
Modelos animales de infecciones fúngicas

Manuel Cuenca-Estrella^a, Juan Luis Rodríguez-Tudela^{a,*} y Joan Gavalda^b

^aUnidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. ^bServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona.

RESUMEN

En las últimas décadas se ha producido un aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas que ha conllevado el desarrollo de todos los campos de la micología médica, incluidos los modelos experimentales de infecciones fúngicas. Hasta hace unos años, sólo existían modelos para realizar muestreos con antifúngicos, estudios de supervivencia o determinación de concentraciones plasmáticas de fármacos, pero en la última década se han desarrollado varios modelos discriminatorios que intentan reproducir la infección fúngica como ocurre en humanos, y que analizan diferentes parámetros que influyen en la secuencia de infección. En este artículo se describen algunos de estos modelos de infección fúngica. En primer lugar, un modelo de candidiasis diseminada en ratones, tras colonización sostenida del tracto gastrointestinal e inmunodepresión de los animales. A continuación, un modelo de aspergilosis invasora tras inoculación respiratoria e inmunodepresión. Por último, se describen brevemente otros modelos. Así mismo se incluyen también sus ventajas, limitaciones y posibles aplicaciones.

Palabras clave:

Patogenia fúngica. Candidiasis sistémica experimental. Aspergilosis pulmonar.

FUNGAL INFECTIONS ANIMAL MODEL

During last decades there has been a persistent rise in the prevalence of mycotic diseases afflicting humans that have led to a significant expansion of our knowledge of the medical mycology. Experimental models of fungal infections are an integral part of these progresses. A few years ago, animal models of infection evaluated the efficacy antifungal agents, survival rate or plasmatic levels of antifungal agents. During last years have been developed discriminative models that are designed to mimic the infection in humans. In these models, multiple parameters of efficacy are measured to ascertain the initiation and progress of fungal infections. Herein we described two discriminative models of fungal infection. Firstly, a mice model of sustained gastrointestinal colonization by *Candida albicans* and disseminated infection after immunosuppression. Likewise, a model of invasive aspergilosis in immunosuppressed mice is also summarized. Finally, other models of fungal infection are briefly described. Advantages, limitations and applications are also included.

Key words:

Fungal pathogenesis. Experimental systemic candidiasis. Pulmonary aspergilosis.

Introducción histórica

La micología médica posee una historia relativamente corta. Puede aceptarse que esta especialidad de la microbiología se inició a finales del siglo XIX. De esta fecha datan las primeras descripciones de los principales agentes etiológicos de micosis, tanto en humanos como en animales

(dermatofitosis, aspergilosis, candidiasis, criptococosis, histoplasmosis, etc.). No obstante, no ha sido hasta las últimas décadas cuando se ha observado que las infecciones fúngicas han aumentado en número y en gravedad, lo que ha conllevado un mayor desarrollo de la micología médica¹. Este incremento de las micosis se ha producido en paralelo al del número de enfermos inmuno-

*Correo electrónico: juanl.rodriguez-tudela@isciii.es.

deprimidos, pacientes que por sus características y por las prácticas diagnósticas y terapéuticas a las que se ven sometidos, han proporcionado la base para que se produzcan cambios ecológicos y epidemiológicos que están desplazando a los patógenos fúngicos tradicionales^{2,3}.

Esta breve historia de la micología médica ayuda a entender las razones por las que apenas existieron avances científicos en este campo hasta los años sesenta, y por qué, desde entonces, los progresos han sido constantes. En estos años se descubrieron los primeros antifúngicos con utilidad terapéutica (5-fluorocitosina y algunas moléculas poliénicas), y tras ellos han ido surgiendo los que actualmente se utilizan en la práctica clínica diaria (azoles, anfotericina B, antifúngicos lipídicos, etc.). También se han conseguido pruebas diagnósticas eficaces y en los últimos años se dispone de técnicas de tipificación subespecífica^{4,5}.

Obviamente, los modelos de infección fúngica en animales se han visto influidos por el desarrollo de la micología médica. Desde 1960 hasta 1985 se describieron más de 1.000 modelos animales que valoraban diferentes aspectos sobre el uso de antimicrobianos en los cuadros infecciosos. De todos ellos, una veintena estaban diseñados para el estudio de la infección fúngica y de los antifúngicos y, además, se desarrollaron intentando reproducir las infecciones fúngicas primarias y las infecciones de la piel y las mucosas⁶.

El aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas diseminadas en pacientes inmunodeprimidos, junto con la aparición de fármacos antifúngicos útiles para el tratamiento de estas infecciones, han conllevado que en la última década se hayan publicado varias decenas de modelos experimentales de infección fúngica⁷⁻⁹.

En la actualidad, existen modelos de variados diseños y utilidades. La complejidad de los mismos, junto con la brevedad de estas líneas, obligan a describir con detalle únicamente los que aportan más información y que, por tanto, pueden tener una mayor utilidad. Son los denominados *modelos discriminatorios*, que intentan reproducir la infección fúngica como ocurre en humanos, y que analizan multitud de parámetros para obtener la mayor información posible (factores de virulencia, farmacocinética, farmacodinamia, etc.)⁹. No obstante, en micología no se han desarrollado modelos que puedan considerarse de referencia. No existe acuerdo sobre qué especies animales deben emplearse. Tampoco lo existe sobre la edad, el género, el régimen inmunosupresor y el inóculo.

Aun así, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que han desarrollado algunos

modelos animales de infección fúngica. A éstos va a referirse el presente artículo. En primer lugar, se describirá un modelo de colonización gastrointestinal por *Candida albicans*, con diseminación sistémica. En segundo término, un modelo de infección invasora por *Aspergillus fumigatus*, tras colonización previa del tracto respiratorio, y como tercer y último punto, se resumirán brevemente otros modelos de infección fúngica de probada utilidad.

Modelos de infecciones fúngicas

Modelo de candidiasis sistémica

En los primeros modelos experimentales que se desarrollaron intentando reproducir las infecciones diseminadas por *C. albicans*, las levaduras se inoculaban por vía intravenosa⁷. Pero los modelos de infección deben imitar lo más posible las vías de contagio y diseminación que utilizan los agentes infecciosos en el ser humano. Así, desde que se conoce que la mayoría de las infecciones por *C. albicans* tienen un origen endógeno, se han desarrollado nuevos modelos de candidiasis profunda o diseminada. *C. albicans* y otras especies de *Candida* forman parte de la flora comensal del tracto gastrointestinal humano. Desde esta localización pueden diseminarse causando infecciones profundas en enfermos inmunodeprimidos o con otros factores desencadenantes⁴. De esta forma, los modelos de candidiasis diseminada que se emplean actualmente se basan en la colonización sostenida del tracto gastrointestinal de los animales de experimentación, en la inmunosupresión de los mismos y en la valoración de la infección diseminada.

1. Descripción del modelo

Animales de experimentación. Se han desarrollado modelos de este tipo en varias especies de animales (ratón, rata, conejo, etc.), aunque en la mayoría de ellos se utilizan ratones Swiss libres de patógenos específicos. No existe acuerdo sobre el peso, el género o la edad de los mismos¹⁰⁻¹⁵.

C. albicans no es constituyente habitual de la flora intestinal del ratón, y además, el tracto gastrointestinal de los ratones adultos sanos no suele colonizarse con facilidad^{16,17}. Por ello, estos modelos se diseñan con ratones neonatos o ratones adultos que son tratados con antibióticos de amplio espectro y fármacos inmunodepresores para facilitar la colonización por levaduras o incluso, se usan ratones inmunodeprimidos me-

dante manipulación genética (BALB/c, CD2F1, etc.). Los ratones neonatos se utilizan por su facilidad para ser colonizados, dada la inmadurez de su sistema inmunológico y la escasez de su flora intestinal^{7,10-15,18}.

