

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

Coordinación de Maestría y Doctorado en Ciencias Biomédicas

FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO BIOLOGICO DEL DIMORFISMO

DE SPOROTHRIX SCHENCKII

T E S I S

Para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (MICOLOGIA)

P r e s e n t a

Gabina Arenas López



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	DR. FELIX GUTIERREZ
SECRETARIO:	M.C. ARMANDO OBREGON
PRIMER VOCAL:	DRA. CONCEPCION TORIELLO
SUPLENTE:	DRA. TERESA MIER
SUPLENTE:	DRA. MARIA DEL ROCIO REYES

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. U.N.A.M. y en el laboratorio de Genética, del Instituto de Investigaciones en Biología Experimental (IIBE), Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
RESUMEN	3
ANTECEDENTES	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	22
METODOLOGIA	23
RESULTADOS	32
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	72
ABSTRACT	73
BIBLIOGRAFIA	74

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Determinación del 100% de germinación de conidios de Sporothrix schenckii, con diferentes fuentes de nitrógeno a pH 5.5.
- Tabla 2. Determinación del 100% de germinación de conidios de Sporothrix schenckii, con diferentes fuentes de nitrógeno a pH 7.2.
- Tabla 3. Características morfológicas de Sporothrix schenckii EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 5.5 a 28°C.
- Tabla 4. Características morfológicas de Sporothrix schenckii EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 7.2 a 28°C.
- Tabla 5. Características morfológicas de Sporothrix schenckii EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 5.5 a 37°C.
- Tabla 6. Características morfológicas de Sporothrix schenckii EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 7.2 a 37°C.
- Tabla 7. Obtención de mutantes espontáneos de Sporothrix schenckii
- Tabla 8. Obtención de mutantes inducidas por UV en Sporothrix schenckii
- Tabla 9. Identificación por exoantígenos y características fenotípicas de las mutantes morfológicas de Sporothrix schenckii
- Tabla 10. Frecuencia de reversión espontánea de las mutantes morfológicas inducidas por UV de Sporothrix schenckii

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Cepas silvestres de Sporothrix schenckii: A) colonia de la cepa blanca EH-36; B) colonia de cepa pigmentada EH-143.
- Fig. 2 Tinción de conidios de Sporothrix schenckii con DAPI: A) campo claro y B) campo oscuro.
- Fig. 3 Curva de sobrevivencia después del tratamiento con luz ultravioleta (UV) de las cepas de Sporothrix schenckii EH-36 y EH-143.
- Fig. 4 Diferentes fenotipos morfológicos después del tratamiento con UV (60 s): A) cepa EH-36 y B) cepa EH-143.
- Fig. 5 Comparación de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-36 (izquierda) con la mutante morfológica UVM9-36 (derecha).
- Fig. 6 Comparación de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-143 (izquierda) con la mutante morfológica UVM1-143 (derecha).
- Fig. 7 Comparación de la morfología microscópica de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-36 (A) y dos aspectos de la mutante morfológica UVM9-36 (B, C) (400 X).
- Fig. 8 Determinación de la frecuencia de reversión del mutante morfológico UVM6-143, las flechas indican la aparición de colonias pigmentadas.
- Fig. 9 Reversión espontánea de las mutantes morfológicas: UVM6-36 (A) y UVM1-143 (B).
- Fig. 10 Mutantes morfológicas UVM3-36 (A) y UVM3-143 (B) sin reversión después de un segundo tratamiento con UV. Aparición de fenotipos diferentes al original.

RESUMEN

Para el estudio del dimorfismo de Sporothrix schenckii, el presente trabajo se enfocó a establecer las condiciones óptimas de transición de conidio a levadura, así como la búsqueda de mutantes morfológicos y auxótrofos, espontáneos e inducidos por luz UV, de las cepas silvestres EH-36 y EH-143 de este hongo. Los parámetros ensayados en la transición de conidio a levadura fueron temperatura de incubación (28° y 37°C), diferentes fuentes de nitrógeno y pH extracelular (5.5 y 7.2). Las condiciones que permitieron un crecimiento predominante de levaduras, independiente de la temperatura de incubación, fueron la utilización de bicarbonato de amonio y arginina como fuentes de nitrógeno a un pH de 7.2. Se observó un crecimiento apical (micelio), independiente de la fuente de nitrógeno, a un pH de 5.5 a 28° y 37°C. Con respecto a la búsqueda de mutantes, se obtuvieron frecuencias de para los mutantes morfológicos y mutantes encontrados alterados en su pigmentación, 4.5×10^{-5} para la cepa EH-36 y 1.07×10^{-4} para la EH-143 respectivamente. La frecuencia de mutantes auxótrofos fué mayor (1.07×10^{-4}). Asimismo, se observó una gran variedad de fenotipos morfológicos y la presencia de colonias sectoriales después de la irradiación con UV. Los resultados del estudio de la transición conidio/levadura sugieren al pH como un factor esencial en la obtención de levaduras, no así a la temperatura de incubación. Los resultados de los mutantes obtenidos sugieren que los caracteres de éstos podrían estar dados por una mutación seguida por recombinación mitótica inducida por UV. Finalmente la alta frecuencia de reversión espontánea al fenotipo silvestre de los mutantes morfológicas inducen a pensar que S. schenckii podría tener un encendido fenotípico semejante al descrito para Candida albicans.

ANTECEDENTES

En el reino de los hongos, existen algunos que infectan y parasitan a organismos vivos. La producción de enzimas, toxinas, moléculas o mecanismos particulares que alteren el equilibrio celular del hospedero, les va a permitir a estos organismos establecerse, invadir y diseminarse. Algunos hongos patógenos, pueden sufrir cambios morfológicos para evadir las defensas del organismo parasitado y establecer un proceso patológico. Este cambio morfológico proporciona un fenotipo con propiedades distintas a la morfología no parasitaria. El término de dimorfismo en hongos, se define como una dualidad fenotípica aunada a un proceso de diferenciación celular, que a la vez puede estar relacionada con mecanismos de patogenicidad (12, 17, 32, 44, 51, 79). Estos hongos que sufren una transición morfológica pueden ser parásitos de animales y de plantas. El estudio de los mecanismos que están involucrados en el proceso dimórfico, nos permite tener un modelo sencillo de diferenciación celular en eucariontes y tratar de elucidar los mecanismos de daño, que conlleven a futuro a medidas aplicativas de prevención. Entre los hongos dimórficos patógenos al hombre, importantes en México, tenemos a Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis y Sporothrix schenckii.

Szaniszlo (86) establece una división de los hongos patógenos dimórficos, dependiendo de la morfología in vivo, y los divide en los siguientes grupos:

1. Hongos que tienen un desarrollo levaduriforme in vivo y presentan un desarrollo filamentosoprófito.
2. Hongos que tienen una fase micelial y levaduriforme in vivo y presentan una fuente de infección a partir de levaduras.
3. Hongos que tienen un desarrollo de formas alargadas isotrópicamente con divisiones nucleares y fase saprofítica micelial.

Los cambios morfológicos pueden estar dados por una gran variedad de factores que, de alguna manera, involucren una alteración o cambio en los patrones de síntesis de pared celular, estructura que participa de manera importante en la determinación de la forma de la célula fúngica. Los patrones de crecimiento y el modo como se deposita la pared celular (3, 86), son los siguientes:

1. Apical - Patrón de depósito de pared celular polarizado y discontinuo que se establece en el extremo de las hifas y que origina el crecimiento micelial.
2. Isotrópico.- La síntesis de la pared celular ocurre alrededor de toda la célula, sincrónicamente, y se presenta como patrón principal del crecimiento levaduriforme.

Dependiendo del estado transicional de los hongos dimórficos puede predominar uno u otro patrón de crecimiento. Estos están dados por diferentes factores; entre ellos, la temperatura, el potencial de oxidoreducción, la tensión de CO₂, fuente de nitrógeno, etc. (55, 88)

Los hongos dimórficos patógenos del hombre se pueden dividir en tres grupos dependiendo de las condiciones requeridas para llevar a cabo la transición morfológica de la fase parasitaria (73). En el primer grupo se encuentran aquellos que necesitan sólo la temperatura de 37°C de incubación; en este grupo se encuentra *B. dermatitidis* y tradicionalmente *S. schenckii*. En el segundo grupo, además de la temperatura de 37°C se requiere de factores nutricionales específicos; como es el caso de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, que necesitan cisteína. En el último grupo se encuentran aquellos hongos que requieren condiciones ambientales y nutricionales complejas y no bien establecidas; en este grupo se encuentran englobados los mucorales y *Candida albicans* (65).

Por otro lado, Gow (20) presenta un modelo donde involucra los factores que influyen en la transición micelio a levadura de *C. albicans*. Sugiere que dichos factores actúan paralelamente, convergiendo en la modulación de un mismo segundo mensajero, dentro de los cuales sugieren al pH intracelular, AMPc, calmodulina y Ca²⁺. El efecto

modulatorio podría tener una repercusión en la actividad de ciertas enzimas o bien en la expresión de genes específicos de morfología. El mismo investigador plantea que a un pH mayor de 7 se mantiene la morfología micelial de C. albicans. Esta sugerencia se basan en el estudio de una mutante monomórfica levaduriforme que es incapaz de alcanzar un pH superior de 7 en el citoplasma y no puede realizar la transición a micelio (81, 82). Los cambios de pH podrían modificar la biosíntesis de la pared celular del hongo, por la alteración de componentes celulares que podrían estar directamente involucrados con el citoesqueleto.

En otro contexto, Leija y cols. (40) determinaron el efecto de la fuente de nitrógeno en la morfología celular de Mucor rouxii, encontraron que al crecer formas hifales a un pH inicial de 5.8 con aspartato a las 12 h se observa un incremento del pH extracelular aunado a una predominancia de levaduras. En contraste, determinaron que existe una disminución de pH al usar glutamina y leucina de 5.8 a 4.7 con una predominancia de formas miceliales. En C. albicans, (19) la formación del tubo germinativo se ve favorecida por la presencia de compuestos nitrogenados de la familia del glutamato (alanina, arginina, ác. glutámico, ornitina y prolina). Además, se ha observado que la N-acetilglucosamina es un importante inductor del mismo, activando el sistema de captación del azúcar. Este sistema puede ser activado por inductores gratuitos (N-acetilmanosamina, quitina coloidal o N-acetilglucosamina acoplada a perlas de agarosa) implicando

que podría existir una señal común entre el metabolismo del azúcar y la morfología del hongo. En Mucor racemosus se describió una mutante que presentaba un cambio en el patrón de desarrollo en forma condicional; dicha cepa mostraba desarrollo en forma de levaduras en ausencia del aminoácido metionina, aunque no requería de este para crecer (68). Así, el papel de los aminoácidos en los cambios morfológicos podría ser elucidado con la obtención y caracterización de mutantes con morfología condicional en términos de la complejidad del medio de cultivo.

Así mismo, la inducción de algunas proteínas por aumento de temperatura (proteínas de choque térmico) ha sido involucrada en fenómenos de diferenciación (34, 47-49). En H. capsulatum parece que la activación de algunos genes de "choque térmico" en la inducción de la fase levadura, no sirve al organismo únicamente en la adaptación al ambiente donde se encuentre, sino que además le permite expresar su capacidad de invasividad y realizar entonces una transición morfológica (47, 48). En C. albicans (9), al mantener levaduras del hongo en condiciones de estrés nutricional, se observó que existía la inducción de proteínas asociadas a un cambio morfogenético (formación del tubo germinativo), además de ser independientes de las proteínas de choque térmico.

En H. capsulatum se han realizado estudios in vitro, que han demostrado tres etapas en la transición de la fase micelial a la de levadura cuando se eleva la temperatura

de 28 °a 37°: 1) Disminución de la respiración con una baja del ATP intracelular, demostrado al medir el consumo de oxígeno, 2) Período de latencia (4-6 días) y 3) Reparación de los distintos componentes de la cadena de citocromos, con el restablecimiento de la respiración y se completa la transición a la fase levaduriforme (49). En la etapa 2 es fundamental la presencia de cisteína, como fuente de grupos sulfhidrilo que provee la vía alterna de transporte de electrones para sobrepasar el bloqueo temporal del sistema de citocromos (44, 45).

