

Artículo original

Cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *Fonsecaea pedrosoi* en dos medios de cultivo

Hilda Romero*, Miguelangel Rodríguez, Ana M. Capote

Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido 4 de diciembre de 2019; aceptado 27 de mayo de 2020

Resumen: Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la cinética de crecimiento de seis aislamientos clínicos autóctonos de *Fonsecaea pedrosoi* en RPMI-1640 y caldo Sabouraud dextrosa (CSD) por espectrofotometría. Para cada aislamiento fúngico se utilizó el inóculo estandarizado a 0,024 de DO (540 nm) a temperatura ambiente y se leyó cada 12 o 24 h hasta 132 h. Se calcularon los parámetros tiempo de generación (Tg) y velocidad de crecimiento (k). Las curvas duraron 72 h en RPMI y 120 h en CSD; la fase de latencia se mantuvo 36 y 48 h en RPMI y de 24 a 72 h en CSD; la fase exponencial duró 36 a 60 h en RPMI y 36 a 72 h en CSD. El promedio de los Tg fue de 16,9 y 19,8 h en RPMI y CSD, respectivamente; la k mostró un promedio de 0,043 h⁻¹ en RPMI y 0,037 h⁻¹ en CSD. Estos resultados preliminares demostraron la variabilidad cinética presente entre los distintos aislamientos de *F. pedrosoi* y podrían ser útiles para estudios que permitan desarrollar nuevos procedimientos diagnósticos y evaluar nuevos antifúngicos *in vitro* que deriven en una mejora en el tratamiento de la cromoblastomycosis producida por este hongo.

Palabras clave: *Fonsecaea pedrosoi*; cromoblastomycosis; cinética de crecimiento; espectrofotometría; tiempo de generación; tasa de crecimiento.

Growth kinetics of native *Fonsecaea pedrosoi* isolates in two culture media

Abstract: The objective of this investigation was to evaluate the growth kinetics of six native clinical isolates of *Fonsecaea pedrosoi* in RPMI-1640 and Sabouraud dextrose broth (SDB) by spectrophotometry. For each fungal isolate, the standardized inoculum at 0.024 OD (540 nm) was used at room temperature. Results were read at intervals of 12 and 24 h up to 132 h. The parameters generation time (Tg) and growth rate (k) were calculated. The curves included 72 h in RPMI and 120 h in CSD; the latency phase was maintained at 36 and 48 h in RPMI and 24 to 72 h in CSD; the exponential phase lasted 36 to 60 h in RPMI and 36 to 72 h in CSD. The average of the Tg was 16.9 and 19.8 h in RPMI and CSD, respectively; the k showed an average of 0.043 h⁻¹ in RPMI and 0.037 h⁻¹ in CSD. These preliminary results demonstrated the kinetic variability present between the different *F. pedrosoi* isolates. These results could be useful for studies about the development of new diagnostic procedures and the evaluation *in vitro* of new antifungals that could lead to an improvement in the treatment of chromoblastomycosis caused by this fungus.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*; chromoblastomycosis; growth kinetics; spectrophotometry; generation time; growth rate.

* Correspondencia:
E-mail: hildarom4@hotmail.com

Introducción

El estudio de la cinética de crecimiento fúngico comprende el abordaje de las diferentes etapas de su desarrollo en un sistema cerrado, descritas como fase de latencia, exponencial, estacionaria y fase de muerte. Una de las metodologías para registrar dicho crecimiento es la espectrofotometría, resultando muy eficiente por arrojar lecturas seguras y relativamente rápidas [1].

Los estudios de la cinética de crecimiento fúngico

han permitido la preparación de antígenos para estudios inmunológicos, la extracción de material genético para ensayos de biología molecular, la realización de pruebas de susceptibilidad antifúngica, y la obtención de biomoléculas fúngicas empleadas en biotecnología, entre otros [2-13].

La cromoblastomycosis (CBM) es una micosis subcutánea de distribución universal que produce lesiones crónicas, deformantes e incapacitantes siendo sus agentes causales predominantes los hongos dematiáceos *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii*. Es una micosis asociada con

poblaciones rurales expuestas a vegetación, predominante en agricultores, y en Venezuela su mayor prevalencia se observa en los estados Falcón, Lara y Zulia, donde *F. pedrosoi* es el segundo agente más aislado [14-16].