No obstante, si se quiere reproducir fielmente la secuencia de esta infección en humanos, la colonización sostenida debe conseguirse antes de que los ratones estén inmunodeprimidos. En este sentido, se han desarrollado varios modelos que intentan conseguir la colonización gastrointestinal sostenida sin emplear ratones inmunodeprimidos ni fármacos inmunosupresores. Entre éstos destacan los que añaden el inóculo al pienso de los ratones¹⁹, los que suplementan el agua con hidratos de carbono²⁰ y los que utilizan dosis bajas de antibióticos de amplio espectro^{21,22}. Las estrategias son muy variadas, pero en todos se busca la colonización gastrointestinal sostenida por *C. albicans*, tras la cual, se los ratones son tratados con inmunosupresores.

En la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III se ha estandarizado un modelo murino de colonización gastrointestinal sostenida por *C. albicans* en ratones adultos sanos (Swiss/CD-1). Para conseguir la colonización se emplea agua estéril suplementada con glucosa (50 g/l) y tetraciclina (1 g/l).

Inoculación de los animales. Dependiendo de la estrategia empleada para conseguir la colonización gastrointestinal, la inoculación debe planearse de una u otra manera. En los modelos descritos, los ratones son tratados con antibióticos o hidratos de carbono de 3 a 15 días antes de ser inoculados²⁰. En el modelo con glucosa y tetraciclina, el agua de los ratones se suplementa 48 h antes del inóculo.

El inóculo empleado debe ser elevado, entre 1×10^6 y 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml¹⁰⁻¹⁵. Se ha observado que con inóculos más bajos no se obtienen buenos resultados en la colonización gastrointestinal. Cada ratón es inoculado intragástricamente con 0,1-0,2 ml, mediante agujas especiales de punta roma para alimentación animal.

Valoración de la colonización gastrointestinal por C. albicans. La colonización gastrointestinal se valora mediante cultivos de heces de ratones elegidos al azar. Puede aceptarse que se ha conseguido la colonización sostenida cuando se obtienen coprocultivos uniformemente positivos para *C. albicans*, durante 10-14 días, y con valores de colonización de 10^2 - 10^6 UFC/g de heces.

En algunos modelos se ha analizado la influencia de las levaduras y los suplementos sobre la flora gastrointestinal del ratón. En el caso de la tetraciclina, ésta origina descensos tanto en la flora aerobia y anaerobia facultativa como en la anaerobia estricta, aunque existen datos que indican que sus efectos se producen, principalmente, por la inhibición de la flora anaerobia facultativa²¹. En la figura 1 se representan las alteraciones en la flora intestinal por especies bacterianas, además de la colonización por *C. albicans*.

Con la utilización de hidratos de carbono se observa que *C. albicans* puede pasar a fase micelial con mayor facilidad, lo que conlleva un mayor grado de penetración en la mucosa gastrointestinal²⁰. Ambas consecuencias, el descenso de la flora bacteriana y la penetración en la mucosa gastrointestinal, pueden explicar la colonización sostenida.

Inmunosupresión. Una vez que se ha documentado una colonización gastrointestinal sostenida, se debe pasar a la inmunosupresión de los ratones, con el fin de que las levaduras se diseminen desde el tracto gastrointestinal. Se han utilizado diferentes regímenes con un solo inmunosupresor o con combinaciones. Las combinaciones de fármacos citostáticos y de corticoides son las que obtienen inmunodepresiones más profundas (menos del 10% de los valores normales de leucocitos)^{23,24}.

Las dosis de inmunodepresión pueden pautarse cada 24, 48 o 72 h. La vía de administración suele ser mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas. En el modelo estandarizado en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología se emplean ciclofosfamida (150 mg/kg de peso) y metilprednisolona (65 mg/kg de peso) cada 72 h, por vía intraperitoneal. Con esta pauta se consigue una profunda inmunosupresión a la séptima u octava dosis.

Los descensos en el número de leucocitos pueden determinarse mediante recuentos celulares de la sangre periférica de ratones seleccionados, realizados en un hematocitómetro.

Evaluación de la diseminación. En el ratón, la candidiasis diseminada ocasiona inmovilidad, pérdida de peso y erección pilosa; también pueden aparecer síntomas oculares y cerebelosos. Cuando se observa alguno de estos signos entre los ratones inoculados, los animales se sacrifican mediante dislocación cervical. En el caso de que se esté valorando la respuesta a un tratamiento antifúngico, se observa la evolución de los animales, y se sacrifican aquellos en los que aparece fallo terapéutico.

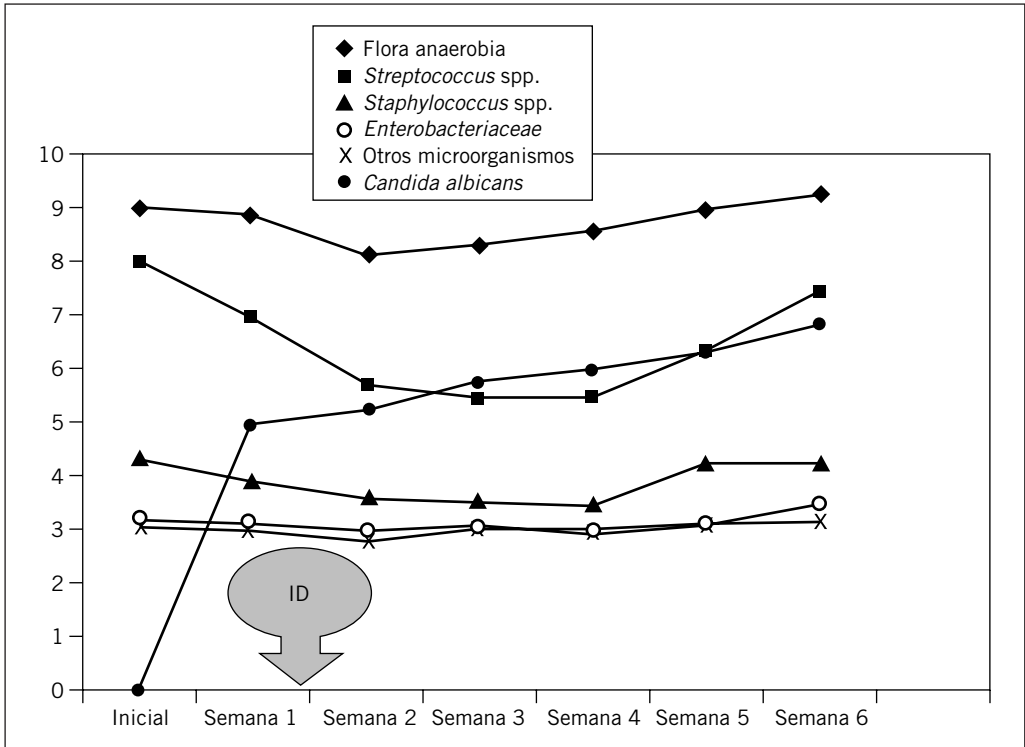


Fig. 1. Alteraciones en la flora intestinal de los ratones, a lo largo de las semanas de duración del modelo de candidosis diseminada de la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología. El gráfico también representa la colonización por *C. albicans*; ID: día en que se comienza el régimen inmunodepresor. Los resultados se expresan en UFC/g de heces + log₁₀.

Es importante tener en cuenta que los fármacos inmunodepresores pueden producir síntomas como inmovilidad y pérdida de peso. Por ello, se debe incluir en el experimento un grupo control sin inocular, pero al que se le aplican estos fármacos.

Los ratones sacrificados con sospecha de candidiasis diseminada se diseccionan en condiciones asépticas. Se toman muestras de varios órganos, generalmente hígado, riñones y bazo, aunque pueden incluirse otros como pulmones, corazón y cerebro. Se hacen cultivos cuantitativos de las muestras viscerales, anotando los resultados en UFC por g de órganos.

Se pueden realizar siembras en medios para cultivo de bacterias, con la intención de analizar si las levaduras se diseminaron en compañía de flora intestinal, ya que la presencia de bacterias en las vísceras puede influir negativamente en las futuras aplicaciones del modelo de infección fúngica.

En la tabla I se observan los resultados obtenidos con el modelo empleado en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología. Descritos brevemente, se obtuvo la colonización gastrointestinal sostenida en el 100 % de los ratones inoculados (se utilizaron seis aislamientos clínicos de *C. albicans*), y la diseminación se observó en el 60 % de los animales.

