VC-409-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	1VC-409-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
		HÍGADO	Granuloma	leve	Multifocal	pos	Lev/mul	5	2
409 IS	2VC-409-F1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	SIN LESIONES					0	0
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	2VC-409-F2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Severo	Focal	pos	Lev/focal	6	2
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	lev/mul	6	2
	2VC-409-F3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Focal	neg	Lev/focal	4	1
		HÍGADO	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos	Lev/mul	6	2
	2VC-409-M1	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	leve	Focal	neg		2	1
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-409-M2	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	leve	Multifocal	pos		4	1
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0
	2VC-409-M3	BAZO	SIN LESIONES					0	0
		PULMÓN	Granuloma	Moderado	Multifocal	pos		5	2
		HÍGADO	SIN LESIONES					0	0

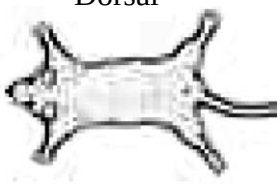
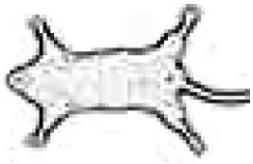
ANEXO 6.6 FORMATO DE IDENTIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO MODELO ANIMAL

Fecha_____ Investigador_____

Estudio_____

Numero de aprobación_____ Número aprobación (CICUAL)

Identificación_____

Animal #			Especie:			
Edad			Linaje:			
Peso			Sexo:			
Evaluación Externa (Observación durante 2 minutos)						
Postura anormal	S	N	**Comportamiento Exploratorio**			
Anormalidades en la marcha	S	N	0 (presente), 1(aumentado), 2(muy frecuente), 3(frenético)			
Congelamiento	S	N	Comp. de excavación	S	N	
Corren	S	N	Comp. de asearse	S	N	
Estereotipos	S	N	Comp. de acicalarse el periné	S	N	
Tendencia al escape	S	N		S	N	
Examen Externo General						
Marcar en el grafico la zona donde se presentan las anormalidades						
Dorsal 			Ventral 			
Zonas de alopecia	S	N	Anormalidades externas	S	N	
Piloerección	S	N	Daño en los bigotes	S	N	
Evaluar según estos parámetros: 0 (ausente), 1(bajo o reducido), 2(normal), 3(aumentado)						
Tono muscular[1]	0 1 2 3		Posición de miembros (5)	0 1 2 3		
Tendencia al escape al manip	0 1 2 3		Reflejo de retirada (6)	0 1 2 3		
Pasividad	0 1 2 3		Tendencia a morder	0 1 2 3		
Arqueamiento del dorso[2]	0 1 2 3		Reflejo cutáneo dorsal (7)	0 1 2 3		
Desplazamiento visual[3]	0 1 2 3		R. pellizcar la oreja (8)	0 1 2 3		
Respuesta a la palpación (4)	0 1 2 3		Reflejo palpebral (9)	0 1 2 3		
Signos Fisiológicos Anormales						
Oculares	Descarga ocular	S N	Parpados cerrados	S N		
Respiratorios	Aumento taza (10)	S N	Dificultad respiratoria	S N		
Apariencia	Lesiones (11)	S N	Perdida de condición del pelaje	S N		
	Deshidratación (12)	S N	Salivación	S N		
Heces/Orina	Diarrea	S N	Constipación	S N		
	Hipostenuria (13)	S N	Poliuria (14)	S N		
Postura	Encorvado	S N	Arqueamiento del dorso	S N		

ANEXO 6.7 ANÁLISIS FACTORIAL POR ORIGEN

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R1 RECUENTO HÍGADO	Model	71,82	15	4,79	1,65	0,0701	not significant
	A-Origen	23,16	3	7,72	2,66	0,0512	
	B-Estado inmune	4,51	1	4,51	1,55	0,2152	
	C-Sexo	8,35	1	8,35	2,87	0,0925	
	AB	28,16	3	9,39	3,23	0,0247	
	AC	2,75	3	0,92	0,32	0,8145	
	BC	3,06	1	3,06	1,05	0,3069	
	ABC	1,83	3	0,61	0,21	0,8895	
	Pure Error	371,94	128	2,91			
	Cor Total	443,76	143				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R2 RECUENTO BAZO	Model	23,18	5	4,64	1,46	0,2086	not significant
	A-Origen	2,28	3	0,76	0,24	0,8697	
	B-Estado inmune	12,2	1	12,2	3,83	0,0524	
	C-Sexo	8,71	1	8,71	2,73	0,1006	
	Residual	439,75	138	3,19			
	Lack of Fit	32,59	10	3,26	1,02	0,4265	not significant
	Pure Error	407,16	128	3,18			
	Cor Total	462,93	143				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R3 RECUENTO PULMÓN	Model	78,87	15	5,26	2,18	0,0099	significant
	A-Origen	14,8	3	4,93	2,05	0,1101	
	B-Estado inmune	9,38	1	9,38	3,9	0,0505	
	C-Sexo	8,1	1	8,1	3,37	0,0689	
	AB	22,38	3	7,46	3,1	0,0292	
	AC	3,01	3	1	0,42	0,7409	
	BC	8,26	1	8,26	3,43	0,0663	
	ABC	12,93	3	4,31	1,79	0,1521	