Los estudios de curvas de desarrollo de los agentes etiológicos de la CBM en Venezuela han hecho posible la descripción morfológica de su ultraestructura durante la fase exponencial de crecimiento, la extracción de antígenos y la evaluación del efecto antiproliferativo de drogas comerciales y de desarrollo independiente. En la mayoría de estas investigaciones se ha trabajado con *C. carrionii*, dando cabida y facilitando la puesta en marcha de investigaciones donde el objeto de estudio sea *F. pedrosoi*, permitiendo así profundizar en el conocimiento de este hongo en el país, debido a su importancia al ser el segundo agente más aislado en Venezuela y por presentar resistencia a alguno de los antifúngicos para el tratamiento de esta enfermedad [3,10,17-19].

Los datos obtenidos de esta investigación podrían ser útiles como base para futuros estudios que permitan desarrollar nuevos procedimientos diagnósticos y evaluar nuevos antifúngicos *in vitro* que puedan derivar en una mejora en el tratamiento de la CBM producida por *F. pedrosoi*.

Los argumentos antes expuestos fueron tomados en consideración para realizar la cinética de crecimiento de seis aislamientos de *F. pedrosoi* provenientes de pacientes que habitan en la zona endémica de la enfermedad en Venezuela, usando un medio químicamente definido (RPMI-1640) y caldo Sabouraud dextrosa (CSD).

Materiales y métodos

Aislamientos fúngicos: Se utilizaron seis aislamientos clínicos autóctonos de *F. pedrosoi*. Estos se conservaron en agar Mycosel® (HiMedia Laboratories) a temperatura ambiente (TA) hasta el momento de su uso y a todos se les verificó su identificación fenotípica, mediante métodos micológicos convencionales (cultivos en agar Sabouraud a 25 y 37 °C) y usando claves taxonómicas [15]. Los datos

disponibles de estos aislamientos se presentan en la tabla 1.

Cinética de crecimiento fúngico:

Adaptación de los aislamientos a los medios de cultivo y preparación de los inóculos: Se usó la metodología reportada previamente [3], con algunas modificaciones. Los medios utilizados fueron caldo Sabouraud dextrosa (CSD) con 2% de glucosa y 1% de peptona y RPMI-1640® con 2% de glucosa, sin bicarbonato. Cada aislamiento fue sub-cultivado en agar Mycosel® (HiMedia Laboratories) e incubado a TA durante siete días. Luego, se inoculó un trozo de la colonia fúngica en un frasco con 30 mL de CSD y se incubó a TA en agitación mecánica constante (80 rpm) durante tres días. Al tercer día se transfirió 5 mL del subcultivo a un frasco con 30 mL de medio CSD y se incubó durante cinco días bajo las mismas condiciones. En el caso del RMPI-1640, se siguió el mismo procedimiento, adicionando un subcultivo con la finalidad de asegurar una mejor adaptación del hongo al medio de cultivo. Luego, el cultivo fúngico se homogeneizó (homogeneizador IKA-WERK®) y diluyó lo suficiente con el medio correspondiente para obtener una DO de 0,024 a 540 nm.

Curvas de crecimiento: El inóculo fúngico (10 mL) se distribuyó en 20 fiolas y se incubó a TA a 80 rpm hasta el momento de su lectura, las cuales se realizaron a las 24, 36, 48, 72, 84, 96, 108, 120 y 132 h, según lo reportado previamente [3,17,20]. Tras obtener los valores de las lecturas, se elaboraron los gráficos (T vs DO) usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA).

Pruebas de pureza: Antes de homogeneizar el contenido de cada fiola, una porción del inóculo se sembró en agar Sabouraud dextrosa (ASD) y se incubó a TA hasta 15 días después de realizada cada curva de crecimiento. Todos los experimentos, incluyendo las pruebas de pureza, se realizaron por duplicado.

Parámetros de la cinética de crecimiento fúngico:

Tiempo de generación (Tg): Se define como el tiempo que

Tabla 1. Aislamientos de *F. pedrosoi*.

