



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Sporothrix schenckii* Y SU
IDENTIDAD GENÉTICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ELDA DEL CARMEN CORTÉS GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS:

MED.CIR. ARTURO RUBÉN LÓPEZ MARTÍNEZ

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

- | | |
|---|--|
| 1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombres
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
No. de cuenta | 1. Datos del alumno
Cortés
González
Elda del Carmen
56589364
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099054711 |
| 2. Datos del tutor
Grado
Nombre
Apellido paterno
Apellido materno | 2. Datos del tutor
Med. Cir.
Arturo Rubén
López
Martínez |
| 3. Datos del sinodal 1.
Grado
Nombre
Apellido paterno
Apellido materno | 3. Datos del sinodal 1
M. en C.
Edith
Sánchez
Paredes |
| 4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre
Apellido paterno
Apellido materno | 4. Datos del sinodal 2
M. en C.
María de los Ángeles Patricia
Manzano
Gayosso |
| 5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombres
Apellido paterno
Apellido materno | 5. Datos del sinodal 3
Biól.
Elva
Bazán
Mora |
| 6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombres
Apellido paterno
Apellido materno | 6. Datos del sinodal 5
Q. F. B
Erika
Córdova
Martínez |
| 7. Datos del trabajo escrito
Título

Número de páginas
Año | 7. Datos del trabajo escrito
Diversidad morfológica de aislamientos clínicos de <i>Sporothrix schenckii</i> y su identidad genética
73 p
2010 |

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme pertenecer a una comunidad de libres pensadores, columna vertebral de nuestro país. Gracias por haberme formado como profesionista y como ser humano.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Con todo mi amor a mis papás, **Elda** y **Víctor** de quienes he recibido amor, comprensión y mucha paciencia.

Con todo mi cariño a mis hermanos **Víctor** y **María Luisa**:

Víctor gracias por haber colaborado en la realización de mis ilustraciones. Por ser un buen hermano y el primer amigo que tuve en la vida. Pero sobre todo por enseñarme a amar y respetar los seres vivos.

María Luisa, mi preciosa y pequeña hermana, gracias por darme los mejores consejos que he recibido en mi vida y por compartir conmigo tu increíble personalidad e inteligencia, eres una gran amiga y la mejor de las hermanas.

Los amo con todo mi corazón hermanos.

Con mucho cariño a mi abuela **Carmelita** por ser una mujer excepcional, que vive con pasión el día a día y por ser un ejemplo de tenacidad.

Agradezco a las instituciones y personas que nos proporcionaron los aislamientos clínicos de *S. schenckii* que se incluyeron en este trabajo:

A la **Dra. Alicia Zavalza** quien nos proporcionó los aislados provenientes de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al **Maestro Alejandro Bonifaz** quien nos proporcionó los aislados provenientes del Servicio de Dermatología del Hospital General de México (SS).

Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Micología Médica del departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAM.

Al **Dr. Rubén López Martínez**, jefe del Laboratorio de Micología Médica, quien dirigió esta tesis y me dio la oportunidad de realizar la investigación para la elaboración de la misma.

Quiero agradecer especialmente a la **Dra. Francisca Hernández Hernández**, Jefa del Laboratorio de Biología Molecular, quien contribuyó en gran medida en la realización de este trabajo y me asesoró durante el mismo; colaborando en la elaboración de mi protocolo de investigación, además de adiestrarme en la realización de técnicas moleculares. Dra. Fran es un gran honor para mí haber trabajado a su lado, pues su calidad humana y científica es invaluable. Agradezco infinitamente el tiempo que dedico a este trabajo, sus enseñanzas y sus comentarios.

A la **Dra. Patricia Manzano**, muchísimas gracias por sus sugerencias y correcciones, así como por su constante estímulo para la culminación de este proyecto. Además agradezco todo lo que aprendí de usted, todas las oportunidades y gratas experiencias que tuve trabajando a su lado. Dra. Paty es usted un gran ejemplo de que el orden y la dedicación son la clave del éxito.

A la **Q.F.B. Erika Córdoba** por sus enseñanzas en el laboratorio, por guiarme pacientemente en la realización de la parte experimental y por sus valiosos aportes en este trabajo. Eres una gran maestra.

A la **Biól. Elva Bazán Mora** por estar pendiente de la realización de este trabajo a nivel experimental y documental. Muchísimas gracias por aclarar mis dudas, por el tiempo que dedicaste a este proyecto y por tu gran amabilidad y buen humor.

A la **M en C. Edith Sanchez** muchas gracias por aceptar el formar parte de mi jurado, por sus comentarios y correcciones a esta tesis.

A la **Dra. Rosio Castañón** por sus enseñanzas y solidaridad..

A la **Dra. Lupita Reyes** por sus enseñanzas y solidaridad.

A la **Biól. Blanca Edith Millán Chiu** muchas gracias por resolver mis dudas y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Muchas gracias también por tu amistad.

A la **Biól. Rosa María** muchísimas gracias porque además de una muy buena amiga eres una excelente maestra. Querida Rose muchas gracias por tu paciencia y por todas tus enseñanzas.

A la **Biól. Laura Verónica** gracias por todos los buenos momentos que pasamos en el laboratorio, por todo lo que me enseñaste y porque eres una magnífica amiga.

A la **Biól. María Antonieta** muchas gracias amiga por tu gran ejemplo de optimismo y perseverancia.

Y por último quiero agradecerte con mucho cariño **Esteban Omar**, por compartir conmigo maravillosas experiencias, por invitarme a aprender junto a ti y por aconsejarme siempre para bien.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 MARCO HISTÓRICO.....	9
1.2 <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i>	10
1.2.1 Clasificación taxonómica	10
1.2.2 Hábitat	11
1.2.3 Morfología macroscópica de la fase micelial	12
1.2.4 Morfología microscópica de la fase micelial	12
1.2.5 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme <i>in vitro</i>	13
1.2.6 Morfología microscópica de la fase levaduriforme <i>in vitro</i>	14
1.2.7 Estudios moleculares para la identificación de <i>S. schenckii</i>	14
1.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS POR EL DOMINIO D1/D2 DEL GEN 28S-LIKE RDNA	15
1.4 ESPOROTRICOSIS.....	17
1.4.1 Epidemiología de la esporotricosis.....	18
1.4.2 Manifestaciones clínicas	19
1.4.3 Diagnóstico de la esporotricosis	20
2. ANTECEDENTES	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 OBJETIVO GENERAL	26
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS	27
6.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	30
6.2.1 Estudio morfológico macroscópico de la fase micelial.....	30
6.2.2 Estudio morfológico microscópico de la fase micelial.....	30
6.2.3 Obtención de la fase levaduriforme.....	31
6.2.1 Estudio morfológico macroscópico de la fase levaduriforme	31
6.2.2 Estudio morfológico microscópico de la fase levaduriforme	31
6.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	31
6.3.1 Extracción y purificación del DNA	31
6.3.2 Cuantificación y visualización del DNA	32
6.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los dominios D1/D2 del gen 28S rDNA	33
6.3.4 Visualización del producto de PCR	34
6.3.5 Purificación del producto de PCR	34
6.3.6 Secuenciación	34
6.3.5 Análisis de las secuencias	34
7. RESULTADOS	35
7.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA FASE MICELIAL	35
7.1.1 Características morfológicas generales de los aislados blancos.....	48

7.1.2 Características morfológicas generales de los aislados pigmentados.....	50
7.2 TRANSFORMACIÓN DE LA FASE MICELIAL A LA FASE LEVADURIFORME	53
7.2.1 Morfología microscópica de la fase levaduriforme	53
7.2.2 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme	54
7.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	55
7.3.1 Extracción de DNA	55
7.3.2 Amplificación del dominio D1/D2 del gen 28S rDNA	56
7.3.3 Purificación de los productos amplificados.....	56
7.3.4 Alineamientos	57
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIONES	65
10. PERSPECTIVAS	65
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
12. APÉNDICES	71

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marco histórico

En Estados Unidos (EUA) en 1898, Benjamin Schenck reportó el primer caso clínico humano de esporotricosis, donde describió múltiples lesiones nodulares, localizadas en la mano y el antebrazo, dispuestas de manera ascendente. El paciente informó que “los nódulos aparecieron después de astillarse las manos al trabajar con madera”. Schenck aisló al hongo causante de esta micosis y envió el cultivo a Erwin Smith, micólogo del Departamento de agricultura de EUA, quien por la morfología lo relacionó con el género *Sporotrichum*. Dos años más tarde en EUA, Hektoen y Perkins reportaron el segundo caso de esporotricosis y después del estudio morfológico que hicieron del hongo, descubrieron que se trataba de un hongo dimórfico al que nombraron *Sporothrix schenckii*, en honor a Schenck ^(3, 14, 41, 42, 44).

En Europa, las primeras descripciones sobre esporotricosis y su agente etiológico iniciaron a principios del siglo XX. Beurman y Ramond, en 1903, reportaron el primer caso clínico, describieron al agente etiológico y observaron características morfológicas distintas a las descritas por Hektoen y Perkins, por lo que en 1905 Beurman y Matruchot renombraron a *Sporothrix schenckii* como *Sporotrichum beurmanni* ⁽¹⁹⁾. En 1908, De Beurmann y Gourgerot, aislaron por primera vez a *S. schenckii* de la naturaleza, y observaron que este aislado era indistinguible del que causaba la esporotricosis; además demostraron que algunos de los aislados de la naturaleza eran virulentos en ratas ^(14,43).

En Brasil, en 1908, Splendore publicó el reconocimiento de una nueva especie de hongo causante de lesiones esporotricoides, al que nombra *Sporotrichum splendore* o *Sporotrichum asteroide*. Splendore observó una estructura parasitaria distinta morfológicamente a las previamente reportadas. Poco tiempo después se publicó que el cuerpo asteroide es una estructura que puede formarse en la fase parasitaria, pero que la fase micelial del hongo sigue correspondiendo a la antes descrita y que por lo tanto no se trata de otra especie ^(31,41).

En 1940, aproximadamente 3000 mineros africanos desarrollaron esporotricosis, después de infectarse con *Sporothrix schenckii* que crecía como saprobio en la madera de los túneles de la mina de oro en la que trabajaban ^(3, 54).

En México, el primer caso de esporotricosis fue diagnosticado y publicado por Gayón en 1914 ⁽³⁸⁾. Las publicaciones que realizaron Lavalle y González-Ochoa entre 1960 y 1970, contribuyeron al conocimiento de la epidemiología de esta micosis en la República Mexicana. Los estados con mayor número de casos fueron: Distrito Federal, Guanajuato, Puebla, Jalisco, Hidalgo, Veracruz y Estado de México. Observaron que era una micosis principalmente ocupacional y que era la micosis subcutánea más frecuente en México. Además lograron aislar a *S. schenckii* de los lugares de juego y trabajo de pacientes con esporotricosis ^(21,28).

Finalmente, otro hecho relevante de mencionar es la descripción que hizo Carmichael en 1962, quien después de los estudios sobre las formas de conidiación de las diferentes especies del género *Sporotrichum* y aislados de lesiones esporotricoides, determinó que eran géneros distintos, por lo que se retomó la propuesta de Hektoen y Perkins de considerar a *Sporothrix schenckii* como agente etiológico de la esporotricosis ^(14, 40, 41, 43, 54).

1.2 *Sporothrix schenckii*

1.2.1 Clasificación taxonómica.

Hektoen y Perkins, en 1900 clasificaron a *S. schenckii* dentro de la división Deuteromycota, clase Hyphomycetes, pero esta se considera una clasificación artificial y por lo tanto errónea, debido a que está basada en el estado asexual del hongo. Actualmente sigue sin conocerse la fase sexual de *S. schenckii*; sin embargo se han realizado estudios morfológicos, bioquímicos, serológicos y moleculares con la finalidad de encontrar su estado teleomorfo y agruparlo en una clasificación natural ^(15,16, 49).

El primer género de hongo con reproducción sexual al que se asoció *S. schenckii*, fue *Ceratocystis sp.*, debido a que comparte nicho ecológico y características morfológicas con *S. schenckii* al igual que el género *Ophiostoma*. Durante mucho tiempo también se pensó que los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma* eran el mismo. Sin embargo actualmente se sabe, gracias a estudios filogenéticos, que son dos géneros distintos. Las especies del género *Ceratocystis* son sensibles a la cicloheximida, y tiene anamorfos del género *Thielaviopsis*; por otro lado las especies pertenecientes al género *Ophiostoma* son tolerantes a la cicloheximida, contienen rhamnosa y celulosa en sus paredes celulares y

sus anamorfos residen en los géneros; *Sporothrix*, *Hyalorhinocladiella*, *Leptographium* y *Pesotum* ^(32, 55).

La clasificación actual de *S. schenckii* se muestra a continuación en el cuadro 1, y se basa en los datos anteriores y en lo descrito por Weijman & De Hoog en 1985. Además se incluyen las nuevas especies descritas por Marimon R et al en el 2007 como causantes de esporotricosis.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Sporothrix sp.* agentes etiológicos de la esporotricosis.

<p style="text-align: center;">Reino Fungi División Ascomycota Clase Euascomycota Orden Ophiostomatales Familia Ophiostomataceae Género <i>Sporothrix</i> Especies <i>Sporothrix schenckii</i> <i>S. brasiliensis</i> <i>S. globosa</i> <i>S. mexicana</i></p>
--

1.2.2 Hábitat

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico y gracias a esta característica puede vivir en la naturaleza como saprobio y como parásito en el tejido humano y de otros animales.

La fase micelial está representada por hifas y conidios; estos se pueden aislar de la naturaleza de diversas fuentes, pero se encuentra principalmente en el suelo, detritus, madera, plantas como el musgo, rosas, paja, pasto, buganvillas, zacate, claveles, cafetos, también se ha encontrado en animales, principalmente roedores, gatos e insectos ^(7, 10, 11 21, 41, 49).

1.2.3 Morfología macroscópica de la fase micelial

En general, este hongo en su fase micelial puede obtenerse *in vitro* en el laboratorio a partir de muestras ambientales o clínicas, inoculando la muestra en medios como agar dextrosa Sabouraud (SS) con o sin cloranfenicol y cicloheximida, incubados a una temperatura de 28°C durante 5 a 14 días. Al quinto día de incubación se observan pequeñas colonias húmedas de color blanco o beige, rodeadas de un halo filamentososo; con el paso del tiempo las colonias pueden adquirir una tonalidad más oscura, amarillenta, marrón, gris, negra o permanecer blanca. También es común observar colonias con pigmento marrón o negro entremezclado con zonas blancas. La mayoría de las colonias tienen un aspecto membranoso; en algunas se observa micelio aéreo con aspecto veloso o aterciopelado, o bien glabras. La superficie de las colonias pueden formar pliegues radiales o cerebriformes, algunas umbilicadas, otras planas o crateriformes ^(3, 14, 42, 43, 49, 51). (Figuras 1,2 y 3).



Fig. 1 Colonia aterciopelada, con pliegues radiales blanca al centro y marrón en la periferia.

Fig. 2 Colonia blanca umbilicada con pliegues radiales.

Fig. 3 Colonia blanca y vellosa.

Figuras. 1, 2 y 3. Aspecto macroscópico de la fase micelial de *Sporothrix schenckii*, a los 14 días de incubación a temperatura ambiente en SS.

1.2.4 Morfología microscópica de la fase micelial

La morfología microscópica de las colonias está caracterizada por abundantes hifas y conidios. Las hifas son hialinas, septadas, tienen un diámetro de 1-2µm y frecuentemente forman conjuntos de micelio ⁽⁴⁹⁾.

Los conidióforos son estructuras poco diferenciadas de la hifa, que generalmente se forman en ángulo recto o agudo respecto a ésta, en el ápice de los conidióforos se disponen los conidios, que pueden estar agrupados, dando la apariencia de una flor,

generados por un mecanismo simpodial; este mecanismo consiste en que después de la formación del conidio terminal, el crecimiento del conidióforo continúa como una pequeña rama lateral que se origina debajo del conidio, esta rama pronto produce otro conidio terminal y el proceso de ramificación se repite por lo que son llamados simpoduloconidios. Los conidios también pueden emerger directamente de la hifa (anteriormente conocidos como raduloconidios) y en este caso están sujetos a la hifa mediante un pequeño pedicelo. Los conidios pueden ser pigmentados o hialinos. Las formas de los conidios varían de esféricos a alargados, piriformes o triangulares y tienen diámetros de 1.5-3 por 3-6 μm ^(3, 14, 42, 46, 49, 50, 51). En la figura 4 se muestra un esquema de la morfología micelial microscópica.

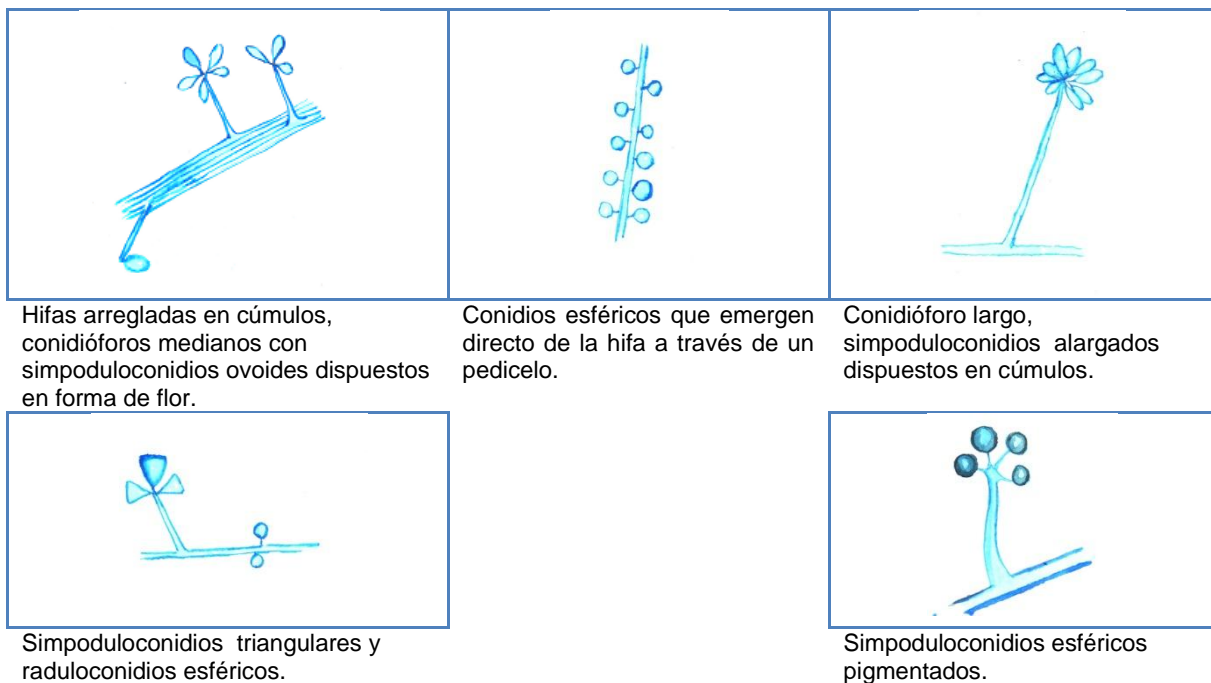


Figura 4. Esquematación de la morfología microscópica de la fase micelial de *S. schenckii*.

1.2.5 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico y este fenómeno está determinado por cambios de temperatura y disponibilidad de algunos nutrientes. Solo las hexosas son útiles fuentes de carbono para el desarrollo de esta fase, además se requiere tiamina y biotina en altas concentraciones para su mantenimiento ⁽⁴⁹⁾. Para estudiar la fase levaduriforme o parasitaria en el laboratorio, es necesario inocular este hongo en medio ricos en carbono nitrógeno, vitaminas y glucosa como son el infusión cerebro corazón o el RPMI 1640, e incubarlo a 37° C. En el agar infusión cerebro corazón se observan colonias

de aspecto cremoso, de color blanco a beige, plegadas o de superficie lisa o rugosa (Figura 5).



Figura 5. Colonia blanca cremosa de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* en agar infusión cerebro corazón incubado 14 días a 37°C.

1.2.6 Morfología microscópica de la fase levaduriforme

En la literatura se ha descrito una morfología polimorfa en los aislados, las cuales varían de células ovoides, esféricas o fusiformes que miden de 2.5 a 5 x 3.5 a 6.5 μm , con gemaciones únicas o múltiples (Figura 6).