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R4 SCORE BAZO	Model	54,42	15	3,63	1,55	0,0972	not significant
	A-Origen	23,14	3	7,71	3,3	0,0227	
	B-Estado inmune	12,25	1	12,25	5,23	0,0238	
	C-Sexo	0,028	1	0,028	0,012	0,9134	
	AB	14,58	3	4,86	2,08	0,1065	
	AC	0,69	3	0,23	0,099	0,9605	
	BC	0,25	1	0,25	0,11	0,7443	
	ABC	3,47	3	1,16	0,49	0,6867	
	Pure Error	299,56	128	2,34			
	Cor Total	353,97	143				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R5 SCORE PULMÓN	Model	79,44	15	5,3	0,79	0,6866	not significant
	A-Origen	30,13	3	10,04	1,5	0,2181	
	B-Estado inmune	7,56	1	7,56	1,13	0,2902	
	C-Sexo	5,06	1	5,06	0,76	0,3864	
	AB	17,35	3	5,78	0,86	0,4622	
	AC	12,19	3	4,06	0,61	0,6122	
	BC	3,06	1	3,06	0,46	0,5003	
	ABC	4,08	3	1,36	0,2	0,8944	
	Pure Error	858	128	6,7			
	Cor Total	937,44	143				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
R6 SCORE HÍGADO	Model	94,67	15	6,31	1,26	0,2385	not significant
	A-Origen	11,67	3	3,89	0,78	0,51	
	B-Estado inmune	13,44	1	13,44	2,68	0,1041	
	C-Sexo	11,11	1	11,11	2,21	0,1392	
	AB	18,44	3	6,15	1,23	0,3033	
	AC	0,33	3	0,11	0,022	0,9955	
	BC	16	1	16	3,19	0,0765	
	ABC	23,67	3	7,89	1,57	0,1993	
	Pure Error	642,22	128	5,02			
	Cor Total	736,89	143				

ANEXO 6.8 ANALISIS FACTORIAL POR AISLAMIENTO

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R1 RECUENTO HÍGADO	Model	70,84	13	5,45	5,97	< 0.0001	significant
	A-aislamiento	66,55	11	6,05	6,63	< 0.0001	
	B-estado inmune	1,5	1	1,5	1,65	0,2082	
	C-sexo	2,78	1	2,78	3,05	0,0898	
	Residual	31,04	34	0,91			
	Cor Total	101,88	47				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R2 RECUENTO BAZO	Model	63,45	13	4,88	4,69	0,0001	significant
	A-aislamiento	56,48	11	5,13	4,93	0,0002	
	B-estado inmune	4,07	1	4,07	3,91	0,0563	
	C-sexo	2,9	1	2,9	2,79	0,1042	
	Residual	35,41	34	1,04			
	Cor Total	98,85	47				

		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R3 RECUENTO PULMÓN	Model	31,67	13	2,44	1,98	0,0553	not significant
	A-aislamiento	25,84	11	2,35	1,91	0,0737	
	B-estado inmune	3,13	1	3,13	2,54	0,1203	
	C-sexo	2,7	1	2,7	2,19	0,1479	
	Residual	41,88	34	1,23			
	Cor Total	73,55	47				

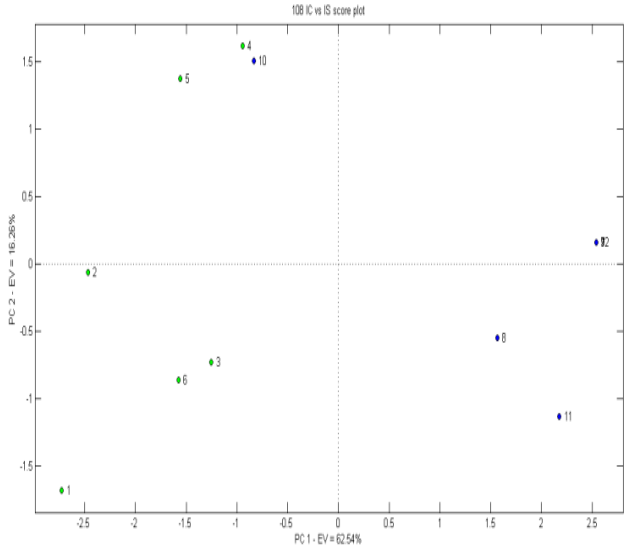
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R4 SCORE BAZO	Model	23,92	13	1,84	1,86	0,0731	not significant
	A-aislamiento	19,82	11	1,8	1,82	0,0888	
	B-estado inmune	4,08	1	4,08	4,13	0,05	
	C-sexo	9,26E-03	1	9,26E-03	9,36E-03	0,9235	
	Residual	33,63	34	0,99			
	Cor Total	57,55	47				