Diferentes investigaciones, encaminadas a estudiar el dimorfismo de hongos patógenos, han tratado de elucidar los factores que intervienen en la producción de la fase parasitaria, que puede presentarse en forma de levadura u otras (Ej. esférulas en *C. immitis*), así como, los componentes químicos particulares de cada fase morfológica, y los mecanismos que intervienen en esta transformación.

Los estudios de Kanetsuna y cols. (28, 71) demostraron que la α -glucana es el componente mayoritario de la pared de la fase levaduriforme de *P. brasiliensis* y la β -glucana el de la fase micelial, además de un mayor contenido de quitina en la levadura (65 %), comparado con el 15 % presente en el micelio. Los mismos investigadores, postulan que la síntesis de α -glucana es sensible al cambio de temperatura. Al variar la temperatura de 37 a 28°C se observa una disminución de

la síntesis de α -glucana. Encontraron un incremento de disulfuro reductasa (5 veces) en la levadura y un aumento de la actividad de la β -glucanasa (8 veces) en el micelio. Estudios de microscopía electrónica, de disección química y la asociación de los estudios anteriores, les permitió sugerir que la quitina se encuentra en forma de "isletas" presentes en el sitio de gemación. La síntesis de α -glucana a 37°C, aunado a la actividad de β -glucanasa y de disulfuro reductasa, permite una pérdida en la rigidez de la pared celular, surgiendo una gema. A una temperatura de 20°C, se induce el aumento de la síntesis de β -glucana, y la producción de una cantidad mayor de proteínas con un contenido alto de enlace disulfuro, originándose una sola capa compuesta por quitina, proteínas con enlaces disulfuro y β -glucana entrelazadas, diferente a la doble capa presente en las levaduras. Klimpel y Goldman (33) obtuvieron una mutante avirulenta de *P. brasiliensis* que mostraba, con respecto a la cepa silvestre, un contenido 1000 veces inferior de α -1,3 glucana; ésta variante podía realizar la transición morfológica pero era fácilmente eliminada por el hospedero. San Blas y San Blas (71) proponen una modificación a la hipótesis de Kanetsuna (28) descrita en el párrafo anterior, con base en nuevos datos acumulados, sugiriendo que la enzima que sintetiza α y β glucana es la misma, cuya actividad enzimática se modificaría en función de un cambio alostérico, dependiendo de los cambios de

temperatura. Esto le daría al sistema la habilidad de sintetizar α o β -glucana con la variación de la temperatura.

En los hongos patógenos, esta capacidad de transformación morfológica también está relacionada con la habilidad de invadir los tejidos del hospedero, provocando así la enfermedad (8, 12, 32, 48).

Es por esto que en fechas recientes, se ha venido estudiando el dimorfismo de estos microorganismos asociándolos con su patogenicidad. Entre estos trabajos se encuentra el de Kimberlin y cols. (32), quienes estudiaron la transición de micelio a levadura de *H. capsulatum* en macrófagos peritoneales y alveolares de ratón. Ellos observaron que la habilidad y rapidez del hongo de transformarse de micelio a levadura, condicionaba la infección del macrófago. Mientras que la fase micelial de *H. capsulatum*, consistente de hifas pequeñas, macro y microconidios, era fácilmente digerida por los macrófagos de ratones normales o inmunizados, en cambio, las levaduras permanecían viables dentro de ellos. Otro hongo, *C. immitis*, presenta una fase micelial de artroconidios y una fase parasitaria de esférulas y endosporas, Sun y cols. (83) estudiaron el ciclo biológico *in vitro* (26° a 40°, CO₂ en medio de Converse) e *in vivo* de este hongo, observando la misma transición morfológica en ambas condiciones experimentales. Estos autores describieron, la secuencia de

este cambio morfológico: artroconidios, artroconidios que se transforman en células redondas, que al aumentar de tamaño se convierten en esférulas jóvenes, las que una vez maduras se rompen, liberando miles de endosporas que, a su vez, vuelven a convertirse en esférulas maduras. Al disminuir la temperatura (26°) las esférulas pueden germinar y pasar a la fase micelial. Frey y Drutz (14) al poner en contacto diferentes fases del hongo (artroconidios, células redondas, esférulas jóvenes, esférulas maduras, endosporas solas o en paquetes) con neutrófilos polimorfonucleares de individuos sanos, observaron actividades fagocítica y fungicida contra C. immitis, que declinaban durante la maduración de artroconidios a células redondas y se perdía en la maduración de las esférulas, estas actividades volvían a manifestarse cuando las endosporas eran liberadas de la esférula madura. Cole y Sun (8) al estudiar artroconidios con y sin la capa externa de pared celular, consistente de α -1,3 glucana observaron que las células que carecían de la capa externa eran más fácilmente fagocitadas.

Por otro lado, San Blas (70) en su trabajo sobre la pared celular y la relación hospedero-parásito en hongos patógenos, le asigna un papel antifagocítico a las α -1,3 glucanas presentes en la fase levaduriforme de P. brasiliensis, donde, según la hipótesis del autor, el hospedero inmunológicamente sano es capaz de destruir

fácilmente la fase micelial infectante del hongo que contiene predominantemente β -glucanas en su pared celular, a través de las β -glucanasas de los fagocitos; mientras que al penetrar la fase micelial del hongo a un hospedero inmunológicamente alterado, éste se transforma rápidamente en levadura con su capa de α -glucanas, el cual no puede ser atacado por la falta de α -glucanasas del fagocito.

En *H. capsulatum*, Klimpel y Goldman (33) sugirieron que las α -1,3 glucanas de *H. capsulatum* podrían alterar el metabolismo normal de los fagocitos, produciéndose así la enfermedad. Entre los trabajos más recientes de este hongo, se encuentra el de Medoff y cols. (49), quienes al estudiar el metabolismo oxidativo de *H. capsulatum*, probaron un bloqueador de grupos sulfidriilo, el ácido p-clorimercurifenil-sulfónico (ACMS), el cual al ponerlo en contacto con la fase micelial del hongo, lo vuelve incapaz de revertirse a la fase levaduriforme. Esta característica fue permanente e irreversible. El micelio tratado con ACMS protegió a ratones desafiados con cepas virulentas de *H. capsulatum*, abriéndose así una estrategia totalmente nueva para la prevención de las micosis.

En *C. albicans* (43) se han aislado mutantes monomórficas y auxótrofas del hongo; se probó la virulencia, en un modelo experimental murino de candidosis sistémica y no se observaron diferencias de virulencia en las mutantes monomórficas tanto de la forma de levadura como de micelio,

con respecto a la silvestre. Sin embargo, se observó que las mutantes auxótrofas diploides, no causaban una candidosis sistémica, pero sí lo hacía una cepa prototrófica tetraploide construida de dos auxótrofas.

El modelo escogido para el presente estudio es *Sporothrix schenckii*, agente etiológico de la esporotricosis, esta corresponde a una micosis subcutánea que afecta al hombre y animales, de evolución subaguda o crónica, que ataca piel y tejido subcutáneo principalmente, pero puede afectar cualquier órgano del cuerpo. Se adquiere a través de un traumatismo en piel con material de origen vegetal contaminado con la forma micelial del hongo (hifas y conidios), y al penetrar al organismo sufre cambios morfogénéticos para inducir la forma parasitaria del mismo (levaduras) (64).

S. schenckii pertenece a la clase de los Hyphomycetes, descrito por primera vez por Hektoen y Perkins en 1900, citado por Rippon (64), es un hongo al que, hasta la fecha, no se le ha determinado su fase sexual. A 28 ° C presenta la fase micelial que consiste macroscópicamente de colonias membranosas, limitadas, de una coloración que puede ir desde crema hasta negra, dependiendo de la cepa. Microscópicamente muestra hifas hialinas de 2.4 a 3.7 μm de diámetro. Las colonias de color oscuro contienen estructuras conidiales triangulares, que emergen

directamente de la hifa, de pared gruesa con depósitos de un pigmento oscuro no caracterizado en la superficie (46). Presenta, además, estructuras denominadas simpodios, de donde emergen apicalmente los simpodio-conidios de un diámetro de 1.5-3 por 3-6 μm .

Las colonias que se obtienen de la forma parasitaria o levaduriforme del hongo crecen en medios complejos a 37°C, presentan una consistencia cremosa y de apariencia húmeda. La morfología microscópica, se observa como células fusiformes u ovoides, uni o bigemantes. Las levaduras poseen un diámetro de 2.5 a 5 por 3.5 a 6.5 μm y se reproducen asexualmente por gemación simple o múltiple. A nivel de microscopía electrónica, se puede observar una capa microfibrilar en la parte externa de la pared celular, en la que, por medio de estudios citoquímicos, se ha demostrado actividad enzimática de fosfatasa alcalina de naturaleza glicoproteica (2) y producción de proteinasas extracelulares (90). En el hombre rara vez se observan las levaduras y si se encuentran en el tejido se ponen de manifiesto como una estructura radiada, a la que se le denomina "cuerpo asteroide". Este está constituido por una levadura central rodeada por clavos compuestas por depósitos de antígeno-anticuerpo. Por otro lado, en muestras biológicas de pacientes con esporotricosis, se han encontrado estructuras miceliales de longitud corta que

demuestran la existencia de una transición *in vivo*, de la fase micelial a la fase parasitaria o levadura (89).

Este hongo requiere tiamina como factor de crecimiento (88, 89). Puede utilizar diferentes fuentes de nitrógeno en distinto estado de oxidación. El hongo se desarrolla como levadura a 37°C, en medios que contienen sulfato de amonio y arginina o asparagina como fuente de nitrógeno, y favorece esta morfología la presencia de una corriente de aire-CO₂ (95:5). En cultivos sin esta atmósfera se pueden obtener levaduras a 28 o 37°C, cuando se emplea bicarbonato de amonio como única fuente de nitrógeno y hexosas como fuente de carbono a un pH de 7.2; estudios recientes muestran que la transición morfológica no está influida determinantemente por la temperatura (51). La presencia en el medio de compuestos que involucran una disminución de los potenciales de óxido-reducción, origina una transición y conservación de la forma de levadura. El paso de micelio a levadura se lleva a cabo a partir de los extremos apicales de la hifa y al lado del septo en las estructuras miceliales. Posteriormente, las levaduras se pueden formar por la fragmentación de oidios, que se originan del interior de la hifa (15,16). *S. schenckii* pertenece a los hongos dimórficos del primer grupo de Szanizslo (86).

El dimorfismo de *S. schenckii* está regulado por factores nutricionales, temperatura y concentración de CO₂ como se describe anteriormente, sin embargo, no se conoce de

que manera estos factores están interrelacionados para modular la expresión de genes de morfogénesis. Rodríguez Del Valle y cols. (67), al probar el efecto del pH sobre el crecimiento, demuestran la predominancia de estructuras levaduriformes a un pH externo inicial de 8 y estructuras miceliales a valores de pH inferiores a 5. Concluyen que el pH es un parámetro que posiblemente regula la expresión de las morfologías en este microorganismo.

Este hongo, cuyas paredes celulares tienen como componentes polisacarídicos mayoritarios glucanas y mananas, pertenece al grupo VI de la clasificación de hongos, con base en los componentes químicos de la pared celular, de Bartnicki García (3). Sin embargo, posee un azúcar poco común en los hongos: ramnosa, que le confiere características inmunológicas particulares entre los hongos patógenos del hombre. El contenido de glucana varía dependiendo de la morfología celular; los trabajos de Mendoca y cols. (51) muestran diferencias en cuanto a la composición química de un polisacárido amorfo entre las hifas, conidios y levaduras, demostrando estructuras de monoramnosil ramnomananas para la fase levaduriforme, y conidios y diramnosil ramnomananas para las hifas. Han-Yaku y cols (22) estudiaron las proteínas y ARN producidas durante la fase de micelio y levadura de este hongo, encontrando una proteína mayoritaria y única de 45 kDa, que se expresa sólo en la fase micelial.