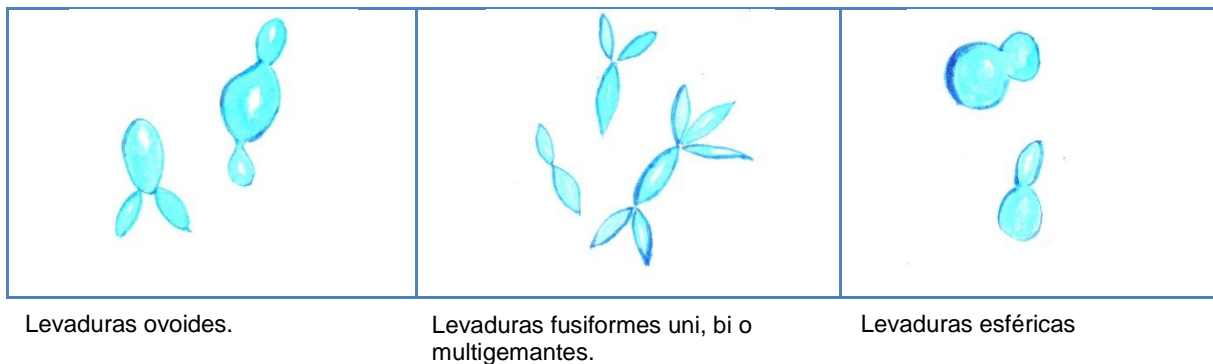


Figura 6. Esquemas de la morfología microscópica de la fase levaduriforme de *S. schenckii*.

1.2.7 Estudios moleculares para la identificación de *S. schenckii*

S. schenckii ha sido identificado por sus características morfológicas, pero este método convencional es limitado en la diferenciación de hongos morfológicamente parecidos, como *S. curviconia*, *S. inflata*, *S. schenckii* var. *luriei* y *Ceratocystis stenoceras*. Ante esta problemática se ha recurrido a las herramientas moleculares, que además han servido para explicar su taxonomía⁽⁵²⁾. Recientemente Marimon et al en el 2008⁽²⁷⁾ reclasificaron a *S. schenckii* var *luriei* como *Sporothrix luriei*.

Para la identificación de hongos con el apoyo de las herramientas moleculares, se han utilizado distintos criterios que a continuación se enumeran: 1) elegir una secuencia de oligonucleótidos para poder distinguir una especie de otra 2) elegir una secuencia de la que se tengan registros de múltiples especies para tener un rango más amplio de comparación.

En *S. schenckii* se han empleado diferentes técnicas moleculares. El análisis de la secuencia del gen que codifica para la quitina sintasa, que es un gen que tiene una secuencia altamente conservada para cada especie, es una prueba considerada como exitosa, ya que es posible detectar hasta 10 picogramos de ADN de *S. schenckii* en una muestra de paciente diagnosticado con esporotricosis ⁽¹⁷⁾. Procedimientos como la amplificación de las regiones espaciadoras de transcritos internos (ITS) del gen rDNA, posteriormente tratados con enzimas de restricción para analizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), logran distinguir a *S. schenckii* de especies estrechamente relacionadas como *S. schenckii* var *luriei*, *S. curviconia*, *S. inflata* y *Ceratocystis stenoceras*. Además evidencian la existencia de tipos dentro de la especie ⁽⁵²⁾.

1.3 Identificación de especies fúngicas por el dominio D1/D2 del gen 28S-like rDNA

El análisis de DNA que codifica para el ribosoma (rDNA), resulta ventajoso en la identificación, debido a que existen grandes similitudes funcionales y estructurales entre los ribosomas de todas las especies; esto refleja que tienen un origen evolutivo común. Los análisis de rDNA de diferentes eucariontes muestran que existen regiones ampliamente conservadas. Estas regiones se utilizan para evaluar relaciones de ancestro-descendencia, además de servir como puntos de referencia para evaluar la divergencia evolutiva. Las regiones conservadas alternan con regiones variables. Mediante el análisis del contenido de los nucleótidos de las regiones variables se pueden identificar especies filogenéticas, debido a que estas regiones son diferentes en cada organismo ^(4, 23).

Los ribosomas de los eucariontes, están constituidos por varias moléculas de RNA ribosomal diferentes y aproximadamente 80 proteínas distintas, organizadas en una subunidad grande y otra pequeña. Tanto las moléculas de rRNA como las proteínas difieren en las 2 subunidades. La subunidad ribosómica menor está formada por una

única molécula de rRNA, y la subunidad ribosómica mayor contiene una molécula de rRNA grande y 1 o 2 moléculas de rRNA menor ^(23, 35).

En hongos, el rDNA tanto el que codifica para el rRNA de la subunidad menor (18S-like) como el rRNA que codifica para la subunidad mayor (23S, 26S ó 28S-like y 5.8S), proveen un excelente blanco para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su secuenciación, debido a que es material genético bien caracterizado en hongos, de ocurrencia universal, posee regiones de evolución rápida y lenta, son genes con múltiples copias homogéneas, además de ser computacionalmente manejables ^(29, 47).

Las secuencias que codifican para la subunidad 18S-like varían poco entre especies. La variación es más característica en los genes que codifican para la subunidad mayor. La variación se debe principalmente a la inserción de G + C y las diferencias entre las secuencias que codifican para la subunidad 28S-like está dada por la expansión o contracción de las regiones variables ⁽⁴⁵⁾.

En el gen rDNA 28S-like existen regiones que son muy variables y en consecuencia útiles para hacer identificación, hay 12 regiones dentro de este gen y son nombradas D1-D12, las primeras tres regiones D1, D2 y D3, se caracterizan por tener la mayor variación interespecífica. En la figura 7 se muestra un esquema que representa la organización del gen que codifica para el rDNA en eucariontes.

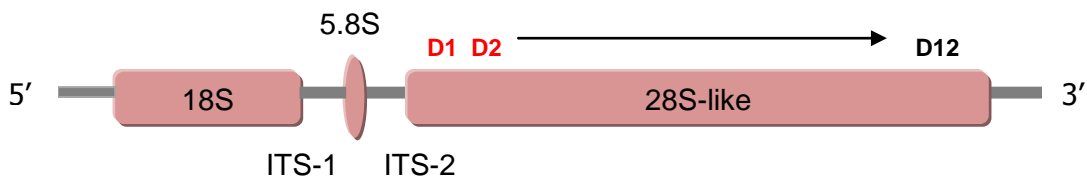


Figura 7. Organización del rDNA eucarionte, se observan los genes que codifican para la subunidad mayor y menor del ribosoma separados por espaciadores transcritos internos (ITS-1, ITS-2), en rojo se muestra la ubicación de los dominios D1/D2.

El dominio D1/D2, está localizado aproximadamente en las primeras 650 pares de bases del gen rDNA 28S-like, y corresponde a dos regiones de rápida evolución. Las primeras 50 pares de bases están muy conservadas. Las regiones entre la posición 70-110, 140-190 y 350-500 son regiones altamente variables. Las regiones más conservadas dentro de este dominio se encuentran entre la posición 200 y 350, y al final de la región a partir de la posición 577. El análisis de la secuencia del D1/D2 del gen 26S-like rDNA, es un método molecular muy eficiente en la identificación a nivel especie, se logra la diferenciación entre especies hasta en una sola base ⁽⁵³⁾ (Figura 8).

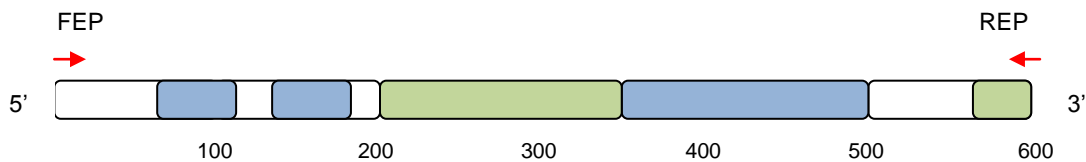


Figura. 8 Representación del D1/D2 del gen rDNA 28S-like. En color azul se muestran las regiones variables y en verde las regiones conservadas. Las flechas rojas indican el lugar de inserción de los oligonucleótidos FEP y REP.

Existe actualmente una vasta base de datos de secuencias del dominio D1/D2 de numerosas especies de levaduras y otros hongos. El análisis de estas secuencias para hongos levaduriformes pertenecientes al phylum ascomycota, concluyen que esta prueba resulta tan sensible, que se observa que en la misma especie no hay más del 1% de sustituciones, mientras que para levaduras pertenecientes al phylum basidiomycota resulta igualmente satisfactoria la identificación a nivel de especie filogenética ^(12,20). También se ha comprobado que esta región es lo suficientemente variable como para distinguir entre especies de hongos dematiáceos de importancia médica ⁽¹⁾. Algunos autores sugieren que para una mayor precisión se utilicen cebadores internos a la región específicos para cada especie.

1.4 Esporotricosis

La esporotricosis es una micosis subcutánea de curso subagudo o crónico, que puede afectar a personas de cualquier sexo, edad y raza, así como a algunos animales. Esta enfermedad inicia después de que *Sporothrix schenckii* entra en contacto con el tejido posterior a la inoculación traumática en la piel con objetos contaminados con conidios de este hongo, aunque también existen reportes de transmisión zoonótica causada por el rasguño o mordedura de animales como armadillos y gatos ^(8, 24, 40). Schubach et al ⁽⁴⁴⁾

destacaron la transmisión por gatos, donde el 83.4% de los pacientes con esporotricosis estuvo en contacto con gatos infectados.

1.4.1 Epidemiología de la esporotricosis

La esporotricosis es una micosis cosmopolita; la distribución geográfica de *S. schenckii* sugiere una amplia adaptabilidad a condiciones de temperatura y humedad ambiental, aunque se ha aislado con mayor frecuencia en climas templados que tienen temperaturas de 20 a 25° C y con humedad relativa superior al 90%. La mayoría de los casos ocurren en personas que viven en regiones tropicales y subtropicales. Los países con mayor número de casos al año son México, Uruguay, Brasil y Venezuela. ^(6, 43).

En México se considera como la micosis subcutánea más frecuente y afecta principalmente a dos regiones de la República Mexicana: la zona occidente (Nayarit y Jalisco) y la zona centro (D.F., Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala). Los datos de morbilidad de acuerdo a los casos clínicos registrados en centros dermatológicos y el número de consultas por año, difieren en los países y regiones de Latinoamérica. México tiene una tasa de morbilidad entre 0.1 al 0.5%. ^(6, 34).

S. schenckii habitualmente vive en el suelo y en vegetales, hábitat en que este hongo se desarrolla en su forma micelial que constituye la fase infectante. Por lo tanto los sujetos que tienen mayor contacto con el hongo y en consecuencia tienen mayor riesgo de contraer esta infección, son los agricultores, floricultores, jardineros, granjeros, floristas, cazadores de armadillos, amas de casa que tienen jardín; es por esto que la esporotricosis se considera como una micosis ocupacional ⁽⁸⁾.

1.4.2 Manifestaciones clínicas

En el cuadro 2 se muestra la clasificación clínica de la esporotricosis descrita por Arenas en el 2008 ⁽²⁾.

Cuadro 2. Clasificación clínica de la Esporotricosis tomado de Arenas ⁽²⁾.

Forma clínica	Vía de entrada	Manifestaciones clínicas	Frecuencia con que se presenta	Regiones anatómicas afectadas
Esporotricosis cutánea linfangítica	<i>S. schenckii</i> penetra por la piel mediante traumatismo con objetos contaminados con conidios de este hongo.	Lesiones nodulares que siguen el trayecto de los vasos linfáticos. Inicia con el chancro de inoculación, que es un nódulo indoloro de color rojo púrpura que puede ulcerarse, a partir de este se forman los siguientes nódulos.	Aproximadamente el 75% de los casos.	Extremidades superiores en 45 a 53%, cara en 14 a 21% y extremidades inferiores en 18 a 23 %.
Esporotricosis cutánea fija	Por la piel de la misma forma que ocurre en la esporotricosis cutánea linfangítica.	Se presenta solo una lesión que es una placa infiltrada eritematosa de forma semilunar, verrugosa o ulcerada.	Representa el 20-30% de los casos.	Cara, cuello y tronco.
Esporotricosis mucocutánea	Piel.	Lesiones granulomatosas, vegetantes o ulceradas y dolorosas.	Es excepcional	Afecta boca, faringe, cuerdas vocales y nariz.
Esporotricosis diseminada: cutánea y sistémica	Resulta de la diseminación hematógena a partir del sitio de infección ya sea cutáneo o respiratorio. La infección a partir de vías respiratorias se produce después de que el individuo inhala conidios de <i>S. schenckii</i> .	Cutánea: hay afección de varias regiones del tegumento. Sistémica: afecta órganos internos y puede haber fungemia ocurre en pacientes con inmunodeficiencias.	2 a 5% de los casos.	Piel, la forma sistémica afecta SNC, tubo digestivo, hígado aparato genitourinario, miocardio, riñones, testículos.
Esporotricosis extracutánea: osteoarticular y pulmonar	Diseminación a partir del sitio de infección respiratorio.	Osteoarticular: hay tenosinovitis, periostitis y osteólisis. Forma pulmonar: tos productiva, con o sin hemoptisis, fiebre y pérdida de peso.	Es excepcional	Osteoarticular: rodillas, articulaciones interfalángicas, codos, metatarsianos y metacarpianos. Pulmones.

Existen otras clasificaciones clínicas de la esporotricosis; algunas se basan en el aspecto clínico, otras en la vía de infección con *S. schenckii* y otras de acuerdo a los órganos afectados ⁽⁴¹⁾.

La mayoría de los estudiosos de la esporotricosis consideran que la forma clínica que se presenta depende de la respuesta inmune del paciente. Sin embargo, un estudio reciente que tuvo como objetivo estudiar los aislamientos clínicos de pacientes con esporotricosis diseminada, linfangítica y fija, así como su relación entre el genotipo y la virulencia, demostró por RAPD un patrón diferente de bandeo entre los aislados de las diferentes formas clínicas; se demostró también que la virulencia se relaciona con el genotipo. Los aislados de *S. schenckii* provenientes de pacientes con esporotricosis diseminada, mostraron mayor patogenicidad en ratones, seguida por los aislados de *S. schenckii* causantes de esporotricosis linfocutánea; por último los aislados provenientes de lesiones fijas causaron menor infección ⁽¹⁸⁾.

1.4.3 Diagnóstico de la esporotricosis

Para el diagnóstico de la esporotricosis cutánea el primer paso es la observación de las lesiones, pero debido a que existen otras enfermedades que tienen una semejanza, es indispensable realizar un diagnóstico diferencial; por ejemplo las lesiones de la esporotricosis linfocutánea son semejantes a algunas formas de leishmaniasis, paracoccidioidomicosis, cromoblastomicosis, blastomicosis, tuberculosis, pioderma bacteriano, absceso subcutáneo, tularemia y sífilis primaria; la esporotricosis fija también puede confundirse con la lesión que provoca el pioderma gangrenoso. ⁽⁴¹⁾. Por lo tanto, es necesario confirmar o descartar el diagnóstico de esporotricosis con ayuda de diversos estudios de laboratorio.

La búsqueda de estructuras fúngicas en un examen directo o frotis hecho a partir de secreciones de la lesión, es un paso importante en el diagnóstico; algunas veces es posible observar levaduras. Este procedimiento diagnóstico tiene un porcentaje de éxito muy variable 20 al 90%, debido a que la cantidad de estructuras fúngicas que se encuentran embebidas en la muestra suelen ser muy escasas y no siempre se sigue una metodología adecuada ^(9, 24).

Otro proceso es la toma de biopsia, para su posterior estudio histopatológico en el que generalmente se observa una reacción inflamatoria granulomatosa y piógena, asociada a infiltrado de neutrófilos, algunas células plasmáticas y linfocitos. En la epidermis se observa hiperplasia pseudoepiteliomatosa. El hallazgo de cuerpos fúngicos es muy poco frecuente, debido a la escasez de este en las muestras de tejido, aunque existen técnicas como la inmunofluorescencia que ayudan a descubrir al hongo. Las levaduras que se observan pueden tener forma redonda, ovoide, alargada, cilíndrica (forma de “cigarro”) y en el caso de la esporotricosis linfocutánea se pueden observar cuerpos asteroides ⁽⁴¹⁾ que es una estructura constituida por una levadura central rodeada de proyecciones radiadas que corresponden a restos de membranas de polimorfonucleares ⁽¹³⁾. En el estudio de Novales et al ⁽³⁶⁾ se demostró que realizando un mayor número de cortes en el bloque de tejido, mejora el resultado en la observación de la estructura parasitaria.

El recurso más confiable y eficaz para el diagnóstico de la esporotricosis sigue siendo el cultivo ⁽²⁴⁾. Éste se realiza a partir de cualquiera de los especímenes biológicos dependiendo de la forma clínica de la enfermedad y los medios de cultivo más utilizados para obtener la fase micelial son agar dextrosa Sabouraud con o sin antibióticos. Los cultivos brindan aproximadamente el 95.2% de los diagnósticos ⁽⁴⁰⁾.

La intradermoreacción (IDR) con esporotricina metabólica o de la fase filamentosa, es un procedimiento que se puede emplear en el diagnóstico de la esporotricosis fija y linfangítica; a las 48 horas de su aplicación se observará una induración mayor a 5 mm si existe infección con *S. schenckii*. Una IDR negativa no significa necesariamente ausencia de infección; puede corresponder a una anergia inmunológica como sucede en los casos de inmunodepresión severa asociada a esporotricosis ⁽²²⁾.

2. ANTECEDENTES

En el 2002, Mesa A, et al ⁽³⁰⁾ publicaron el primer trabajo que asocia las características fenotípicas de aislamientos de *S. schenckii* con su origen geográfico. Estudiaron 44 aislados de México (Mx), Colombia (Co) y Guatemala (Gt), provenientes de muestras clínicas y en el caso de México tanto clínicas como ambientales. Las características morfológicas fueron evaluadas a los 15 días de incubación a 28°C en APD. Todos los aislados presentaron colonias húmedas, planas, finamente plegadas o muy plegadas, al inicio color crema posteriormente marrón. Microscópicamente observaron conidios simpodiales en arreglo de flor y/o conidios de pared gruesa pigmentados dispuestos a lo largo de la hifa. El tamaño promedio de los conidios fue: ancho 1.2 a 3.5µm y largo de 1.2 a 5.4 µm. Entre los tres países hubo algunas diferencias : el largo de los conidios de los aislamientos mexicanos ($\bar{x} = 2.06 \pm 0.53 \mu\text{m}$) y de Gt ($\bar{x} = 2.68 \pm 0.83$) fue similar, a diferencia de los de Co ($\bar{x} = 4.03 \pm 1.04$). Todos los aislamientos transformaron a fase levaduriforme dando levaduras con gemaciones ovoides. Mediante el análisis del RAPD (Polimorfismo en el DNA por amplificación al azar) se obtuvieron patrones que agruparon a los aislamientos de acuerdo a su origen geográfico y se observó la gran variabilidad genética que presenta *S. schenckii*.

Ramírez et al en el 2005 ⁽³⁹⁾, confirmaron que la morfología es un parámetro limitado para diferenciar a *S. schenckii* de especies con las que comparte nicho ecológico y características morfológicas. Realizaron muestreos ambientales de una zona con alta incidencia de pacientes con esporotricosis, con la finalidad de aislar *S. schenckii*. La morfología fue el primer parámetro para la identificación y de acuerdo a características morfológicas se obtuvieron 18 aislados. Una vez realizado el estudio morfológico se extrajo DNA a cada aislamiento, para posteriormente amplificar el dominio D1/D2 del gen 28S rDNA; las secuencia de este fragmento fueron comparadas en la base de datos del genbank y 15 aislamientos correspondieron a *S. schenckii*, 1 al género *Ophiostoma* y 2 al género *Endomyces*.

En el 2006 O'Reilly et al ⁽³⁷⁾, publicaron los resultados de identificación morfológica y de tipificación mediante análisis por macrorrestricción utilizando el método de electroforesis en campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis "PFGE"), a un total de 70 aislamientos clínicos y ambientales de Australia. Las características morfológicas de los 70

aislamientos, permitieron esclarecer que dentro de los aislados ambientales, además de *S. schenckii* existen especies relacionadas como *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum*. Todos los aislamientos microscópicamente presentaron en común conidios ovoides de origen simpodial con arreglo en flor. Otras características como la presencia de peritecios, producción de melanina, conidios pigmentados, crecimiento a 35°C y la transformación a fase levaduriforme, dividieron a los aislados en 6 grupos. Un grupo particularmente interesante caracterizado morfológicamente por masas de conidios pigmentados y transformación a fase levaduriforme incluía únicamente los aislados clínicos y ambientales obtenidos de los lugares de vivienda y trabajo de los pacientes. La tipificación por PFGE también agrupó a los aislados de acuerdo a zona geográfica. Los aislados clínicos mostraron un patrón de bandeo indistinguible al de los aislados ambientales provenientes de los lugares de trabajo y vivienda de los pacientes. Este método también resulta muy eficiente para la diferenciación de *S. schenckii* de especies relacionadas como *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum*.