Aislamiento	Edad (años)	Sexo	Procedencia	Ubicación de la lesión	Evolución (años)	Tratamiento
Fp - 1	ND	ND	DMINH N° 412000-83	ND	ND	ND
Fp - 2	43	Masculino	Bolívar	MID	ND	Itraconazol
Fp - 3	43	Masculino	Carabobo	ND	ND	ND
Fp - 4	61	Masculino	Guárico	MS	ND	ND
Fp - 5	ND	ND	DMINH N° 412000-126	ND	ND	ND
Fp - 6	57	Femenino	Caracas	ND	28	ND

ND: datos no disponibles. MSI: miembro superior izquierdo. MS: miembro superior. MID: miembro inferior derecho. DMINH: Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

transcurre para que una población microbiana se duplique durante su fase exponencial de crecimiento, y está dada por la ecuación de la recta cuya expresión es: $T_g = \ln 2/m$, donde: \ln = logaritmo neperiano; m = pendiente [1,20].

Constante de velocidad de crecimiento (k): Es una medida del número de generaciones que ocurre por unidad de tiempo (una hora) en un cultivo con crecimiento exponencial y se expresa con la ecuación: $k = \ln 2/T_g$ [1,20].

Análisis estadístico: Los resultados se presentaron en valores absolutos, porcentajes, promedios, tablas y gráficos.

Resultados

Verificación de las características fenotípicas de los aislamientos fúngicos: Mediante los estudios micológicos realizados se constató que los aislamientos estudiados correspondían fenotípicamente a *F. pedrosoi*.

Cinética de crecimiento de los aislamientos de *F. pedrosoi*: En RPMI, las curvas de crecimiento tuvieron una duración de 72 a 108 h hasta la fase estacionaria. La fase de latencia se apreció durante las primeras 36 h de cultivo, la exponencial persistió entre 36 a 60 h y la fase estacionaria comenzó entre las 72 y 108 h (Figuras 1 y 2 y tabla 2).

En CSD, la cinética de crecimiento se extendió entre 84 y 120 h hasta la fase estacionaria. La fase de latencia se

observó durante las primeras 24 h, la exponencial duró entre 36 a 72 h y la fase estacionaria comenzó entre las 84 y 120 h (Figuras 1 y 2 y tabla 2).

Parámetros de la cinética de crecimiento fúngico: T_g : En RPMI el T_g fue de 12,6 a 23,1 h (\bar{x} =16,9 h) y en CSD de 15,1 a 28,9 h (\bar{x} =19,8 h) (Tabla 2).

k : Este parámetro fluctuó entre 0,030 a 0,055 h⁻¹ (\bar{x} =0,043 h⁻¹) en RPMI y en CSD fue de 0,024 a 0,046 h⁻¹ (\bar{x} =0,037 h⁻¹) como se observa en la tabla 2.

Discusión

Debido al escaso conocimiento de la cinética de crecimiento de *F. pedrosoi* en Venezuela y la importancia que ello reviste, se consideró necesario realizar las curvas de crecimiento de seis aislamientos clínicos autóctonos de este hongo con la finalidad de aportar información para futuros trabajos en áreas como inmunología, morfología, sensibilidad antifúngica, entre otras.

Se usó el método espectrofotométrico ya que ha demostrado ser reproducible, útil y seguro y ha sido utilizado por otros autores para *F. pedrosoi* [19] y *C. carrionii* [3,17,21]. La temperatura seleccionada fue la del laboratorio, la cual oscila entre 24 y 30 °C, siendo ésta la del hábitat natural de *F. pedrosoi* [14], coincidiendo con otros estudios para el mismo hongo [19,22] y difiriendo con las

Tabla 2. Parámetros de la cinética de crecimiento de los aislamientos de *F. pedrosoi*.

Aislamiento	Duración de fase log (h)		Duración de fase log (h)		Inicio de fase estacionaria (h)		T_g (h)		k ((h ⁻¹))	
	RPMI	CSD	RPMI	CSD	RPMI	CSD	RPMI	CSD	RPMI	CSD
Fp-1	48	48	48	72	96	120	17,3	28,9	0,040	0,024
Fp-2	48	72	36	48	84	120	14,4	17,8	0,048	0,039
Fp-3	36	48	36	36	72	84	12,6	15,1	0,055	0,046
Fp-4	48	72	60	36	108	108	23,1	16,1	0,030	0,043
Fp-5	36	24	48	60	84	84	16,9	21,0	0,041	0,033
Fp-6	48	48	36	36	108	108	14,7	16,9	0,047	0,041