A S. schencki se le atribuía ser la fase imperfecta de Ceratocystis stenoceras, ascomiceto patógeno de plantas, lo cual se descartó por técnicas de hibridación de ADN (89)

Los hongos dimórficos con reproducción sexual son susceptibles de estudios genéticos por medio de demostración de ligamiento entre genes y producción de células recombinantes por medio de cruces. Sin embargo, existen hongos dimórficos patógenos sin un estadio sexual demostrado a la fecha. Desde el punto de vista genético, C. albicans ha sido el más ampliamente estudiado (26, 41, 53, 54, 74). Dentro de las diferentes investigaciones realizadas con este hongo se encuentra la de Whelan y cols. (93, 94), que al emplear dosis bajas de UV, y buscar mutantes auxótrofos, no encontraron la diversidad esperada. Observaron una frecuencia alta de auxótrofos a cisteína y metionina; los autores postularon que este organismo pudo haber tenido un alelo recesivo que se segregó al existir una recombinación mitótica inducida por UV que condujo a la homocigosis para dicho alelo. El comportamiento antes descrito sirvió de apoyo para postular la diploidia de este organismo. Estudios posteriores de medición de ADN y de cariotipificación confirmaron la naturaleza diploide del organismo (35, 42). En este mismo hongo se demostró una alta frecuencia de variación fenotípica espontánea e inducida por dosis bajas de UV (1, 69, 77, 78, 80, 84, 91). Rustchenko y cols. (69) sugieren que la alta frecuencia de mutantes morfológicas, podría estar dada por pérdida o rearrreglos

cromosomales, este comportamiento daría al hongo una variación genética al carecer de ciclo meiótico.

Gow (20) observa que los múltiples sistemas de inducción del cambio morfológico en *C. albicans* pueden ser inhibidos diferencialmente, sin un bloqueo en la transición morfológica, por lo que sugirió que los inductores pueden actuar paralelamente y no en serie. La obtención de cepas incapaces de cambiar a la fase parasitaria (mutantes monomórficas) han sido descritas en este organismo (7, 24, 60, 73). Estas variantes genéticas no se transforman a la fase micelial (parasitaria) y además, tienen alterada su capacidad patogénica, al no poder colonizar e infectar al animal en un modelo experimental murino. La ventaja de las mutantes monomórficas sobre las mutantes bioquímicas específicas (auxótrofas) , es que no solamente reflejan el papel del inductor en el cambio de forma, sino que presentan un modelo con alteraciones en el procesamiento de la señal que induce el cambio de patrón de crecimiento y su regulación y por otro lado pueden mostrar la relación existente entre el proceso morfogenético y la virulencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conociendo la trascendencia de la obtención de mutantes y para comprensión de la diferenciación morfogénica en los hongos patógenos dimórficos, es de fundamental importancia el estudio de un modelo que de alguna manera permita explicar la interrelación de las características morfológicas con la capacidad del hongo de producir daño al hospedero. Por otro lado, deben de conocerse los aspectos fisiológicos del hongo *in vitro* que permitan manipular el proceso de diferenciación.

HIPOTESIS

La temperatura no es un factor indispensable mientras que el pH extracelular participa de manera importante, junto a inductores nitrogenados, en la transición conidio/levadura de Sporothrix schenckii.

La combinación del pH extracelular con la presencia en el medio de inductores nitrogenados apropiados debe de permitir las transiciones del dimorfismo de S. schenckii y aislar mutantes afectadas en ellas.

HIPOTESIS

La temperatura no es un factor indispensable mientras que el pH extracelular participa de manera importante, junto a inductores nitrogenados, en la transición conidio/levadura de Sporothrix schenckii

La combinación del pH extracelular con la presencia en el medio de inductores nitrogenados apropiados debe de permitir las transiciones del dimorfismo de S. schenckii y aislar mutantes afectadas en ellas.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el dimorfismo de Sporothrix schenckii a través del conocimiento de la transición de conidio-levadura en condiciones controladas en el laboratorio y por medio de la búsqueda de mutantes bioquímicas y morfológicas.

FALLA DE ORIGEN

METODOLOGIA

1. CEPAS UTILIZADAS

Las cepas de Sporothrix schenckii EH-36 y EH-143 utilizadas se aislaron de casos humanos de esporotricosis del país y pertenecen al cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Para mantener la virulencia de las cepas estas se inocularon en ratones y se obtuvieron retrocultivos de hígado y bazo. Las colonias aisladas se clonaron por dilución seriada y se mantuvieron en medio de conservación a 4 °C.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se emplearon fueron los siguientes:

- a) **Medio de conservación.** Medio que se utilizó en la conservación de las cepas mutantes y silvestres (g/L): peptona (Bioxon de México), 10; glucosa (Técnica Química IQ de México), 4 y agar (Bioxon), 20.
- b) **Medio extracto de levadura, peptona, dextrosa (YPG).** Se empleó en la producción de conidios y en la selección de mutantes auxótrofas, morfológicas y no pigmentadas de S. schenckii, constituido por (g/L): extracto de levadura (Bioxon), 10 ; peptona (Bioxon), 20; glucosa (TQ), 20 y agar (Bioxon), 15.

- c) **Medio BHI (Bioxon)**. Se utilizó como medio completo de referencia en la transición morfológica de S. schenckii. Para medio sólido se adicionó agar 15 g/L.
- d) **Medio de Toriello y Mariat (87)**. Con este medio se determinó el efecto del tiempo de cultivo en la conservación del pH. Constituido por (g/L): KH_2PO_4 , 0.91; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 2.38; MgSO_4 , 0.6; KCl , 1; tiamina, 10^{-6} ; biotina, 10^{-9} ; glucosa 20 y agar 15. A este medio se le adicionó un mililitro de solución de oligoelementos de Berthelot (g/L): $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$, 50; $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 2; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{Ti}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{GISO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0.01; H_3BO_3 , 0.05 y H_2SO_4 concentrado (1 ml).
- e) **Medio de Rodríguez del Valle y cols. (67)**. Se empleó en la transición morfológica de S. schenckii. Constituido por (g/L): glucosa, 20; Na_2HPO_4 , 1.6; KH_2PO_4 , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; H_3BO_3 , 0.005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.003; Na_2MoO_4 , 0.0025; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.003; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005; biotina, 0.00002; pantotenato de calcio, 0.002; hidrocloreuro de tiamina, 0.002; y ácido nicotínico, 0.002. Se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore (0.45 μm).

f) **Medio mínimo** (75). Se empleó en la selección de mutantes auxótrofas y está constituido por (g/L): base nitrogenada sin aminoácidos (Difco Laboratories, Detroit, Mi.), 6.7; glucosa 20 y sulfato de amonio 2. Se adicionó agarosa (Bioxon) a una concentración del 1.5 %, para solidificar.

g) **Medio con glicerol** (75). Se empleó para determinar la capacidad que tienen las mutantes deficientes respiratorias de no crecer en presencia de glicerol. Constituido por (g/L): extracto de levadura, 10; peptona 20, glicerol (Merck) 40 y agar 15.

* Todos los reactivos descritos en los medios de cultivo provienen de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. con excepción de los especificados.

3. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES NORMALES DE TRANSICION DE LA FASE MICELIAL A LA FASE LEVADURIFORME DE S. schenckii IN VITRO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

a) **Determinación del porcentaje de germinación de S. schenckii** . Las cepas se sembraron en tubos de agar YPG sólido y se incubaron a 28°C por 7 días. Se adicionó 5 ml de agua y se agitaron los tubos hasta obtener una suspensión celular. Posteriormente, la suspensión celular se filtró a través de portafiltros (swinnex, Millipore, Bedford, MA) con papel Whatman No. 41. Estos se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/ml en el medio de prueba. El porcentaje de germinación se determinó cada 4 h a 28 °C y cada 6 h a 37 °C. Después de cada tiempo de incubación se tomaron muestras y se fijaron con glutaraldehído a una concentración final del 2 %. Se consideraron conidios germinados aquellos que presentaron las características de las germinulas (crecimiento apical) independientemente del tamaño del tubo germinativo. El porcentaje de germinación se calculó por duplicado con base en 200 células en cada determinación.

b) Experimentos de transición conidio a levadura

Se llevaron a cabo utilizando medio BHI como medio de referencia, con pH de 5.5 y 7.2 a 37°C. El medio de Toriello y Mariat (87) se utilizó con un pH de 6.5, a

28°C. El medio químicamente definido de Rodríguez Del Valle y cols. (67), se utilizaron las fuentes de nitrógeno antes mencionadas a un pH de 5.5 y 7.2 a 28° y 37°C. Todos los medios se inocularon con una concentración de 1×10^6 células/ml. Se tomaron muestras cada 24 h, se observó la morfología celular y se determinó el pH del medio de cultivo.

4. TINCION DE NUCLEOS CON 4,6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL-2HCL (DAPI)

Las hifas, conidios o levaduras de S. schenckii se tiñeron conforme a la técnica descrita por Cano, 1985, citado por Obregón (52). Las células se fijaron con 2 ml de una solución de etanol al 70 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con agua destilada y se recuperaron por centrifugación a 170 g por tres minutos. Al paquete celular se le adicionó 1 ml de una solución de 4,6-diamidino-2-fenilindol(Sigma) a una concentración de 0.5 µg/ml por 10 min a temperatura ambiente. Las células teñidas se lavaron dos veces con agua destilada y se recuperaron por centrifugación a 1500 g por 5 minutos. Finalmente se suspendieron en 0.2 ml de agua destilada y se observaron por medio de un microscopio de fluorescencia (Nikon, Optiphot-Z). Se tomaron fotografías de campo claro y fluorescencia en película Tri-X (Kodak).

5. MUTAGENESIS

La inducción de mutantes se realizó empleando una lámpara de luz ultravioleta germicida (General Electric Type G, 15T8). Las condiciones experimentales con el agente mutagénico se establecieron realizando curvas de viabilidad. Los parámetros probados fueron: distancia entre la lámpara y las células, así como el tiempo de exposición. El porcentaje de viabilidad se realizó contando las unidades formadoras de colonias (UFC) de muestras diluidas antes y después del tratamiento mutagénico. Se seleccionaron los parámetros que condujeron a una viabilidad del 1-3 %.

6. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LAS MUTANTES

Se buscaron mutantes morfológicas y bioquímicas de colonias con (inducidas) y sin (espontáneas) tratamiento de luz ultravioleta. Para la obtención de mutantes morfológicas, se inspeccionaron las colonias que crecieron en el medio complejo de YPG, seleccionando aquellas que presentaban alguna alteración morfológica o de pigmentación a simple vista. Las mutantes auxótrofas se recuperaron al comparar el crecimiento de las colonias en medio completo (YPG) y mínimo sin aminoácidos. Aquellas que crecieron en medio completo, pero no lo hicieron en medio mínimo se consideraron posibles auxótrofas. Las colonias que presentaron la característica de auxotrofia en el paso

anterior, se sembraron en tubos de medio YPG y se subclonaron y probaron nuevamente en medio mínimo. Este paso se repitió tres veces consecutivas. Después del tratamiento con UV, se observaron colonias pequeñas de crecimiento lento y por lo tanto se investigó si correspondían a mutantes deficientes respiratorias por la característica que tienen de no crecer en medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentables. El medio que se utilizó estuvo compuesto por los siguientes componentes (g/L): peptona, 20; extracto de levadura, 10; glicerol, 40 y agar 15. Al sustituir el glicerol por glucosa al 2 %, se originó un medio completo donde las mutantes deficientes respiratorias pueden crecer. Al sembrar simultáneamente las colonias de crecimiento lento en los medios anteriores, se observó el desarrollo.