En el 2007, Marimon R, et al ⁽²⁶⁾ reportaron que existe una correlación entre la morfología y la clasificación filogenética realizada a partir de fragmentos del gen que codifica para la calmodulina. En este estudio procesaron 127 aislados de *S. schenckii* de origen clínico en su mayoría y algunos de la naturaleza, provenientes de diferentes países. Estos autores propusieron tres nuevas especies; *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* y *Sporothrix mexicana* en base a los análisis filogenéticos, y observaron que la morfología de los conidios que se correlacionaron con las características morfológicas con el análisis filogenético de los aislados.

Sporothrix brasiliensis se caracteriza morfológicamente por dos tipos de conidios: ovoides simpodiales, hialinos, pocos de ellos formados sobre dentículos directamente de la hifa, de 2-6 µm de largo por 1-4 µm de ancho; y conidios sésiles pigmentados y globosos, de 2.5-5 µm por 2-3 µm, las células conidiógenas son en su mayoría terminales o intercalares. Estos conidios se encuentran dispuestos en conidióforos que son ligeramente más gruesos que la hifa.

S. globosa se caracteriza por conidios simpodiales, hialinos, ovoides, con numerosos dentículos, de 2.5-5 µm de largo por 1-3 µm de ancho, y conidios sésiles, globosos,

pigmentados, de pared gruesa, de 3-4 μm por 2-3.5 μm . Las células conidiógenas en su mayoría son terminales o intercalares, en un conidióforo más o menos diferenciado.

S. mexicana forma conidios simpodiales hialinos, ovoideos de 3-5.5 μm por 2-2.5 μm , además de conidios sésiles pigmentados, subglobosos, ovoides y elipsoidales que miden 3-4 μm por 2- 3.5 μm .

En el 2009 Madrid H et al ⁽²⁵⁾, reportan que de 32 aislamientos clínicos previamente identificados como *S. schenckii* provenientes de México, Colombia y Guatemala, por análisis cladístico de la secuencia parcial del gen de la calmodulina, identificaron que 87.5% de los aislados correspondía a *S. schenckii* y el resto a *S. globosa* (12.5%).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de la esporotricosis se realiza principalmente mediante el cultivo de muestras biológicas, al cual se le realiza un estudio morfológico macro y microscópico, ya que la morfología ha sido el principal parámetro considerado para su identificación. Sin embargo, *Sporothrix schenckii* presenta variabilidad en sus características fenotípicas y en ocasiones sugiere que se trata de diferentes géneros como *Endomyces* y *Cerinosterus* que comparten características morfológicas y ecológicas con *S. schenckii*. El laboratorio de micología médica cuenta con una colección de aislados identificados como de *S. schenckii* provenientes de diversos centros de salud; en estudios piloto se ha observado una diversidad morfológica entre ellos. Por lo anterior consideramos que es probable que existan otras especies implicadas en la etiología de la enfermedad atribuida únicamente a *S. schenckii* y que pasan desapercibidas para el personal de laboratorio. Actualmente se cuenta con métodos de identificación a nivel molecular, que han resultado efectivos en la identificación por lo que sin duda la mejor opción es complementar los estudios morfológicos con los moleculares.

Debido a la diversidad morfológica que se observa en aislados de *S. schenckii* es necesario corroborar su identidad con estudios genéticos, con la finalidad de verificar si es el único agente causal de esporotricosis en paciente mexicanos.

4. HIPÓTESIS

El cuadro clínico de la esporotricosis es causado principalmente por *Sporothrix schenckii*. Es posible que utilizando procedimientos más sensibles como la PCR se identifiquen otros géneros o especies de hongos causantes de lesiones esporotricoides.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Correlacionar los datos morfológicos y genéticos de aislados clínicos de *Sporothrix schenckii*.

5.2 Objetivos particulares

- Describir y registrar la diversidad morfológica de los aislados fúngicos de pacientes con diagnóstico clínico de esporotricosis.
- Corroborar el dimorfismo de los aislados.
- Obtener la identidad de los aislados mediante la comparación de la secuencia de un fragmento del dominio D1/D2 del gen 28S-like rDNA con la base de datos del genbank.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron 26 aislados clínicos de pacientes mexicanos con diagnóstico de esporotricosis, 18 provenientes del Servicio de Dermatología del Hospital General de México (SS) y 8 provenientes de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, y como grupo externo se incluyó 1 aislado clínico de Francia (no. 19) y 1 una cepa ATCC (201681) correspondiente a un aislado de un paciente brasileño diabético con esporotricosis diseminada. (Ver tablas 1 y 2)

6.1 Obtención de cultivos monospóricos

Se realizó un cultivo monospórico de cada uno de los aislados estudiados, por el método de dilución y aislamiento por estría, con el siguiente procedimiento:

A partir del cultivo original se realizaron sub-cultivos en agar dextrosa Sabouraud ADS (Apéndice A) en tubo, incubados por un periodo de 5 a 8 días a temperatura ambiente (TA, 25-28°C). Posteriormente, de cada aislado se preparó una suspensión de conidios en 1 ml de solución salina 0.85 mM más 5 µl de Tween 80. Se determinó el número de conidios en suspensión, utilizando la cámara de Neubauer.

A partir de esta suspensión se realizaron diluciones para inocular 20 a 40 conidios contenidos en un volumen de 10 µl; el inóculo fue distribuido homogéneamente en placas de ADS por estría abierta con la finalidad de obtener colonias aisladas.

Las cajas se mantuvieron a TA y se revisaron a las 48 y 72 horas, tiempo en que se observaron las primeras colonias; de estas se eligió una colonia para ser sembrada de manera masiva en ADS en tubo. Este último cultivo fue utilizado para obtener los cultivos para el estudio morfológico y genético y para conservar las cepas en viales de 20 mililitros con solución salina estéril.

Tabla 1. Datos clínico epidemiológicos de los aislados de *Sporothrix shenckii* provenientes del Hospital General de México.

Clave aislado		Datos del paciente				Esporotricosis		Tratamiento	
hospital	estudio	procedencia	Edad en años	sexo	ocupación	Tipo de esporotricosis	Tiempo de evolución Meses (m)	Medicamento prescrito	Resultado del tratamiento
1	1	Oaxaca	33	M	Campesino	Linfagítica	4m	KI	Curación
2	2	Puebla	38	M	Campesino	Fija	1 año	KI	Curación
4	3	Tlaxcala	23	F	Hogar	Fija	9m	KI	Curación
5	4	D.F.	25	M	Obrero	Linfagítica	3m	KI	Curación
6	5	Michoacán	43	M	Campesino	Linfagítica	2m	KI	Curación
7	6	Puebla	68	F	Hogar	Linfagítica	6m	Itraconazol	Mejoría (No acudió más)
8	7	Hidalgo	55	M	Campesino	Linfagítica	8m	KI	Curación
9	8	Puebla	34	M	Hogar, campesina	Linfagítica	6m	KI	Curación
10	9	Veracruz	8	F	Escolar	Fija	3m	Termoterapia	Curación
11	10	Puebla	33	M	Campesino, floricultor	Linfagítica	5m	KI	Curación
12	11	Michoacán	48	M	Agricultor	Hematógena	10m	Anfotericina B, Itraconazol	Muerte
13	12	Veracruz	19	F	Hogar y campesina	Linfagítica	3m	Itraconazol	Curación
14	13	Edo de México	72	M	Campesino	Linfagítica	8m	KI + Itraconazol	Curación
16*	14	-	-	-	-	-	-	-	-
17*	15	-	-	-	-	-	-	-	-
19*	16	-	-	-	-	-	-	-	-
20*	17	-	-	-	-	-	-	-	-
21*	18	-	-	-	-	-	-	-	-

*Datos no disponibles.

Tabla 2. Datos de los aislados clínicos de *Sporothrix shenckii* provenientes de la Universidad de San Luis Potosí

Clave aislado		Datos de paciente				Datos sobre la esporotricosis			
SLP	estudio	Edad	Sexo	Procedencia	ocupación	Tipo de esporotricosis	Tiempo de evolución	Medicamento prescrito	Resultado del tratamiento
dhmss 51r00	19			Francia	Desconocida	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido
dhmss 51r01	20	No conocida	F	Villa de Reyes SLP.	obrera	Linfangítica	Desconocido	KI	Curación
dhmss 51r02	21	No conocida	F	Ciudad de SLP.	Desemplead o/artesanía paja	Hematógena Diseminada	2 meses	Desconocido	Desconocido
dhmss 51r03	22	No conocida	F	Sta. María del Río SLP.	Ama de casa	Linfangítica	Desconocido	KI	Desconocido
dhmss 51r04	23	44 años	M	Villa de Arriaga SLP.	Jornalero	Linfangítica	Desconocido	KI	Desconocido
dhmss 51r05	24	9 años	M	Mexquitic de Carmona SLP.	Escolar	Linfangítica	Desconocido	KI	Desconocido
dhmss 51r07	25	14 años	M	Pino Suárez Zacatecas	Estudiante	Desconocido	Desconocido	KI	Desconocido
dhmss 51r13	26	72 años	F	Cerritos SLP.	Ama de casa	Linfangítica	Desconocido	KI	Desconocido
dhmss 51r14	27	38 años	M	Ojuelos Jal.	Comerciante/ agricultor	Cutánea verrugosa (frente y párpado)	Mes y medio	Desconocido	Desconocido

6.2 Estudio morfológico

6.2.1 Estudio morfológico macroscópico de la fase micelial

A partir de una resiembra del cultivo monospórico, se preparó una suspensión inicial con una concentración de 10^5 conidios/ml, se inocularon 3 μ l de esta suspensión en el centro de una placa de ADS; se incubaron a TA durante 14 días, y se registraron las siguientes características de la colonia: aspecto (velloso, glabro, aterciopelado, húmedo, membranoso, pulverulento, etc.), pigmentación, superficie (lisa, cerebriforme, con elevación central, umbilicada, con pliegues radiales, etc.). Se realizó registro fotográfico.

6.2.2 Estudio morfológico microscópico de la fase micelial

Se realizaron microcultivos con algunas modificaciones de la técnica tradicional de microcultivo en portaobjetos (citado en López-Martínez et al 2004). Esta técnica consistió en cortar cubos de ADS de aproximadamente 5 mm por lado; se colocó un cubo en un portaobjetos estéril y sobre el agar se depositaron 3 μ l de una suspensión de 10^5 conidios/ml. Posteriormente se colocó un portaobjetos estéril sobre el medio inoculado. Los cultivos se incubaron a TA durante 3 días.

Las laminillas resultantes se tiñeron con azul de algodón y se observaron con un microscopio óptico, utilizando los objetivos 40x y 100x, y se registraron las siguientes características: disposición del micelio fértil (agregados de hifas o hifas aisladas), origen de los conidios (simpodial o directo de la hifa, en racimo, únicos, alternados, etc), forma del conidio (globosa, ovoide, triangular, alargado), conidios hialinos o pigmentados; tamaño del conidio (ancho y largo), tamaño del conidióforo (ancho y largo). Se observaron 10 campos al azar y se anotó el predominio de las características previamente mencionadas para cada aislado. Se realizó registro fotográfico.

6.2.3 Obtención de la fase levaduriforme

Para verificar la transformación de la fase micelial a la fase levaduriforme de cada uno de los aislados, se utilizó un medio rico en nutrientes; infusión cerebro corazón (BHI) (Apéndice A) y agar para infusión cerebro corazón (AICC) (Apéndice A). Los cultivos fueron incubados a 37°C.

6.2.4 Estudio morfológico macroscópico de la fase levaduriforme

Se inocularon 3 µl de una suspensión de 10⁵ conidios/ml en el centro de una caja con AICC. Se incubaron 14 días a 37°C, y se observaron y registraron las siguientes características: color de la colonia, consistencia y superficie (lisa o plegada). Se realizó registro fotográfico.

6.2.5 Estudio morfológico microscópico de la fase levaduriforme

Se inocularon 500 µl de una suspensión de 10⁵ conidios/ml, en 15 mililitros de BHI; los cultivos fueron incubados durante 3 a 7 días a 37°C y se mantuvieron en agitación a 100 rpm. Los cultivos fueron revisados a los 5 días y se registraron las características morfológicas de las levaduras; forma (alargada, ovoide, esférica), número de gemas y tamaño (ancho y largo). Se realizó registro fotográfico de las diversas formas.

6.3 Identificación molecular

6.3.1 Extracción y purificación del DNA

Se utilizó la metodología propuesta por Blin et al 1976 ⁽⁵⁾.

Para la extracción de DNA, se inocularon 200ml de medio líquido de Sabouraud (MLS) (apéndice A) con una suspensión de conidios realizada a partir de un sub-cultivo. Los cultivos fueron incubados a 26 °C en agitación a 110 rpm durante 4-5 días. Una vez que se observó suficiente crecimiento, se separó la masa fúngica mediante centrifugación y el concentrado se secó con papel filtro estéril.

Para romper la pared celular, la masa fúngica se maceró con nitrógeno líquido. El macerado se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se trató con buffer de lisis (apéndice B) y proteinasa K (Invitrogen), con la finalidad de digerir los componentes protéicos; la mezcla se incubó a 65° C durante 1 hora. Posteriormente se adicionó fenol-cloroformo-isoamílico (25-24-1) en un volumen igual al de la muestra, se agitó vigorosamente hasta obtener una

muestra con aspecto lechoso; se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo donde se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio y etanol al 100%; una vez que ocurrió la precipitación del DNA, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos; se decantó el sobrenadante y se dejó secar el DNA. Una vez seco, se agregó un volumen de agua miliQ estéril proporcional a la cantidad de DNA obtenido y se adicionaron 10 µl de una solución de 10 mg/ml de RNAsa incubándose a 37°C por una hora. Para asegurar la pureza del DNA se repitió el procedimiento desde la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico, hasta re-suspender el DNA en agua.

6.3.2 Cuantificación y visualización de DNA

Para conocer la concentración de DNA obtenido en la extracción, se realizaron por duplicado diluciones 1:500 de cada una de las muestras. Y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro visible ultrospec, 1100 pro, Amersham Biosciences, se tomaron lecturas a 260 y 280 nanómetros y se determinó la concentración en µg/µl.

Para verificar la calidad del DNA se depositaron 3µl de DNA con 1.6 µl de buffer de carga (Apéndice B) y 5.4 µl de H₂O, en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio; dependiendo del tamaño del gel, se aplicó un voltaje entre 70 volts y 90volts, aproximadamente durante 40-70 minutos. Por cada gel se incluyó un pozo con marcador λ DNA/ Hind III Fragments. Una vez concluida la migración, el gel se visualizó con un trans-iluminador de luz ultravioleta UVP.

6.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los dominios D1/D2 del gen 28S rDNA.

Se utilizaron los iniciadores propuestos por Fell, 1993 con modificación en una base en la secuencia del oligo FEP.

Secuencia original Fell FEP 5' a 3' :CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG

La secuencia del Oligo FEP 5' a 3': CAT ATC AAT AAG CGG AGC AAA AG

La secuencia del Oligo REP secuencia de 5' a 3': GCT CCG TGT TTC AAG ACG

Para un volumen de 25 µl el contenido de la mezcla de reacción fue:

Componentes de reacción	Cantidad en µl	Concentración final
H ₂ O miliQ	12.8 µl	
Buffer 10x	2.5 µl	1x
MgCl ₂ 30mM	1.0 µl	1.2mM
dATP 10mM	.5 µl	.2mM
dCTP 10mM	.5 µl	.2mM
dGTP 10mM	.5 µl	.2mM
dTTP 10mM	.5 µl	.2mM
Oligo FEP 5µM	2.0 µl	.4µM
Oligo REP 5µM	2.0 µl	.4 µM
Taq 5 unidades Amplificasa BIOGENICA	.2 µl	.04 U
DNA (10ng/ µl)	2.5 µl	1ng/ µl

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos

Treinta y cinco ciclos con los siguientes tiempos y temperaturas:

Desnaturalización 94°C por 1 minuto

Hibridación 63:3°C por 1 min

Polimerización 72° C por 1 minuto

Un ciclo final de polimerización a 72 grados centígrados durante 5 minutos

6.3.4 Visualización del producto de PCR

Para visualizar el producto de amplificación, se depositaron 3µl de la muestra de reacción, 1.6 µl de buffer de carga y 5.4 µl de agua miliQ. Por separado se depositó 1µl de marcador de 100 pares de bases adicionado de 1.6 µl de buffer de carga y 7.4 µl de H₂O miliQ. Estas mezclas fueron depositadas en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Para la migración se aplicó un voltaje de 70 a 90 volts durante 40-70 minutos. Finalmente el gel fue visualizado en un trans-iluminador de luz ultravioleta.

6.3.5 Purificación del producto de PCR

Se realizó el protocolo de purificación de Qiagen (QIAquick principle), donde se utiliza una columna con propiedades selectivas de ligandos debido a una membrana de sílica y a buffers especiales que proveen condiciones adecuadas para la recuperación del DNA y la eliminación de contaminantes. El DNA es adsorbido por la membrana de sílica en presencia de sales, mientras que los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas son eliminadas y el DNA puro es eluído con agua.

6.3.6 Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, y estos fueron secuenciados con el equipo Applied Biosystems 3100 de 16 capilares.

6.3.7 Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron editadas y analizadas con el programa ChromasPro. Todas las secuencias fueron procesadas a través del programa nucleotide Blast (Basic Local Alignment Search Tool) y comparadas con secuencias existentes en el banco genético de datos (genbank data base, NCBI "National Center for Biotechnology Information") mediante el programa Megablast que indicó las especies con las que las secuencias problema compartían mayores similitudes.

7. RESULTADOS

7.1 Estudio morfológico de la fase micelial

A continuación se observan las imágenes correspondientes a la morfología macroscópica y microscópica de la fase micelial de cada uno de los aislados incluidos en este estudio. Los aislados problema se agruparon de acuerdo a las características observadas en la morfología macroscópica y se formaron 6 grupos.

El grupo externo; la cepa tipo ATCC y el aislamiento de origen francés, se observan a continuación. La cepa tipo comparte características morfológicas con el grupo 1 y el aislado 19 de origen francés con el grupo 2.

ATCC

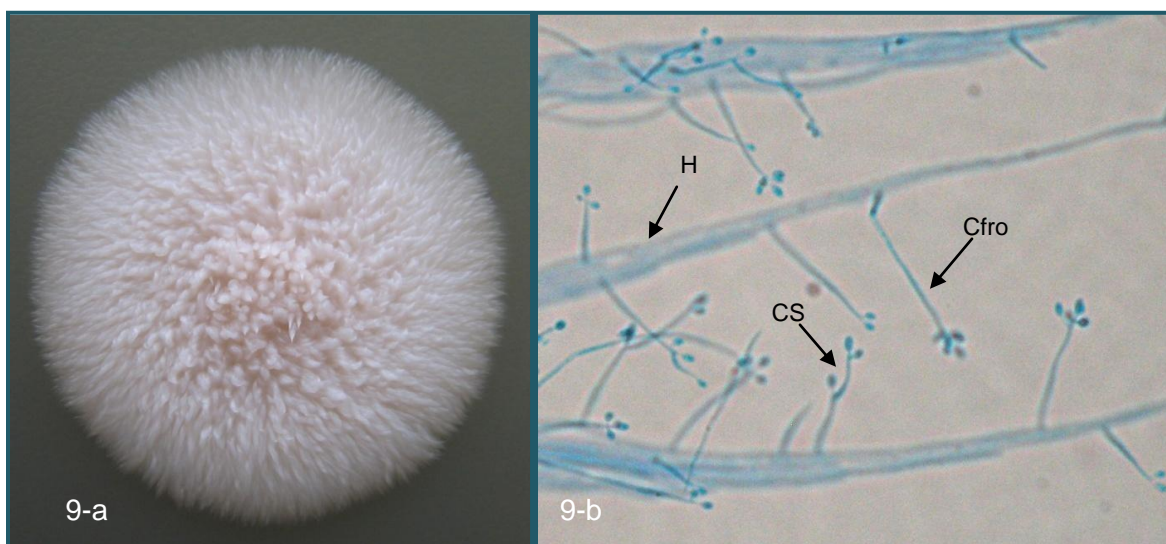


Figura 9-a Colonia blanca, vellosa y húmeda. Figura 9-b Conidios hialinos ovoides de origen simpodial; (H) hifas agrupadas en haces; (Cfro) conidióforo perpendicular a las hifas; conidio desarrollado a partir de un (CS) conidióforo secundario(100x).

