



ORIGINAL

Virulencia de *Sporothrix globosa* en modelos murinos



Rodrigo Cruz Choappa^{a,*}, Salomón Pérez Gaete^b, Valentina Rodríguez Badilla^b,
Peggy Vieille Oyarzo^c y Héctor Opazo Sanchez^d

^a Cátedra de Micología, Universidad de Valparaíso, Unidad de Infectología, Hospital Carlos van Buren, Valparaíso, Chile

^b Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile

^c Cátedra de Micología y Anatomía Patológica, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^d Anatomía Patológica, Universidad de Valparaíso, Chile

Recibido el 3 de noviembre de 2015; aceptado el 8 de abril de 2016

Disponible en Internet el 25 de agosto de 2016

PALABRAS CLAVE

Esporotricosis;
Sporothrix globosa;
Patogenicidad

KEYWORDS

Sporotrichosis;
Sporothrix globosa;
Pathogenicity

Resumen

Introducción: La esporotricosis es una infección causada por especies pertenecientes al complejo *Sporothrix schenckii*. Dependiendo de la especie, estos organismos pueden tener virulencia y formas clínicas diferentes.

Objetivo: Verificar la virulencia de una cepa de *Sporothrix globosa* en un modelo murino usando 2 concentraciones de inóculo, en aplicación intraperitoneal o subcutánea.

Materiales y métodos: Estudio experimental no aleatorizado en murinos inoculados con una cepa de *S. globosa* (CBS 14.076M), por vía intraperitoneal y subcutánea, a 0,5 y 4 de concentración McFarland. Se utilizaron 18 roedores CF-1 (ISP, Santiago, Chile).

Resultados: La cepa estudiada no provocó enfermedad ni lesiones, todos los animales sobrevivieron, no hubo desarrollo de hongos en el cultivo de tejidos y el análisis histopatológico de órganos no mostró alteraciones sugerentes de infección.

Conclusiones: La cepa de *S. globosa* estudiada no presentó virulencia en modelos murinos y no provocó enfermedad al ser inoculada a concentración McFarland 0,5 y 4, tanto por vía intraperitoneal como subcutánea.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Virulence of *Sporothrix globosa* in murine models

Abstract

Introduction: The sporotrichosis disease is an infection caused by species included in *Sporothrix schenckii* complex.

Objective: Verify the virulence of a strain of *S. globosa* using two different concentrations of inoculum by intraperitoneally and subcutaneously, into a mouse model.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rcruzchoappa@gmail.com (R. Cruz Choappa).

Materials and methods: Nonrandomized pilot study, in murine inoculated with a strain of *S. globosa* (CBS 14.076 M) by intraperitoneally and subcutaneously with inoculum concentrations of 0.5 and 4 McFarland. For this purpose 18 rodents CF-1 (ISP, Santiago, Chile) were used.

Results: The studied strain did not induce illness or injury on animals, they all survived and neither the tissue culture nor the histopathological analysis showed fungal growth or suggestive infection by organ abnormalities.

Conclusions: The *S. globosa* strain did not present any virulence enough to cause disease at 0.5 and 4.0 McFarland concentration inoculum when inoculated in both intraperitoneally and subcutaneously, in murine models.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El complejo *Sporothrix schenckii* está conformado por un grupo de hongos dimorfos distribuidos en distintos ambientes de la naturaleza; sin embargo, se concentran principalmente en zonas tropicales y subtropicales⁷. Son los agentes causales de la esporotricosis, una micosis subaguda o crónica que afecta a humanos y otros mamíferos^{5,7}. La presentación clínica linfocutánea de extremidades es la más común, pero se han descrito infecciones en distintos órganos y formas diseminadas^{4,5,14}. Es considerada una enfermedad profesional, pues afecta principalmente a granjeros, jardineros, agricultores, veterinarios o a aquellas personas que presentan alguna herida punzante o mordedura por algún animal^{4,5,14}. En América, se han comunicado casos de esporotricosis en la mayoría de los países¹. En Chile, se han aislado las especies del citado complejo en forma esporádica, tanto de muestras médicas como del ambiente^{5,12}.