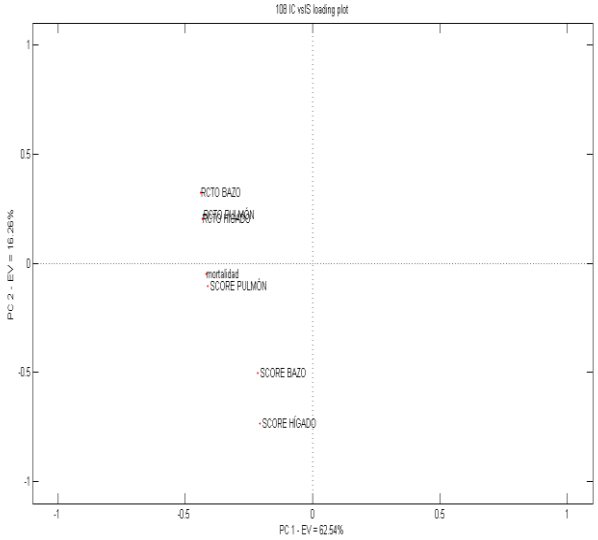
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R5 SCORE PULMÓN	Model	75,22	24	3,13	2,01	0,0498	significant
	A-aislamiento	39,06	11	3,55	2,27	0,0467	
	B-estado inmune	2,52	1	2,52	1,61	0,2166	
	C-sexo	1,69	1	1,69	1,08	0,3094	
	AB	31,95	11	2,9	1,86	0,1012	
	Residual	35,92	23	1,56			
	Cor Total	111,15	47				

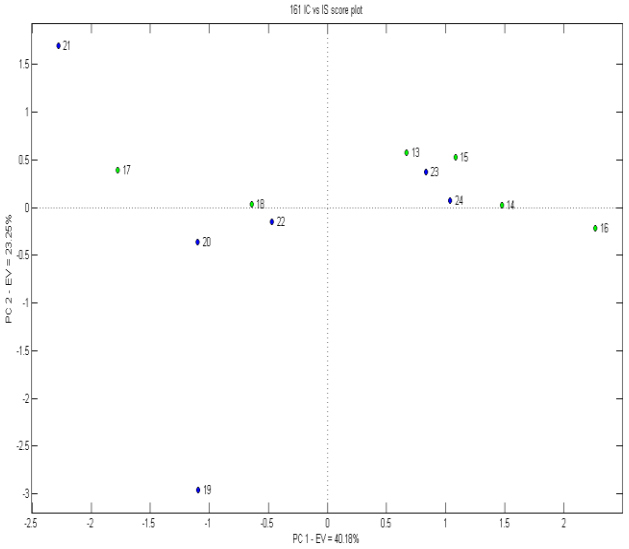
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R6 SCORE HÍGADO	Model	43,59	13	3,35	1,26	0,2834	not significant
	A-aislamiento	35,41	11	3,22	1,21	0,3181	
	B-estado inmune	4,48	1	4,48	1,68	0,2031	
	C-sexo	3,7	1	3,7	1,39	0,2463	
	Residual	90,48	34	2,66			
	Cor Total	134,07	47				

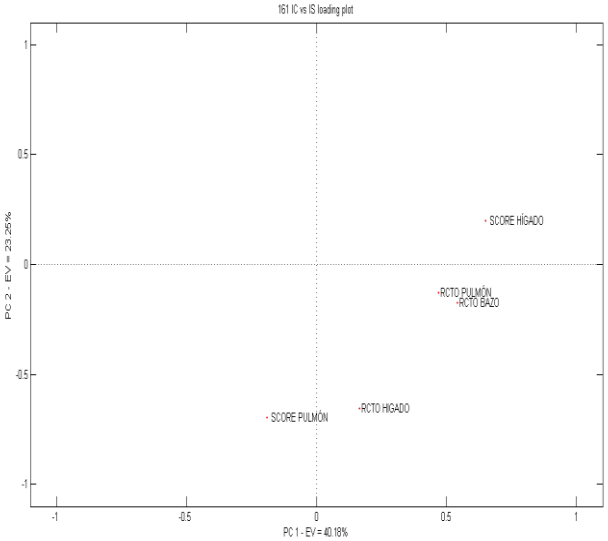
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
R7 MORTALIDAD	Model	618300	13	47564,61	2,89	0,0065	significant
	A-aislamiento	532700	11	48425,63	2,94	0,0077	
	B-estado inmune	85413,66	1	85413,66	5,19	0,0291	
	C-sexo	244,31	1	244,31	0,015	0,9037	
	Residual	559400	34	16453,49			
	Cor Total	1178000	47				

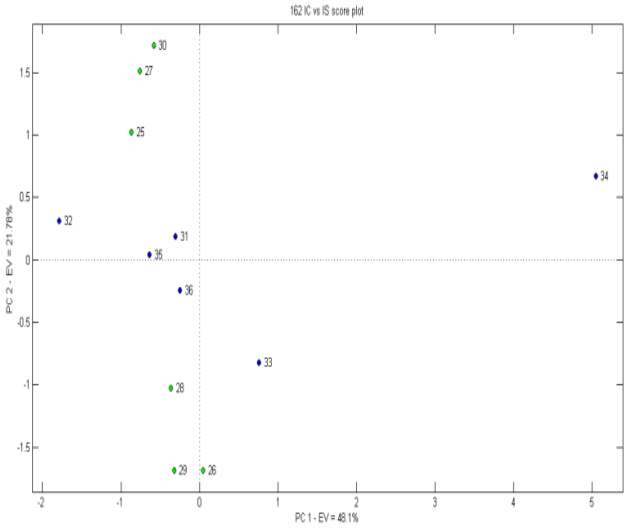
ANEXO 6.9 PLOT DE LA DISTRIBUCIÓN DE PATRONES DE RESPUESTA POR AISLAMIENTO UTILIZANDO ANALISIS DE COMPONENTES (PCA)