7. IDENTIFICACION DE LAS MUTANTES MORFOLOGICAS

La identificación de las mutantes morfológicas se realizó por observación microscópica de las estructuras de reproducción, y la identidad de exoantígenos de las mutantes con exoantígenos de referencia de las cepas silvestres, en pruebas de inmunodifusión en gel por medio de la metodología descrita por Kaufman y cols. (29). Se preparó suero hiperinmune anti-S. schenckii de conejo (Nueva Zelanda) con una suspensión de 2 mg de levaduras secas con acetona por ml de solución salina isotónica estéril, muertas previamente con timerosal al 0.05% . El

animal se inyectó con un ml de la suspensión por vía intravenosa, dos veces a la semana durante dos semanas. Después de una semana de concluido el esquema se sangró y el suero que se obtuvo, se tomó como suero de referencia para la identificación de los antígenos metabólicos (25) producidos por las cepas silvestres y mutantes morfológicas. Los exoantígenos de las cepas silvestres y mutantes se obtuvieron a partir de los filtrados de los cultivo. Se sembraron los hongos en medio de Toriello y Mariat (87), se incubaron por 72 h y se eliminó la biomasa. El sobrenadante se filtró y se esterilizó con membranas Millipore de 0.45 μm . El filtrado concentrado por ultrafiltración se empleó como exoantígeno en las pruebas de inmunodifusión.

8. FRECUENCIA DE REVERSION ESPONTANEA DE MUTANTES MORFOLOGICAS

. Se seleccionaron ocho mutantes morfológicas (cuatro provenientes de cada una de las cepas silvestres) que no revirtieron después de haberlas sembrado dos veces consecutivas en medio YPG e incubado a 28°C por siete días. Se obtuvo una suspensión de conidios de las mutantes morfológicas, como se describió anteriormente y se sembraron en placas de medio YPG. Se contaron las UFC que revirtieron al fenotipo silvestre y se determinó la frecuencia de reversión en una población que varió de 730 a 4.9×10^4 UFC, dependiendo de la viabilidad de los conidios.

9. FRECUENCIA DE REVERSION INDUCIDA CON UV DE MUTANTES OBTENIDAS

Se seleccionaron cuatro mutantes morfológicas, una proveniente de la cepa silvestre EH-36 y tres derivadas de la EH-143, y se obtuvieron los conidios en las condiciones antes descritas. La exposición a luz ultravioleta se realizó por 60 s y se sembraron en medio YPG. Se observaron las características morfológicas de las colonias y se calculó la frecuencia de reversión de igual manera que para la reversión espontánea.

RESULTADOS

Las cepas silvestres de *S. schenckii* EH-36 y EH-143 utilizadas en este trabajo presentaron diferente pigmentación. La primera, que presenta una apariencia de color blanco crema (Fig. 1A) no cambió de color, independientemente del tiempo de incubación. Por el contrario, la segunda cepa adquirió un color negro (Fig. 1B) con el tiempo de incubación. Las características macroscópicas consistieron de colonias membranosas con bordes filamentosos y de consistencia dura. El aspecto microscópico mostró hifas septadas, finas con simpodio-conidios emergiendo de los simpodios, así como conidios laterales, característicos de este hongo.

En los experimentos de germinación y transición morfológica, se utilizaron diferentes medios de cultivo. El medio completo BHI se empleó como medio de referencia. Los medios definidos químicamente de Rodríguez del Valle y cols. (67) y el de Toriello y Mariat (87) se probaron para seleccionar un medio que permitiera una mayor estabilidad y conservación del pH del mismo. El medio de Rodríguez del Valle se seleccionó debido a que impidió cambios bruscos de pH, aún en periodos largos de incubación (72 h). Los cambios de pH de este medio variaron aproximadamente en ± 1 unidad. En el medio de Toriello y Mariat (87) se observaron variaciones mayores del pH, de

FALLA DE ORIGEN

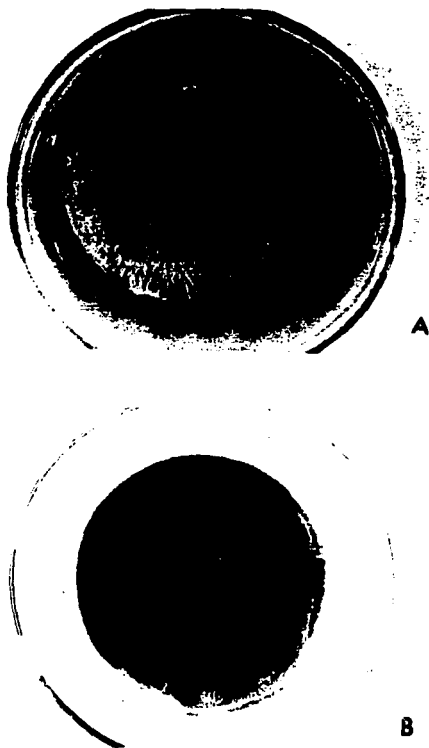


Fig. 1 Cepas silvestres de Sporothrix schenckii: A) colonia de la cepa blanca EH-36; B) colonia de cepa pigmentada EH-143.

alrededor de dos unidades de pH, por lo que se descartó en los experimentos de transición morfológica.

El 100 % de germinación con diferentes fuentes de nitrógeno, a 28° y 37°C y pH de 5.5 y 7.2 se encuentra resumido en la tabla 1 y 2, respectivamente. Para ambas cepas, a pH 5.5 se observó un tiempo de germinación menor que a pH de 7.2, tanto a 28°C como a 37°C. Al aumentar la temperatura a 37°C en ambos pH, se observó marcado retardo en el tiempo de germinación, independientemente de la fuente de nitrógeno o medio de cultivo probado, el hongo no germinó a pH 7.2, 37°C al utilizar como fuentes de nitrógeno la asparagina o la cisteína (Tabla 2). Con estas fuentes de nitrógeno solamente se observó un tipo de crecimiento indefinido a 28°C; las células observadas no correspondían a las germinulas típicas que aparecen en medio con bicarbonato de amonio o arginina como fuentes de nitrógeno.

Los resultados del seguimiento de la transición morfológica y la medición del pH cada 24 h, se encuentran resumidos en las tablas 3 a 6 de la cepa EH-36 ya que los resultados fueron muy similares para ambas.

Al probar las fuentes de nitrógeno, a pH 5.5 a 28°C (Tabla 3), se pudo visualizar un crecimiento apical primordialmente, con un descenso del pH hasta 3.5 en el medio BHI, 4.2 en el de Rodríguez del Valle con bicarbonato

Tabla 1. Determinación del 100% de germinación de conidios de *Sporothrix schenckii*, con diferentes fuentes de nitrógeno a pH 5.5.

Fuente de nitrógeno	100% de germinación (tiempo h)			
	EH-36		EH-143	
	28°C	37°C	28°C	37°C
<i>S. schenckii</i>				
BHI	14	18	12	16
Bicarbonato de Amonio	16	20	14	20
Arginina	18	24	14	24
Asparagina	GNT	22	GNT	22
Cisteína	OTC	GP	OTC	GP

BHI = Infusión cerebro corazón

GNT = Germinulas no típicas

OTC = Otro tipo de crecimiento

GP = germinación parcial a las 72 h (menor del 5 %)

Tabla 2. Determinación del 100% de germinación de conidios de *Sporothrix schenckii*, con diferentes fuentes de nitrógeno a pH 7.2.

Fuente de nitrógeno	100% de germinación (tiempo h)			
	EH-36		EH-143	
	28°C	37°C	28°C	37°C
<i>S. schenckii</i>				
BHI	26	36	20	28
Bicarbonato de Amonio	22	44	18	38
Arginina	18	42	16	36
Asparagina	OTC	CSG	OTC	CSG
Cisteína	OTC	CSG	OTC	CSG

BHI = Infusión cerebro corazón
 OTC = Otro tipo de crecimiento
 CSG = Conidios sin germinar

FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Características morfológicas de *Sporothrix schenckii* ER-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 5.5 a 28°C

TIEMPO	BHI	BICARBONATO DE AMONIO	ARGININA	ASPARAGINA	CISTEINA
0 h	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)
24 h	Germinulas (pH 5.7)	Filamentos (pH 4.95)	Filamentos (pH 5.35)	Escaso crecimiento producción de germinulas (pH 5.6)	Estructuras redondas y escasos filamentos gruesos (pH 5.6)
48 h	Filamentos y células sin gemar (pH 4.37)	Filamentos y células sin gemar (pH 4.75)	Filamento (pH 5.1)	Estructuras redondas, escasos filamentos (pH 5.45)	Estructuras de crecimiento isodiamétrico (pH 5.5)
72 h	Filamentos (pH 3.5)	Filamentos y conidios (pH 4.2)	Células sin gemar y filamentos (pH 4.8)	Crecimiento escaso no definido (pH 5.4)	Estructuras de crecimiento isodiamétrico (pH 5.45)

Tabla 4. Características morfológicas de *Sporothrix schenckii* KH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 7.2 a 28°C.

TIEMPO	BHI	BICARBONATO DE AMONIO	ARGININA	ASPARAGINA	CISTEINA
0 h	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)
24 h	Germínlulas (pH 7.12)	Germínlulas y filamentos cortos (pH 7.1)	Filamentos y levaduras gemando (pH 7.10)	Conidios y escasa producción de germínlulas (pH 6.8)	Conidios y estructuras redondas aparentemente sin gemar (pH 6.8)
48 h	Filamentos y escasas células únicas (pH 7.4)	Filamentos cortos, gruesos y tendencia a formar células gemantes (pH 6.8)	Levaduras uni y, bigemantes y escasos filamentos (pH 6.9)	Filamentos cortos y escaso crecimiento (pH 6.85)	Estructuras redondas, escasos filamentos cortos (pH 6.84)
72 h	Filamentos y mezcla de células únicas y escasas gemando (pH 6.5)	Levaduras uni y bigemantes, los filamentos cortos bien dan a desaparecer (pH 6.5)	Levaduras y escasos filamentos (pH 6.7)	Escaso crecimiento, filamentos cortos y estructuras semejantes a levaduras (pH 6.8)	Estructuras redondas con características típicas de levaduras (pH 6.5)

FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Características morfológicas de *Sporothrix schenckii* EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 5.5 a 37°C

TIEMPO	BHI	BICARBONATO DE AMONIO	ARGININA	ASPARAGINA	CISTEINA
0 h	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)	Conidios (pH 5.5)
24 h	Germinulas (pH 5.65)	Germinulas (pH 5.4)	Germinulas (pH 5.54)	Germinulas (pH 5.58)	Conidios sin germinar (pH 5.45)
48 h	Filamentos y células únicas (pH 4.8)	Filamentos con escasa producción de células (pH 3.85)	Filamentos (pH 5.2)	Formas de crecimiento no definida (pH 5.2)	Conidios sin germinar (pH 5.4)
72 h	Mezcla de morfologías, formado por células únicas y uni-gemantes (pH 3.2)	Filamentos con gemación en el ápice compatible con la forma de conidia (pH 3.9)	Filamentos y células no gemando (pH 4.8)	Crecimiento no definido y escaso (pH 4.7)	Germinación en un porcentaje inferior a un 5% (pH 5.3)

Tabla 6. Características morfológicas de *Sporothrix schenckii* EH-36 con diferentes fuentes de nitrógeno pH 7.2 a 37°C

TIEMPO	BHI	BICARBONATO DE AMONIO	ARGININA	ASPARAGINA	CISTEINA
0 h	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)	Conidios (pH 7.2)
24 h	Germinulas (pH 8.2)	Germinulas y filamentos (pH 7.1)	Filamentos y levaduras gemando (pH 7.18)	Conidios sin germinar (pH 7.15)	Conidios sin germinar (pH 7.25)
48 h	Filamentos y células gemantes (pH 8.1)	Filamentos cortos y gruesos y tendencia a formar células gemantes (pH 6.8)	Levaduras uni y bigemantes y escasos filamentos (pH 6.94)	Conidios sin germinar (pH 7.15)	Conidios sin germinar (pH 7.1)
72 h	Filamentos cortos y levaduras gemantes (pH 7.3)	Levaduras uni y bigemantes, los filamentos cortos tienden a desaparecer (pH 6.5)	Levaduras y escasos filamentos (pH 6.7)	Conidios sin germinar (pH 7.08)	Conidios sin germinar (pH 7.15)

de amonio y arginina a las 72 h. Es importante mencionar que la morfología predominante al usar arginina, pH 5.5 era una morfología compatible con la forma micelial del hongo, hifas y estructuras ovaladas no gemantes similares a simpodio-conidios, en algunas ocasiones se logró observar estructuras conidiogénicas características de este hongo dimórfico. Al utilizar asparagina se observó crecimiento escaso no definido morfológicamente y con cisteína, estructuras de crecimiento isodiamétrico predominantemente. En la tabla 5 se observó que a 37°C y pH 5.5, el hongo crecía formando una mezcla de morfologías, con predominancia de estructuras hifales y escasas formas unigemantes. En las tablas 4 y 6 con pH 7.2 en ambas temperaturas, las fuentes de nitrógeno bicarbonato de amonio y arginina originaban una morfología a las 48-72 h con un predominio de levaduras independientemente de la temperatura. Al usar cisteína a un pH 7.2 a 28°C (Tabla 4), a las 48-72 h, se observó un crecimiento de tipo isodiamétrico, pero sin las características típicas de levadura, no se logró definir una morfología específica. El empleo de asparagina, permitió un escaso crecimiento a pH 7.2 a 28°C (Tabla 4), las estructuras que se observaron consistían de filamentos cortos con gemaciones en el apice. Sin embargo, no se pudo discernir entre conidios y levaduras por medio de microscopía óptica.