Distintos trabajos taxonómicos demuestran la alta variabilidad genética del complejo, el que se encuentra constituido por *S. schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix pallida*, las 3 primeras con importancia clínica y las otras aisladas principalmente de diversos sustratos ambientales^{8,11,13}. Las distintas especies pueden presentar virulencia y formas clínicas diferentes, ya que *S. schenckii sensu stricto* y *S. brasiliensis* pueden provocar lesiones cutáneas, profundas y diseminadas; en cambio, *S. globosa* se ha descrito principalmente en infecciones linfocutáneas^{2,3,5,11} y *S. pallida* en queratitis y onicomiosis^{9,12}.

El objetivo del presente trabajo fue verificar la virulencia de una cepa de *S. globosa*⁵ en un modelo murino usando 2 concentraciones de inóculo y en aplicación por vía intraperitoneal o subcutánea.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio experimental no aleatorizado en modelos murinos.

Cepa inoculada

Se eligió una cepa de origen clínico de *S. globosa* (CBS 14.076 M), identificada previamente por morfofisiología en el laboratorio de Micología de la Universidad de Valparaíso

y confirmada por biología molecular en el CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Animales

Se utilizaron en total 18 ratones CF1 (ISP, Santiago, Chile) de 6 semanas de edad, de 30 a 39 g de peso. Los roedores se manejaron teniendo en cuenta las normas del bioterio y del comité de ética animal de la Universidad de Valparaíso. El protocolo de supervisión utilizado fue el de Morton y Griffiths¹⁰.

Preparación del inóculo

La cepa se sembró en placas con agar con extracto de papa y glucosa (PDA; papa, 200 g; glucosa, 10 g; agar agar, 18 g; agua destilada, 1000 ml) y se incubaron durante 4 días a 30 °C.

Luego se preparó una suspensión de conidios agregando solución salina al 0,9% a los cultivos y rascando suavemente la superficie. Después se resembraron en 250 ml de caldo papa glucosa (PDC; papa, 200 g; glucosa, 10 g; agua destilada, 1000 ml) y se incubaron a 30 °C por 5 días. Posteriormente, los caldos de cultivo se filtraron a través de gasas estériles, se lavaron 3 veces con solución salina mediante centrifugación (2500 rpm, 10 min) y el sedimento se resuspendió también en solución salina. Por turbidimetría del nefelómetro de McFarland, el inóculo se ajustó a las concentraciones de 0,5 y 4 (1,5 y 12 × 10⁸ células/ml, respectivamente). La viabilidad se comprobó con siembras en PDA de cada dilución realizada.

El experimento constó de 2 tratamientos de acuerdo con la concentración del inóculo (0,5 y 4 McFarland).

Se crearon 2 modelos de infección, uno con inoculación intraperitoneal de 1 ml de la suspensión final y otro subcutáneo, por inoculación en el dorso a la misma concentración. Seis roedores fueron inoculados con una solución a una concentración 0,5 McFarland y los otros 6 con una concentración de 4 McFarland, además cada tratamiento tenía 3 roedores de control inoculados con *Sporothrix chilensis*, especie recientemente reconocida y cuya baja virulencia ya fue demostrada¹². La observación y el control se realizaron durante 30 días. A las lesiones subcutáneas se les asignó una categoría, según se describe en la [tabla 1](#).

Tabla 1 Características de las lesiones subcutáneas

| Tipo de lesión | Grado |
|---------------------------------------|-------|
| Sin lesión | 0 |
| Induración | 1 |
| Induración con enrojecimiento y calor | 2 |
| Ulceración superficial | 3 |

Supervivencia

Todos los animales se mantuvieron en observación durante 30 días. Solo serían sacrificados antes de ese plazo aquellos que presentaran un puntaje mayor de 8 según el protocolo de Morton y Griffiths¹⁰.

Histopatología y carga fúngica

A los 30 días de la inoculación, los animales fueron sacrificados según el protocolo del bioterio de la Universidad de Valparaíso. Se extrajeron asépticamente la región subcutánea de inoculación, el bazo, el hígado, los riñones y los pulmones. Un trozo de cada órgano se fijó en formalina al 10%, se procesó y se incluyó en parafina. Se realizaron secciones de 3 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina, ácido periódico-reactivo de Shiff y Grocott- Gomori para su estudio histológico. Muestras de 1 g de la región subcutánea de inoculación y de los órganos extraídos fueron homogeneizadas en 2,5 ml de solución salina al 0,9% y sembradas en PDA para conteo de las unidades formadoras de colonias.