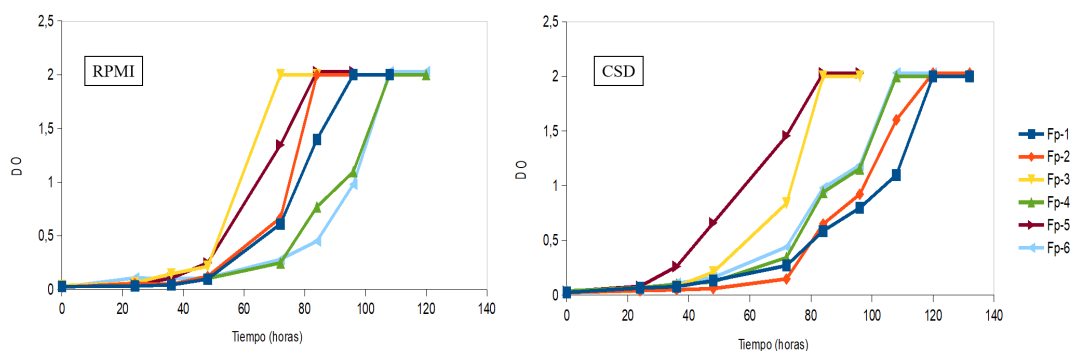


Figura 1. Curvas de crecimiento de los aislamientos de *F. pedrosoi* en RPMI y CSD.

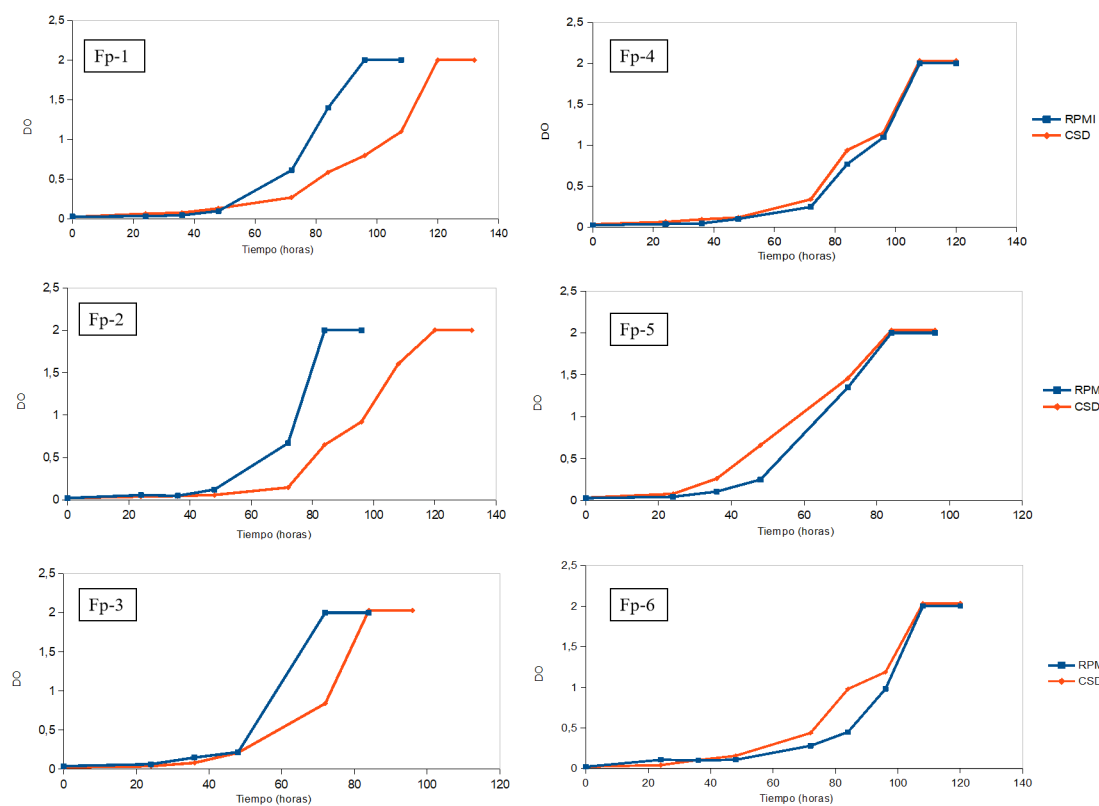


Figura 2. Curvas de crecimiento de cada aislamiento de *F. pedrosoi* en RPMI y CSD.

condiciones escogidas (37 °C) en un trabajo anterior [23].

Se seleccionaron dos medios de cultivo, CSD y RPMI; el primero debido a que es el medio de cultivo universal en micología y además se ha empleado en la ejecución de curvas de crecimiento fúngico [2,3,5,6,17,22] y el segundo por ser un medio enriquecido, químicamente definido que se ha usado para realizar curvas de crecimiento de otros hongos [5,6,8,18] y para estandarización de métodos [12,20].