Después de haber realizado los experimentos de transición morfológica bajo distintas condiciones, para establecer los patrones morfogenéticos de las cepas silvestres estudiadas, se procedió a la obtención de mutantes. Con el objeto de establecer cual era el estadio más adecuado para realizar los experimentos de mutagénesis, se procedió a determinar el número de núcleos en hifas, conidios y levaduras. La tinción fluorescente con DAPI mostró solamente un núcleo en las tres estructuras mencionadas, así como también en muchos de los espacios interseptales. A manera de ilustración, en la figura 2 se muestran los resultados de la tinción de núcleos con DAPI en los conidios. En la Fig 2A se observa al microscopio de luz con campo claro y en la Fig. 2b con fluorescencia campo oscuro, como se aprecia los conidios contienen un solo núcleo.

Para la búsqueda de mutantes espontáneas de S. schenckii, se realizaron tres experimentos distintos; los datos de los tres experimentos se sumaron para obtener la población total analizada. El número de mutantes morfológicos, de pigmentación o auxótrofos se utilizó para calcular la frecuencia de cada uno de estos en relación al total de colonias analizadas (Tabla 7). Así, se observó que en 21948 colonias analizadas de la cepa EH-36 no se encontraron cepas con alteraciones morfológicas (frecuencia $< 4.5 \times 10^{-5}$), ni de pigmentación (frecuencia

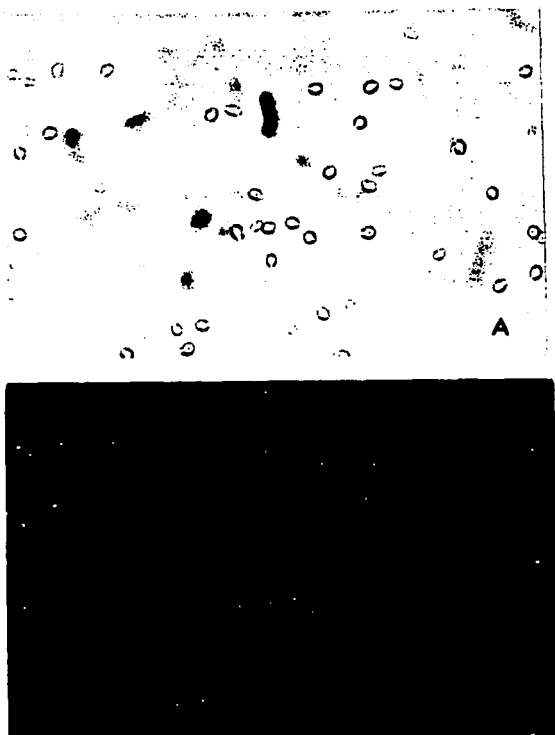


Fig. 2 Tinción de conidios de la cepa de Sporothrix schenckii con DAPI: A) campo claro y B) campo obscuro.

Tabla 7. Obtención de mutantes espontáneos de *Sporothrix schenckii*

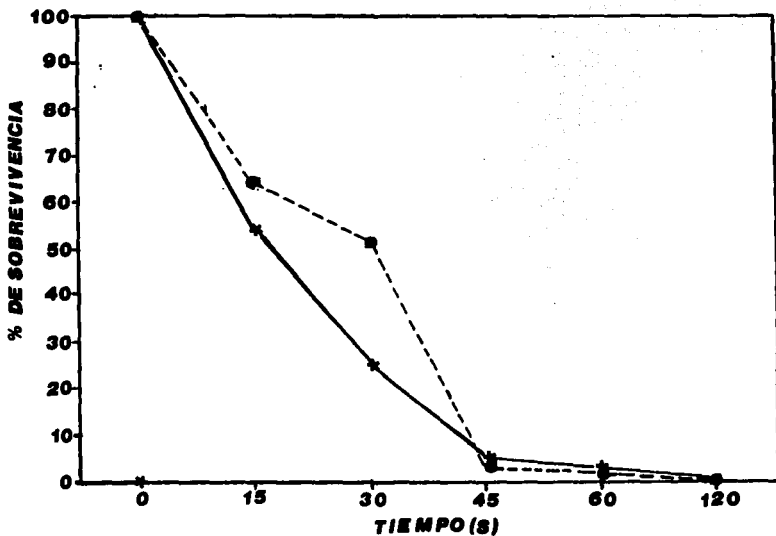
CEPA	POBLACION ANALIZADA	NUMERO Y FRECUENCIA DE MUTANTES EN LA CATEGORIA QUE SE INDICA		
		MORFOLOGICOS	ALTERADOS EN PIGMENTACION	AUXOTROFOS
EH-36	21948	0 ($< 4.5 \times 10^{-5}$)	0 ($< 4.5 \times 10^{-5}$)	2 (9.1×10^{-5})
EH-143	9276	0 ($< 1.07 \times 10^{-6}$)	0 ($< 1.07 \times 10^{-6}$)	1 (1.07×10^{-6})

La búsqueda de mutantes se realizó en cajas con el medio especificado en Material y Métodos; los cultivos se incubaron a 28° por 7 días. La población analizada corresponde a la suma de tres experimentos distintos; los números entre paréntesis indican la frecuencia del tipo particular de mutante en relación a la población analizada.

$< 4.5 \times 10^{-5}$) y se obtuvieron dos cepas auxótrofas (frecuencia= 9.1×10^{-5}). Con respecto a la cepa EH-143, en una población total analizada de 9276 colonias no se observaron mutantes morfológicos o de pigmentación (frecuencia $< 1.07 \times 10^{-4}$) y sólo apareció una cepa auxótrofa (frecuencia= 1.07×10^{-4})

Antes de realizar los ensayos de mutagénesis con UV, se determinaron las curvas de sobrevivencia de ambas cepas en respuesta al tratamiento con dicho agente (Fig 3). De acuerdo a estos resultados, la mutagénesis con UV se llevó a cabo por 60 s de exposición, tratamiento que produjo una viabilidad de los conidios de 1.04 % para la cepa EH-36 y de 3.1 % para la cepa EH-143.

Después del tratamiento mutagénico se observó una amplia variedad de fenotipos morfológicos y la presencia de colonias que presentaban disminución en el tamaño con alteraciones morfológicas (Figs. 4, 5, y 6). La cepa EH-143 pigmentada originó un número elevado de mutantes sin pigmento, y, además, colonias sectoriales formadas por secciones con y sin pigmento (Fig. 4). Las características de las colonias de algunos mutantes morfológicos se encuentran resumidas en la tabla 8. En la figura 7 se observa la comparación de la morfología microscópica de la cepa silvestre no pigmentada EH-36 (7A) y dos aspectos microscópicos del mutante morfológico UVM9-36 (7B y C). Se puede observar un crecimiento isodiamétrico de las células



● = S. schenckii EH-36 * = S. schenckii EH-143

Fig. 3 Curva de sobrevivencia después del tratamiento con luz ultravioleta (UV) de las cepas de Sporothrix schenckii EH-36 y EH-143.

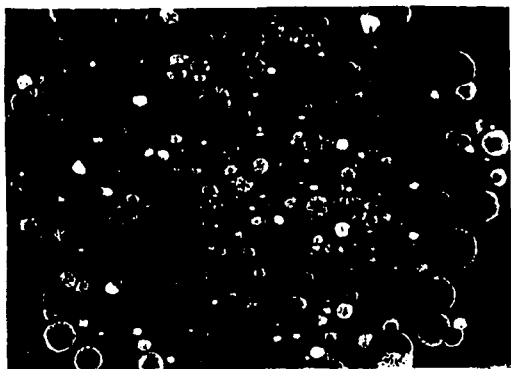
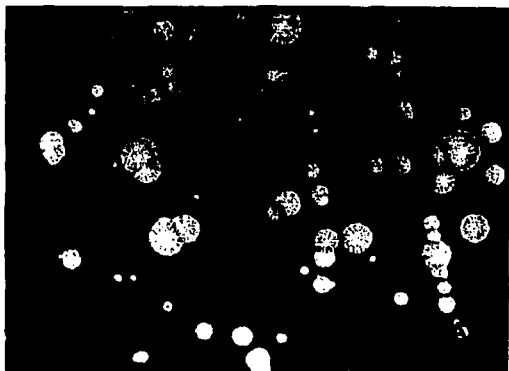


Fig. 4 Diferentes fenotipos morfológicos después del tratamiento con UV (60 s): A) cepa EH-36 y B) cepa EH-143.

FALLA DE ORIGEN

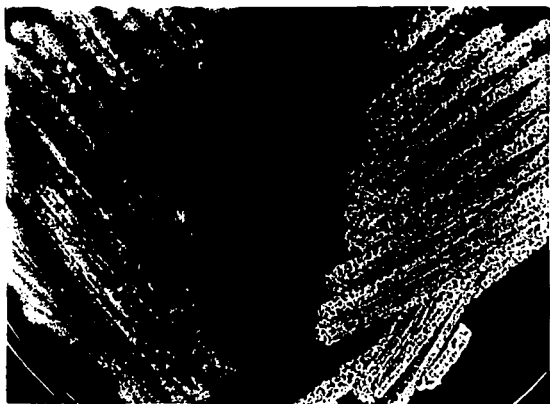


Fig. 5 Comparación de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-36 (izquierda) con la mutante morfológica UVM9-36 (derecha).



Fig. 6 Comparación de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-143 (izquierda) con la mutante morfológica UVM1-143 (derecha).

Tabla 8. Características fenotípicas e identificación por exoantígenos de las mutantes morfológicas de *Sporothrix schenckii*

CEPAS	IDENTIFICACION POR EXOANTIGENOS	CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS
EH-36	+	Blanca, membranosa filamentosa de bordes irregulares. Cepa silvestre, control positivo
UVM1-36	+	Blanca, de crecimiento lento, bordes regulares, cerebriforme, con sectores filamentosos
UVM3-36	+	Blanca, de crecimiento lento, compacta, bordes regulares
UVM6-36	+	Blanca, de bordes definidos, crecimiento lento y una alta frecuencia de reversión
UVM9-36	+	Blanca, de crecimiento lento, viabilidad baja (10%), se despega fácilmente del medio
EH-143	+	Negra, membranosa filamentosa de bordes irregulares. Cepa silvestre, control positivo
UVM1-143	+	Blanca, de crecimiento lento con bordes definidos, no adherente
UVM3-143	+	Presenta clones blancas y negras, de bordes definidos y crecimiento lento, no adherente
UVM6-143	+	Blanca, de bordes irregulares cremosa en el centro y con filamentos en los bordes
UVM8-143	+	Negra, de bordes irregulares y consistencia cremosa
EH-155	-	<i>Candida albicans</i> . Control negativo

Las características de las cepas silvestres y mutantes se describen de cultivos sde 7 días en medio YPG e incubadas 7 días a 28°C.