Resultados

Concentración de conidios y características de las lesiones

En la fase 1 (0,5 McFarland), ningún roedor inoculado por vía intraperitoneal o subcutánea presentó signos de infección en el sitio de inoculación ni signos generales de enfermedad durante los 30 días de observación.

En la fase 2 (4 McFarland), los animales inoculados vía intraperitoneal tampoco presentaron lesiones durante los 30 días de observación. Un ratón inoculado subcutáneamente presentó una lesión nodular en el sitio de inoculación al día 7, sin calor local ni pérdida de pelo (lesiones grado 1), sin signos de sufrimiento de acuerdo con el protocolo de supervisión (fig. 1). Esta lesión se mantuvo sin cambios hasta los 30 días. Al mismo tiempo, 2 ratones inoculados por vía subcutánea presentaron máculas de tono rosado oscuro en la zona perinasal, asociadas a la pérdida de bigote (fig. 2).

Los animales inoculados con la cepa control no presentaron lesiones ni enfermedad.

Supervivencia

La supervivencia fue de un 100% en los ratones inoculados, tanto subcutánea como intraperitonealmente, al igual que los de control.

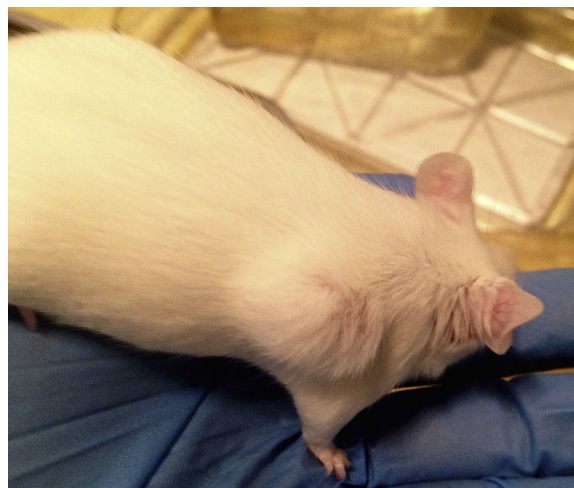


Figura 1 Nódulo dorsal sin signos de inflamación.

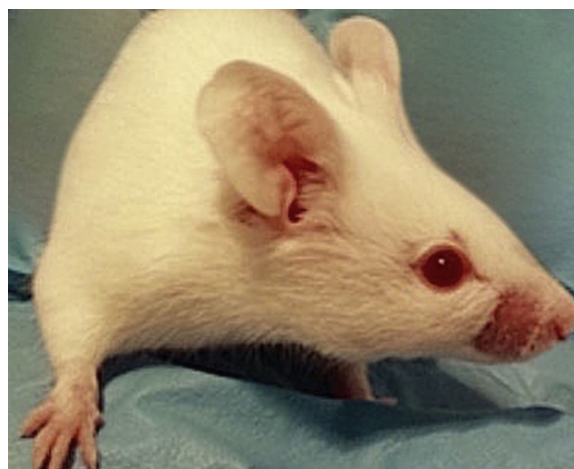


Figura 2 Lesiones perinasales compatibles con barbering o efecto Dalila.

Carga fúngica

Los cultivos de todos los órganos estudiados no presentaron desarrollo de hongos. En los animales de control, tampoco hubo aislamiento del hongo.

Estudio histopatológico

En los animales inoculados intraperitonealmente no hubo alteraciones histológicas ni presencia de elementos levaduriformes indicativos de infección por *Sporothrix*. En los animales inoculados subcutáneamente hubo uno que presentó un nódulo en el sitio de inoculación; sin embargo, en la histología solo se observó inflamación inespecífica y no se observaron elementos levaduriformes indicativos de infección por *S. globosa*. En los animales de control la histología fue normal.

Discusión

Se describe a *S. brasiliensis* y *S. schenckii sensu stricto* como las especies del complejo que tienen mayor virulen-

cia y pueden provocar lesiones, tanto subcutáneas como profundas^{2,3}. En Chile, se han identificado a nivel de especie solo *S. globosa* y *S. chilensis*^{5,12}. *S. globosa* se describe como de baja virulencia y asociada principalmente a infección linfocutánea^{2,3,5}. En nuestro estudio no se logró reproducir la enfermedad por inoculación intraperitoneal ni subcutánea en las 2 concentraciones estudiadas, lo que difiere de otros estudios en murinos, donde a una menor concentración de conidios se reprodujo la infección, tanto sistémica como subcutánea^{2,3,6}. Esto podría explicarse debido a una menor virulencia de nuestra cepa, la cual se aisló de una paciente adulta mayor que cursó con esporotricosis linfocutánea, virus de la inmunodeficiencia humana (-), en quien no se realizó estudio de complemento C3 y C4, ni cuantificación de inmunoglobulinas IgA, M y G⁵.