Un aspecto interesante a la hora de evaluar la diseminación es la realización de estudios histológicos. Los exámenes anatomopatológicos de los órganos infectados aportan una valiosa información. Se ha observado que la unión gastroesofágica (UGE) es el lugar en el que se produce un mayor nivel de colonización. En el cuerpo del estómago, en el duodeno y en el yeyuno-íleon la colonización es mucho menor⁷. En la UGE se observan levaduras en fase micelial, que pueden llegar a penetrar hasta la submucosa. La evolución de la lesión suele conllevar profundas úlceras necróticas, desde donde se produce la dise-

TABLA I
RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO DE CANDIDIOSIS DISEMINADA DE LA UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Grupos	Día de inicio inmunosupresión		Día de la muerte ^a		Diseminación	
	Ratones colonizados ^b	Concentración en heces ^c	Ratones colonizados ^b	Concentración en heces ^c	Ratones con diseminación ^b	Concentración en órganos ^c
Controles	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Agua estéril ^d	8/30	2,91 ± 0,31	24/30	4,80 ± 0,28	3/30	2,73 ± 0,67
Tetraciclina y glucosa ^e	30/30	5,28 ± 0,18	30/30	7,08 ± 0,31	18/30	4,14 ± 1,31

^aDía de la muerte hace referencia al día en que los ratones fueron sacrificados por presentar síntomas de candidiasis diseminada, o si no la presentaron, al día final del experimento.

^bLos datos indican ratones número de ratones infectados/número total de ratones por grupo.

^cLos datos se expresan en media ± desviación típica de las UFC/g de heces × log₁₀.

^dAgua estéril se refiere a los ratones que estaban inoculados pero que no fueron tratados con glucosa y tetraciclina; ^eratones que fueron tratados con glucosa y tetraciclina.

minación, generalmente por vía hematógena, aunque en algunos casos puede seguir el sistema linfático o simplemente provocar fístulas e infectar las vísceras por continuidad²⁵. En los modelos que emplean suplementos dietéticos de hidratos de carbono se ha observado un mayor número de levaduras en fase micelial, penetrando y ulcerando la mucosa gástrica²⁰. Esto puede explicar los porcentajes de diseminación tan elevados que se obtienen en estos modelos. El uso de antibióticos de amplio espectro ayuda a la colonización gastrointestinal, pero parece ser sólo un coadyuvante de la diseminación, ya que no debe olvidarse que, siendo la UGE el lugar en el que se produce una mayor colonización, ulceración y diseminación, la flora bacteriana es muy escasa en esta zona del tracto intestinal.

También aportan información los estudios histológicos de los órganos infectados. En ellos suelen observarse microabscesos con necrosis central, y abundantes levaduras e hifas infiltrando los tejidos y produciendo necrosis celular⁷. La respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud, pero parece estar mediada por la colaboración de varios factores. Linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y monocitos participan en ella, y varias citocinas, factores de necrosis tumoral y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macró-fagos parecen modularla²⁻⁴. En animales inmunodeprimidos la respuesta, obviamente, varía. Los citostáticos, como la ciclofosfamida, lesionan células en división, como las de la médula ósea y las de la mucosa gastrointestinal. La lesión sobre esta última contribuye a la diseminación hematógena de las candidiasis de origen endógeno. Los corticoides afectan a la respuesta inmunita-

ria celular. Así, en los tejidos de ratones inmunodeprimidos la respuesta inmunitaria es escasa, por lo que se producen los microabscesos y la infiltración necrosante.

2. Ventajas y limitaciones del modelo

Con anterioridad se destacó que los modelos animales deben intentar imitar la secuencia de infección como ocurre en el ser humano. Los modelos que inoculan intragástricamente las levaduras, y después causan la inmunodepresión de los animales reproducen con bastante fidelidad la candidiasis sistémica de origen endógeno de los pacientes inmunodeprimidos. Por ello, los experimentos que se planean en estos modelos aportan una información que puede ser aplicada para el estudio de esta infección en humanos. En la tabla II y en el apartado de "Aplicaciones del modelo" se resumen las principales aplicaciones de estos modelos, y los avances que han supuesto para el estudio de esta infección fúngica.

Los modelos que inoculan las levaduras por vía intravenosa no reproducen la vía de infección de las candidiasis sistémica de origen endógeno. No obstante, se emplean en estudios de supervivencia que analizan la virulencia o la respuesta al tratamiento o a la profilaxis con un antifúngico. Los resultados obtenidos en estos trabajos deben interpretarse con rigor, y no deben aceptarse con facilidad extrapolaciones al ser humano, ya que la fisiopatología de esta infección no ha sido reproducida en el modelo.

Por otra parte, los modelos que utilizan la colonización gastrointestinal presentan algunas limitaciones que deben valorarse a la hora de pla-

TABLA II
POSIBLES APLICACIONES DEL MODELO DE CANDIDIASIS DISEMINADA

<i>Aplicaciones</i>	<i>Características de las que existen datos publicados</i>
Estudio de factores de virulencia	Adhesinas Aspartil proteasas Propiedades hidrofóbicas Fase micelial
Estudio de factores favorecedores	Alteraciones de la flora bacteriana Lesiones en la mucosa gastrointestinal
Análisis de la respuesta inmunitaria	Respuesta inmunitaria celular Inmunomoduladores Posibilidad de estudiar ratones con alteraciones genéticas
Valoración de moléculas antifúngicas	Estudios farmacocinéticos Modelos profilácticos Modelos terapéuticos Correlación <i>in vitro-in vivo</i> Modelos con nuevas moléculas Estudios de sinergismo

near su desarrollo. En primer lugar, la necesidad de inducir en los ratones una inmunodepresión tan intensa obliga a trabajar con material estéril. La estabulación y el mantenimiento de los animales deben incluir pienso irradiado, agua estéril, sistemas de filtración del aire y otras precauciones. Todo lo anterior complica el desarrollo del modelo, por lo que se requieren estabularios dotados para la utilización de este tipo de animales, y un personal con formación especializada.

Este tipo de modelos se ha desarrollado principalmente con *C. albicans*, y en algunas ocasiones con *Candida tropicalis*^{26,27}. Con esta última se han obtenido peores resultados en la colonización gastrointestinal y en la diseminación. Con otras especies de *Candida* apenas existen datos publicados. No obstante, las candidiasis sistémicas causadas por *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y otras especies de levaduras no parecen tener un origen gastrointestinal, sino que su vía de infección suele ser la colonización de catéteres y sondas de los enfermos²⁸. Con estos datos, no parece que tenga sentido el desarrollo de modelos de colonización gastrointestinal con estas especies de levaduras, y parece más razonable plantear el desarrollo de un modelo de los denominados *ex vivo*.

La necesidad de obtener una colonización sostenida, y tras ello causar una profunda inmunodepresión, hacen que la duración de los experimentos sea prolongada (6-8 semanas). De esta forma, las levaduras que diseminan desde el tracto gastrointestinal, alcanzan diferentes vísceras, se producen abscesos y numerosas levaduras se disponen en fase micelial. Con lo anterior

se intenta reproducir lo que ocurre en los enfermos inmunodeprimidos, pero tiene como consecuencia cierta inexactitud a la hora de valorar la diseminación. En la evaluación de la infección sistémica suele utilizarse el cultivo de las vísceras afectadas, expresándose los datos en UFC/g tejidos. Sin embargo, los cultivos sólo reflejan la presencia de levaduras en los tejidos, sin tener en cuenta si están en fase micelial o celular. La fase micelial de las levaduras se ha relacionado con su virulencia, ya que colabora en la invasión tisular y en la resistencia a los mecanismos de defensa del huésped^{4,29}. Todo lo anterior tiene una trascendencia especial cuando este modelo se utiliza en la valoración de la profilaxis o en el tratamiento de la infección. La reducción en el número de UFC/g de tejido se interpreta como que la profilaxis o el tratamiento antifúngico analizado en el modelo tiene utilidad. Sin embargo, no suele tenerse en cuenta si en los tejidos siguen existiendo lesiones con levaduras en fase micelial. La reducción en el número de UFC puede ser un magnífico índice de eficacia en algunos casos, pero en otros pueden existir lesiones con organismos miceliales, cuyo cultivo rinde un escaso número de UFC, pero que está causando una infección grave que no responde al tratamiento. Actualmente no existe una solución satisfactoria para este problema, aunque algunos especialistas proponen la utilización de técnicas que intenten determinar antígenos de la fase micelial³⁰, métodos de biología molecular (PCR)^{31,32}, tinciones histológicas o estudios de imagen para seguir la evolución de las lesiones viscerales²⁹.