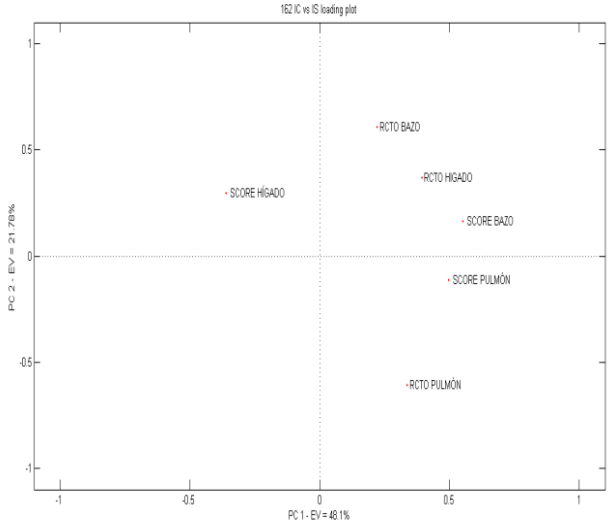


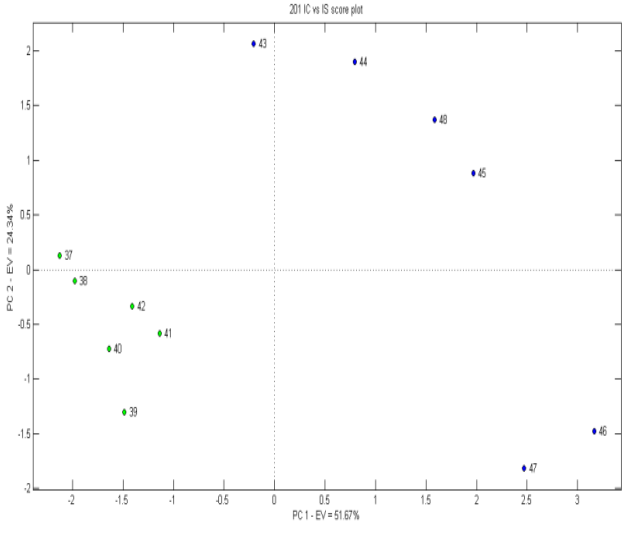


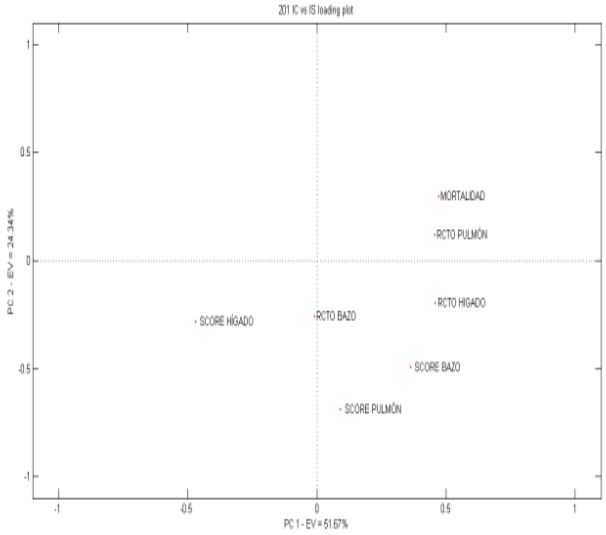


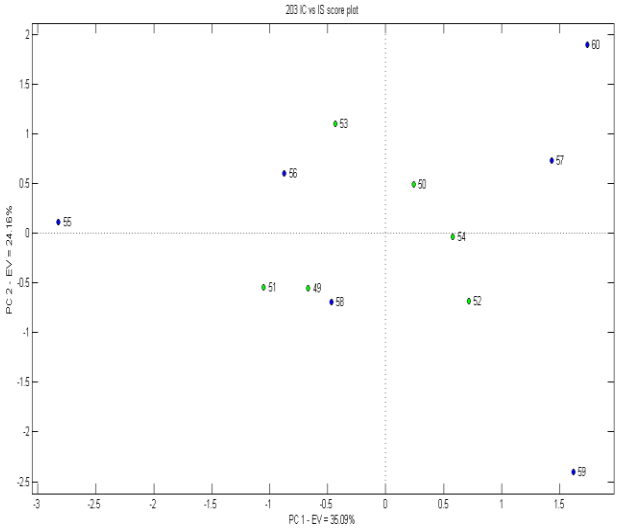


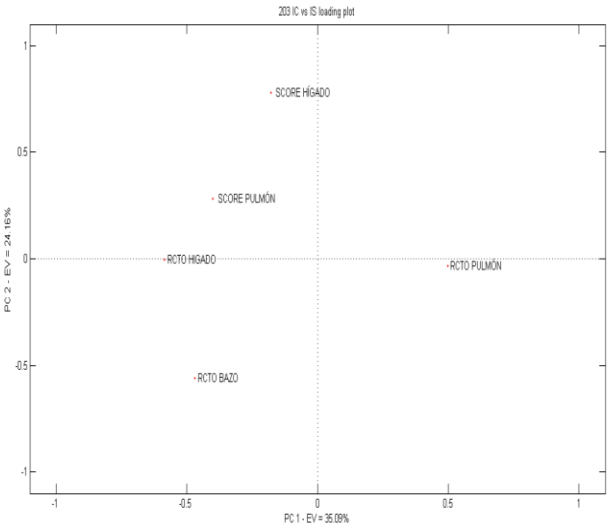

162 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 21.76%
PC 1 - EV = 48.1%
30
27
25
34
32
31
35
36
33
28
29
26

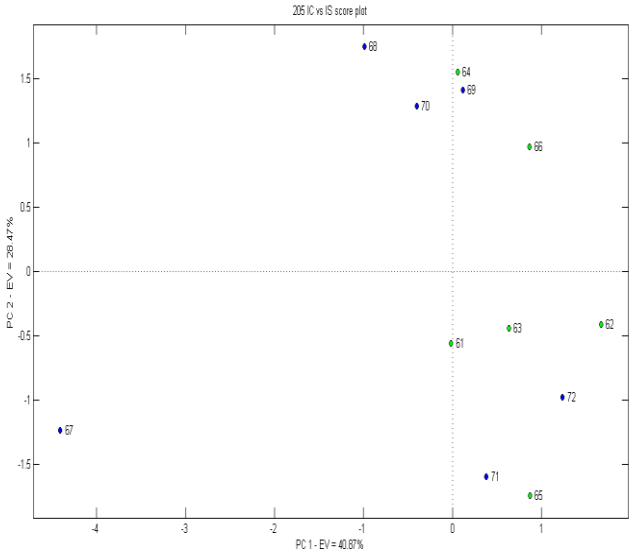

162 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 21.76%
PC 1 - EV = 48.1%