En cuanto a las curvas de crecimiento se observó que estas se extendieron, en promedio, por 92 y 104 h en RPMI y en CSD, respectivamente. La fase de latencia mostró una duración similar en ambos medios para todos los aislamientos, hallazgos que coinciden con un trabajo anterior para *C. carrionii* [17,20]. La duración de la fase *log* en ambos medios fue semejante en cuatro aislamientos, concordando con un estudio precedente, realizado con *F. pedrosoi* en MBL [19] mientras que fue más larga en los aislamientos N° 1 (Fp-1) en CSD y en el N° 4 (Fp-4) en RPMI, lo cual sugiere que estos aislamientos podrían tratarse de otra especie del género *Fonsecaea*; se han reportado nuevas especies que comparten características fenotípicas con *F. pedrosoi* [24-26] y el presente estudio se limitó estrictamente a la implementación de los métodos micológicos convencionales para su identificación fenotípica.

En referencia al Tg, éste fue similar en ambos medios de cultivo en cuatro de los seis aislamientos, con excepción del Fp-4 en RPMI y del Fp-1 en CSD, donde el Tg fue

mayor, correspondiéndose con su fase exponencial en el mismo medio, lo que podría deberse a las características de crecimiento intrínsecas del hongo.

En lo que se refiere a la *k*, los valores obtenidos fueron muy semejantes en ambos medios. Existen estudios que sustentan la relación directa entre la tasa de crecimiento y la virulencia de *Aspergillus fumigatus*, por lo que sería conveniente proponer el estudio sobre la correlación entre la tasa de crecimiento de *F. pedrosoi* y su virulencia [12,27].

Los resultados de esta investigación preliminar demostraron que no existen diferencias entre los dos medios de cultivo para los fines mencionados con anterioridad, por lo que se recomienda el uso del CSD por tratarse, en comparación con el RPMI, de un medio más económico cuyos componentes se consiguen actualmente en el país. Asimismo, el uso de estos medios de cultivo mostró la variabilidad que existe en la cinética de crecimiento entre distintos aislamientos de *F. pedrosoi*, por lo que se recomienda realizar curvas de crecimiento de cada aislamiento a estudiar, así como lo apoyan otros autores [24-26].

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud al personal de la Escuela de Bioanálisis-UCV, especialmente al Lcdo. Joel Torres†, a los Sres. Pablo Rojas y Alexander Clavijo de la Cátedra de Micología; a la profesora Nina Polanco y al Sr. Carlos Barcia, de la Cátedra de Microbiología; a la profesora

María Isabel Ramos de la Cátedra de Bioquímica B, a la profesora Rosaria Ruggiero de la Cátedra de Estadística. Asimismo, a las doctoras Mireya Mendoza, Primavera Alvarado y María Mercedes Panizo por haber facilitado algunos aislamientos de *Fonsecaea pedrosoi*.