Estudios de supervivencia han mostrado que murinos inoculados sistémicamente con cepas de *S. brasiliensis* y *S. schenckii sensu stricto* tuvieron una letalidad de 100% entre la segunda y la sexta semana, a diferencia de *S. globosa*, para la que no se describe letalidad^{2,3,6}. Esto coincide con los resultados de nuestro trabajo, en el que el total de los murinos sobrevivieron a los 30 días y sin signos de enfermedad o sufrimiento según el protocolo de Morton y Griffiths¹⁰. Esto también podría estar dado por la menor virulencia de nuestra cepa, sin capacidad para provocar infección subcutánea o profunda en ratones inmunocompetentes.

En un estudio realizado con anterioridad, tanto la carga fúngica como el compromiso histológico (cantidad de levaduras en el tejido) provocado por *S. globosa* fue menor comparado con *S. brasiliensis* y *S. schenckii sensu stricto*^{2,3}. En esta investigación no hubo desarrollo de colonias de hongos ni compromiso histológico de órganos profundos indicativo de infección, tampoco presencia de elementos levaduriformes en los tejidos de los roedores. Esto sugiere que nuestra cepa no tiene la capacidad para invadir tejidos profundos, a diferencia de otras cepas de *S. globosa* aisladas en otras zonas geográficas.

Uno de los ratones presentó una lesión dorsal sin signos clínicos, micológicos ni histológicos de infección, lo cual se interpretó como una posible reacción inespecífica a la punción o a la suspensión inoculada. Las lesiones rosadas en la región perinasal de 2 de los roedores, al no evidenciar infiltración fúngica en la histopatología ni desarrollo de *Sporothrix* en el cultivo, se explicarían por un comportamiento llamado *barbering* o «efecto Dalila», que consiste en la remoción de bigotes y piel perinasal a compañeros de jaula para demostrar dominancia¹⁵.

La cepa de *S. globosa* utilizada en esta investigación, que había sido aislada de una paciente de la quinta región de Chile, podría ser menos virulenta que las presentes en otras regiones. Esto podría ser una de las razones por las cuales la esporotricosis se presenta esporádicamente en nuestro país y sin compromiso de órganos profundos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

1. Arenas R. Esporotricosis. En: Arenas R, editor. *Micología médica ilustrada*. 2.ª ed. México D.F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2004. p. 149–60.
2. Arrillaga Moncrieff I, Capilla J, Fernández AM, Fariñas F, Mayayo E. Diferencias en la patogenicidad del complejo de especies *Sporothrix* en un modelo animal. *Patología*. 2010;48(2):82–7.
3. Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, Cano J, Guarro J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):651–5.
4. Carrada T. Esporotricosis pulmonar cavitada: diagnóstico y tratamiento. *Med Int Mex*. 2006;22:457–61.
5. Cruz R, Vieille P, Oschilewski D. Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfocutánea. *Rev Chil Infectol*. 2012;29:401–5.
6. Ferreira G, Oliveira P, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, Pires de Camargo Z. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 2013;4:1–9.
7. López-Romero E, Reyes-Montes M, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro J, Mora H, Flores-Carreón A, Toriolo C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol*. 2011;6:85–102.
8. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3198–206.
9. Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG, Kim JY, Burd EM. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Med Mycol Case Reports*. 2013;2:88–90.
10. Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*. 1985;116:431–6.
11. Oliveira D, Markus Lopes P, Spander T, Mahl C, Tronco-Alves G, Lara V, Santurio J, Hartz Alves S. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):3047–9.
12. Rodrigues AM, Cruz R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo Zoilo P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (*Ascomycota: Ophiostomatales*), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol*. 2015;120:246–64.
13. Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia*. 2011;172:179–86.
14. Rubio G, Sánchez G, Porras L, Alvarado Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27:75–9.
15. Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res*. 2000;108(1):39–45.