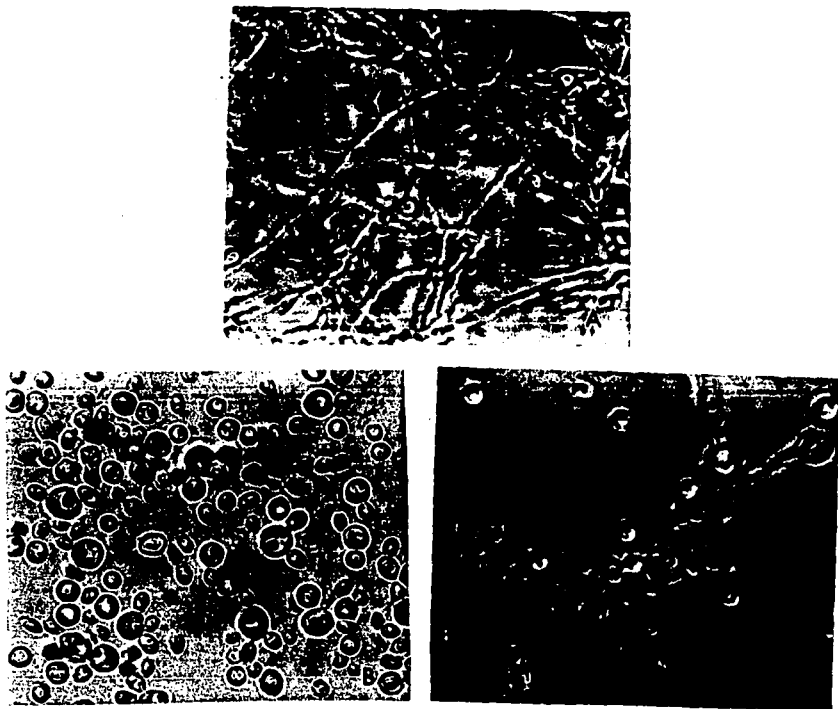


Fig. 7 Comparación de la morfología microscópica de la cepa silvestre de Sporothrix schenckii EH-36 (A) y dos aspectos de la mutante morfológica UVM9-36 (B, C) (1000 X).

FALLA DE ORIGEN

del mutante, una aparente pérdida del patrón de crecimiento apical así como el engrosamiento de algunos fragmentos hifales.

Se obtuvo el número de mutantes morfológicos, auxótrofos y no pigmentados después del tratamiento con UV de ambas cepas; la frecuencia de cada tipo de mutante se obtuvo de la manera descrita para los mutantes espontáneos. Las frecuencias obtenidas se muestran en la tabla 8. De una población total de 1656 colonias analizadas derivadas de la cepa EH-36 se encontró una frecuencia de alrededor 8.45×10^{-3} mutantes morfológicos; de $< 6.04 \times 10^{-4}$ mutantes alterados en la pigmentación y de cerca de 1.2×10^{-3} mutantes auxótrofos. Con respecto a la cepa pigmentada EH-143, en 2036 colonias analizadas se obtuvieron mutantes morfológicos a una frecuencia cercana a 5.9×10^{-3} , mutantes alteradas en la pigmentación a una frecuencia de 6.8×10^{-3} y mutantes auxótrofos a una frecuencia de alrededor de 1.96×10^{-3} . La comparación de la frecuencia de aparición de los diferentes tipos de mutantes indica que los alterados en morfología y los auxótrofos se producen a frecuencias similares en ambas cepas. A las mutantes que perdieron las características macroscópicas de las cepas silvestres, se les denominó mutantes morfológicas (UVM) y a las que perdieron el pigmento de la cepa silvestre se les denominó mutantes no pigmentadas (UVNP).

Para comprobar que los mutantes obtenidos fueron derivados de las cepas silvestres, se realizaron dos

Tabla 9. Obtención de mutantes inducidas por UV en *Sporothrix schenckii*

CEPA	POBLACION ANALIZADA	NUMERO Y FRECUENCIA DE MUTANTES EN LA CATEGORIA QUE SE INDICA		
		MORFOLOGICOS	ALTERADOS EN PIGMENTACION	AUXOTROFOS
EH-36	1656	14 (8.45×10^{-3})	0 ($< 6.04 \times 10^{-4}$)	2 (1.2×10^{-3})
EH-143	2036	12 (5.9×10^{-3})	14 ($< 6.8 \times 10^{-3}$)	4 (1.96×10^{-3})

La búsqueda de mutantes se realizó en cajas con el medio especificado en Material y Métodos; los cultivos se incubaron a 28° por 7 días. La población analizada corresponde a la suma de tres experimentos distintos con UV. Los números entre paréntesis indican la frecuencia del tipo particular de mutante en relación a la población analizada.

experimentos: un método indirecto que contempla la detección de exoantígenos de los mutantes y las silvestres por medio de la prueba de inmunodifusión y la reversión espontánea de los mutantes al fenotipo silvestre. Se seleccionaron cuatro mutantes morfológicos de los más frecuentes de cada cepa silvestre; sus características fenotípicas y los resultados de la prueba de detección de exoantígenos se muestran en la tabla 9. Como se aprecia independientemente del fenotipo morfológico de las cepas mutantes, todos dieron una reacción positiva en la prueba de identificación por exoantígenos. Al determinar la frecuencia de reversión espontánea, las mutantes UVM1-36, UVM3-36, UVM6-36, y la UVM1-143 mostraron frecuencias de reversión alta (Tabla 10). A pesar de que los cinco mutantes restantes, no presentaron reversión espontánea en la población probada, todos ellos fueron identificados por las líneas de identidad que se observaron al realizar las pruebas de inmunodifusión (ver Tabla 8). La figura 8A muestra la reversión espontánea al fenotipo silvestre del mutante morfológico UVM6-36 y en la 10B se observa la reversión de la cepa UVM1-143. De los cuatro mutantes morfológicos derivados de la cepa silvestre EH-36, solo la UVM9-36 se conservó estable en la población muestreada, a pesar de tener una viabilidad baja (10 %) y un crecimiento lento. Los mutantes morfológicos derivados de la cepa EH-143 mostraron una mayor estabilidad, solo la UVM1-143 mostró una frecuencia alta de reversión (Tabla 10). El

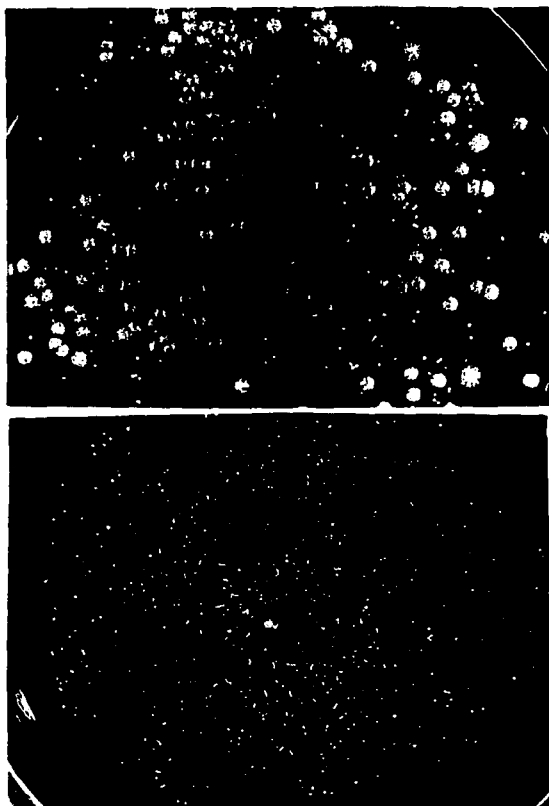


Fig. 8 Reversión espontánea de las mutantes morfológicas:
UVM6-36 (A) y UVM1-143 (B). Las flechas indican
colonias que revitieron al fenotipo silvestre.

Tabla 10. Frecuencia de reversión espontánea de las mutantes morfológicas inducidas por UV de Sporothrix schenckii

Cepa	N° de colonias probadas	N° de revertantes	Frecuencia de reversión
UVM1-36	2147	80	3.7×10^{-2}
UVM3-36	15480	11	7.1×10^{-4}
UVM6-36	730	393	0.53
UVM9-36	732	0	$< 1.36 \times 10^{-3}$
UVM1-143	5972	9	1.5×10^{-3}
UVM3-143	49658	0	$< 2.01 \times 10^{-5}$
UVM6-143	2045	0	$< 4.8 \times 10^{-4}$
UVM8-143	1180	0	$< 8.4 \times 10^{-4}$

mutante morfológico UVM6-143 era un mutante que además carecía de pigmento y al realizar la determinación de la frecuencia de reversión, se observó la presencia de colonias pigmentadas y no pigmentadas, que conservaban la morfología del mutante (Fig. 9)

Los mutantes morfológicos presentaban un crecimiento lento; se probó su capacidad de crecer en un medio con fuente de carbono no fermentable (glicerol) y con glucosa simultáneamente, observándose crecimiento en ambos casos. A pesar de no haber realizado la determinación de la frecuencia de reversión en las colonias auxótrofas mutantes, al tratar de caracterizarlas fisiológicamente se observó una reversión de todas las que se habían obtenido en forma espontánea.

Actualmente se cuenta con mutantes auxótrofas inducidas con UV, una derivado de la cepa EH-36 y tres derivados de la cepa EH-143. En los mutantes no pigmentados se observó el mismo fenómeno; de los 14 mutantes sin pigmento inicial, actualmente se conservan sólo seis, los ocho restantes adquirieron nuevamente su pigmento.

A dos de los mutantes morfológicos inducidos con UV (UVM3-36 y UVM3-143), se les irradió nuevamente por 60s. Los resultados no mostraron reversión al fenotipo silvestre, sin embargo, se observó la aparición de los mismos fenotipos morfológicos que anteriormente se habían presentado en la primera irradiación con UV. En la figura 10A y B se observa



Fig. 9 Determinación de la frecuencia de reversión del mutante morfológico UVM6-143, las flechas indican la aparición de colonias pigmentadas.

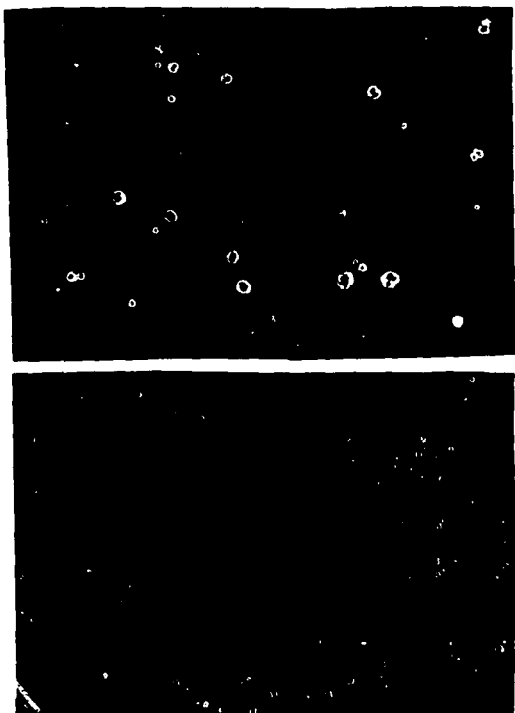


Fig. 10 Mutantes morfológicas UVM3-36 (A) y UVM3-143 (B) sin reversión después de un segundo tratamiento con UV. Las flechas muestran la aparición de fenotipos diferentes al original.

la aparición de mismos fenotipos morfológicos de las mutantes UVM3-36 y UVM3-143 respectivamente después de la irradiación con UV, que repetidamente se observaron con la primera exposición a UV de las cepas silvestres.

Discusión

Desde que se conoce la esporotricosis y su agente etiológico, S. schenckii, se ha observado la pigmentación variada que presentan diferentes cepas. Generalmente la colonia del hongo al ser aislada del paciente, comienza de un color crema que con el tiempo de incubación va adquiriendo pigmentación y en la mayoría de los casos se transforma en una colonia negro al cabo de 3-4 semanas. Sin embargo, la cepa EH-36 de color crema, hasta la fecha no ha adquirido pigmentación después que fué clonada aún en periodos de incubación largos. En otros hongos patógenos con pigmento como Wangiella dermatitidis y Cryptococcus neoformans, se ha encontrado una asociación entre el pigmento de diferentes tipos y la virulencia (10, 11, 36, 37, 57, 59). El pigmento fué caracterizado como melanina para ambos hongos (11, 57). En W. dermatitidis al obtener mutantes deficientes en melanina y compararlas con las cepas silvestres se observó la diferencia en virulencia en un modelo experimental murino (10). En C. neoformans se presenta el pigmento solamente en presencia del sustrato (dopa, dopamina, catecolaminas, etc.) al activarse la enzima fenol-oxidasa (37). También se observó la mayor virulencia de la cepa silvestre al compararla con las mutantes albinas obtenidas (36).