Aislado 19: Francia

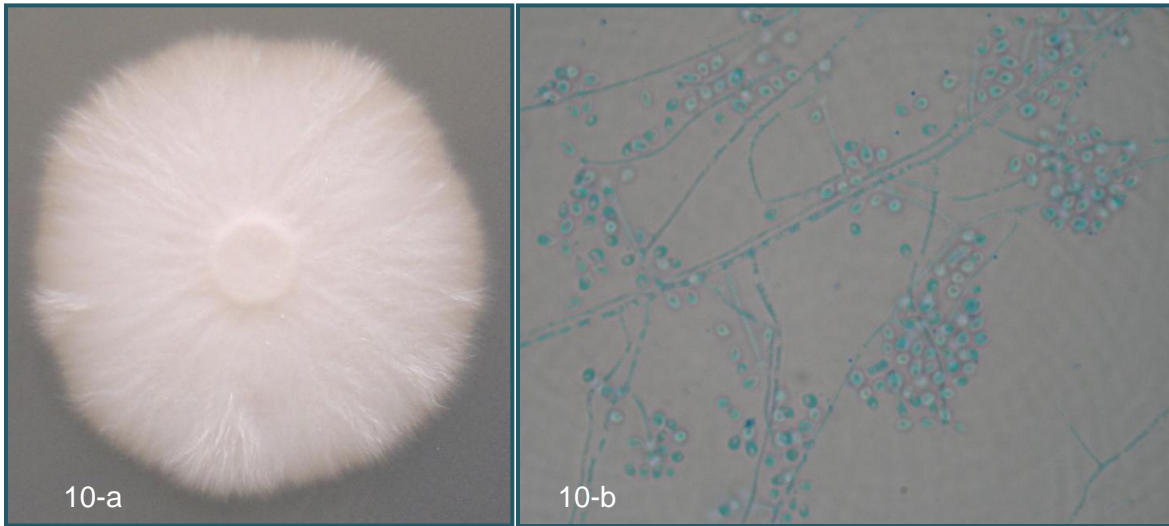


Figura 10-a Colonia blanca, vellosa, opaca umbilicada. Figura 10-b Hifas aisladas, conidios hialinos globosos, que surgen directamente de la hifa y otros conidios en cúmulos (100x).

a) **Grupo 1.** Los siguientes 5 aislamientos que se observan a continuación, presentaron las siguientes características en común: color blanco, textura vellosa y aspecto húmedo.

Aislado 14

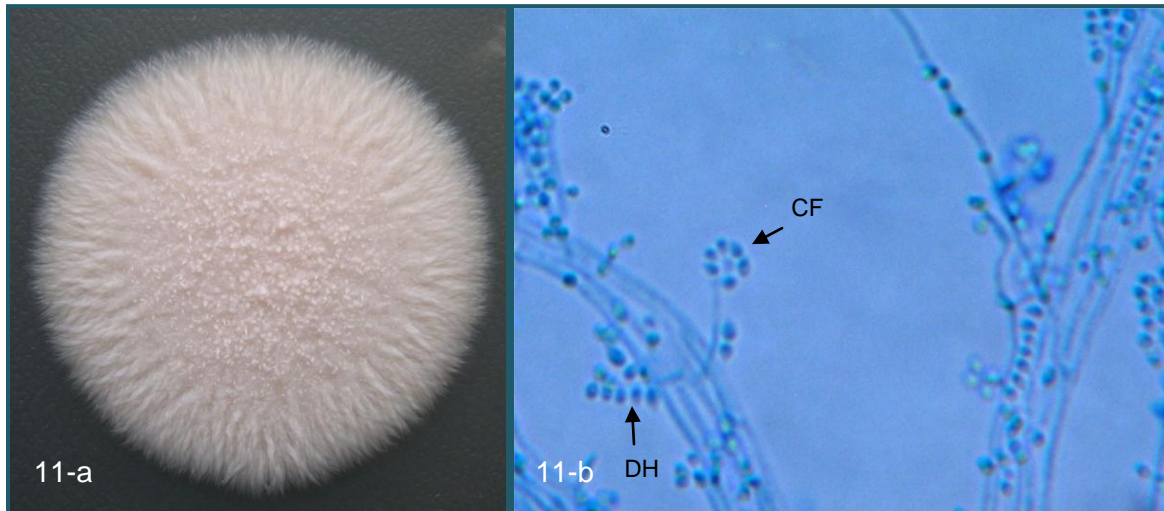


Figura 11-a Colonia blanca, vellosa y húmeda. Figura 11-b Conidios ovoides hialinos, que emergen (DH) directamente de la hifa; (CF) arreglo de conidios en flor (100x).

Aislado 21

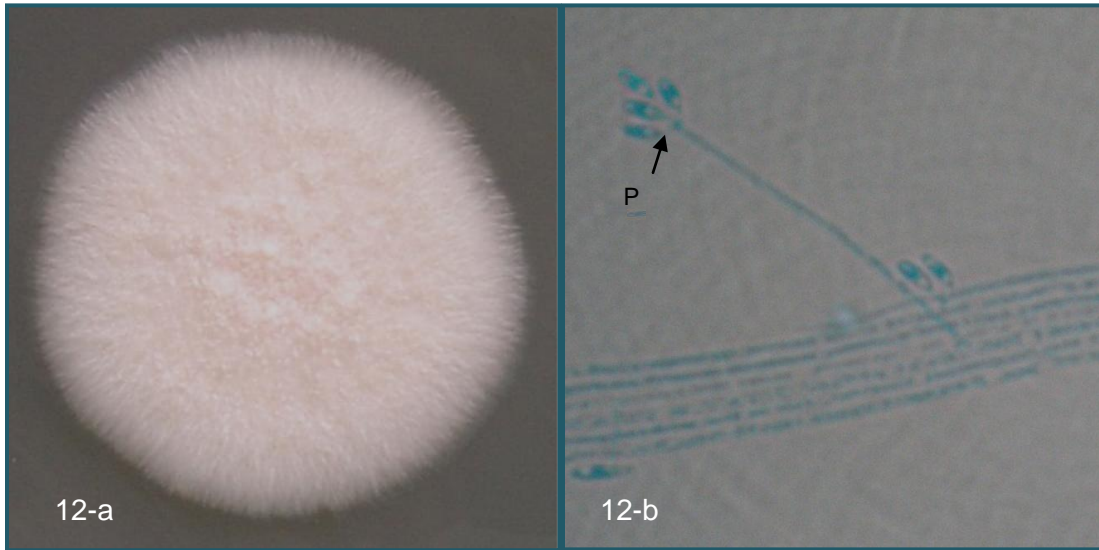


Figura 12-a Colonia blanca vellosa, húmeda. Figura 12-b Hifas agrupadas en haces, de donde surge un conidióforo largo con conidios hialinos ovoides; se observa también el (P) pedicelo a través del cual se unen los conidios con el conidióforo (100x).

Aislado 1



Figura 13-a Colonia blanca, vellosa, húmeda con pliegues radiales. Figura 13-b Conidios ovoides hialinos en arreglo de flor. Hifas aisladas (A), hialinas (100x).

Aislado 7

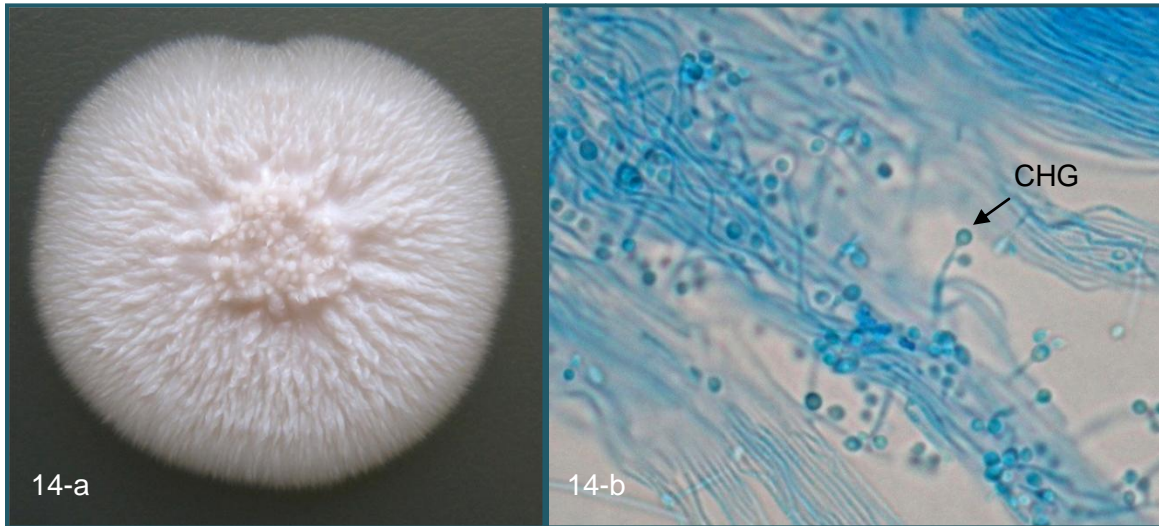


Figura 14-a Colonia blanca, vellosa, membranosa, con elevación central. Figura 14-b Hifas en haces, (CHG) conidios hialinos globosos (100x).

Aislado 18

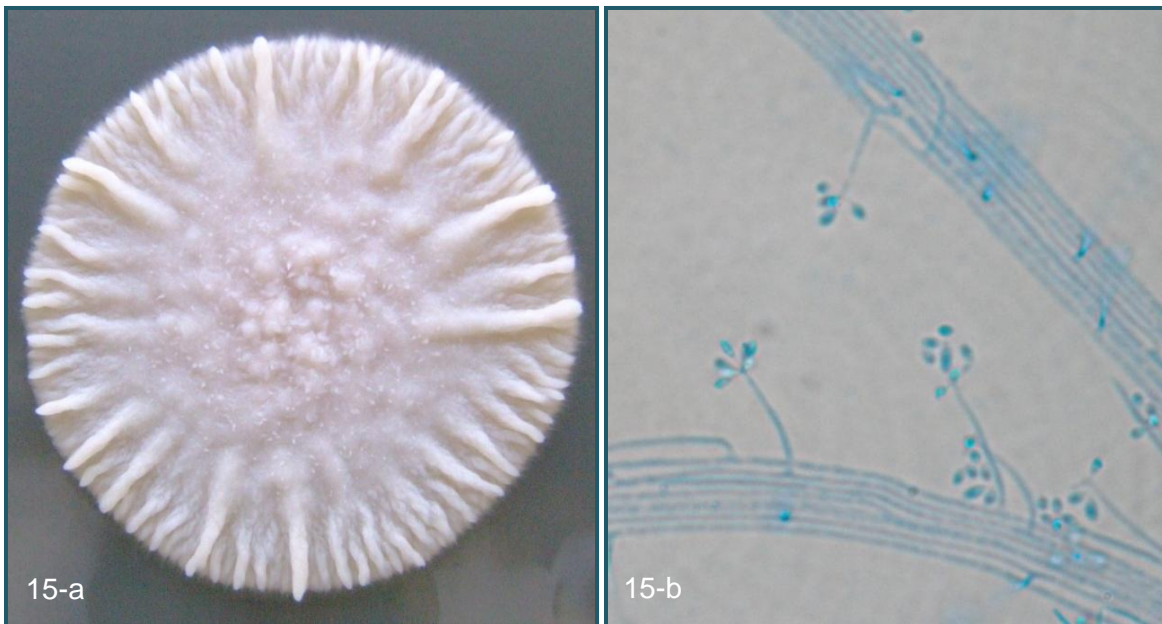


Figura 15-a Colonia blanca, vellosa, de aspecto grumoso en el centro y múltiples pliegues radiales. Figura 15-b Hifas dispuestas en haces, conidios ovoides hialinos en arreglo de flor (100x).

b) GRUPO 2: es el más numeroso y está formado por 8 aislamientos en los que se observan 3 características en común: colonias blancas, de aspecto veloso y opaco. Entre estos aislamientos existen diferencias en cuanto al aspecto de la colonia: cerebriforme, crateriforme umbilicada, plegada etc.

Aislado 27

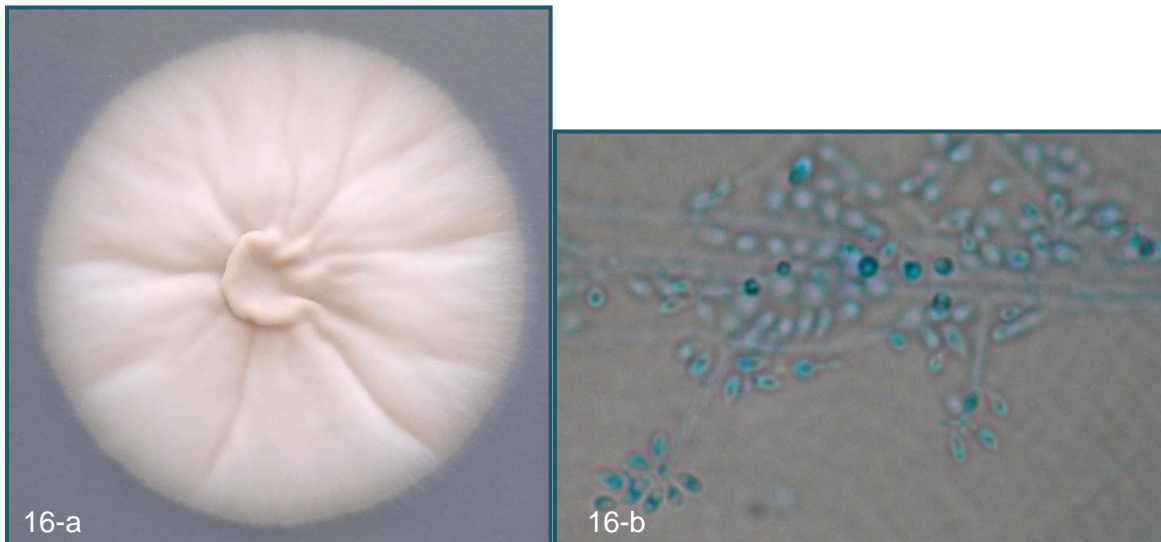


Figura 16-a Colonia blanca, vellosa, opaca, umbilicada con pliegues radiales. Figura 16-b Conidios hialinos ovoides en arreglo de flor (100x).

Aislado 20

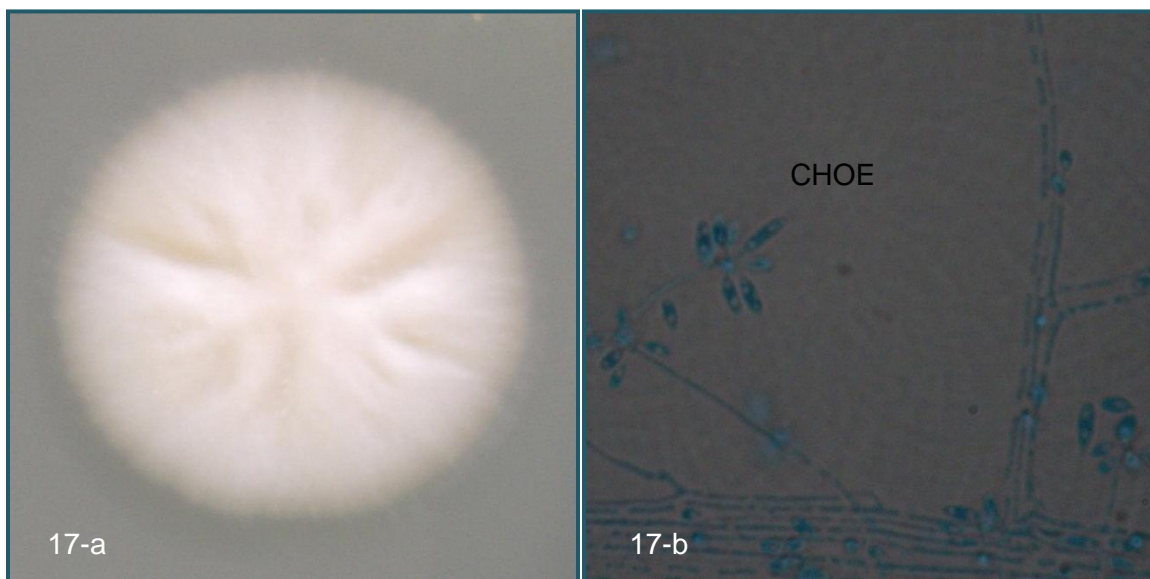


Figura 17-a Colonia blanca, vellosa, opaca con elevación central y pliegues. Figura 17-b Conidios hialinos alargados algunos con arreglo de flor otros solitarios, e hifas arregladas en haces. (100x)

Aislado 24



Figura 18-a Colonia blanca, vellosa, opaca, con elevación central. Figura 18-b Conidios hialinos globosos, algunos pigmentados. Hifas dispersas (40x).

Aislado 9

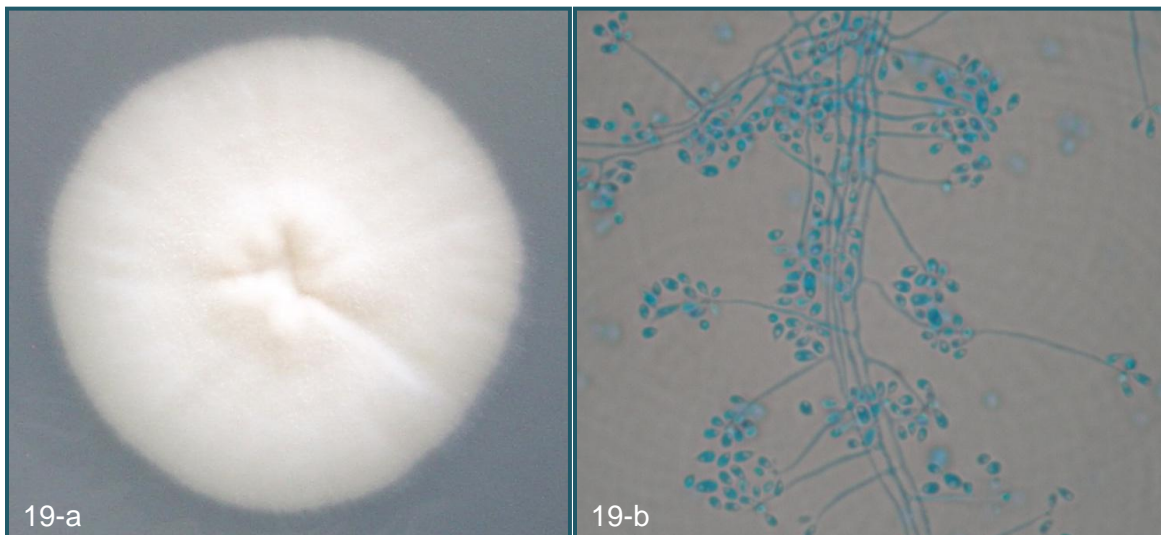


Figura 19-a Colonia blanca, vellosa, opaca, crateriforme. Figura 19-b Conidios hialinos ovoide con arreglo en flor; hifas en haces más o menos dispersos (100x).

Aislado 23

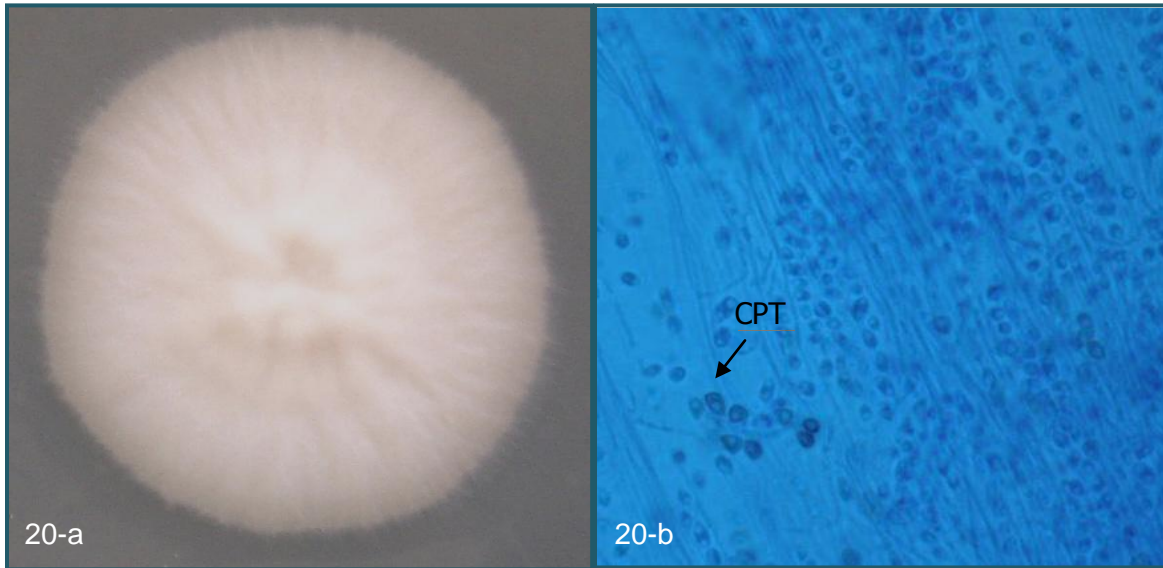


Figura 20-a Colonia blanca, vellosa, opaca, crateriforme. Figura 20-b Conidios triangulares pigmentados (CTP), que surgen directamente de la hifa; también se observan conidios ovoides pigmentados (100x).