Referencias

- Brooks G, Butel J, Morse S. Crecimiento, supervivencia y muerte de los microorganismos. En: Microbiología Médica de Jawetz, Melnik y Adelberg. Décima octava edición. México: Editorial El Manual Moderno; 2005. p 51-60.
- Mendoza M, Hung MB, Díaz AM, Zambrano EA, Díaz E, De Albornoz MC. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. J Mycol Med. 2005; 15:127-35. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2005.05.002>.
- Romero H, Guedez E, Magaldi S. Evaluation of immunoprecipitation techniques in chromoblastomycosis. J Mycol Med. 1996; 6:83-7.
- Álvarez S, Blanco J, Alba P, García M. Fungal growth in culture media simulating an extreme environment. Rev Iberoam Micol. 2011; 28:159-65. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.03.005>.
- Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. *In vitro* inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. J Mycol Med. 2004; 14:181-4. Doi: <https://doi.org/JMM-01-2005-14-4-1156-5233-101019-200512060>.
- Torres J, Romero H. Actividad antifúngica *in vitro* del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Iberoam Micol. 2012; 29:24-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.04.001>.
- Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* effect of ajoene on *Microsporium canis*. J Mycol Med. 2000; 10:152-5.
- Vivas J, Romero H, Herrmann G, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Cryptococcus neoformans*. J Mycol Med. 2002; 12:149-51. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/287852543_In_vitro_antiproliferative_effect_of_ajoene_on_Cryptococcus_neoformans. Acceso 3 de noviembre 2019.
- San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño F, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. Antimicrob Agents Chemother. 1989; 33:1641-4. Doi: <https://doi.org/10.1128/aac.33.9.1641>.
- Vitale RG, Pérez-Blanco M, De Hoog GS. *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. Med Mycol. 2009; 47:35-40. Doi: <https://doi.org/10.1080/13693780802566333>.
- Romero H, Viscaya L, Ferrara G. *Bacillus subtilis* inhibits growth of *Cladophialophora carrionii* *in vitro*. J Mycol Med. 2006; 16:92-4. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2006.01.007>.
- Paisley D, Robson GD, Denning DW. Correlation between *in vitro* growth rate and *in vivo* virulence in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2005; 43: 397-401. Doi: <https://doi.org/10.1080/13693780400005866>.
- Romero H, Capote AM, Contreras S, Castro A. Cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *Aspergillus* sección *Fumigati*. VITAE. 2018; 74. Disponible en: https://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_5824.pdf. Acceso 15 de noviembre 2019.
- Bonifaz A. Cromoblastomycosis. En: Micología médica básica. Cuarta edición. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2012. p 231-46.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi The ultimate benchtool for diagnostics. 2015; Versión 4.1.2. Disponible en: <http://atlas.clinicalfungi.org/AtlasOnline//protected/index.xhtml?index.html>. Acceso 3 de noviembre 2019.
- Avelar C, Simões J, Ranyelle B, Brasil M, Moraes G, Cardoso A. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. An Bras Dermatol. 2012; 87:555-60. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000400006>.
- Sánchez-Mirt A, Romero H, Fernández-Zeppenfeldt G. Growth and morphology of *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*. J Mycol Med. 1997; 7:1-4. Disponible en: <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2639149>. Acceso 15 de noviembre 2019.
- San-Blas G, Guanipa O, Moreno B, Pekerar S, San-Blas F. *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resiniae* (*C. Resinae*): cell wall and melanin studies. Curr Microbiol. 1996; 33:11-6. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002849900003>.
- Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Efecto inhibitorio y alteraciones estructurales producidas por ajoeno sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos dematiáceos *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. Rev Iberoam Micol. 1993; 10:74-8.
- Rojas Garcia OC, Vivas Alcalá JJ, Guerrero Onofretti AJ. Estandarización del inóculo de *Cladophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos. Rev Soc Ven Microbiol. 2004; 24:89-94. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100016&lng=es&nrm=iso&lng=es. Acceso 13 de noviembre 2019.
- Romero H, Ferrara G, Pérez-Blanco M, Contreras I. An ELISA test for the serodiagnostics of chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*. J Mycol Med. 1999; 9:210-3.
- Andriantsimahavandi A, Michel P, Rasolofonirina N, Roux J. Apport de l'immunologie au diagnostic de la chromomycose à Madagascar. J Mycol Med. 1993; 3:30-6. Disponible en: <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&i>

- dt=4691029. Acceso 5 de noviembre 2019.
23. Ibrahim-Granet O, De Bièvre C, Jendoubi M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species-specific IgG. J Med Microbiol. 1988; 26:217-22. Doi: <https://doi.org/10.1099/00222615-26-3-217>.
 24. Xi L. Molecular diversity of *Fonsecaea* (*Chaetothyriales*) causing chromoblastomycosis in southern China. Med Mycol. 2009; 47:27-33. Doi: <https://doi.org/10.1080/13693780802468209>.
 25. Rojas OC, León-Cachón RBR, Pérez-Maya AA, Aguirre-Garza M, Moreno-Treviño MG, González GM. Phenotypic and molecular identification of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. Mycoses. 2015; 58:267-72. Doi: <https://doi.org/10.1111/myc.12308>.
 26. Najafzadeh MJ, Gerrits van den Ende AHG, Vicente VA, Dolatabadi S, Sun J, de Hoog GS. Identification of chromoblastomycosis agents by PCR based reverse line blot (PCR RLB) hybridization assay. Microb Pathog. 2018; 125:43-7. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.002>.
 27. Amarsaikhan N, O'Dea EM, Tsoggeri A, Owegi H, Gillenwater J. Isolate-dependent growth, virulence and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. PLoSOne. 2014; 9:e100430. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100430>.