Benitez (5) determinó la virulencia de las cepas de S. schenckii utilizadas en este trabajo y observó que la DL₅₀ de la cepa pigmentada era menor con respecto a la cepa

de color crema sugiriendo su mayor virulencia. Garrison (15) observó en la parte externa de los conidios de S. schenckii depósitos de material electrodensó, sugiriendo que podría tratarse de depósitos de melanina. Sin embargo, a la fecha, no se conoce la naturaleza bioquímica y las bases genéticas que originan la pigmentación en este hongo.

Los factores inductores de la transición dimórfica son muy variados; sin embargo, a la fecha, poco se conoce sobre la interrelación entre ellos. El estudio del dimorfismo de S. schenckii se inició para conocer el proceso de transformación de conidio/levadura del hongo con aminoácidos, que en otros estudios con el mismo hongo (), se consideraban como inductores de la fase parasitaria. Los resultados obtenidos en los experimentos de transición de conidio/levadura revelaron datos interesantes. Al probar los aminoácidos asparagina, arginina y cisteína a 28°C, pH 7.2, se observó que la cisteína no era capaz de inducir la germinación a las 72 h; sin embargo si la indujo a pH de 5.5 observándose un desarrollo en forma micelial. Algunos investigadores (13, 21, 38, 63) han demostrado que el transporte de aminoácidos en levaduras, se realiza por medio de un cotransporte-sustrato-H⁺ y está directamente relacionado con el gradiente electroquímico de protones. Al parecer, la captación de la cisteína está directamente relacionada con el pH y al no existir los protones necesarios el cotransporte-sustrato-H⁺ la captación no se lleva a cabo. Lammert y cols. (38) demostraron que en

algunos medios no regulados en su pH, algunos hongos presentan un intercambio de cationes entre los componentes de la pared celular y los del medio; este intercambio origina una disminución drástica del pH extracelular, que impidió demostrar el cotransporte asociado a protones. En este trabajo se observó que en cultivos de S. schenckii ocurre un comportamiento similar al sembrar en medios no regulados; la disminución del pH se presentó en forma drástica. La realización de estudios referentes a los sistemas de transporte y la determinación de la participación del gradiente electroquímico en los procesos morfogénéticos queda sin definir y como una perspectiva interesante a futuro.

En S. schenckii, hasta hace una década se consideraba que la temperatura era un parámetro indispensable, en la transición de micelio a levadura; sin embargo, los trabajos de Mendoça y cols. (51), y Rodríguez del Valle y cols (67) demostraron que el proceso dimórfico puede ser independiente de temperatura, parecía estar determinado por el pH extracelular y que la germinación de los conidios de S. schenckii requiere de la presencia de iones Ca^{2+} (66). En nuestro trabajo, los resultados mostraron que el pH extracelular participa como un factor que regula la morfología. La temperatura de 37°C fué un factor que impidió la germinación a pH de 7.2 al emplear asparagina y cisteína. Al someter a S. schenckii a una temperatura elevada (37°C), pudieron haberse ocasionado alteraciones

en la síntesis de proteínas, que condujeron a cambios en la regulación de la actividad o de la síntesis de permeasas o bien a cambios en la fluidez de la membrana (18, 30, 76). Así, para tratar de explicar los cambios morfogénéticos en S. schenckii y su regulación por factores ambientales (temperatura, pH, nutrientes, etc.) es necesaria otro tipo de experimentación.

Recientemente en H. capsulatum, se ha demostrado la expresión de genes selectivos y la síntesis de proteínas que originan un programa de desarrollo ordenado, que incluye cambios en los requerimientos nutricionales y adaptación al choque térmico, dentro de los cuales se encuentran genes específicos de morfología (YPs70 y YPs3) (31, 44). En S. schenckii se ha aislado una proteína que se presenta específicamente cuando el hongo crece en forma de micelio, sin embargo su papel no ha sido determinado (22). Los resultados de este trabajo sobre el efecto del pH en el desarrollo de S. schenckii correlacionan con los encontrados por Rodríguez del Valle y cols. (67). Estos investigadores, al realizar la transición de conidios de S. schenckii a 28°C, en un medio definido químicamente y bicarbonato de amonio como fuente de nitrógeno, encontraron que el pH neutro inducía la forma de levadura y que al disminuir el pH a valores menores de 6.0, se producía un crecimiento apical. Los autores postulan que el pH externo es un factor que regula el proceso dimórfico y que es independiente de temperatura. El papel del CO₂ en el cambio

de conidio/levadura, no ha sido determinado pero podría estar asociado a cambios intracelulares de pH, y originar un mantenimiento en la morfología. El crecer nuestras cepas de S. schenckii en un medio productor de CO₂, podría haber originado un mantenimiento de la morfología de levadura y ser independiente de temperatura.

Travassos (88) establece que la asparagina es un aminoácido que induce la forma de levadura de S. schenckii a 37°C, sin embargo, en este trabajo se observó que el hongo era incapaz de germinar a 37°C y que tenía un pobre crecimiento a 28 °C. En levaduras, Eddy (13) ha observado que para que ocurra crecimiento es necesaria una absorción y una hidrólisis intracelular posterior de la asparagina a aspartato y amonio. El crecimiento al usar este aminoácido es lento, por el efecto inhibitorio del aspartato y la absorción del aminoácido a través de una permeasa general. Esto podría explicar el crecimiento lento de S. schenckii que obtuvimos al sembrarlo en un medio con este aminoácido.

Uno de los aminoácidos que se emplearon en este trabajo, la arginina, era un fuerte inductor de la fase de levadura, aún a 28°C. Sin embargo, se observó que esta transición, se ve afectada al disminuir el pH a 5.5, cambiando totalmente el patrón de desarrollo a un crecimiento apical. Es posible que el pH influya en la entrada del aminoácido a las células a través de posibles

efectos sobre permeasas o sobre un paso posterior con el metabolismo del aminoácido o con los blancos intracelulares de éste. Peterson y Calderone (56) demostraron que los extractos lisosomales de macrófagos inhibían el transporte de aminoácidos en *C. albicans* y la transformación de éste a la fase parasitaria. Esto sugiere una relación entre la captación de aminoácidos y la diferenciación. En *C. albicans* (13), se observó que la captación de L-prolina era inducible y determinaron la presencia de permeasas específicas para L-lisina, L-arginina y L-histidina.

Ciertas investigaciones han demostrado que pueden existir cepas de la misma especie (50), con un comportamiento diferente en la transición a pesar de que los parámetros de los cultivos sean los mismos. Anteriormente se había relacionado la capacidad que tienen algunas cepas de hongos dimórficos de realizar una transición más rápida a la forma parasitaria comparandola con otras de la misma especie. En este trabajo se observó que, al realizar la transición a la fase parasitaria en aquellos medios de cultivo donde se podían obtener levaduras, la cepa EH-143 realizaba una transición más rápida y eficiente con respecto a la cepa EH-36. Se ha pensado que esta rapidez este asociada a la mayor virulencia de la cepa EH-143. La determinación de las fases del ciclo celular de ambas cepas sería importante para descartar si es la rapidez del cambio morfológico o la duración del ciclo

celular, la que interviene en la capacidad de producir daño.

Al usar cisteína como fuente de nitrógeno a pH 7.2 y 37°C, no se observó germinación de los conidios. Estos resultados sugieren una inhibición por alteraciones en las permeasas, de manera similar a lo postulado anteriormente para asparagina. A 28°C, se observó un escaso crecimiento de formas isodiamétricas, posiblemente asociado al alto potencial de oxido-reducción originado por la concentración del aminoácido. Al usar arginina, a un pH de 7.2 y 28°C se obtienen levaduras; pudiera ser que el metabolismo de arginina puede originar la síntesis de poliaminas, compuestos que están involucrados en los cambios morfogénéticos de Mucor rouxii (85). Como resumen, los resultados de este trabajo indican que los factores que influyen en la transición conidio/levadura es una asociación entre la fuente de nitrógeno y el pH.

Después de conocer el comportamiento de la transición conidio/levadura de las dos cepas en estudio, se inició la búsqueda de mutantes bioquímicas y morfológicas, que darán a futuro bases para comprender la patogenia de S. schenckii.

La tinción con DAPI de las estructuras de S. schenckii, demostró la presencia la presencia de un solo núcleo en conidios, hifas y levaduras. Los conidios se consideraron idóneos para llevar a cabo los ensayos de mutagénesis debido

a que son formas uninucleadas, fáciles de obtener y forman una población homogénea genéticamente.

En las cepas estudiadas de *S. schenckii* EH-36 y EH-143 se encontró una frecuencia alta de fenotipos auxótrofos espontáneos, la cual fué de alrededor de 9.1×10^{-5} y de 1.07×10^{-4} , respectivamente. En el hongo dimórfico patógeno *C. albicans*, que no posee estadio sexual como *S. schenckii* y que es diploide, se han reportado frecuencias menores de mutación espontánea, alrededor de 10^{-6} y 10^{-8} (42). Además, en este organismo demostró la ocurrencia de recombinación mitótica espontánea de alrededor de 1×10^{-4} (92). En el hongo no patógeno *S. cerevisiae* la frecuencia de recombinación mitótica espontánea es aún menor (1.2×10^{-5}) (92).

En organismos diploides, en una misma célula, se puede producir una mutación seguida de una recombinación mitótica y originar un organismo homocigoto recesivo para cierto carácter (61, 62). En hongos en los que se desconoce el grado de ploidía, al ser tratados con UV, el carácter de auxotrofia puede estar dado por una mutación seguida por una recombinación mitótica o bien, si el organismo ya es heterocigótico para la mutación en cuestión, conducir a un homocigoto mutante por alteración genética de la copia normal del gene. Al tratar con UV los conidios de *S. schenckii* para obtener mutantes, se observó, respecto de la búsqueda de mutantes espontáneos, un aumento en la frecuencia de fenotipos auxótrofos. Las frecuencias fueron

de alrededor de 1.2×10^{-3} en la cepa EH-36 y de 1.96×10^{-3} en la EH-143. Queda por determinar si estos mutantes provienen de eventos de mutación de un complemento cromosómico haploide, diploide (heterocigótico) o, en este último caso, de recombinación mitótica.