RCTO BAZO
RCTO HIGADO
SCORE HÍGADO
SCORE BAZO
SCORE PULMÓN
RCTO PULMÓN

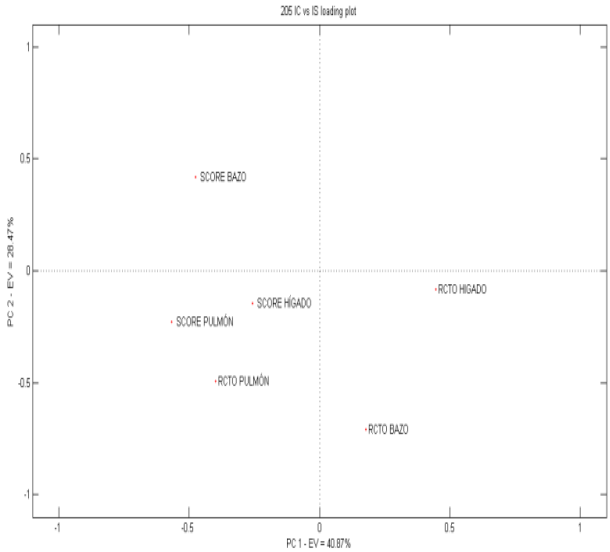

201 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 24.34%
PC 1 - EV = 51.67%
43
44
48
45
37
38
42
41
40
39
46
47

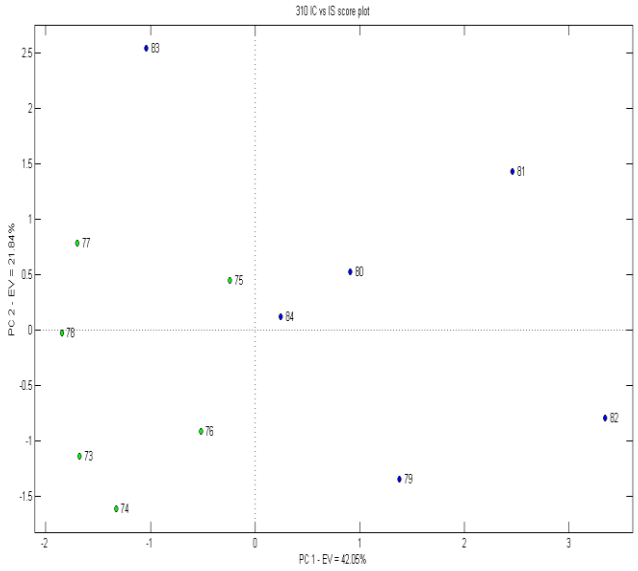

201 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 24.34%
PC 1 - EV = 51.67%
MORTALIDAD
RCTO PULMÓN
RCTO HIGADO
SCORE HÍGADO
RCTO BAZO
SCORE BAZO
SCORE PULMÓN