Aislado 11

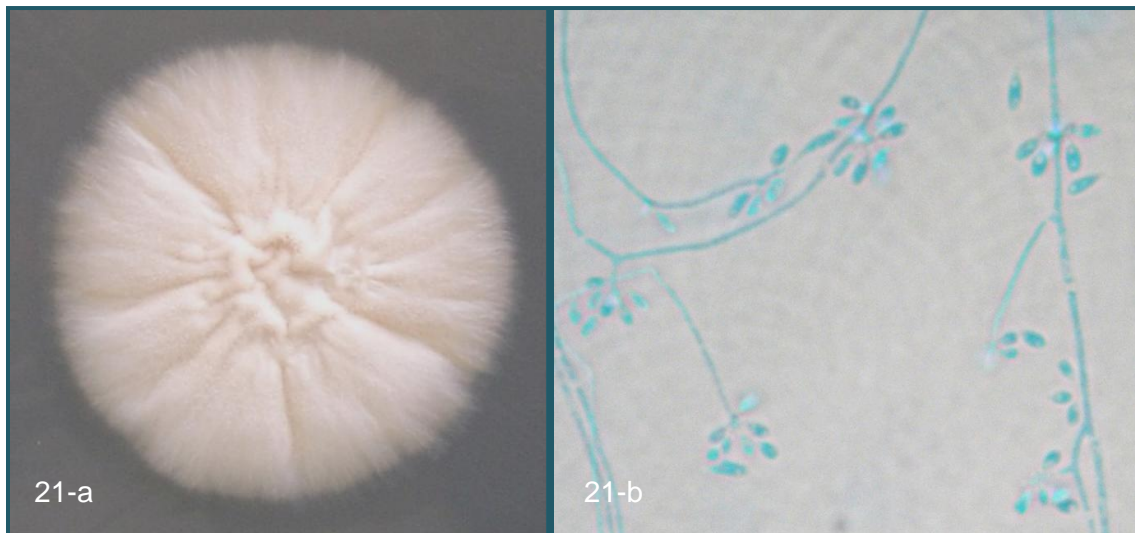


Figura 21-a Colonia blanca, opaca, vellosa, crateriforme, con pliegues radiales. Figura 21-b Conidios hialinos ovoides y algunos alargados, en arreglo de flor (100x).

Aislado 2

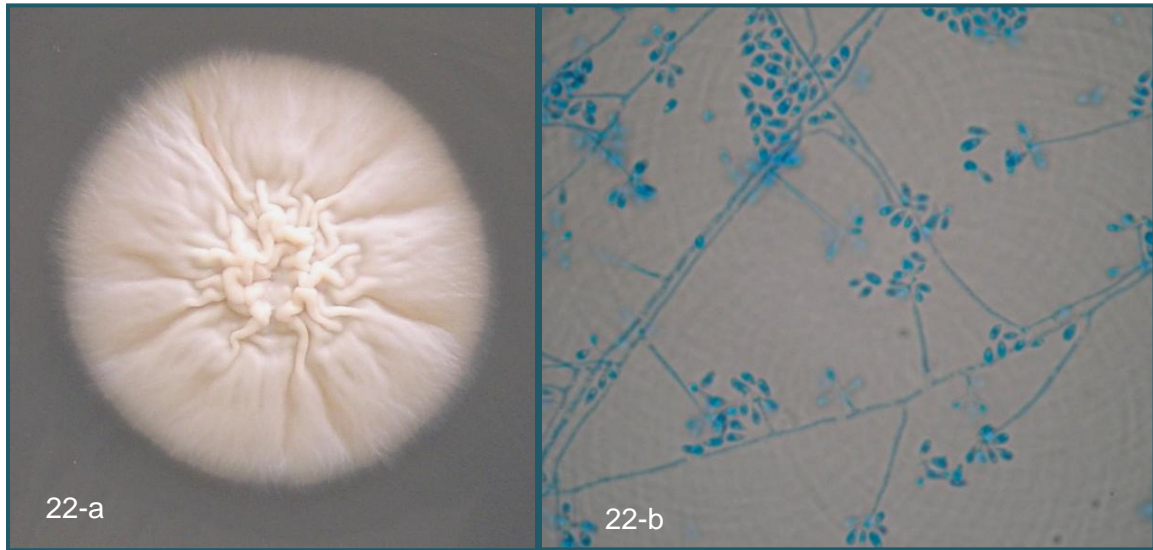


Figura 22-a Colonia blanca, vellosa, opaca, de aspecto cerebriforme en el centro. Figura 22-b Conidios ovoides hialinos en arreglo de flor; hifas aisladas (100x).

Aislado 5

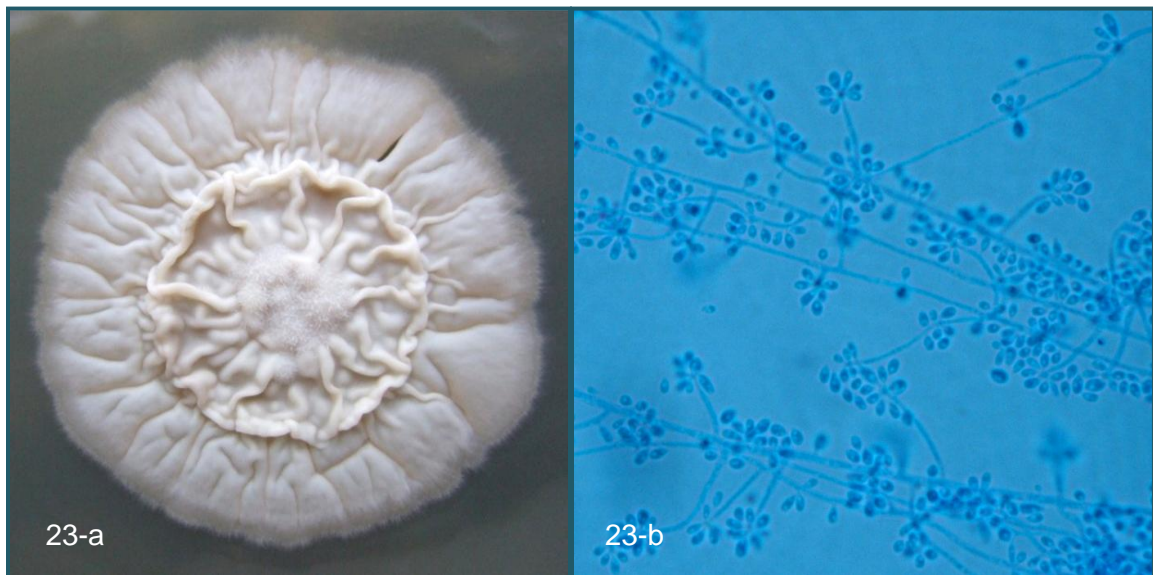


Figura 23-a Colonia blanca, vellosa en el centro y membranosa en la periferia, opaca, con elevación central y pliegues radiales. Figura 23-b Conidios ovoides hialinos con arreglo en flor (100x).

c) **GRUPO 3:** incluye solo a 2 aislamientos, en donde las colonias son blancas y algodonosas.

Aislado 4

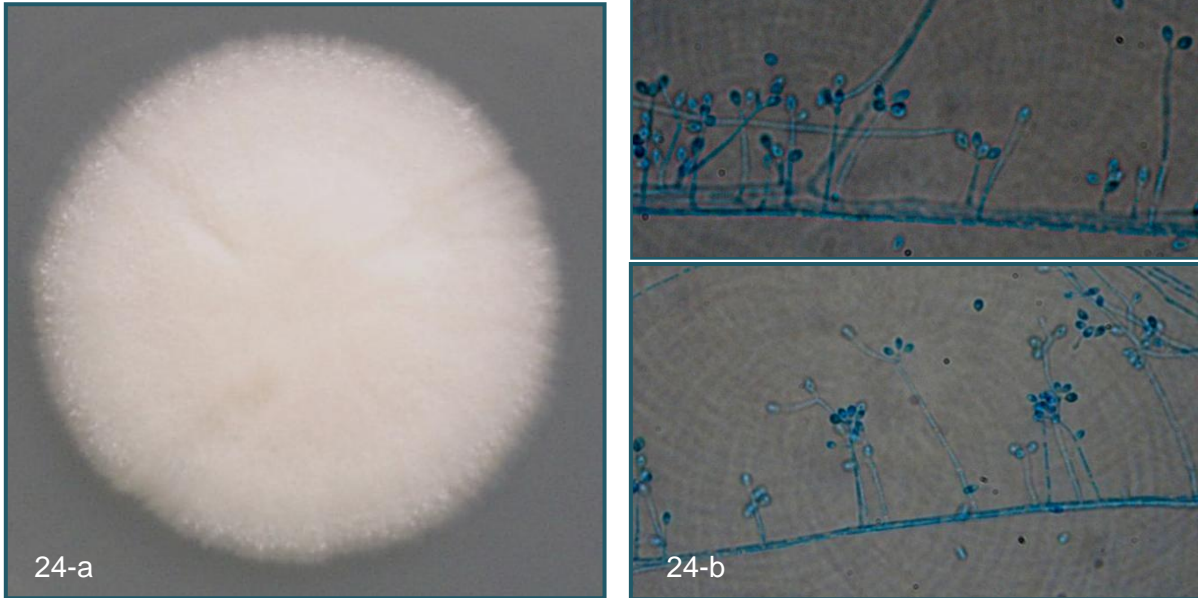


Figura 24-a Colonia blanca algodonosa. Figura 24-b Conidios ovoides hialinos, hifas aisladas y conidióforos secundarios (100x).

Aislado 15



Figura 25-a Colonia blanca, algodonosa. Figura 25-b Conidios alargados cilíndricos, que se originan a partir de un conidióforo largo, perpendicular a la hifa (100x). Morfología microscópica propia del género *Acremonium* sp.

d) **GRUPO 4:** colonias blancas aterciopeladas.

Aislado 13

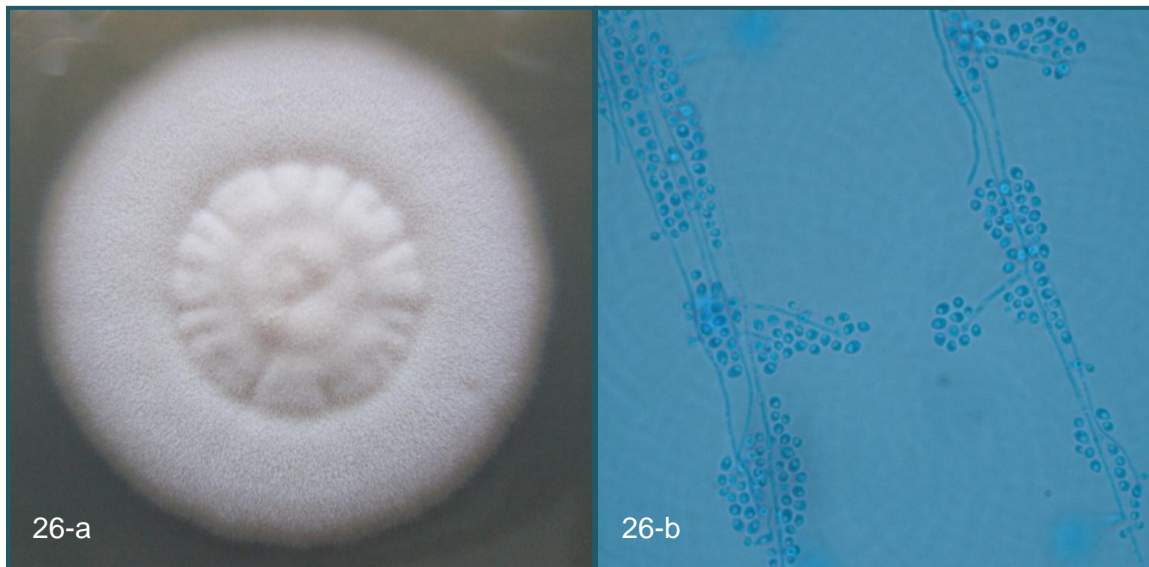


Figura 26-a Colonia blanca, aterciopelada con elevación central. Figura 26-b Conidios hialinos globosos, en cúmulos, otros conidios que emergen directo de la hifa; hifas aisladas (Objetivo 100x).

Aislado 16

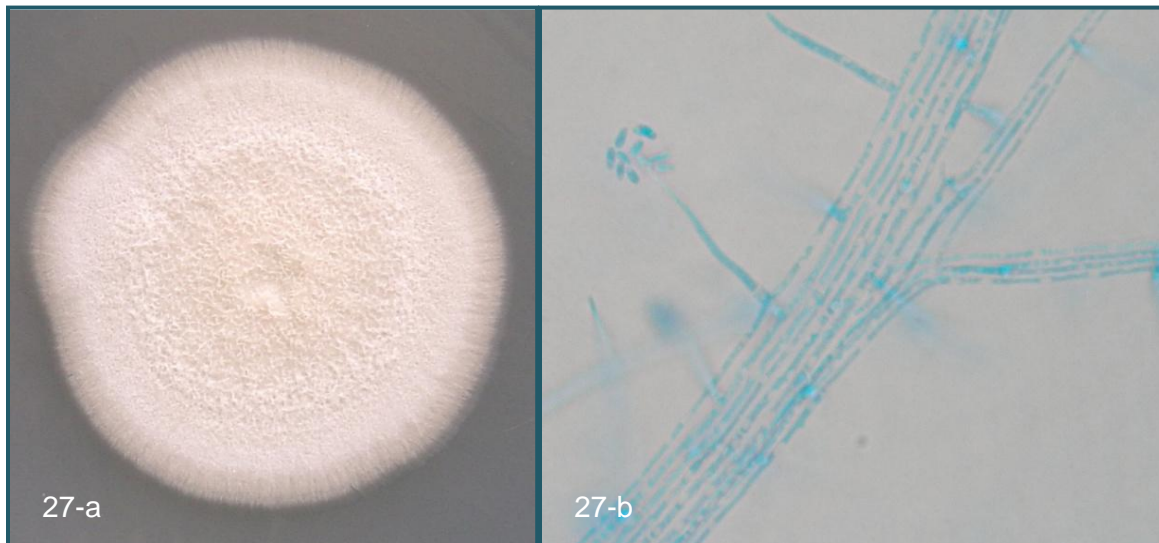


Figura 27-a Colonia blanca aterciopelada. Figura 27-b Hifas en haces; conidios hialinos cilíndricos, dispuestos en grupo que se originan a partir de un conidióforo largo (100x). Morfología microscópica característica del género *Acremonium* sp.

e) **GRUPO 5** Colonia color beige.

Aislado 8

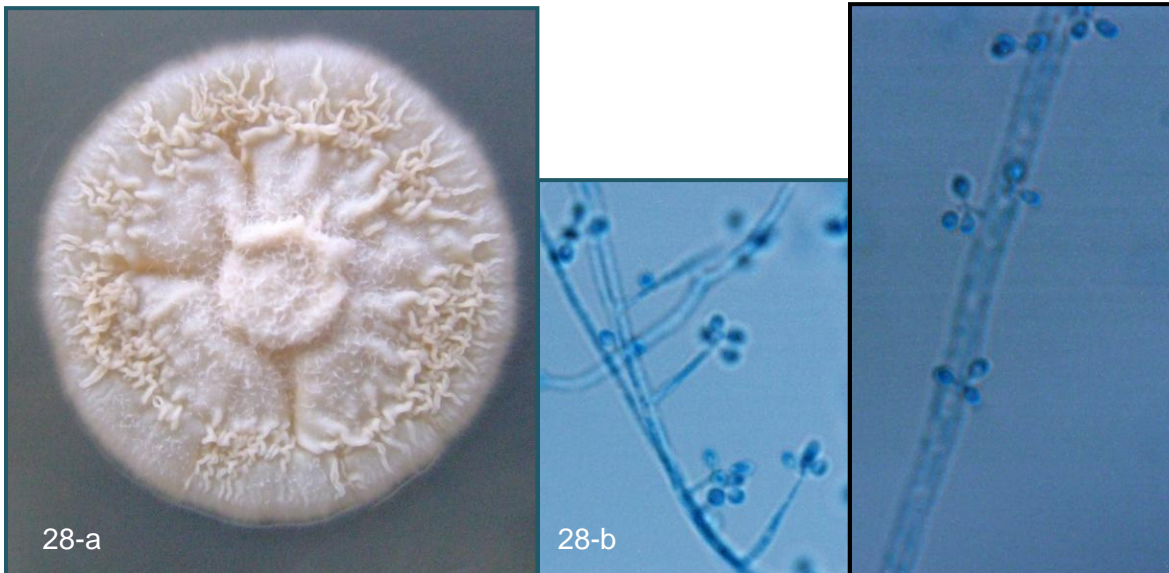


Figura 28-a Colonia beige, vellosa, umbilicada con múltiples pliegues radiales. Figura 28-b Conidios ovoides hialinos en arreglo de flor, hifas agrupadas en haces (100x).

f) **GRUPO 6:** El sexto y último grupo está formado por colonias de coloración mixta con tonos marrón claro y oscuro, blanco y beige. Entre este grupo se observan muchas diferencias morfológicas macroscópicas.

Aislado 10

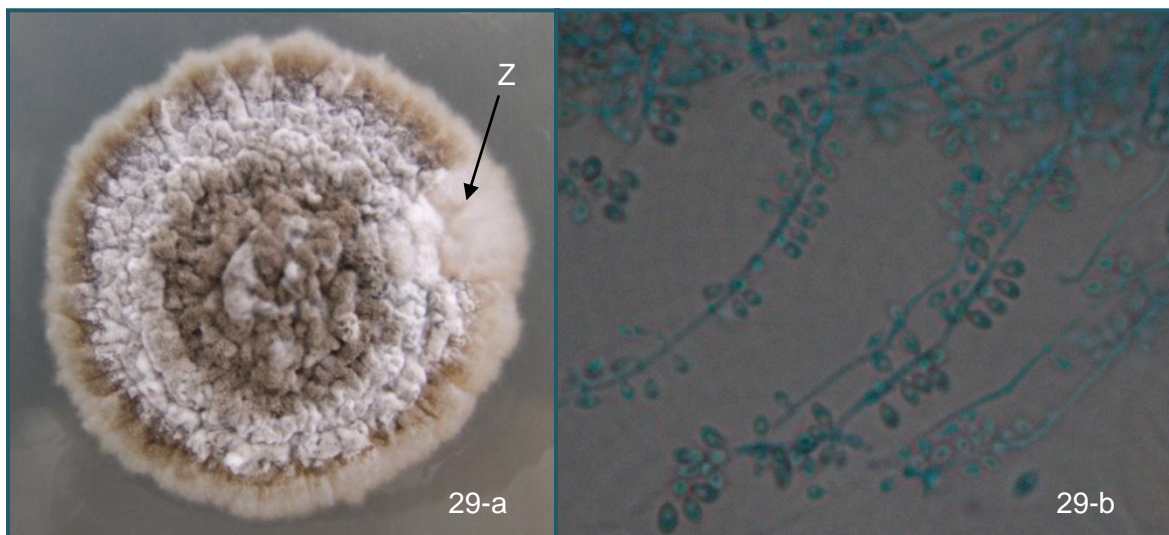


Figura 29-a Colonia de aspecto mixto entre vellosa y pulverulenta, color marrón al centro, seguido por una zona blanca y periferia marrón claro. Se observa también un fenómeno denominado (Z) zonación. Figura 29-b Conidios ovoides con tendencia a ser alargados, pigmentados y originados directamente de la hifa (100x).