3. Aplicaciones del modelo

En la tabla II se resumen las aplicaciones y avances que ha supuesto el modelo de colonización gastrointestinal y posterior diseminación, en el conocimiento de la candidiasis sistémica.

Estos modelos ofrecen la posibilidad de explorar la fisiopatología de la infección. *C. albicans* coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos durante los primeros años de vida. Además, se ha aislado en alimentos, en objetos personales y en el medio hospitalario, por lo que son frecuentes las recolonizaciones. Las candidiasis sistémicas aparecen en enfermos con inmunodepresión y con factores que favorecen la diseminación. Entre estos últimos destacan tratamientos antibióticos que dañan la flora bacteriana gastrointestinal y las alteraciones de la mucosa digestiva. En definitiva, se produce un sobrecrecimiento de levaduras en la mucosa, se facilita su diseminación y la respuesta inmunitaria que podría controlar la infección se encuentra alterada^{4,7,29}.

En estos modelos, se han estudiado los factores que pueden influir en la secuencia de la infección. Se conoce que existen factores de virulencia de las levaduras como adhesinas (mannanos)³⁰, proteinasas y aspartil proteasas²⁹, la presencia de propiedades hidrofóbicas o la tendencia a entrar en fase micelial que favorecen la adhesión e invasión de la mucosa gastrointestinal²⁰. En los modelos pueden incluirse cepas que tengan alterados alguno de los factores y propiedades anteriores, y de esa forma se puede analizar su capacidad de producir una infección diseminada^{33,34}. También se ha comprobado cómo las alteraciones de la flora bacteriana tanto aerobia como anaerobia, y la lesión que pueden causar los fármacos citostáticos sobre la mucosa ayudan a la colonización y diseminación^{16,17,21-23}. Así mismo, se han analizado los distintos factores que intervienen en la respuesta inmunitaria para controlar la infección. Actualmente no se conoce con exactitud esta respuesta, pero se acepta que está constituida por un complejo mecanismo de interacciones humorales y celulares, en el que los linfocitos T desempeñan un papel primordial²⁹. Existen modelos que utilizan ratones inmunodeprimidos mediante manipulación genética (*knock-out*, transgénicos, etc.), en los que se están analizando qué componentes de la inmunidad son los principales en el control de la candidiasis sistémica endógena^{7,18}.

Sin embargo, estos modelos han sido utilizados con más profusión en los estudios que analizan la profilaxis y los tratamientos antifúngicos. Se han desarrollado distintos modelos para eva-

luar la eficacia de antifúngicos mediante análisis de supervivencia, medición de concentraciones farmacológicas o descenso de UFC en los tejidos^{7,9,33}. Aunque en muchos de ellos se ha empleado la infección parenteral, es el modelo de colonización gastrointestinal, inmunosupresión y diseminación el que ofrece la posibilidad de examinar los diferentes parámetros que influyen en el desarrollo de la infección, y posteriormente, en la respuesta al tratamiento y en el control de la misma. En ellos se debe pautar el tratamiento antifúngico o la profilaxis intentando reproducir la situación de los enfermos inmunodeprimidos. Por ejemplo, un modelo profiláctico debería diseñarse con una pauta de antifúngicos que cubriera todo el período de tiempo en el que los animales se encuentran inmunodeprimidos.

Se han desarrollado diferentes estudios en los que se evalúan diferentes pautas profilácticas o terapéuticas^{10,14,34-36}. También se pueden realizar valoraciones de nuevas moléculas (polienos lipídicos, equinocandinas, sordarinas, nuevos azoles, etc.)^{4,37}. En la actualidad, este modelo es uno de los mejores métodos de los que se dispone para realizar estudios de correlación *in vitro-in vivo*. Así, se han llevado a cabo estudios inoculando aislamientos con resistencia *in vitro* al flucanazol o a la anfotericina B³⁵. También se han analizado aislamientos secuenciales de enfermos en tratamiento antifúngico prolongado (infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH] con candidosis orofaríngea), que han ido desarrollando resistencia *in vitro* al antifúngico. Con estos aislamientos se ha valorado si existe una alteración en la virulencia de las cepas y su respuesta al tratamiento con antifúngicos ante los que presentaban resistencia *in vitro*³⁶. También pueden diseñarse modelos en los que se trate a los ratones con dos moléculas antifúngicas, valorando el sinergismo de las mismas.

Modelo de aspergilosis invasora

En los últimos años se han desarrollado modelos animales que pretenden analizar la secuencia de infección de la aspergilosis invasora. Anteriormente, únicamente existían modelos experimentales de aspergilosis que se utilizaban para muestreos de antifúngicos, y modelos monoparamétricos que medían concentraciones de fármacos en fluidos orgánicos o descensos en las UFC tisulares tras el tratamiento antifúngico^{8,9}. En ellos se inoculaban los animales, generalmente ratones (inmunodeprimidos o no), con una dosis letal del hongo, para en una segunda fase analizar la virulencia de las cepas o la invasión tisular.

Sin embargo, estos modelos aportan una información limitada, por lo que se han desarrollado modelos discriminatorios que examinan diferentes parámetros que influyen en la infección³⁸⁻⁴⁰. Estos modelos intentan reproducir una aspergilosis invasora. Su diseño ha sido posible gracias a un mayor conocimiento epidemiológico de la aspergilosis³⁸. *A. fumigatus* coloniza el tracto respiratorio superior del ser humano mediante la inhalación de esporas del hongo. Es un organismo ubicuo, que se encuentra en cualquier medio. La secuencia de infección es muy variable, pero brevemente puede afirmarse que se desarrolla en enfermos colonizados que reciben un tratamiento inmunodepresor, y en pacientes inmunodeprimidos que se colonizan en el medio hospitalario⁵. Se han descrito varios modelos que intentan reproducir la secuencia mencionada. A continuación se describe, en líneas generales, la metodología que debe emplearse para desarrollar un modelo discriminatorio de aspergilosis invasora.

1. Descripción del modelo

Animales de experimentación. Pueden emplearse varios tipos de animales. Se han publicado modelos con ratones, ratas, cobayas, conejos, pavos, vacas, monos, pollos y patos. La mayoría de los modelos publicados utilizan ratones Swiss, aunque no existe acuerdo sobre su edad y género. Algunos autores señalan que la utilización de conejos o ratas facilita la inoculación por su mayor tamaño. Se deben utilizar animales libres de patógenos específicos. También existe la posibilidad de desarrollar el modelo en animales inmunodeprimidos mediante manipulación genética (ratones atímicos, ratones C5-deficientes, C57BL/6, BALB/c, CD2F1, etc.)^{8,38}.

Inoculación de los animales. Para reproducir la vía de infección más habitual de la aspergilosis invasora los animales tienen que ser inoculados por el tracto respiratorio. El método más empleado es la inoculación intranasal, aunque se han descrito otras vías de infección. En la inoculación intranasal, los animales deben anestesiarse previamente mediante la inhalación de éter dietílico. Tras esto, se les aplican 25-50 μ l de una suspensión de suero salino con un 0,01 % de Tween 80 que contiene esporas de *A. fumigatus*. La cantidad de esporas con que cada animal es inoculado varía según las publicaciones (5×10^2 - 5×10^4), aunque los mayores porcentajes de infección e invasión se consiguen con los inóculos más elevados^{39,40}.