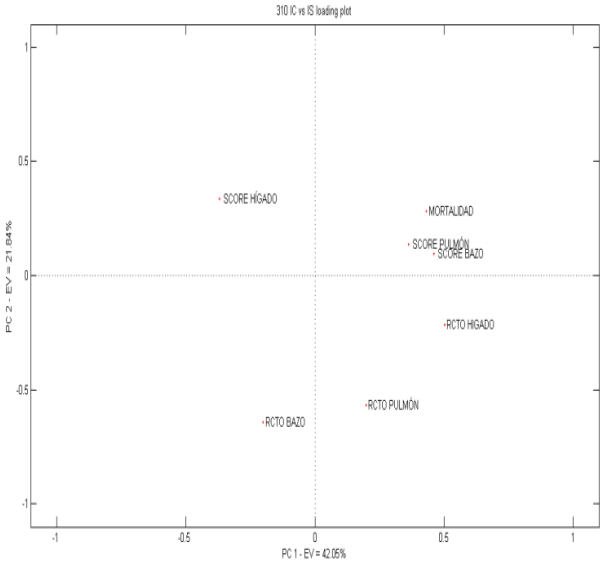

203 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 24.16%
PC 1 - EV = 35.09%
60
53
57
56
50
55
54
51
49
58
52
59

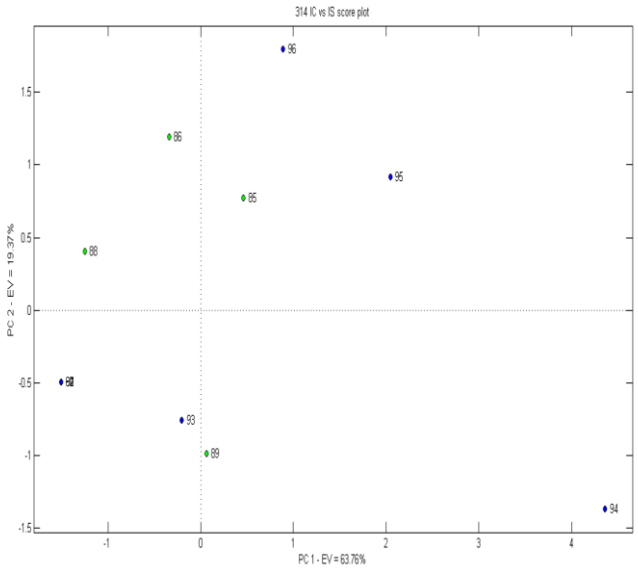

203 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 24.16%
PC 1 - EV = 35.09%
SCORE HÍGADO
SCORE PULMÓN
RCTO HÍGADO
RCTO PULMÓN
RCTO BAZO

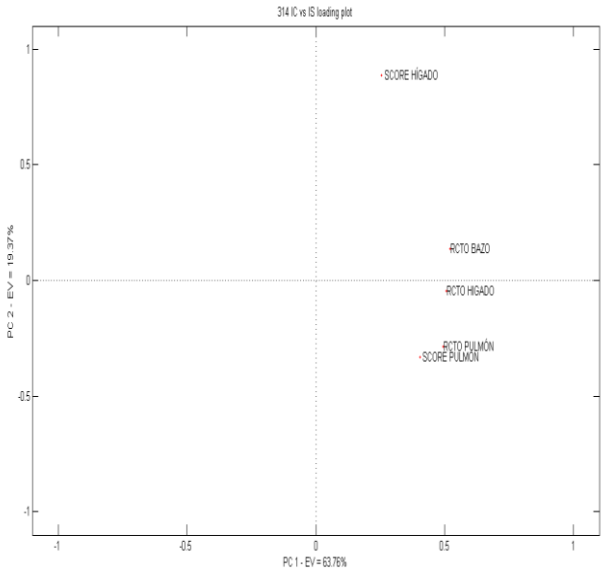

205 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 28.47%
PC 1 - EV = 40.87%
68
64
69
70
66
63
62
61
72
67
71
65

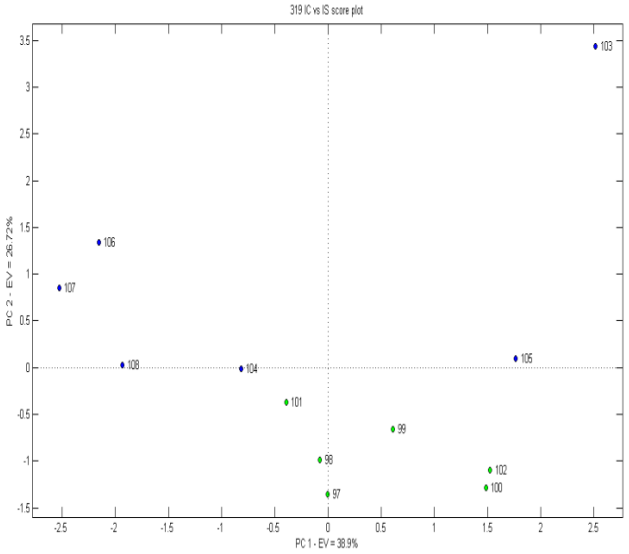

205 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 28.47%
PC 1 - EV = 40.87%
SCORE BAZO
RCTO HÍGADO
SCORE HÍGADO
SCORE PULMÓN
RCTO PULMÓN
RCTO BAZO