Aislado 17

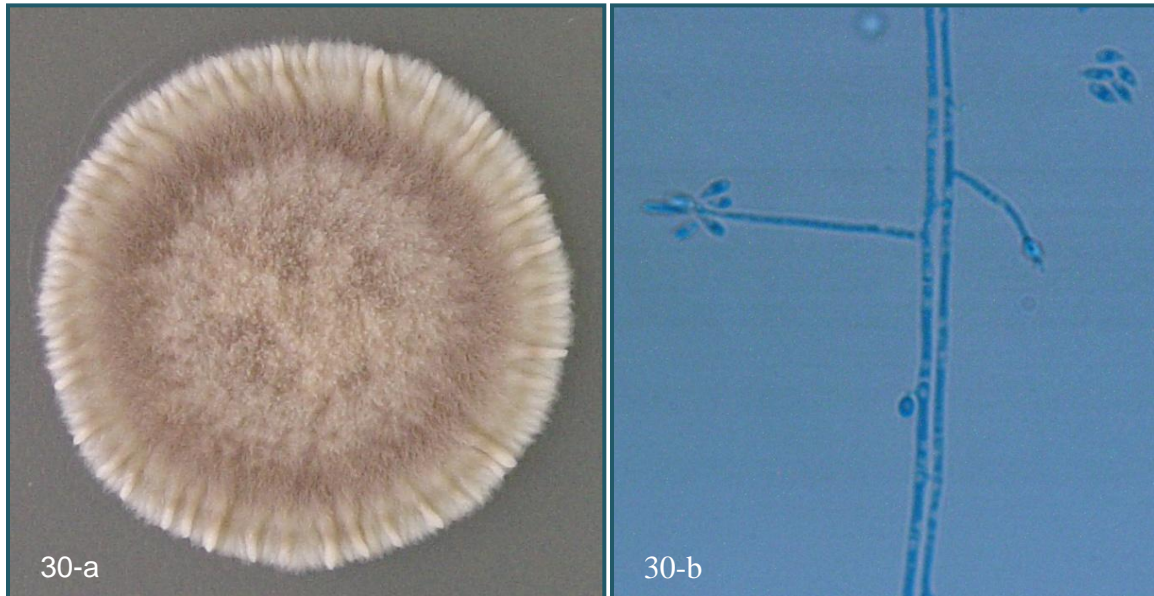


Figura 30-a Colonia marrón claro, aspecto veloso, húmedo y numerosos pliegues en el borde. Figura 30-b Conidios ovoides en arreglo de flor; se observan claramente los septos de las hifas (100x).

Aislado 22

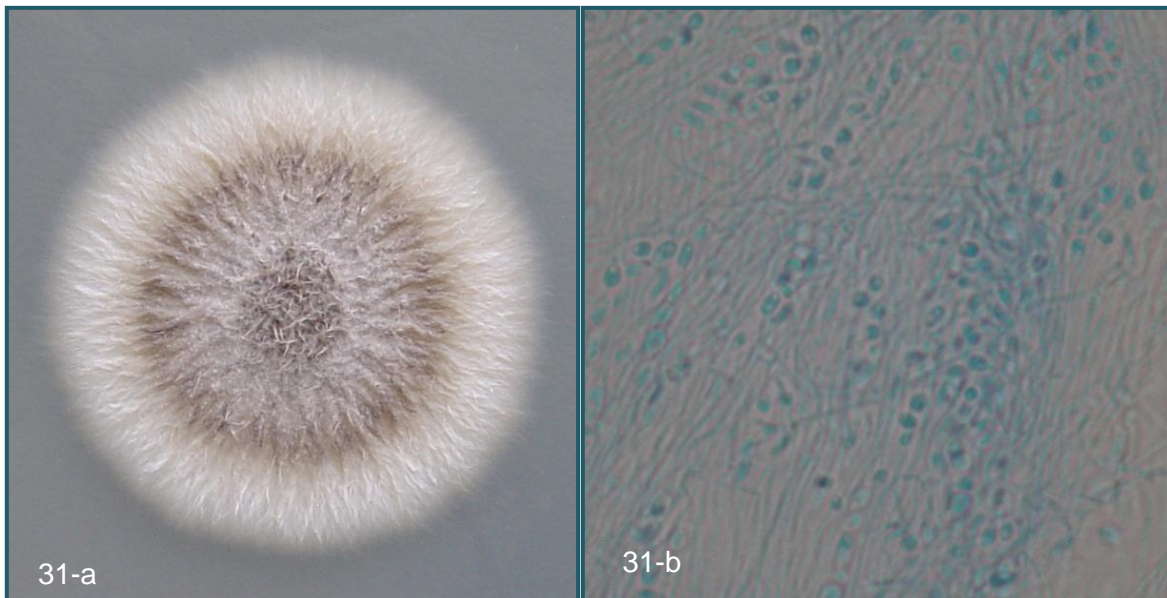


Figura 31-a Colonia vellosa, de aspecto húmedo, marrón en el centro y blanca en la periferia. Figura 31-b Se observan hifas dispersas y conidios ovoides con tendencia a globosos, hialinos (100x).

Aislado 26

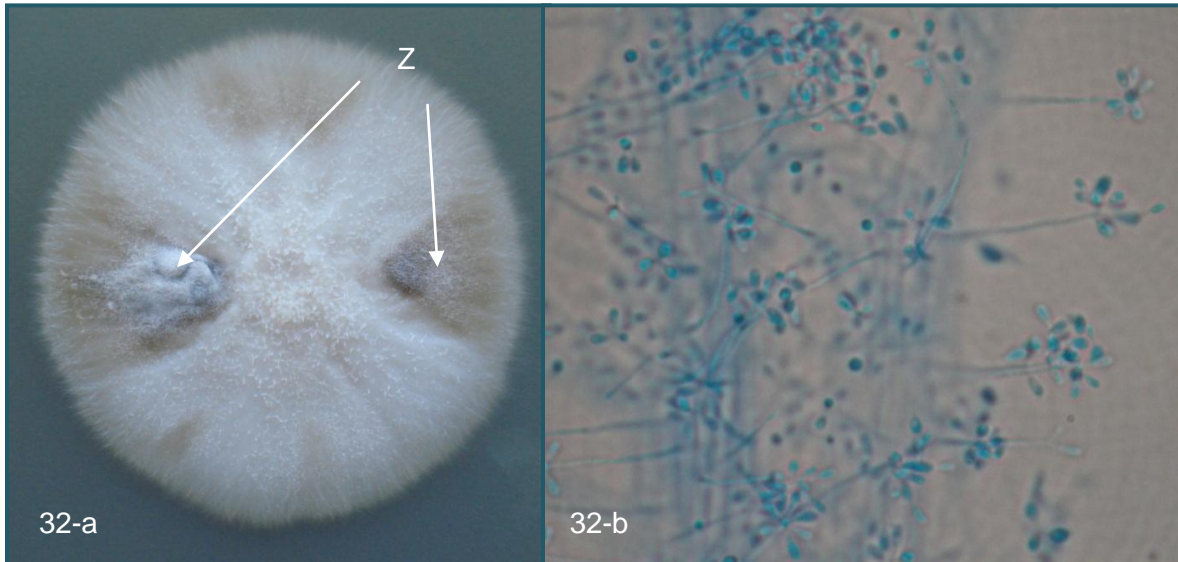


Figura 32-a Colonia vellosa, húmeda, blanca con zonas de color marrón claro. Se observa también fenómeno de zonación. Figura 32-b Conidios hialinos ovoides en arreglo de flor; hifas en haces (100x).

Aislado 3

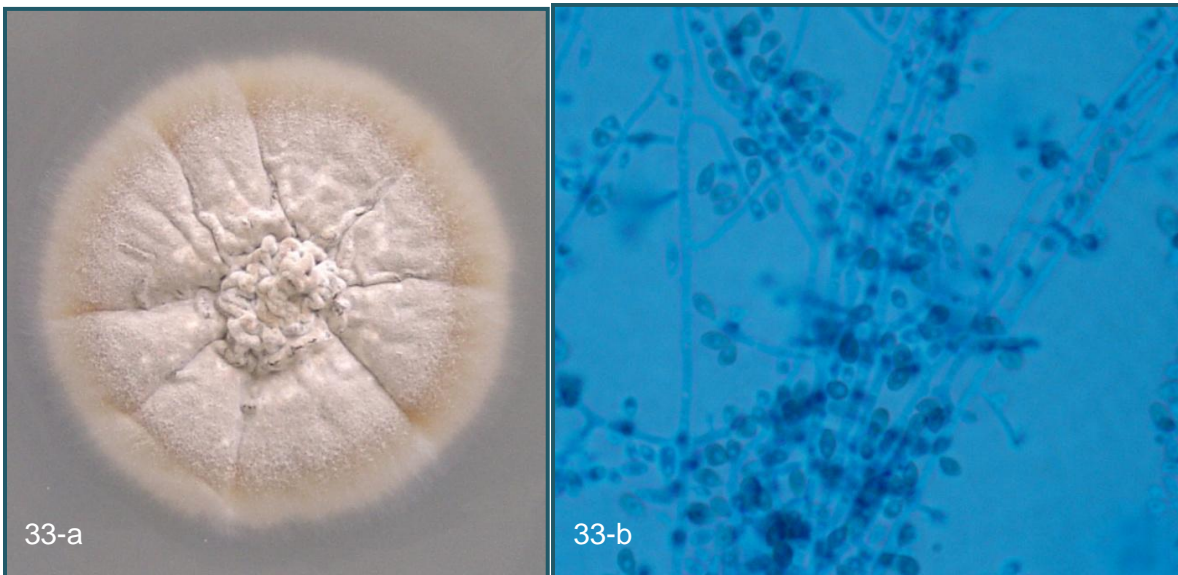


Figura 33-a Colonia aterciopelada de color marrón claro, cerebriforme en el centro con pliegues radiales. Figura 33-b Se observan conidios, ovoides hialinos y pigmentados, triangulares pigmentados, que surgen directamente de la hifa y de conidióforos de diferentes tamaños (100x).

Aislado 6

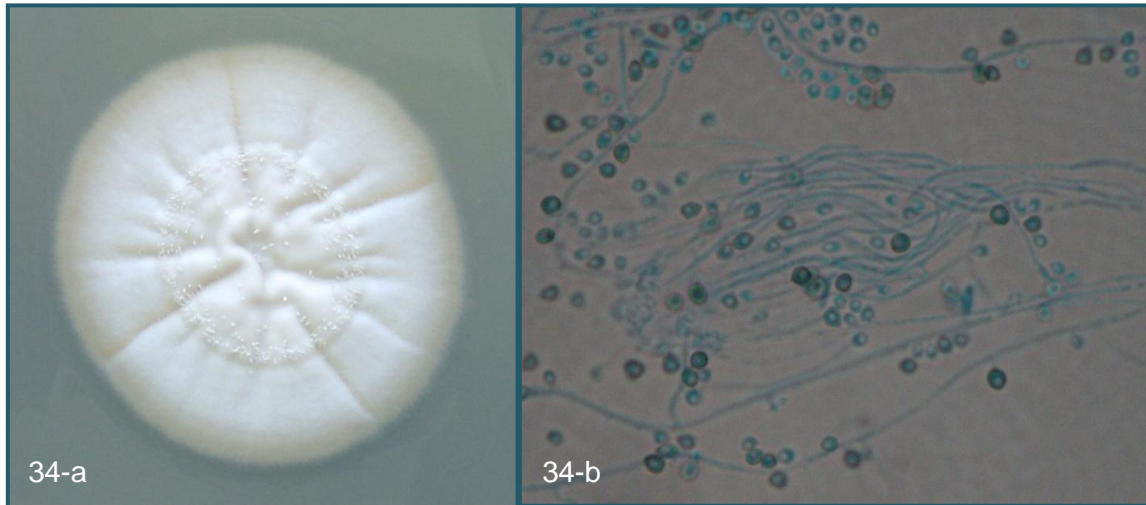


Figura 34-a Colonia aterciopelada, de predominio blanco y borde marrón claro, tiene una elevación central con aspecto vellosa y pliegues radiales. Figura 34-b Conidios globosos y triangulares pigmentados, algunos conidios globosos hialinos (100x).

Aislado 25

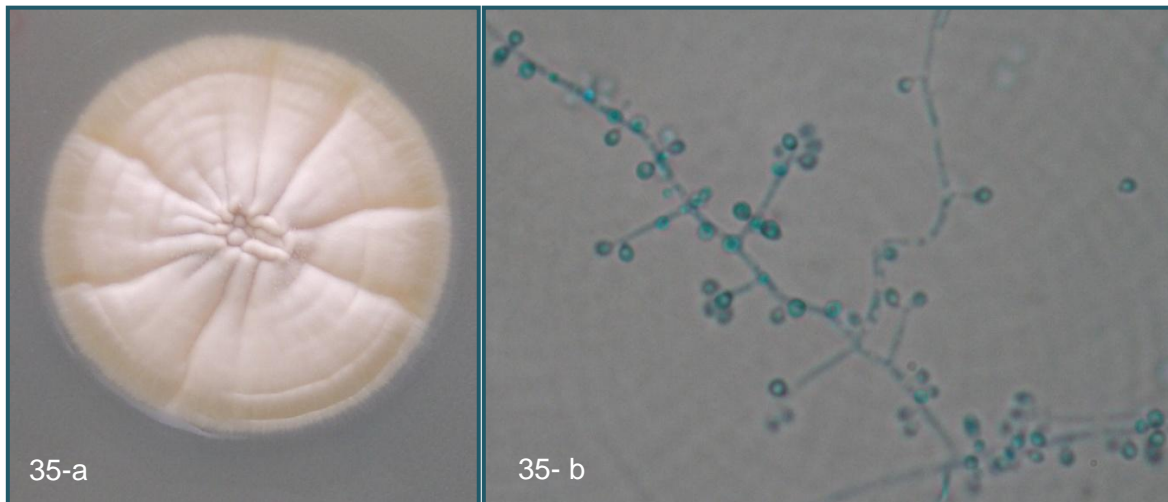


Figura 35-a Único aislamiento que presentó aspecto glabro, crateriforme, con algunos pliegues radiales de color marrón claro y periferia más oscura. Figura 35-b Hifa hialina que presenta múltiples conidióforos perpendiculares, que dan origen a conidios ovoides hialinos y algunos pigmentados (100x).

De acuerdo al color de la colonia, los aislados fueron separados en dos grupos: aislados blancos y aislados pigmentados. En las tablas 3 y 4 se describen los detalles de la morfología micelial macro y microscópica a los 14 días de incubación a TA en SS y a los 3 días de incubación TA en SS respectivamente, de aislamientos macroscópicamente blancos (ver tabla 3) y pigmentados (ver tabla 4), los datos de la morfología microscópica corresponden a 10 campos seleccionados al azar. Debido a que el registro fotográfico solo ilustra un campo observado, carece de algunas características reportadas en el cuadro.

7.1.1 Características morfológicas generales de los aislados albinos

De los 26 aislados problema, se observó un predominio de colonias blancas con un 65% (17 aislados); dentro de este grupo, 13 colonias presentaron textura vellosa, 2 algodonosa y 2 aterciopelada. El grupo externo, tanto la cepa ATCC como el aislado de Francia (numero 19) formaron colonias blancas y presentaron textura vellosa

Respecto a la morfología microscópica de los aislados blancos, 9 de 17 presentaron un predominio de hifas en haces o agregados. El tamaño promedio de los conidióforos fue de 14 μm (con una desviación estándar de 8.3 μm); en general los aislados problema formaron un conidióforo más pequeño que la cepa tipo ($\leq 36 \mu\text{m}$). Los aislados 1 y 23 presentaron los conidióforos más cortos, de 3 y 5 μm respectivamente. Con excepción de los aislados 15 y 16, todos formaron conidios con arreglo en flor por mecanismo de conidiación simpodial. La forma de conidios que se presentó con más frecuencia dentro de este grupo fue la ovoide, seguida por la globosa, solo dos aislamientos presentaron conidios ovoides alargados, dos cilíndricos (aislados 15 y 16), y dos triangulares (aislado 23 y 24). Todos los aislados presentaron conidios hialinos, con excepción de los aislados 23 y 27 que presentaron algunos conidios triangulares y ovoides pigmentados. El tamaño promedio de los conidios ovoides fue de 3.26 (± 0.57) X 1.9 (± 0.35) μm , el de los conidios globosos fue de 1.9 (± 0.35) X 1.9 (± 0.35) μm , los conidios ovoides alargados 3.36 (± 0.9) X 1.69 (± 0.21) μm , conidios cilíndricos 4.16 (± 0.36) X 0.72 (± 0.19) μm y los triangulares 2.9 (± 0.32) X 2 μm . Los aislados 20 y 23 presentaron los conidios más largos y los aislados 21, 19, 7, 27 y 13 presentaron los conidios más pequeños, y estos estuvieron relacionados con la forma globosa. En seis aislados se observó la formación de conidios sésiles, formándose directamente de la hifa.

7.1.2 Características morfológicas generales de los aislados pigmentados

El número de aislados pigmentados correspondió al 34% (9 aislados). La mayoría con aspecto veloso, en este grupo se observaron los únicos aislamientos con textura glabra (aislado 25) y con textura entre vellosa y pulverulenta (aislado 10). Dos aislamientos presentaron fenómeno de zonación (aislados 10 y 26).

Microscópicamente, la mayoría presentó hifas en haces. El tamaño promedio de los conidióforos fue de $11.18 (\pm 5.2) \mu\text{m}$ el aislamiento 26 presentó los conidióforos más largos con $14 \mu\text{m}$ y el aislado 12 presentó los conidióforos más cortos con $5 \mu\text{m}$. La gran mayoría de aislados de este grupo formó conidios simpodiales, los aislados 10, 17 y 6 además formaron conidios directamente de la hifa. Este grupo presentó 3 formas conidiales, pero la mayoría de los aislamientos tuvo más de una forma conidial. El tamaño promedio de los conidios ovoides fue de $3.24 (\pm .76) \times 1.93 (\pm .33) \mu\text{m}$, los globosos $1.89 (\pm .26) \times 1.89 (\pm .26) \mu\text{m}$ y los triangulares $3.47 (\pm .59) \times 2 \mu\text{m}$. A pesar del color de la colonia, 4 de los 9 aislados (8, 12, 22 y 26) no mostraron pigmento evidente en sus conidios.

Tabla 3. Morfología micelial macro y microscópica en aislados blancos de *S. schenckii*.

No. de aislado estudio	Morfología colonial macroscópica	conidióforos en hifas fértiles	Tamaño del conidióforo (µm) (promedio ± desviación estándar).	Arreglo de conidios	Forma y tamaño de conidios: ancho X largo (µm) ± desviación estándar
*ATTC	Blanca, vellosa, húmeda.	A	36 ± 4.3	S	CHO 1.5±.14 X 3.3±.22
*14	Blanca, vellosa, húmeda.	H	13	S	CHO 2.2±.21 X 3.4±.23
*21	Blanca, vellosa, húmeda.	H	11.3 ± 5.2	S	CHO 1.7±.2 X 3.9±.2 CHG 1.8±.21 X 1.8±.21
*1	Blanca, vellosa húmeda, con pliegues radiales.	H/A	3 ± 1	S /DH	CHO 2.4±.43 X 2.9±.48
*7	Blanca, vellosa húmeda, con elevación central.	H 60%, A 40%	10 ± 3.1	S	CHO 2±.12 X 3±.12 CHG 2 X 2
*18	Blanca, vellosa, húmeda, con elevaciones centrales y pliegues en los bordes.	H	13.8 ± 1	S	CHO 2 X 3.5±.47
*19	Blanca, vellosa, opaca, membranosa, umbilicada y bordes irregulares.	H	14 ± 5.6	S /DH	CHG 1.84±.2 X 1.84±.2
*27	Blanca, vellosa, opaca, umbilicada, con pliegues radiales.	A	17 ± 1.6	S	CHO/CPO 1.5±.5 X 4 CHG 2 X 2
*20	Blanca, vellosa, opaca con algunos pliegues radiales.	H	13 ± 5.4	S y DH	CHO 1.8±.26 X 3±.47 CHOA 2.2 ± .5 X 6
*24	Blanca, vellosa, opaca con elevación central.	H 60%, A 40%.	8 ± 3.7	S y DH	CHO 1.6 X 3.2±1.1 CHG 2 X 2 CPT 2 X 3
*9	Blanca, vellosa, opaca, crateriforme.	A	19.6 ± 4.7	S	CHO 1.8±.19 X 3.4±.61
*23	Blanca, vellosa, opaca, crateriforme.	H	5 ± 4	S y DH	CHO/CPO 2 X 3±.34 CHOA 1.6 X 6 CPT 2 X 3±.34
*11	Blanca, vellosa, opaca muy plegada.	A	22.6 ± 4.1	S	CHO 2 X 2.8±.32
*2	Blanca vellosa, opaca, al centro cerebriforme.	A	9 ± 3	S	CHO 1.8±.16 X 2.4±.18
*5	Blanca, vellosa, opaca, centro elevado y plegado.	A	12.5 ± 1.5	S	CHO 2.1±.16 X 3.75±.36
*4	Blanca, algodonosa convexa.	A/ H	30 ± 3.4	S y DH	CHO 1.6±.09 X 3.2±.32
*15	Blanca algodonosa convexa.	A	20x1	En grupos	CHC.72±.18 X 4.16±.36
*13	Blanca aterciopelada con elevación central	A	12 ± 1.4	S	CHO 2.2±.14 X 3±.37 CHG 2±.24 X 2±.24
*16	Blanca aterciopelada	H	32 ± 2.9	En grupos	CHC 1.4±.2 X 5±1.4

*grupo 1, grupo 2, grupo 3, grupo 4.