El tamaño de los animales parece que influye directamente sobre la cantidad de inóculo necesario; así, la inoculación intranasal suele utilizarse en modelos desarrollados en ratones³⁸. Su principal limitación es la falta de exactitud a la hora de evaluar qué cantidad de esporas alcanzan los pulmones de los animales. Por ello, se han desarrollado otros métodos, como la inoculación intralaringea y la punción transtraqueal. Son sistemas algo más cruentos que el intranasal, por lo que el porcentaje de mortalidad postinoculación es más elevado. Con estos dos últimos métodos la cantidad de inóculo es menor y, para facilitar la técnica, suelen emplearse animales de mayor tamaño que el de los ratones, siendo los conejos y las ratas los más utilizados.

Inmunodepresión. Los regímenes de inmunosupresión que se describen en estos modelos son también muy variados, y no existe una pauta estandarizada. La vía de administración puede ser la intraperitoneal o la intravenosa. En general, los animales empiezan a inmunodeprimirse con citostáticos 3 días antes de la inoculación, y a algunos modelos se les añaden corticoides. Las dosis de inmunosupresores son variables. A modo de indicación cabe citar que en el caso de la ciclofosfamida se emplean dosis de 150-200 mg/kg de peso, con metilprednisolona de 65-130 mg/kg de peso y con acetato de hidrocortisona de 112,5-200 mg/kg de peso. Otra posibilidad es la de inmunodeprimir a los animales sólo con corticoides intentando reproducir la secuencia de la aspergilosis de los enfermos que reciben corticoterapia prolongada⁴⁰.

En la tabla III se resume el régimen de inmunosupresión del modelo de aspergilosis invasora con el que se trabaja en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Evaluación de la invasión tisular. La valoración de la invasión tisular puede realizarse mediante el recuento de UFC en tejidos, los exámenes histológicos o la determinación de la antigenemia de *A. fumigatus*³⁸. Con esto último se intenta relacionar la extensión de la enfermedad con diferencias en las concentraciones plasmáticas de antígenos fúngicos.

En los animales de experimentación, la aspergilosis invasora produce inmovilidad, letargo y disnea⁴⁰. Cuando se observen estos síntomas, los animales deben sacrificarse, salvo que se esté evaluando la respuesta a un antifúngico, en cuyo caso se sacrificará a los animales en los que el fallo terapéutico sea evidente.

TABLA III
PAUTA DE INMUNOSUPRESIÓN DEL MODELO DE ASPERGILOSIS INVASORA EMPLEADO POR LA UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Día del experimento*	Fármaco inmunodepresor	Dosis	Vía de administración
-3	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
-1	Ciclofosfamida + metilprednisolona	150 mg/kg	Intraperitoneal
		75 mg/kg	Intraperitoneal
3	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
6	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
9	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal

*El día 0 es el día de la inoculación.

Es importante tener en cuenta que los fármacos inmunodepresores pueden producir síntomas como inmovilidad y pérdida de peso. Por ello, se debe incluir en el experimento un grupo control sin inocular, pero al que se le aplican estos fármacos.

Una vez diseccionados los animales en condiciones asépticas se extraen los órganos que se desea analizar. Los pulmones y el cerebro son los órganos que deben examinarse indefectiblemente, aunque también pueden incluirse en el análisis los riñones, el hígado, el corazón y el bazo.

El recuento de UFC/g en los tejidos se realiza mediante cultivos cuantitativos de muestras tisulares. Este método es el que más difusión ha tenido en los modelos de aspergilosis. Pero como se ha señalado en el apartado anterior de "Modelo de candidiasis diseminada", la invasión tisular por hongos conlleva habitualmente la aparición de hifas, lo que no puede valorarse mediante los cultivos de órganos. Por ello, deben incluirse exámenes histológicos, que aportan una mayor información sobre la verdadera afectación de los órganos. En éstos, puede incluirse la determinación de antígenos en los tejidos supuestamente afectados^{38,41}. Se conocen más de 100 antígenos de *A. fumigatus*, pero recientemente se ha demostrado que las concentraciones de quitina se relacionan directamente con la masa fúngica que invade los tejidos³⁹. Determinaciones serológicas de este antígeno, o técnicas inmunohistoquímicas, pueden convertirse en los métodos más adecuados para valorar la infección y la respuesta a un tratamiento dado⁴¹. También se han propuesto métodos de detección de ADN en los tejidos y en el suero³⁸. Su sensibilidad es muy elevada, pero con bajos valores predictivos. Es posible que si se desarrollan técnicas cuantitativas, la detección del ADN tenga un gran futuro.

No obstante, los métodos de análisis de la antigenemia de *A. fumigatus* que más se han de-

sarrollado son los que detectan hidratos de carbono del hongo, principalmente galactomananos⁴¹. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de desarrollar estudios en los que se valora la extensión de la infección. Se emplean técnicas de ELISA que determinan las concentraciones de antígeno circulante, y pueden correlacionarse con la invasión tisular y la respuesta al tratamiento³⁸.

2. Ventajas y limitaciones del modelo

Los modelos que utilizan la inoculación intravenosa y valoran la supervivencia de los animales o las UFC/g de tejido aportan datos sobre la respuesta al tratamiento o a la profilaxis, pero deben tomarse con prudencia, ya que no reproducen la secuencia de infección en humanos⁹. Los modelos que intentan reproducir la aspergilosis invasora imitando esta secuencia ofrecen la posibilidad de obtener una información de gran valor a la hora de comprender la fisiopatología de esta infección.

La inoculación a través del tracto respiratorio propicia que la invasión tisular se desarrolle de forma similar que en los enfermos inmunodeprimidos. Así, los parámetros que se analicen en el modelo pueden tener una utilidad práctica indudable. Además, es posible valorar los factores de virulencia y la respuesta inmunitaria del organismo, constituyendo un magnífico índice de correlación *in vitro-in vivo*³⁸.

No obstante, los modelos de aspergilosis invasora desarrollados de esta forma presentan algunas limitaciones. Es esencial que sean realizados por personal experimentado, y que el estabulario disponga del material y de las condiciones necesarias para trabajar con ratones libres de patógenos y en los que se va a inducir una inmunodepresión intensa. Por ello, estos modelos no pueden ser mantenidos por muchos laboratorios de micología.

TABLA IV
POSIBLES APLICACIONES DEL MODELO DE ASPERGILOSIS INVASORA

<i>Aplicaciones</i>	<i>Características sobre las que existen datos publicados</i>
Estudio de factores de virulencia	Adhesinas Pigmentos Moléculas tóxicas (gliotoxina, hemolisina) Enzimas Fase micelial
Análisis de la respuesta inmunitaria	Respuesta inmunitaria celular Macrófagos alveolares y respuesta inmunitaria inespecífica Respuesta inmunitaria humoral Posibilidad de estudiar ratones con alteraciones genéticas Moléculas inmunosupresoras del propio hongo
Valoración de moléculas antifúngicas	Estudios farmacocinéticos Modelos profilácticos Modelos terapéuticos Correlación <i>in vitro-in vivo</i> Modelos con nuevas moléculas
Aplicación con otras especies fúngicas	Estudios de sinergismo <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Scedosporium</i> spp., etc.

Otras limitaciones están relacionadas con la complejidad de la cadena de infección de la aspergilosis^{5,41}. Los modelos que inoculan una gran cantidad de esporas del hongo a través del tracto respiratorio ocasionan en los animales una aspergilosis hiperaguda. Sin embargo, la aspergilosis es una enfermedad que se produce por la exposición repetida a pequeños inóculos de esporas, a una infiltración lenta de los tejidos y a una invasión de los mismos cuando existe inmunodepresión. Se han desarrollado modelos que intentan inocular un reducido número de conidias, y que éstas se mantengan durante semanas en los pulmones, con la intención de desarrollar lesiones inflamatorias crónicas. En este sentido existen modelos con ratones transgénicos en los que se consigue desarrollar una aspergilosis inoculando 50 esporas⁴², y un modelo en el que el hongo es inoculado en el interior de pequeñas esferas de agarosa, consiguiéndose que permanezca 6 semanas en los pulmones de los animales, para en una segunda fase inmunodeprimirlos e inducir una aspergilosis invasora⁴³. Otros de los aspectos que influyen en el desarrollo de las aspergilosis invasoras en humanos, y que es difícil explorar con los modelos discriminatorios, son las diferencias de virulencia entre las cepas. Así, con la utilización de inóculos tan elevados es arriesgado diseñar estudios que investiguen si

son cepas de origen endógeno o ambientales las que predominan en las aspergilosis pulmonares invasoras, si existen cepas colonizadoras y cepas patógenas o si pueden existir aspergilosis invasoras producidas por varias cepas³⁸. Estas cuestiones no están aún resueltas en humanos, entre otras razones por la falta de técnicas de tipificación subespecífica totalmente estandarizadas⁴¹, pero parece obvio que los modelos discriminatorios que se han desarrollado hasta el momento no exploran estos acontecimientos.