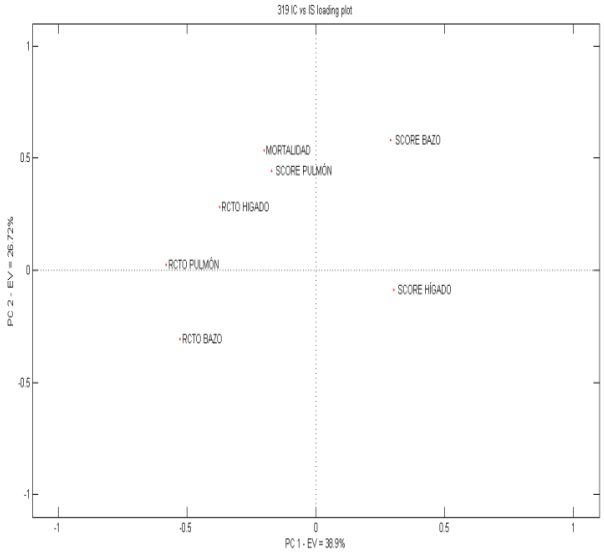

310 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 21.84%
PC 1 - EV = 42.05%
83
81
77
80
75
84
78
82
76
73
79
74

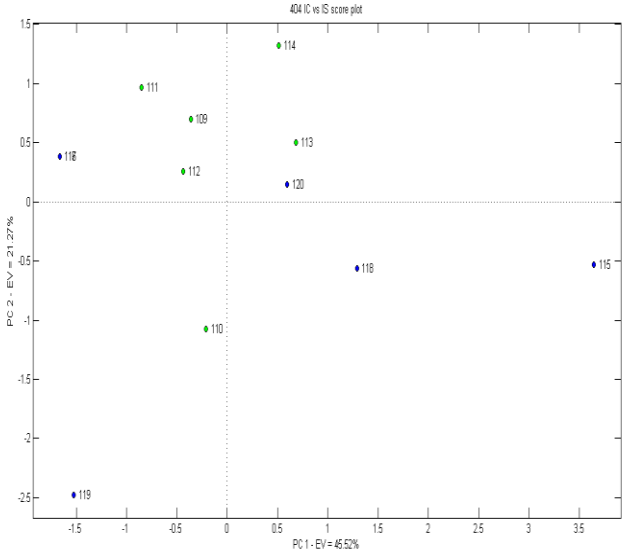

310 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 21.84%
PC 1 - EV = 42.05%
SCORE HÍGADO
MORTALIDAD
SCORE PULMÓN
SCORE BAZO
RCTO HIGADO
RCTO PULMÓN
RCTO BAZO

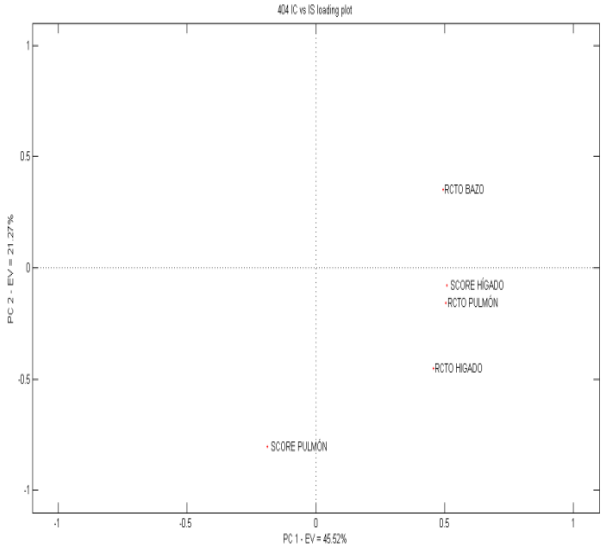

314 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 19.37%
PC 1 - EV = 63.76%
96
86
95
85
88
93
89
94

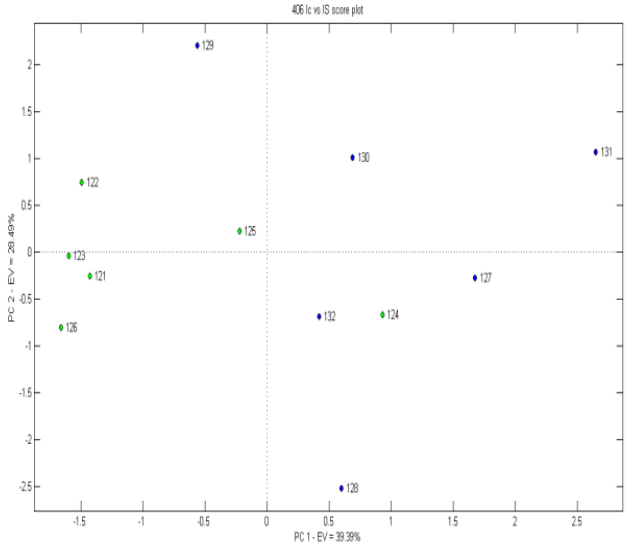

314 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 19.37%
PC 1 - EV = 63.76%
SCORE HÍGADO
RCTO BAZO
RCTO HIGADO
RCTO PULMÓN
SCORE PULMÓN