Abreviaturas tabla 3

Desarrollo de conidióforos en hifas fértiles	Arreglo de conidios: S/ DH	Forma de conidios: CHO, CHG, CHOE, CPO, CPG, CPT y promedio de tamaño ancho X largo (µm) ± desviación estándar
A- Hifas fértiles aisladas. H- Hifas fértiles en haz.	S- simpodial DH- directo de la hifa	CHO – conidio hialino ovoide. CHG – conidio hialino globoso. CHOA – conidio hialino ovoide alargado. CHC- conidios hialinos cilíndricos CPO – conidio pigmentado ovoide. CPG – conidio pigmentado globoso. CPT – conidio pigmentado triangular.

Tabla 4. Morfología micelial macro y microscópica en aislados pigmentados de *S. schenckii*.

No. aislado estudio	Morfología colonial macroscópica	Desarrollo de conidióforos en hifas fértiles: A / H.	Tamaño del conidióforo (μm) largo	Arreglo de conidios : S/DH	Forma de conidios: CHO, CHG,CHOE, CPO,CPG,CPT y promedio de tamaño ancho X largo (μm) \pm desviación estándar
8	Beige con elevación central muy plegada y vellosa.	H	12.6 \pm 4.6	S	CHO 2 X 2.8 \pm .48 CHG 2.05 \pm .1 X 2.05 \pm .1
*10	Pigmentación mixta, vellosa y pulverulenta, de aspecto cerebriforme.	A/H	13 \pm 7	S y DH	CPO 1.75 \pm .19 X 2.56 \pm .74
*12	Gris claro al centro y marrón claro en los bordes, aterciopelada, umbilicada, con pliegues radiales.	H	5 \pm .7	S	CHO 3 \pm .19 X 2 \pm .09
*17	Pigmentación mixta, vellosa, húmeda, numerosos pliegues en el borde.	H	12 \pm 4.8	S y DH	CHO/CPO 2 \pm .1 X 3.2 \pm .21 CHG 2.4 X 2.4
*22	Vellosa, de aspecto húmedo, marrón en el centro y blanca en los bordes.	Hifas entrelazadas		S	CHO 2 X 4 \pm .21
*26	Vellosa, húmeda, con dos regiones en la colonia con morfología distinta al resto.	H	14.6 \pm 5.16	S	CHO 1.7 \pm .48 X 3.7 \pm .94
*3	Aterciopelada, pigmentación mixta al centro se observa una morfología cerebriforme y pliegues radiales.	H/A	10.5 \pm 4.1	S	CHG 1.8 \pm .2 X 1.8 \pm .2 CHO 1.8 \pm .14 X 2.16 \pm .16 CPT 2 X 3
*6	Color blanco predomina, solo el borde es marrón claro, aterciopelada, elevación central con aspecto vellosa y pliegues radiales.	A	7.5 \pm 3.7	S y DH	CHG 1.6 X 1.6 CPG 1.6 X 1.6 CPT 2.4 \pm .8 X 3.6 \pm .4
*25	Color blanco predomina, solo el borde presenta una coloración marrón claro. glabra, crateriforme, se observan algunos pliegues radiales.	A	12.5 \pm 4.5	S	CHO 2 X 3.74 \pm .59 CPO 2 X 3.74 \pm .59 CHG 2 X 2

grupo 5, *grupo 6.

Desarrollo de conidióforos en hifas fértiles	Arreglo de conidios: S/ DH	Forma de conidios: CHO, CHG,CHOE, CPO,CPG,CPT y promedio de tamaño ancho X largo (μm) \pm desviación estándar
A- Hifas fértiles aisladas. H- Hifas fértiles en haz.	S- simpodial DH- directo de la hifa	CHO – conidio hialino ovoide. CHG – conidio hialino globoso. CHOA – conidio hialino ovoide alargado. CHC-conidios hialinos cilíndricos CPO – conidio pigmentado ovoide. CPG – conidio pigmentado globoso. CPT – conidio pigmentado triangular.

7.2 Transformación de la fase micelial a la fase levaduriforme

7.2.1 Morfología microscópica de la fase levaduriforme

En este procedimiento, 26 de los 28 aislados revirtieron a fase levaduriforme cuando se les sometió a las condiciones previamente descritas para este fin. En los 26 aislamientos hubo transformación a fase levaduriforme a las 120 horas y se observaron distintas morfologías incluso para un mismo aislamiento. A continuación se muestran algunas fotografías de la morfología microscópica, para mejor apreciación se utilizó azul de algodón en las preparaciones:

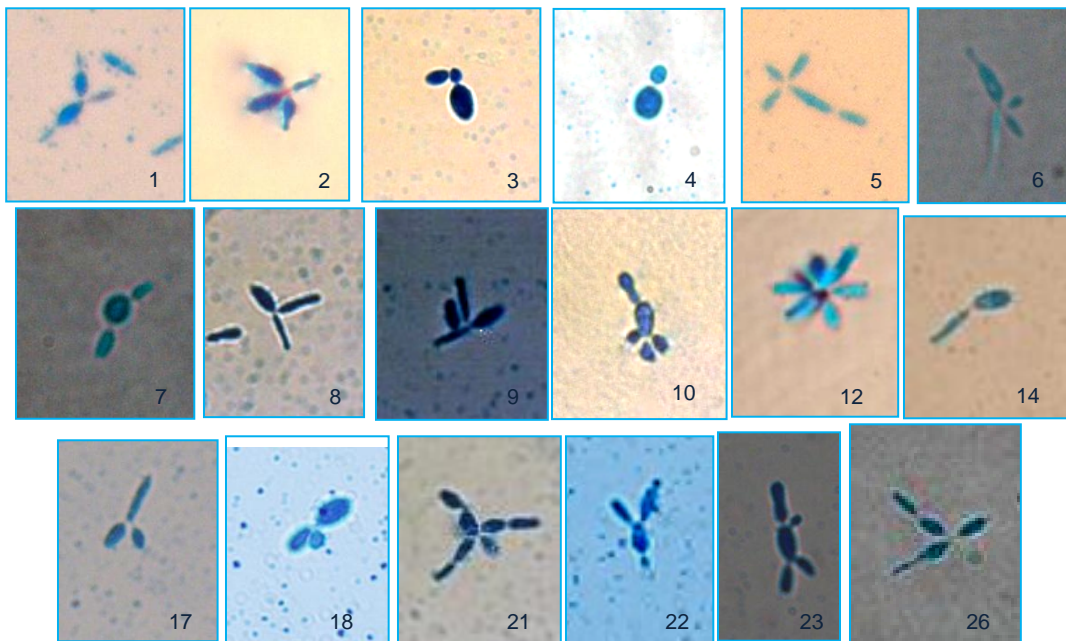


Figura 36. Morfología microscópica de la fase levaduriforme. El número de aislamiento se observa en la parte inferior derecha de cada figura. Los aislados 2, 3, 10, 14, 18, 21, 22, y 23 presentaron morfología ovoide uni, bi y multigemante. Los aislados 1, 6, 8, 9, 14, 17, 26 fusiformes con prolongaciones digitiformes, aislados 4 y 7 levaduras globosas. Aislado 5 levadura cilíndrica.

La morfología microscópica de la fase levaduriforme se caracterizó por levaduras ovoides y fusiformes en la mayoría, seguida por las formas globosas y las cilíndricas, las gemaciones fueron únicas, dobles y múltiples. Se observaron distintas formas de levadura dentro de un mismo aislamiento. El tamaño promedio de las formas ovoides y fusiformes fue de $2.36 (\pm 0.8) \times 4.5 (\pm 1.3) \mu\text{m}$, el tamaño promedio de las formas globosas, fue de un diámetro de $4 (\pm 0.7) \mu\text{m}$.

7.2.2 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme

Macroscópicamente se observó la típica morfología descrita; colonias color crema de aspecto cremoso, de superficie lisa o rugosa. En este estudio se observaron con mayor frecuencia las colonias con superficie rugosa, en la figura 37 se muestran algunas de las morfologías observadas.

Morfología macroscópica de la fase levaduriforme

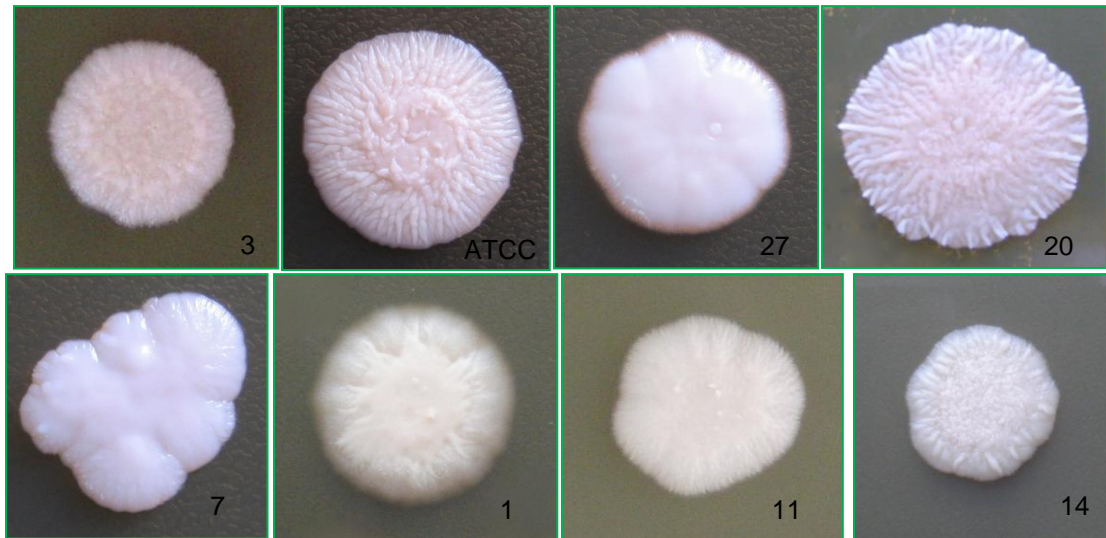


Figura 37. El número de aislamiento se observa en la parte inferior derecha, los aislados 7 y 27 presentan una superficie lisa, los demás aislamientos (3, 11, 20, 21, 24 y ATCC) exhiben una superficie rugosa, todos presentan una coloración crema.

7.3 Identificación molecular

7.3.1 Extracción de DNA

En las figuras 38 y 39, se muestra el DNA obtenido de 19 de los 26 aislados incluidos en este estudio, en las que se constata que el material nucléico es de alto peso molecular y de calidad adecuada para el estudio por PCR.

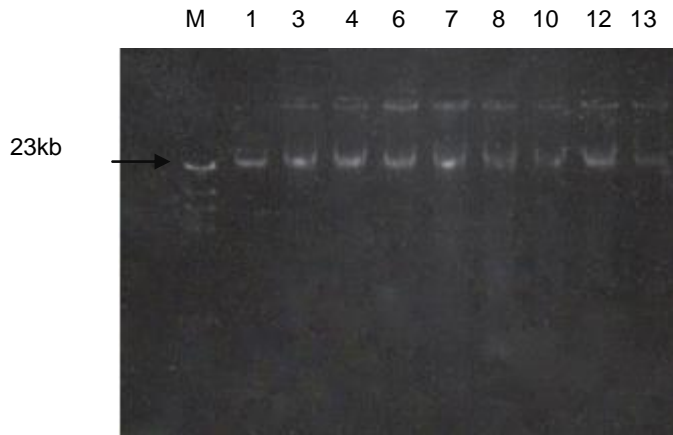


Figura 38

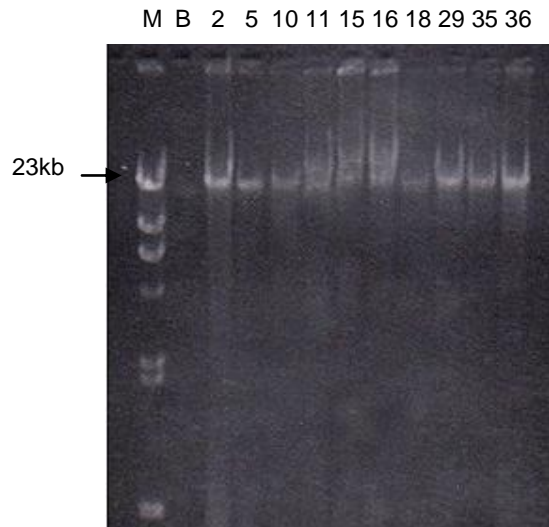


Figura 39

Figuras 38 y 39. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. (M) marcador de peso molecular λ DNA/Hind III Fragments. El número de cada pozo corresponde al número de aislado; se depositaron 3 μ l de cada producto de extracción.

7.3.2 Amplificación del dominio D1/D2 del gen 28S rDNA

La figura 40 muestra los productos de amplificación obtenidos de algunos aislados previamente considerados *S. schenckii* bajo las condiciones de PCR descritas en material y métodos, en donde se observa el fragmento de 600pb esperado.

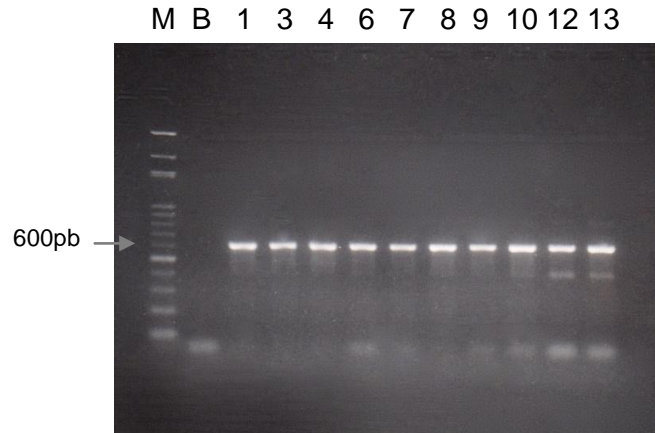


Figura 40

Figura 40. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. (M) marcador de peso molecular de 100 pb. Los números de cada pozo corresponden al número de aislado.

7.3.3 Purificación de los productos amplificados

Las figuras 41 y 42, muestran el producto de purificación obtenido de los fragmentos amplificados incluidos los mostrados en la figura 40. Se observa el fragmento de 600 pb de calidad y cantidad suficiente para su secuenciación.

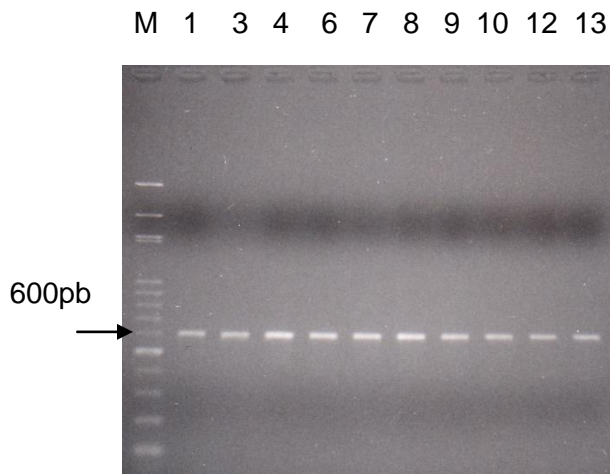


Figura. 41

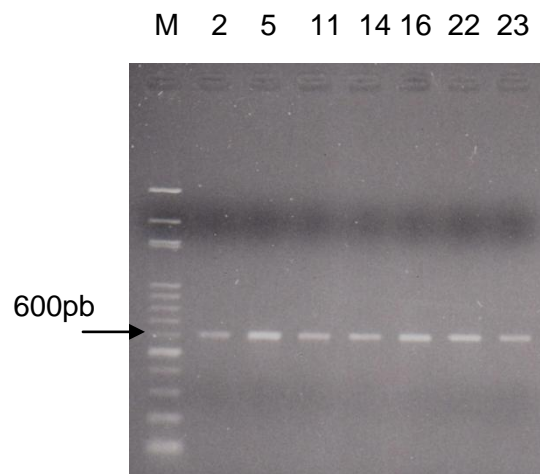


Figura. 42

Figuras 41 y 42. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb. Los números de cada pozo corresponden al número de aislado.

7.3.4 Alineamientos

De los 28 aislados (incluyendo la cepa de referencia ATCC y el aislado proveniente de Francia), después de ser editadas, analizadas y comparadas con la base de datos del NCBI, utilizando el programa Blastn, 26 mostraron un porcentaje de identidad del 100% compatibles con el gen rDNA 28S de *S. schenckii*.

A continuación se muestra un alineamiento realizado en el Blastn, en el que se observó un 100% de similitud entre el aislado 1 de este estudio (Query) contra el aislado con clave 10268 ATCC de origen clínico del gen Bank (Sbjct).

```
Query 1  AATTTGAAATCTGGCCCCCGGCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGATGCTTCTGGCGCGGC
60
|
Sbjct 35  AATTTGAAATCTGGCCCCCGGCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGATGCTTCTGGCGCGGC
94

Query 121 GCCGTCCGAGTTCCTTGGAACAGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGACGGACG
120
|
Sbjct 95  GCCGTCCGAGTTCCTTGGAACAGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGACGGACG
154

Query 181 CCTAGCCTCTACGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGG
180
|
Sbjct 155  CCTAGCCTCTACGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGG
214

Query 241 GAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTG
240
|
Sbjct 215  GAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTG
274

Query 301 ATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGG
300
|
Sbjct 275  ATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGG
334

Query 361 GAAGCGCCTGTGACCAGACTTTCGCCCCGCGGACCACCCGGCGTTCGCGCGGTGCACTC
360
|
Sbjct 335  GAAGCGCCTGTGACCAGACTTTCGCCCCGCGGACCACCCGGCGTTCGCGCGGTGCACTC
394

Query 420 TCGGGTGCAGGCCAGCATCGGTTCTCCAGGGGGACAAAGGCCGCGGGAACGTAGCTC
420
|
Sbjct 395  TCGGGTGCAGGCCAGCATCGGTTCTCCAGGGGGACAAAGGCCGCGGGAACGTAGCTC
454
```

```

Query 421 CTTTCGGGAGTGTATAGCCCGCGGCGGCATGCCCTGGGGGGACCGAGGACCGCGCTTCG
480
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 455 CTTTCGGGAGTGTATAGCCCGCGGCGGCATGCCCTGGGGGGACCGAGGACCGCGCTTCG
514

Query 481 GCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCAC 505
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 515 GCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCAC 539

```

Los aislados 17 y 19 correspondieron al gen rDNA 28S de *Acremonium sp* en un 100%. Estos resultados de secuenciación son compatibles con los datos morfológicos descritos previamente: La morfología microscópica mostró conidióforos largos similares a fiálides poco diferenciadas, conidios cilíndricos dispuestos en grupos y la ausencia de transformación a fase levaduriforme; sin embargo la morfología macroscópica fue muy similar a los aislados de *S. schenckii*.