3. Aplicaciones del modelo

Los modelos de aspergilosis invasora tienen varias aplicaciones. En la tabla IV se resumen las posibles utilidades de este modelo.

La reproducción en animales de la aspergilosis invasora puede emplearse para avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la infección. En primer lugar, tiene aplicaciones en los estudios que intentan descubrir factores de virulencia de este hongo. Se conocen varios factores de virulencia de *A. fumigatus*, algunos de los cuales se han investigado en modelos con cepas mutantes. Entre ellos destacan adhesinas, pigmentos, moléculas tóxicas (gliotoxina, hemolisina, etc.) y enzimas (proteasa alcalina, fosfolipasa, etc.)^{5,38-41}.

También se puede analizar la respuesta inmunitaria del organismo, que se encuentra formada por complejas interacciones entre la respuesta inmunitaria específica y la inespecífica. Las células ciliadas bronquiales, los macrófagos alveolares y los linfocitos T parecen tener un papel predominante en esta respuesta inmunitaria. Existen estudios en los que consiguió inmunizar animales mediante la inoculación de dosis subletales de hongos; no obstante, no se desconoce la importancia de las inmunoglobulinas en la respuesta inmunitaria frente a la aspergilosis, aunque estudios como el anterior apoyan que la inmunoterapia puede ser un acercamiento a considerar en pacientes con alto riesgo de aspergilosis³⁸⁻⁴⁴.

Las alteraciones que producen distintos fármacos inmunosupresores en esta respuesta inmunitaria también son valorables con estos modelos. Así mismo, pueden analizarse moléculas inmunodepresoras de origen fúngico, las cuales parecen inhibir la fagocitosis⁴¹.

Las aplicaciones del modelo de más difusión son las que se refieren a la evaluación de moléculas antifúngicas⁸. Con la adición de un antifúngico en dosis profilácticas o terapéuticas al modelo de aspergilosis invasora puede valorarse si se controla o no la infección. Así, puede analizarse la respuesta al tratamiento de cepas resistentes *in vitro*, constituyendo un buen índice de correlación entre el laboratorio y la práctica clínica^{45,46}. También pueden valorarse nuevas moléculas antifúngicas. Entre éstas destacan las presentaciones lipídicas de anfotericina B, nuevos azoles como el voriconazol y el Sch 565-92, o las equinocandinas⁴⁷⁻⁵⁰. Pueden incluirse también estudios de sinergismo. Así mismo, la inmunoterapia y la adición al tratamiento de factores estimulantes de colonias han sido analizadas en algunos modelos, denotando que pueden ser de utilidad en el futuro³⁸.

Por último, el modelo puede emplearse con otras especies fúngicas que pueden tener una secuencia de infección parecida, como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y, obviamente, otras especies de *Aspergillus*⁵¹.

Otros modelos de infección fúngica

1. Modelos de vaginitis por *Candida*

Los primeros modelos de vaginitis por *C. albicans* datan de 1960. Fue uno de los escasos modelos animales de infección fúngica que se desarrollaron antes de los años ochenta. Existen muchos trabajos publicados con modelos de va-

ginitis por levaduras, pero puede considerarse que existen dos estandarizados, uno con ratones hembra y otro con ratas. En ambos se inocula la levadura con hispos⁵².

En estos modelos se ha comprobado la influencia de numerosos factores sobre la incidencia de la vaginitis. Así, las alteraciones del ciclo estrogénico, el uso de antibióticos de amplio espectro, la corticoterapia, los déficit de hierro o la diabetes se han relacionado con la vaginitis por *Candida*. También se ha analizado el uso de antifúngicos tópicos y sistémicos, y de antisépticos locales, por lo que han tenido un papel destacado en el proceso de estandarización del tratamiento de esta infección. Se han desarrollado, a su vez, modelos con otras especies de levaduras distintas de *C. albicans*, con los que se ha observado que sólo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* son capaces de producir infecciones vaginales. Actualmente, estos modelos se siguen empleando por su sencillez y accesibilidad, y se utilizan fundamentalmente para la valoración de nuevas moléculas antifúngicas y de factores de virulencia de *Candida* spp.⁵²⁻⁵⁴.

2. Modelos *ex vivo*

Estos modelos se emplean para estudiar la adherencia de los agentes infecciosos a determinados cuerpos extraños, y para determinar la difusión del antifúngico al lugar de la infección. La estrategia más frecuente es instalar un dispositivo en el tejido subcutáneo, por lo que se emplean animales grandes (conejos Nueva Zelanda, perros o cerdos). El dispositivo puede ser un catéter al que se le aplica el inóculo, o un cuerpo extraño hueco en cuyo interior hay líquido que puede incluir un agente infeccioso^{9,55}.

Las aplicaciones de estos modelos se encaminan a estudios de adherencia de levaduras y hongos miceliales que colonizan dispositivos vasculares, causando posteriormente una infección diseminada (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Dipodascus capitatus*, etc.). También tienen utilidad en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos que analicen la difusión del antifúngico hasta dispositivos huecos de fibrina y otros materiales porosos, y la actividad fungicida del mismo.

3. Modelos de criptococosis

Hasta la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), la criptococosis era una infección poco frecuente, que se había implicado en la etiología de micosis pulmonares crónicas, tanto en enfermos inmunocompetentes como en

inmunodeprimidos. Así mismo, la criptococosis diseminada con meningitis se había descrito en enfermos con graves alteraciones del sistema inmunitario. A finales de los años sesenta se publicaron los primeros modelos de criptococosis⁵⁶.

Desde la aparición del sida la situación ha cambiado notablemente, lo que ha influido sobre el desarrollo de los modelos de criptococosis. Así, se han diseñado varios modelos, mayoritariamente en ratones o en ratas, que intentan analizar la secuencia de infección en los enfermos inmunodeprimidos. La vía de inoculación puede ser la intranasal, la parenteral o la punción pericraneal. Se han descrito modelos tanto con animales inmunodeprimidos como sanos. Estos modelos se han empleado en estudios que valoraban factores de virulencia, como grosor de la cápsula, morfología de la colonia, pigmentación, proteasas y susceptibilidad a los antifúngicos. También han servido para apoyar la búsqueda de tratamientos útiles, como el que hoy día se considera de elección, la anfotericina B más 5-fluorocitosina. Así mismo, tienen utilidad en el análisis de nuevas moléculas antifúngicas^{57,58}.

4. Modelos de neumocistosis

En 1966 se realizaron los primeros experimentos con animales y *Pneumocystis carinii*⁵⁹. No obstante, su baja prevalencia en aquellos años y la necesidad de trabajar con cultivos celulares hicieron que los modelos con este microorganismo apenas se desarrollasen. Pero con el aumento en su prevalencia que ocasionó la aparición del sida, empezaron a desarrollarse modelos de neumocistosis, además de otras líneas de investigación que demostraron que este agente era un hongo⁶⁰.

Los modelos actuales inoculan el hongo por vía intranasal o transtraqueal. Con la primera, algunos autores destacan la necesidad de un inóculo alto y de una inmunodepresión intensa para que aparezca la infección. Los modelos se han desarrollado con ratones, ratas, conejos y hurones. Los animales son tratados con corticoides, administrando la primera dosis unos días antes de la inoculación. También se han empleado ratones atímicos y con otras inmunodepresiones. Recientemente se ha publicado que los conejos son muy susceptibles a la neumocistosis, y que no necesitan inmunodepresión para desarrollar la infección⁶¹.