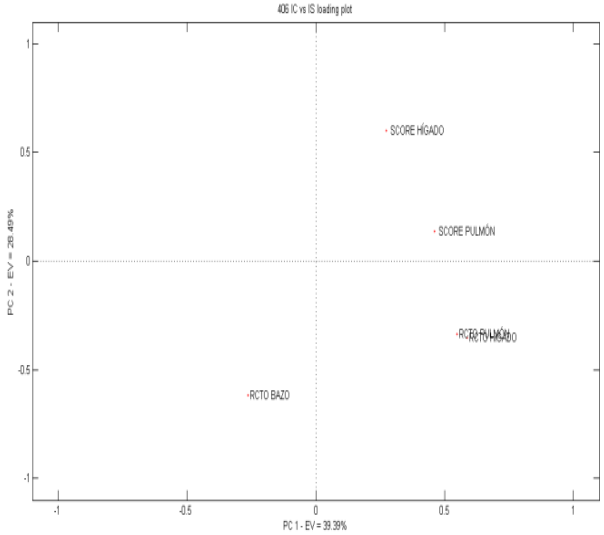

319 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 26.72%
PC 1 - EV = 38.9%
103
106
107
108
104
105
101
99
98
102
100
97

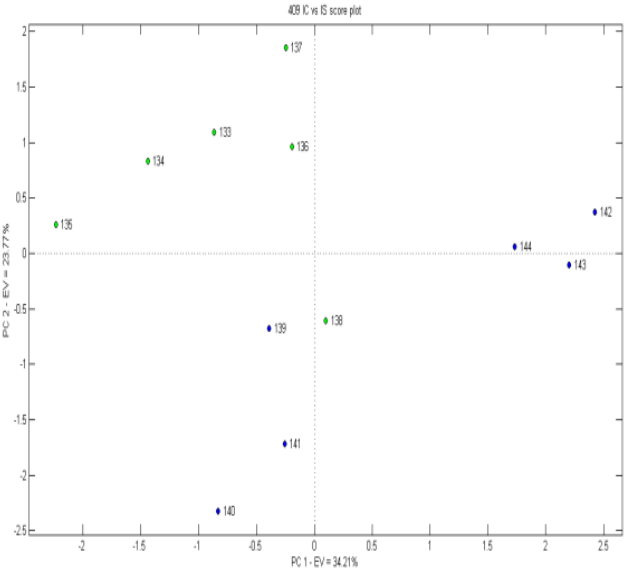

319 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 26.72%
PC 1 - EV = 38.9%
SCORE BAZO
MORTALIDAD
SCORE PULMÓN
RCTO HIGADO
RCTO PULMÓN
SCORE HÍGADO
RCTO BAZO

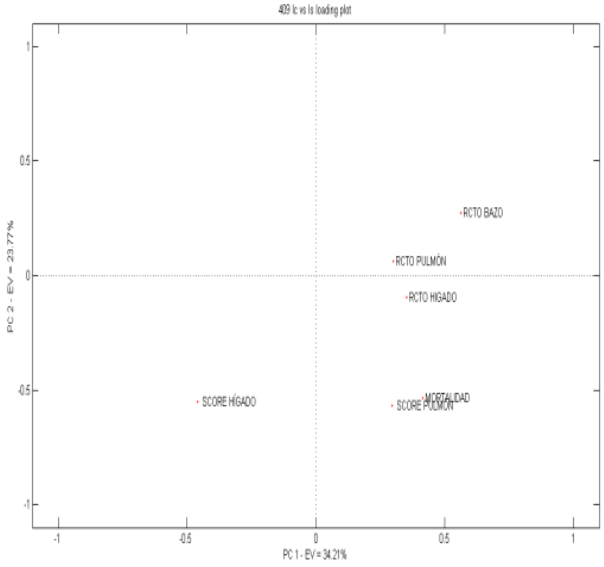

404 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 21.27%
PC 1 - EV = 45.52%
114
111
109
113
116
112
120
118
115
110
119


404 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 21.27%
PC 1 - EV = 45.52%
RCTO BAZO
SCORE HÍGADO
RCTO PULMÓN
RCTO HIGADO
SCORE PULMÓN


406 Ic vs IS score plot
PC 2 - EV = 28.49%
PC 1 - EV = 39.39%
129
130
131
122
125
123
121
127
126
132
124
128


406 IC vs IS loading plot
PC 2 - EV = 28.49%
PC 1 - EV = 39.39%
SCORE HÍGADO
SCORE PULMÓN
RCTO BAZO


409 IC vs IS score plot
PC 2 - EV = 23.77%
PC 1 - EV = 34.21%
137
133
134
135
136
142
144
143
139
138
141
140


409 Ic vs Is loading plot
PC 2 - EV = 23.77%
PC 1 - EV = 34.21%
RCTO BAZO
RCTO PULMÓN
RCTO HÍGADO
SCORE HÍGADO