En seguida se observa el alineamiento del aislado 15 de este estudio (Query) contra el aislado con clave del geneBank de K5225-6-1 (Sbjct) que corresponde a *Acremonium sp*.

```

Query 1 CAAATTTGAAATCTGGCCGCAAGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAG
60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 73 CAAATTTGAAATCTGGCCGCAAGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAG
132

Query 61 GTGCC TTCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTAGGA
120
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 133 GTGCC TTCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTAGGA
192

Query 121 CCACCAAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAA
180
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 193 CCACCAAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAA
252

Query 181 TGGGAGGTGTACGCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGA
240
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 253 TGGGAGGTGTACGCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGA
312

```

```

sQuery 241 GTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
300
      |
Sbjct 313 GTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
372

Query 301 AGGGAAGCATTTCATGACCAGACTTGGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTCCTCGCCGGTGCA
360
      |
Sbjct 373 AGGGAAGCATTTCATGACCAGACTTGGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTCCTCGCCGGTGCA
432

Query 361 CTCTGCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTTGCCCCGGGGATAAAGGCGGCGGGAATGTGGC
420
      |
Sbjct 433 CTCTGCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTTGCCCCGGGGATAAAGGCGGCGGGAATGTGGC
492

Query 421 TCCCTTCGGGGAGTGTATAGCCCGTCGTGTAATGCCCTGGGGCGGACTGAGGAACGCGC
480
      |
Sbjct 493 TCCCTTCGGGGAGTGTATAGCCCGTCGTGTAATGCCCTGGGGCGGACTGAGGAACGCGC
552

Query 481 TTCGGCACGGATGCTGGCGT 500
      |
Sbjct 553 TTCGGCACGGATGCTGGCGT 572

```

Finalmente para de evidenciar las diferencias entre las secuencias de los aislados pertenecientes a la especie *S. schenckii* y los aislados pertenecientes al género *Acremonium sp.* se muestra el alineamiento del aislado 1 perteneciente a la especie *S. schenckii* contra el aislado 15 *Acremonium sp.*, se observó un 87% de similitudes entre estas dos secuencias, las pares de bases subrayadas con amarillo son aquellas que mostraron disimilitud.

```

Query 3 AATTTGAAATCTGGCCGCAAAGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT
62
      |
Sbjct 1 AATTTGAAATCTGGCCCCCGGCCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGATGCTTCTGGCGCGGC
60

Query 63 GCCITCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTAA--GGAC
121
      |
Sbjct 61 GCCGTCCGAGTTCCCTGGAACAAGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTACGGAC
119

Query 122 CACCAAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAAT
181
      |
Sbjct 120 G-CCTTAGCCTCTACGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAAT
178

```

```

Query 182 GGGAGGTGTACGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAG
241
      |||||
Sbjct 179 GGGAGGTAAAATTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAG
238

Query 242 TGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAA
301
      |||||
Sbjct 239 TGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAA
298

Query 302 GGAAGCAT-TCATGACCAGACTTGGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTCCTCGCCGGTGCA
360
      |||||
Sbjct 299 GGAAGCGCCGTG-TGACCAGACTTGGCGCCCGCGGACCACTCCGGCGTTCCTCGCCGGTGCA
357

Query 361 CTCTGCCAGT-C-CAGGCCAGCATCAGTT-TGCCCGGGGGATAAAGGCCGCGGGAAATGT
417
      |||||
Sbjct 358 CTCTGCC-GTGC-CAGGCCAGCATCAGTTCT-CCCGGGGGACAAAGGCCGCGGGAAACGT
415

Query 418 GGCTCCCTTCGGGAGTGTATAGCCCGTCGT-GTAATGCC-TGGGGCGGACTGAGGAA
475
      |||||
Sbjct 416 AGCTCC-TTCGGG-AGTGTATAGCCCGCGGCGGCATGCCCTGGGG-GGACCGAGGAC
471

Query 476 CGCGCTTCGGCAGGATGCTGGCGT 500
      |||||
Sbjct 472 CGCGCTTCGGCAAGGATGCTGGCGT 496

```

8. DISCUSIÓN

En la identificación de un microorganismo patógeno como *Sporothrix schenckii*, diversos autores han demostrado que es complementario el estudio de la morfología y su genotipificación ^(26, 30, 37, 44); de igual manera en este estudio correlacionamos los datos morfológicos con los genéticos de aislados clínicos de esporotricosis mexicana.

En cuanto a las características morfológicas macroscópicas de la fase micelial, la mayoría de los aislados fueron no pigmentados. El resto presentaron pigmentaciones que van desde el marrón claro hasta el marrón oscuro y con excepción del aislamiento número 8 ninguno presentó homogeneidad en la pigmentación. Esto coincide con lo reportado por Vélez y colaboradores en 1996 ⁽⁵¹⁾, quienes observaron diversos patrones de pigmentación colonial en aislamientos clínicos de Colombia cultivados en agar malta y por otro lado el trabajo de Ramírez et al 2005 ⁽³⁹⁾, donde también reportan distintos patrones de pigmentación de aislamientos ambientales de *S. schenckii* cultivados en SS. Mesa et al en 2002 ⁽³⁰⁾, por el contrario encontraron una morfología colonial homogénea en agar papa dextrosa (APD) en aislamientos de Colombia, Guatemala y México, caracterizada inicialmente por una coloración beige y trascurridos 15 días, pigmentados. El estudio de Marimon et al 2007 ⁽²⁶⁾ también coincide con aislados que tornaron de blanco a marrón en el transcurso de 15 días.

El polimorfismo macroscópico de *S. schenckii* está asociado a variabilidad genética, aunque también se ha observado que los aislados cambian sus características morfológicas después de varias resiembras o al emplear medios de cultivo como es el APD y el agar extracto de malta ⁽¹⁹⁾. Considerando que los aislados incluidos en este estudio provienen de dos colecciones externas a nuestro laboratorio es posible que hayan sido sometidas a repetidas resiembras, y en consecuencia perdido su pigmento lo que explicaría el mayor número de colonias blancas, sin embargo es probable que al utilizar medios para inducir la producción de melanina se observaría un mayor porcentaje de colonias pigmentadas. Por otro lado Kwon-Chung KJ et al 1992 ⁽¹⁹⁾ consideran a las cepas pigmentadas como las más virulentas y la esporotricosis diseminada cutánea, sistémica, mucocutánea y extracutánea son asociadas a aislados pigmentados. En este estudio esta proposición no fue corroborada, pues se estudiaron 2 aislados causantes de esporotricosis hematogena y no presentaron pigmentación, sin embargo hay que

considerar seriamente los anteriormente expuesto pues no se tiene una referencia sobre el número de resiembras ni de los medios utilizados previos a este estudio.

El medio de cultivo utilizado en este estudio para la caracterización micelial fue el agar dextrosa Sabouraud pues es el medio empleado con mayor frecuencia en el proceso de diagnóstico, esta elección se tomo con la finalidad de que las descripciones fueran comparables con lo que comúnmente se observa en los laboratorios de diagnóstico clínico. Sin embargo, es recomendable para posteriores estudios emplear a la par el medio de cultivo APD, pues actualmente es el medio que se emplea con mayor frecuencia en estudios de correlación morfológica y genética ^(25, 26, 30).

Uno de los procesos por el cual los hongos anamorfos pueden adquirir variabilidad genética es la heterocariosis, que se refiere a la presencia de diferentes núcleos en un mismo citoplasma. Este fenómeno afecta el fenotipo del hongo, pues el genoma se expresa dependiendo de la proporción en la que se presenten los diferentes núcleos, este fenómeno puede corresponder con un aspecto heterogéneo en la morfología. Los aislados 10 y 26 presentaron zonas con características fenotípicas distintas a las del resto de la colonia “zonaciones”. Y aunque el fenómeno de heterocariosis no está descrito en *Sporothrix schenckii* no lo descartamos como posible causa de estas zonas heterogéneas ⁽³³⁾.

En el presente trabajo, microscópicamente se observó un predominio de conidios ovoides de origen simpodial; esto coincide con lo reportado en la literatura ^(11, 26, 30). Sin embargo el 54% de los aislados además presentaron otras formas; conidios globosos, alargados y triangulares, algunos pigmentados. Marimon et al en el 2007 ⁽²⁶⁾ observaron que las formas de los conidios sésiles permitían diferenciar las especies de *Sporothrix*: *S. globosa*, presenta conidios sésiles, globosos, pigmentados, de pared gruesa, de 2.5-4 µm por 2-3.5 µm; *S. mexicana*, conidios pigmentados subglobosos, ovoides o elipsoidales de 3-4 µm de largo por 2-3.5 µm de ancho; y *S. brasiliensis*, conidios sésiles pigmentados globosos o subglobosos, de 2.5-5 µm de largo por 2-3 µm de ancho. En este estudio se observaron principalmente tres formas sésiles pigmentadas; las ovoides, globosas y triangulares. El aislado, 6 presentó conidios pigmentados globosos con 1.6 x 1.6 µm, por su tamaño no corresponde a ninguna de las especies propuestas por Marimon, y los

aislados 12, 17 y 23 presentaron conidios sésiles pigmentados ovoides, y por su tamaño entran en la descripción hecha para la especie *S. mexicana*.

En promedio el tamaño de los conidios en este estudio es superior al reportado por Meza y colaboradores para aislados mexicanos, lo que nos indica una gran variabilidad morfológica en los aislados de *S. schenckii* de México.

El color pigmentado de las colonias no siempre se correlacionó con la presencia de conidios pigmentados observados en los micro-cultivos. Posiblemente esto se deba a la diferencia en el tiempo de incubación entre estos ya que para la morfología macroscópica se contaron 15 días de incubación y para el microcultivo 3. Es probable que la baja frecuencia de observación de conidios pigmentados en el presente estudio esté relacionada con el periodo de incubación del microcultivo (3 días), ya que otros estudios reportan la presencia de pigmento conidial en cultivos de mayor edad ⁽³⁰⁾.

De acuerdo a Dixon et al en 1991 ⁽¹¹⁾, el origen geográfico influye en la morfología de *S. schenckii*, pues observó homogeneidad entre aislados provenientes de las mismas regiones y heterogeneidad entre regiones. Por otro lado O'Reilly et al en el 2006 ⁽³⁷⁾ observó también que los aislados australianos son heterogéneas entre regiones y homogéneos dentro de una región. En nuestro estudio incluimos aislados de diferentes estados de la Republica mexicana y observamos una gran heterogeneidad en la morfología, y este fenómeno se repitió entre aislados provenientes del mismo estado.

Como refieren Fell et al 1992 ⁽¹²⁾, Kurtzman et al 1996 ⁽²⁰⁾, Wesselink et al 2002 ⁽⁵³⁾ entre otros autores, el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del gen 28S rDNA, es útil para discernir entre especies estrechamente relacionadas. Encontramos que el 92% (26 de los 28 aislados incluyendo a la cepa de referencia) corresponden genéticamente a la especie *S. schenckii*, a pesar de su diversidad morfológica tanto macroscópica como microscópica micelial, el estudio de esta región no fue suficientemente sensible para detectar variabilidad genética interespecífica que se correlacione con la diversidad morfológica. Por lo que es importante diseñar iniciadores para regiones con alta variabilidad interespecífica o probar diferentes técnicas moleculares.

Con este estudio no pudimos demostrar la existencia de un agente causal diferente a *S. schenckii* para la esporotricosis, a pesar de que el 8% de los aislados correspondieron a género *Acremonium sp.* pues no contamos con la información sobre el verdadero origen de estos y difícilmente podemos concluir sobre su papel patógeno en los pacientes con lesiones esporotricoides, no descartamos la posibilidad de una contaminación.

9. CONCLUSIONES

Observamos un alto grado de polimorfismo morfológico en los aislados clínicos de pacientes mexicanos con esporotricosis, sin embargo con el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del gen 28-S rDNA, todos los aislamientos correspondieron a la especie *S. schenckii*. Por lo anterior es importante buscar un fragmento genético o una técnica molecular con la que se puedan detectar las variaciones genéticas interespecíficas, para hacer una correlación entre la morfología y la genética.

10. PERSPECTIVAS

Aunque hay autores que mencionan que el fenotipo es suficiente para el reconocimiento de una especie de microorganismo, también se sabe que los caracteres morfológicos de los microorganismos son difíciles de evaluar y la tasa de cambio de caracteres morfológicos puede ser menor a la tasa de variación genética ⁽⁴⁸⁾. Existen trabajos que demuestran que la caracterización genética es más sensible en la identificación de especies sin embargo la mayoría de los estudios de variabilidad genética se pueden corresponder con las características morfológicas.

Por lo anterior y considerando la reciente descripción de nuevas especies de *Sporothrix* basada en la amplificación de los genes ITS, β -tubulina y particularmente la calmodulina, es altamente probable que algunos de nuestros aislados pertenezcan a alguna de las especies descritas. Por lo que es importante realizar este estudio a nuestros aislamientos.

Además para tener un conocimiento íntegro que pueda ser aplicado con fines de diagnóstico más eficiente, así como tratamiento y que amplíe el conocimiento de la epidemiología de la esporotricosis es necesario plantear un protocolo que incluya datos sobre la adquisición de la micosis, su evolución, tratamiento y complementar con los estudios morfológicos y genéticos del hongo.

Para esto será importante la formación de un grupo de trabajo en el que los médicos se comprometan a coleccionar una serie de datos sobre el paciente, el tipo de esporotricosis, su tratamiento y evolución y que además alienten al paciente a informar el tiempo de curación y de no haber mejoría a regresar a consulta médica. Por otro lado el investigador

que realice el trabajo morfológico y genético de los aislados deberá realizar una correlación que brinde datos de mayor utilidad.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004; 40:41-49.
2. Arenas R. *Micología médica ilustrada*. Tercera edición. México D.F. McGraw Hill. 2008 pp 149-160.
3. Belknap BS. Sporotrichosis. *Dermatol Clin* 1989; 7: 193-202.
4. Ben-Ali A, Wuyts J, De Wachter R, Meyer A, Van de Peer Y. Construction of a variability map for eukaryotic large subunit ribosomal RNA. *Nucl Acids Res*. 1999; 27: 2825-2831.
5. Blin N, Stafford D. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl Acids Res* 1976; 3: 2303-2308.
6. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Segunda edición. México D.F. Méndez editores S.A. de C.V. 2000
7. Cafarchia C, Sasanelli M, Lia RP, de Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case Report. *Mycopathol*. 2007;163: 75-79.
8. Conti-Díaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathol*. 1989; 108: 113-116.
9. Da Rosa DW, Gezuele E, Calegari L, Goñi F. Asteroid body in sporotrichosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. *Med Mycol*. 2008; 46: 433-448.
10. De Oliveira-Nobre M, de Ávila-Antunes T, Osório de Faria R, Brum-Cleff M, Gevehr-Fernandes C, Cunha-Muschner A, Araújo-Meireles MC, Ferreira L. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. *Mycopathol*. 2005; 160: 43-49.
11. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 1106-1113.
12. Fell J. rDNA targeted oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. *J Ind Microbiol*. 1995; 14: 475-477.
13. Hiruma M, Kawada A, Ishibashi A. Ultrastructure of asteroid bodies in sporotrichosis. *Mycoses* 1991; 34: 103-107.
14. Howard DH, Orr G. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. *J Bacteriol*. 1963; 85: 816-821.
15. Ishizaki H, Nakamura Y, Kariya H, Iwatsu T, Wheat R. Delayed hypersensitivity cross-reactions between *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species in sporotrichotic patients. *J Clin Microbiol*. 1976; 3: 546-547.
16. Ishizaki H, Wheat RW, Kiel DP, Conant NF. Serological cross-reactivity among *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis*, *Euophium* and *Graphium* species. *Infect Immun* 1978; 21: 585-593.

17. Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses* 2001; 44: 261-265.
18. Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 1076-1081.
19. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Lea & Febiger. Philadelphia. 1992 pp 707-729.
20. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1216-1223.
21. Lavalle Aguilar P. Esporotricosis en: *Desarrollo y estado actual de la Micología Médica en México*. Ed. Simposio Syntex. 1979 pp 115-138.
22. Lavalle-Aguilar P, Padilla Desgarenes MC. 2000. Programa de actualización para el dermatólogo. Libro 2 dermatomicología. Esporotricosis. http://www.galderma.com.mx/pac/Pac2/d2_p38.htm
23. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira D, Baltimore D, Darnell J. *Biología celular y molecular*. Cuarta edición. España Madrid. Editorial Médica Panamericana. 2003 pp 287-288 y 467-468.
24. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares LR. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Segunda Edición. México D.F. Editorial Trillas S.A. de C.V. 2004 pp 67-70.
25. Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol*. 2009; 26: 218-222.
26. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. Mexicana*, three new *Sporothrix* Species of Clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3198-3206.
27. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol*. 2008; 46: 621-625.
28. Mayorga-Rodríguez JA, Barba-Rubio J, Muñoz-Estrada VF, Rangel-Cortés A, García-Vargas A, Magaña-Camarena I. Esporotricosis en el estado de Jalisco, estudio clínico-epidemiológico (1960-1996). *Dermatol Rev Mex*. 1997; 41: 105-108.
29. McGinnis MR, Nunn GB. Sequence-Based Fungal Identification and Classification. En: Persing DH et al (Eds). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. ASM press. Washington D.C. 2004; 561-568pp.
30. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3004-3011.
31. Michel da Rosa A, Scrofernerker M, Vettorato R, Lopes R, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 52: 451-459.

32. Middelhoven WJ, Guého E, de Hoog GS. Phylogenetic position and physiology of *Cerinosterus cyanescens*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 77: 313-320.
33. Moore-Landecker E. *Fundamentals of the Fungi*. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey 1996; 226-248pp.
34. Munguía-Pérez R, Romo-Lozano Y, Castañeda-Roldan E, Velázquez-Escobar MC, Espinosa-Texis A. Epidemiología de la esporotricosis en el municipio de Huauchinango, Puebla. *Enf inf microbiol*. 2007; 27:38-43.
35. Nelson D, Cox M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*. Tercera edición. Ediciones Omega. España Barcelona. 2001 pp 1000-1002
36. Novales J, Navarrete G, Ramos A. Esporotricosis. Aspectos histológicos, análisis de 50 casos. *Rev Centro Dermatol Pascua* 1995; 4:149-152.
37. O' Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 :2547-2552.
38. Padilla Desgarenes MC, Zuloeta Espinosa de los Monteros E, Novales Santa CJ. Esporotricosis linfangítica. Presentación de un caso. *Rev Centro Dermatol Pascua* 2002; 11: 130-134.
39. Ramírez-Gaona AY. Identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Sporothrix schenckii* obtenidos de la naturaleza en el estado de Puebla. Tesis profesional de maestría en ciencias microbiológicas con orientación en microbiología médica. BUAP 2005
40. Ramos -e- Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*. 2007; 25: 181-187.
41. Rippon JW. *Micología Médica: Hongos y Actinomicetos Patógenos*. Tercera edición Tr. Castañeda L. Interamericana McGraw Hill. México. 1990
42. Shadomy H.J, Wang H. Unusual structures of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathol*. 1988; 102: 143-147.
43. Schell WA. Agents of Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. En: Ajello L, Hay RJ (eds.) *Medical Mycology*. Arnold. Londres, 1998; 315-336pp
44. Schubach A, Barros MB, Wanke B.. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21: 129-133.
45. Srivastava AK, Schlessinger D. Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* 1991; 73: 631-638.
46. St- Germain G, Summerbell R. Identifying Filamentous Fungi, *A clinical laboratory handbook*. Belmont, California 1996; 54-55 y 192-195.
47. Sugita T, Nishikawa A. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of the pharmaceutical society of Japan and the Japanese pharmacopoeia. *J Health Sci* 2003; 496: 531-533.
48. Taylor JW, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philos Trans R Soc Lon B Bio Sci*. 2006; 361:1947-1963.
49. Travassos LR, Lloyd KO. *Sporothrix schenckii* and Related Species of *Ceratocystis*. *Microbiol Rev*. 1980; 44: 683-721.
50. Ulloa M, Hanlin RT. *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. The american phytopathological society. Minesota 2006; 510-511 pp

51. Vélez H, Santamaría L, Vargas ME, Montoya F. Polimorfismo fenotípico de cepas autóctonas de *Sporothrix schenckii*. IATREIA 1996; 9: 71-75.
52. Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. Jpn J Med Mycol. 2004; 45: 165-175.
53. Wesselink JJ, de la Iglesia B, James SA, Dicks JL, Roberts IN, Rayward-Smith VJ. Determining a unique defining DNA sequence for yeast species using hashing techniques. Bioinformatics. 2002; 18: 1004-1010.
54. Winn RE. A contemporary view of sporotrichosis. Curr Top Med Mycol. 1995; 6: 73-94.
55. Zipfel RD, de Beer W, Jacobs K, Wingfield BD, Wingfield MJ. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. Stud in Mycol. 2006; 55: 75-97.

12. APÉNDICES

Apéndice A

Medios de cultivo empleados

Agar Dextrosa Sabouraud sin antibióticos BD Bioxon®

Agar	15,0g
Dextrosa	40,0g
Peptona de Carne	5,0g
Peptona de Caseína	5,0g
pH final 5.6 +- 0.2	

Suspender 65 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Caldo Dextrosa Sabouraud BD Bioxon®

Fórmula aproximada para 1000ml de agua purificada

Peptona de Carne	5,0g
Peptona de Caseína	5,0g
Dextrosa	20,0g
pH final 5.7+-0.2	

Ajustar y/o suplementar como se requiera para cumplir los criterios de funcionalidad

Agar para infusión cerebro corazón BD Bioxon®

Peptona de carne	5,0g
Peptona de caseína	16,0g
Cloruro de sodio	5,0g
Dextrosa	2,0g
Fosfato disódico	2,5g
Agar	13,5
pH final 7.4 +- .2	

Suspender 52g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

Infusión de cerebro corazón BD Bioxon®

Fórmula para 1000ml de agua destilada:

Infusión de cerebro de ternera	200,0g
Infusión de corazón de res	250,0g
Peptona de gelatina	10,0g
Cloruro de sodio	5,0g
Fosfato disódico	2.5g
dextrosa	2,0g
Ph final 7.4 +- 0.2	

Disolver 37 g de material deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 o 20 minutos.

Apéndice B

Buffer de lisis. En un tubo estéril mezclar:

2ml de Tris HCl 50mM (pH 7.2)

2ml de EDTA (50Mm)

6ml de SDS 3%

200 μ l de β -mercaptoetanol 1%

2.8 ml de agua destilada estéril

Buffer de carga

Azul de bromofenol 0.25%

Azul de xilencianol 0.25%

Glicerol en agua 30%

Conservar a 4°C