Existen modelos que se diseñan con la intención de analizar la progresión de la enfermedad en respuesta al tratamiento, sin necesidad de sacrificar a los animales. Plantean la toma de muestras respiratorias, y su examen, lo que resulta

muy difícil en animales de pequeño tamaño. Por ello, se han desarrollado modelos de esta infección en caballos, cerdos y primates que han demostrado ser muy susceptibles a la neumocistosis⁶².

No obstante, la mayoría de los modelos que analizan factores de virulencia, respuesta al tratamiento o profilaxis están diseñados con ratones atímicos o con ratas sanas tratadas con corticoides, modelos con los que se obtienen buenos resultados a la hora de reproducir la infección⁶¹⁻⁶².

BIBLIOGRAFÍA

1. Drouhet E. Historical introduction: evolution of knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4. Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9ª ed.). Londres: Arnold, 1988; 3-42.
2. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995; 20: 1.526-1.530.
3. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis 1996; 22 (Supl 2): 112-118.
4. Edwards JE, Jr. *Candida* species. En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases (4ª ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 2.289-2.306.
5. Bennett JE. 1995. *Aspergillus* species. En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases (4ª ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 2.306-2.311.
6. Zak O, Sande MA. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy, Vol. 1. Londres: Academic Press, 1986; 1-6.
7. Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. Clin Infect Dis 1996; 22 (Supl 2): 73-88.
8. Andriole VT, Minitzer P, George D, Kordick D, Patterson TF. Animal models: usefulness for studies of fungal pathogenesis and drug efficacy in aspergillosis. Clin Infect Dis 1992; 14 (Supl 1): 134-138.
9. Zak O, O'Reilly T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1.527-1.531.
10. Flattery AM, Abruzzo GK, Gill CJ, Smith JG, Bartalzy K. New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD4+ T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1.604-1.609.
11. Herrera C, Guentzel MN. Mice with persistent gastrointestinal *Candida albicans* as a model for antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 1982; 21: 51-53.

12. Lacasse M, Fortier C, Chakir J, Cote L, Deslauriers N. Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse: a model of the carrier state in humans. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 313-318.
13. Pope LM, Cole GT, Guentzel MN, Berry LJ. Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. *Infect Immun* 1979; 25: 702-707.
14. Turner JR, Butler TF, Johnson ME, George RS. Colonization of the intestinal tract of conventional mice with *Candida albicans* and treatment with antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 787-792.
15. Walsh TJ, Pizzo PA. Experimental gastrointestinal and disseminated candidiasis in immunocompromised animals. *Eur J Clin Epidemiol* 1992; 8: 477-483.
16. Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* 1985; 49: 654-663.
17. Ekenna O, Sherertz RJ. Factors affecting colonization and dissemination of *Candida albicans* from the tracto-intestinal tract of mice. *Infect Immun* 1987; 55: 1.558-1.563.
18. Narayanan R, Joyce WA, Greenfield RA. Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* 1991; 59: 2.116-2.119.
19. Samonis G, Anaissie EJ, Rosenbaum B, Bodey GP. A model of sustained gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in healthy adult mice. *Infect Immun* 1990; 58: 1.514-1.517.
20. Vargas SL, Patrick CC, Ayers GD, Hughes WT. Modulating effect of dietary carbohydrate supplementation on *Candida albicans* colonization and invasion in a neutropenic mouse model. *Infect Immun* 1993; 61: 619-626.
21. Helstrom PB, Balish E. Effect of oral tetracycline, the microbial flora and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun* 1979; 23: 764-774.
22. Samonis G, Anastassiadou H, Dassiou M, Tselentis Y, Bodey GP. Effects of broad-spectrum antibiotics on colonization of gastrointestinal tracts of mice by *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 602-603.
23. Greenfield RA, Joyce WA. Gastric colonization with *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1993; 122: 1-5.
24. Guentzel MN, Herrera C. Effects of compromising agents on candidosis in mice with persistent infection initiated in infancy. *Infect Immun* 1982; 35: 222-228.
25. Wells CL, Maddaus MA, Simmons R. Proposed mechanism for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 958-979.
26. De Repentigny L, Phaneuf M, Mathieu LG. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infect Immun* 1992; 60: 4.907-4.914.
27. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Burns WH. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infect Immun* 1980; 29: 808-813.
28. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1.886-1.889.
29. Segal E, Elad D. *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4. Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9^ª ed.). Londres: Arnold, 1998; 423-460.
30. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T et al. Enolase antigen, mannan antigen Cand-tec antigen, and B-glucano in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1.918-1.921.
31. Van Deventer AJM, Goessens WHF, Van Belkum A, Van Etten EWM, Van Vliet HJA, Verbrugh HA. PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of Systemic candidiasis in neutropenic mice. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 25-28.
32. Díaz-Guerra TM, Martínez-Suárez JV, Laguna F, Valencia E, Rodríguez-Tudela JL. Change in fluconazole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida albicans* isolates. *AIDS* 1998; 12: 1.601-1.610.
33. Ashman RB, Fulurija A, Papadimitriou JM. Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. *Infect Immun* 1996; 64: 1866-1869.
34. Ghannoum MA, Spellberg B, Saporito-Irwin SM, Fonzi WA. Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect Immun* 1995; 63: 4.528-4.530.
35. Barchiesi F, Najvar LK, Luther MF, Scalise G, Rinaldi MG, Graybill JR. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1.317-1.320.
36. Beker JM, Henry LK, Jiang W, Koltin Y. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect Immun* 1995; 63: 4.515-4.518.
37. Belanger P, Nast CC, Fratti R, Sanati H, Ghannoum M. Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.840-1.842.
38. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
39. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, Holden DW. The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* 1996; 20: 667-679.

40. Tang CM, Cohen J, Krause T, Van Noordens S, Holden DW. Alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993; 61: 1.650-1.656.
41. Richardson MD. *Aspergillus* y *Penicillium* species. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4, Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9ª ed.). Londres: Arnold, 1998; 281-313.
42. Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T et al. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following a earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infections. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1.433-1.439.
43. Morgenstern DE, Gifford MAC, Li LL, Doerschuck CM, Dinauer M. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 1997; 185: 207-218.
44. Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, Del Sero G et al. Cytokine- and T-helper-dependent immunity in murine aspergillosis. *Res Immunol* 1998; 145: 445-454.
45. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.364-1.368.
46. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM y Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 401-414.
47. George D, Minitier P, Andriole VT. Efficacy of UK-109,496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 86-91.
48. Martin MV, Yates J, Hitchcock CA. Comparison of voriconazole (UK-109,496) and itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 13-16.
49. Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, Bell A, Callender DP, Sein T et al. Antifungal efficacy, safety, and single-dose pharmacokinetics of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2.898-2.905.
50. Verweij PE, Oakley KL, Morrisey J, Morrisey G, Denning DW. Efficacy of LY3033666 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 873-878.
51. Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Barlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 282-288.
52. Polak A. Experimental *Candida* vaginitis (vaginal thrush). En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 2. Londres: Academic Press, 1986; 21-41.
53. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* 1999; 179: 201-208.
54. Fidel PL Jr, Cutright JL, Sobel JD. Efficacy of D0870 treatment of experimental *Candida* vaginitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1455-1459.
55. Zimmerli MP, Waldvogel FA. Models of foreign-body infections. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 1. Londres: Academic Press, 1986; 295-318.
56. Gaybrill JR. Animal models for treatment of cryptococcosis. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 3. Londres: Academic Press, 1986; 131-148.
57. Fries BC, Casadevall A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. *J Infect Dis* 1998; 178: 1.761-1.766.
58. Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR. An alternative animal model for comparison of treatments for cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 413-414.
59. Walzer PD. *Pneumocystis carinii* infection. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 3. Londres: Academic Press, 1986; 185-202.
60. Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 489-498.
61. Cere N, Polack B. Animal pneumocystosis: a model for man. *Vet Res* 1999; 30: 1-26.
62. Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 163-168.

DISCUSIÓN

J. GAVALDA: Si al hablar de los modelos de infección bacteriana ya se habían planteado muchas dudas y habían surgido algunas discusiones, creo que ahora con modelos de infección fúngica la situación es todavía más extrema. Podemos partir, por ejemplo, del modelo de aspergilosis que se parece bastante a lo que sucede en el enfermo sometido a un trasplante, con inmu-

nosupresión con corticoides y una infección invasora con una mortalidad del 100 % en 10 o 15 días. Pero si a la hora de evaluar los resultados en el modelo de infección bacteriana nos basamos en el cultivo cuantitativo, para el tipo de infecciones que discutimos ahora esto no sirve. Ni los estudios histológicos, ni las técnicas de imagen en animal pequeño, ni escáneres de

alta resolución nos permiten solucionar el problema, por la limitaciones que suponen. Probablemente en todos estos estudios creo que el único punto final de evaluación que puede haber es el aumento de supervivencia o la curación final. En segundo lugar, me gustaría añadir que en el tema de la aspergilosis experimental, cuando se habla de diferentes tipos de inmunosupresión, creo que hay que diferenciar entre inmunosupresión por corticoides y neutropenia. Se trata de dos enfermedades diferentes y, por tanto, de dos modelos totalmente diferentes y que, probablemente, todos los estudios que se hacen y se hagan en el futuro tienen que contemplar el trabajar con los dos modelos por separado sin intentar extrapolar los resultados de uno a otro.

M. CUENCA-ESTRELLA: No tiene nada que ver un modelo con otro. Con el modelo de aspergilosis tenemos menos experiencia; hemos realizado experimentos muy preliminares y la inoculación intranasal nos ha funcionado bien, aunque no hemos hecho ninguna valoración histológica ni de otro tipo, porque estamos planteando utilizar un modelo parecido a la aspergilosis pero para otros patógenos fúngicos. Con *Candida* sí tenemos experiencia y creo que no tiene nada que ver en muchos aspectos con los hongos miceliales, y además no son dos infecciones comparables. Como has comentado, los modelos que, con resonancia magnética nuclear, evalúan la fase micelial en los tejidos y constatan cómo va disminuyendo, están fuera del alcance de la mayoría de laboratorios. Por ello, actualmente se está empezando a plantear para el modelo de la aspergilosis la medición de la quitina. Ésta parece ser que está relacionada con la cantidad de hifas que produce una determinada cepa de *Aspergillus*. De hecho, han aparecido algunas publicaciones del laboratorio de *Aspergillus* del Instituto Pasteur, en las que el descenso de quitina sería una constatación de que el animal estudiado está respondiendo al tratamiento.

M. DOMINGO: Por si os puede servir como modelo, la especie aviar y el pollo doméstico, en concreto, ha demostrado ser altamente susceptible a la aspergilosis sin necesidad de inmunodepresión previa. En la incubadora y entre el primer y tercer días de vida adquieren por vía aérea la infección en masa, y desencadenan espectaculares modelos de aspergilosis con entrada por vía sanguínea y visualización histológica de hifas en los vasos, en la circulación, invasión pulmonar masiva, etc.

M. CUENCA-ESTRELLA: Sobre modelos de aspergilosis hay muy poco publicado, nada estandarizado y, fundamentalmente, casi todo el mundo empezó a hacerlo en ratones, probablemente por razones logísticas, mientras que en la actualidad se está ensayando también en ratas y conejos. Aunque no he leído nada sobre este modelo en especie aviar y por esta vía, es un comentario a tener en cuenta.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: Bajo mi punto de vista está claro que necesitamos un modelo de inmunodepresión, puesto que es la patología que tenemos en humanos, lo que limita que se pueda emplear un modelo con aves sin inmunosupresión. El otro problema comentado y tremendamente grave, incluso con *Candida*, es el recuento de UFC, por ejemplo; en el modelo del absceso en muslo de ratón, si bien se observa que el absceso es mucho más grande en el muslo no tratado que en el tratado, después de cultivar ambos muslos se pueden obtener las mismas UFC por g de tejido. Por tanto, no hay manera de interpretar los resultados, a menos que, como hace el grupo de investigación de Glaxo, y lo tiene más o menos a punto, se empleen sofisticadas técnicas de imagen. Pero se encarece de tal manera el modelo que lo hace inviable para la mayoría de grupos de investigación. Con respecto a esos problemas, los modelos de patología que ha estudiado Jean Paul Latge con *Aspergillus* con dos genes interrumpidos, se ha demostrado que no son útiles. Incluso con dos genes interrumpidos *A. fumigatus* mata igual que sin ellos. De ahí se puede deducir lo difícil que va a ser trabajar con este microorganismo y que probablemente, como se ha mencionado anteriormente para la medida de la eficacia terapéutica, la supervivencia, sea la salida más corta o la más fácil.

J. PACHÓN: Has comentado que evaluáis la sintomatología de los animales durante el experimento, aunque creo que alguna de las sintomatologías son difíciles de valorar. ¿El sacrificio se hace en tiempos preestablecidos o en función de dicha sintomatología?

M. CUENCA-ESTRELLA: Cuando el ratón está afectado por candidiasis sistémica es facilísimo identificar su sintomatología típica: el animal ha perdido peso, está prácticamente inmóvil, tiene el pelo erizado y se diferencia claramente de los controles sanos y de los controles inmunodeprimidos, aunque el propio régimen inmunodepresor produce pérdida de peso y algún otro síntoma. Resulta difícil llegar a la sexta dosis de inmunodepresión, que sabemos que provoca un nivel de polimorfonucleares por debajo del

10%. En estas circunstancias y con esta sintomatología todos los ratones son sacrificados, salvo que se vaya a valorar la posible respuesta terapéutica. Muy pocos animales con esta sintomatología no presentan candidiasis diseminada. El resto de animales sin sintomatología después de la sexta dosis de inmunodepresión se mantienen durante 15-20 días hasta el final del experimento, cuando se sacrifican y se analizan todas sus vísceras. Durante esos 15-20 días se mantienen dosis de inmunodepresión con valores de polimorfonucleares inferiores al 10%, con lo que conseguimos un modelo de inmunodepresión crónica con una candidiasis que se convierte en subcrónica y que es bastante difícil de evaluar. Pero hasta este momento estamos contentos porque el 60% de los ratones tienen candidiasis diseminada y en muy pocas ocasiones presentan infecciones bacterianas asociadas.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: La verdad es que sabemos muy poco del modelo. Estamos aprendiendo todavía y tenemos más dudas que respuestas. Creo que debemos trabajar todavía mucho, porque se trata de un modelo muy pesado, y habrá que definir claramente, sobre todo para valorar la eficacia terapéutica, cuáles son las variables finales.

A. PAHISA: Como ya se ha matizado anteriormente, es importante destacar y separar dos grandes grupos de aspergilosis que son muy diferentes entre sí: la del trasplantado o inmunodeprimido y la del paciente neutropénico. A partir de ahí, realmente lo que interesa desde el

área de medicina es obtener conclusiones del tipo de aspergilosis que más nos preocupa en la práctica clínica: es decir, de la aspergilosis en paciente inmunodeprimido, porque sabemos que mata casi a la totalidad de los enfermos. No nos interesa, por tanto, la colonización aspergilar de un amplio grupo de personas sino la aspergilosis de comportamiento hiperagudo y de elevada mortalidad. Por ello somos partidarios del empleo del modelo por instilación transtraqueal que nos permite obtener una aspergilosis realmente masiva, que es la situación real, y es la responsable de la muerte de los pacientes. A partir de ahí, podremos estudiar diferentes posibilidades terapéuticas y alcanzar conclusiones prácticas para las verdaderas aspergilosis que nos preocupan en los hospitales.

M. CUENCA-ESTRELLA: Tengo mis dudas de si realmente la aspergilosis hiperaguda inducida por el inóculo en el ratón se asemeja fisiopatológicamente a lo que ocurre en humanos. Las últimas publicaciones al respecto sugieren otras posibilidades de interpretación. Parece ser que en los pacientes que desarrollan una aspergilosis invasora, anteriormente se podría haber producido una infección crónica que sería la responsable de las lesiones en el tejido pulmonar. Siguiendo esta interpretación, se está intentando desarrollar modelos experimentales en los que se pueda inocular muy poca cantidad de conídeas, incluso 50 conídeas, repetidas veces, hasta conseguir una lesión pulmonar; tras ello, se inmunodeprime al animal para desarrollar la aspergilosis invasora.