Al iniciar la discusión, se mencionó que la diferencia macroscópica entre las cepas EH-36 y EH-143, consistió en la pigmentación. Por experimentos realizados en el laboratorio se determinó que la DL_{50} de la cepa EH-36 era mayor, con respecto a EH-143 (58, 59). En hongos, la pigmentación negra ha sido asociada a una mayor resistencia a radiaciones, UV, calor y fagocitosis (). Al iniciar este trabajo se pensó en la utilización de la cepa EH-143 (cepa negra), en la obtención de mutantes no pigmentadas, que serán utilizadas posteriormente en estudios asociados a patogenicidad. Sin embargo, al irradiar los conidios se observó que se presentaba un número elevado de colonias sectoriales con variaciones en el pigmento, estos aunado a la alta frecuencia de obtención de mutantes auxótrofas y morfológicas sugieren la posibilidad de que S. schenckii sea diploide y que, al igual que algunos aislados de C. albicans (62, 92) sean heterocigóticos para las mutaciones de auxotrofías. En este contexto el tratamiento con UV induciría recombinación mitótica, la cual conduciría a homocigosis para la mutación. Alternativamente, la aparición de los mutantes mencionados sugieren que en S. schenckii

ocurren fenómenos genéticos similares a los responsables de los encendidos fenotípicos o rearrreglos cromosomales descritos en *C. albicans* (69, 80). En este organismo se han descrito dos sistemas de encendido fenotípico (phenotypic switching) (77, 78, 80, 84, 91). El primero, postulado por Slutsky y cols. (77), han demostrado que el hongo tiene una frecuencia alta (1.4 %) de pasar espontáneamente de un fenotipo morfológico a otro y este se incrementa 200 veces al tratarse la células con UV. El segundo (78) consiste en la alta frecuencia que tiene *C. albicans* de pasar de un fenotipo blanco a uno opaco; la frecuencia es similar al descrito en el primero (77). El segundo sistema de encendido demostró que, además de las diferencias fenotípicas macroscópicas, se observan también diferencias en el tipo de gemación, tamaño celular, volumen, estructura nuclear, distribución en los patrones de actina y en la síntesis de polipéptidos mayoritarios. Al investigar las bases genéticas que originan este fenómeno, los mismos investigadores (91) han encontrado secuencias repetidas en la parte media de los cromosomas, localizada en la región telomérica. Los patrones de las secuencias repetidas son idénticos en diferentes fenotipos y tienen la particularidad de saltar en determinado momento. Además, observaron que no sólo es un fenómeno que se presenta *in vitro*, sino que también sucede en aislamientos del hongo a partir de infecciones vaginales, aunque en estos ocurre con una frecuencia mayor. Recientemente se ha postulado que la

variación fenotípica producida por los sistemas de encendido, pueden inducir cambios en la resistencia a fármacos antifúngicos o en la antigenicidad del mismo (91). Lane y García (39) apoyan el razonamiento anterior al determinar, la producción de fosfolipasa en una cepa silvestre de *C. albicans* y en tres de sus variantes morfológicas; observaron que la actividad de las fosfolipasas está relacionada con la morfología y que esta característica podría estar relacionada a la vez con la patogenicidad del hongo. Como anteriorente se menciona, el sistema de encendido fenotípico varía cuantitativamente dependiendo del origen de la cepa de *C. albicans* y la variación no está ligada únicamente a la morfología. Kaur y cols. (30) determinaron que la morfología está involucrada en la captación de aminoácidos durante el dimorfismo de *C. albicans* regulado por el pH; observaron que la tasa de captación de los aminoácidos L-alanina, L-fenilalanina y L-lisina es menor en la fase de micelio, pero la captación de metionina es mayor en esta misma fase. Sin embargo, estos mismos autores determinaron que la captación de glicina, ácido glutámico y L-prolina es similar en ambas fases. Además, determinaron que existe una variación en la captación de los aminoácidos y durante la transición. En el caso de *S. schenckii*, la determinación cuantitativa de ADN, la electrocariotipificación y el mapeo usando marcadores de auxotrofia u otros podrían comprobar la hipótesis postulada.

CONCLUSIONES

1. El pH cercano a la neutralidad fue un factor determinante para que se presentara un crecimiento isodiamétrico (levaduras), con las fuentes de nitrógeno probadas.
2. La disminución del pH del medio induce un crecimiento micelial, independientemente de las fuentes de nitrógeno y de la temperatura de incubación probadas.
3. A 37°C, Sporothrix schenckii muestra requerimientos específicos de fuente de nitrógeno para germinar; algunas fuentes de nitrógeno como bicarbonato de amonio y arginina son permisivos, en tanto que otros, como asparagina y cisteína, son restrictivos.
4. La baja frecuencia de mutantes espontánea e inducida y la presencia de colonias sectoriales sugieren que S. schenckii, podría ser diploide y heterocigoto para los caracteres buscados.
5. La elevada frecuencia de fenotipos morfológicos de las cepas de S. schenckii irradiadas con UV, así como la alta frecuencia de reversión sugiere una similitud con el fenómeno de encendido fenotípico de Candida albicans.

ABSTRACT

In the study of Sporothrix schenckii dimorphism, the present work was aimed to obtain the optimal conditions for the conidium/yeast transition of this fungus, as well as the search of spontaneous and UV morphologic and auxotrophic mutants. For the dimorphic transition, incubation temperature (28 and 37°C), extracellular pH (5.5 and 7.2) and different nitrogen sources were assayed. Predominant yeast forms were obtained with ammonium bicarbonate and arginine as nitrogen sources at pH 7.2, independent of temperature. Apical growth (mycelium) was observed at pH 5.5, at 28 and 37°C, independent of the nitrogen source. Concerning the search of mutants, low frequencies were obtained for morphologic and non-pigmented mutants found, 4.5×10^{-4} for EH-36 strain and 1.07×10^{-4} for EH-143 respectively. The auxotrophic mutants frequency was higher (1.07×10^{-4}). A great variety of morphologic phenotypes was observed as well as sectorial colonies after UV treatment. Results of the conidium/yeast transition assays suggest the extracellular pH as an essential factor for yeast morphology, but not the incubation temperature. Results of the mutants characters obtained suggest that these could be given by a mutation followed by UV treatment induced mitotic recombination. Finally the high spontaneous reversion frequency to the wild phenotype of morphologic mutants induce to suggest that S. schenckii could share the phenotypic switching described for Candida albicans.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson J, Cundiff L, Schnars B, Gao M, Mackenzie I, Soll DR. 1989. Hypha formation in the white-opaque transition of Candida albicans. Infect Immun. 57: 458-467.
2. Arnold WN, Mann LC, Garrison RG. 1987. Media-induced departures from the usual, temperature-dependent cell shapes of Sporothrix schenckii and concomitant changes in the acid phosphatase isoenzyme patterns. Microbios 52: 161-171.
- 3.- Bartnicki-García S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Ann Rev Microbiol. 22: 87-107.
- 4.- Bartnicki-García S, Lippman E. 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in Mucor rouxii. Science. 165: 302-304.
5. Benítez-Alonso JI. 1991. Determinación de la DL₅₀ de Sporothrix schenckii en ratones Taconic machos. Tesis de Licenciatura Químico-Farmacéutico-Biólogo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla.
- 6.- Bossche HV, Kobayashi GS, Edman JC, Keath EJ, Maresca B, Soll DR. 1992. Molecular determinants of fungal dimorphism. J Med Vet Mycol. 30 Supplement 1: 73-76.
- 7.- Cannon DC. 1986. Isolation of mycelial mutant of Candida albicans. J Gen Microbiol. 132: 2405-2407.
- 8.- Cole G, Sun SH. Arthroconidium-spherule-endospore transformation in Coccidioides immitis. In: Szaniszlo PJ, Harris JL (Eds.). Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans and animals. Plenum Press, New York. pp. 281-336.
- 9.- Dabrowa N, Zeuthen ML, Howard DH. 1990. Nutritional stress proteins in Candida albicans. J Gen Microbiol. 136:1387-1391.
- 10.- Dixon DM, Polak A, Szaniszlo PL. 1987. Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient Wangiella dermatitidis. J Med Vet Mycol. 25: 97-106

11. Dixon DM, Szaniszló PJ, Polak A. 1991. Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeochyphomycosis. In: Cole GT, Hoen HC. (Eds.). The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 291-318.
- 12.- Drutz DJ, Huppert M. 1983. Coccidioidomycosis: Factors affecting the host parasite interaction. *J Infect Dis.* **147**: 372-390.
- 13.- Eddy AA. 1982. Mechanism of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv Microbiol Physiol.* **23**: 1-78.
- 14.- Frey C L, Drutz DJ. 1986. Influence of fungal surface components on the interaction of Coccidioides immitis with polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis.* **153**: 933-943.
- 15.- Garrison RG, Boyd KS, Mariat F. 1975. Ultrastructural studies of mycelium-to-yeast transformation of Schenckii schenckii. *J Bacteriol.* **124**:959-968.
16. Garrison RG. 1985. Cytological and ultrastructural aspects of dimorphism. In: Szaniszló PJ, Harris JL (Eds.). Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans and animals. Plenum Press, New York. pp. 15-47.
17. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. 1990. Pathogenicity determinants of Candida. *Mycoses.* **33**: 265-282.
18. Ghannoum MA, Janini G, Khamis L, Radwan SS. 1986. Dimorphism associated variations in the lipid composition of Candida albicans. *J Gen Microbiol.* **132**: 2367-2375.
19. Gibbons GF, Howard DH. 1986. Arginine auxotrophs of Candida albicans deficient in argininosuccinate lyase. *J Gen Microbiol.* **132**: 263-268.
20. Gow NAR. 1988. Biochemical and biophysical aspects of dimorphism in Candida albican. In: Torres-Rodríguez JM. (Ed.). Proceedings X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology-ISHAM. JM Prous Science, Barcelona. pp. 73-77.
21. Gupta P, Mahanty SK, Ansari S, Prasad R. 1992. Transport of acidic amino acids in Candida albicans. *J Med Vet Mycol.* **30**: 27-34.

- 22.- Han-Yaku H, Naka W, Tajima S, Harada M, Masuda M, Ikatami M, Nishikawa T. 1991. Differential gene expression in the yeast and mycelial form of Sporothrix schenckii. XI Congress of the international Society for Human and Animal Mycology. Montréal, Québec, Canada.
23. Hilton C, Markie D, Corner B, Rikkerink E, Poulter R. 1985. Heat shock induces chromosome loss in the yeast Candida albicans. Mol Gen Genet. 200: 162-168.
- 24.- Hubbard MJ, Markie D, Poulter RTM. 1986. Isolation and morphological characterization of a mycelial mutant of Candida albicans. J Bacteriol. 165: 61-65.
25. Ishizaki H, Wheat RW, Kiel DP, Conant NF. 1978. Serological cross-reactivity among Sporothrix schenckii, Ceratomyces, Europhium and Graphium species. Infect. Immun. 21: 585-593.
26. Kakar SN, Magee PT. 1982. Genetic analysis of Candida albicans: Identification of different isoleucine-valine, methionine, and arginine alleles by complementation. J Bacteriol. 151: 1247-1252.
27. Kakar SN, Partridge RM, Magee PT. 1983. A genetic analysis of Candida albicans: Isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. Genetics. 104: 241-255. ?
- 28.- Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. J Bacteriol. 110: 208-218.
29. Kaufman L, Standard P, Padhye AA. 1983. Exoantigen tests for the immunoidentification of fungal cultures. Mycopathologia. 82: 3-12.
30. Kaur S, Mishra P, Prasad R. 1988. Dimorphism associated changes in amino acid transport of Candida albicans. FEMS Microbiol Lett. 50: 97-100.
31. Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Variable expression of a Yeast-Phase-Specific gene in Histoplasma capsulatum strains differing in thermotolerance and virulence. Infect Immun. 57: 1384-1390.
32. Kimberlin CL, Hariri AR, Hempel HO, Goodman NL. 1981. Interactions between Histoplasma capsulatum and macrophages from normal and treated mice: Comparison of mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. Infect Immun. 34: 6-10.

- 33.- Klimpel KR, Goldman WE. 1988. Cell walls from avirulent variants of Histoplasma capsulatum lack α -(1,3)-glucan. Infect Immun. **56**:2997-3000.
34. Kobayashi GS, Medoff G, Maresca B, Sacco M, Kumar BV. 1985. Studies on phase transitions in the dimorphic pathogen Histoplasma capsulatum. In: Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Szaniszló PJ, Harris JL (Eds.). Plenum Press, New York. pp. 69-91.
- 35.- Kurtz MB, Kirsch DR, Kelly R. 1988. The molecular genetics of Candida albicans. Microbiol Sci. **5**: 58-63.
- 36.- Kwong-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ. 1982. Melanin-lacking mutants of Cryptococcus neoformans and their virulence for mice. J Bacteriol. **150**: 1414-1421.
- 37.- Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in Cryptococcus neoformans. Rev Infect Dis. **10**: 436-439.
38. Lammert T, Prasad R, Höfer M. 1987. Relevance of cation-exchange capacity of cell wall in detecting H^+ -symport in yeast. Biochem Int. **15**:753-759.
39. Lane T, Garcia JR. 1991. Phospholipase production in morphological variants of Candida albicans. Mycoses. **34**: 217-220.
- 40.- Leija A, Ruiz-Herrera J, Mora J. 1986. Effect of L-amino acids on Mucor rouxii dimorphism. J Bacteriol. **168**: 843-850.
41. Lott TJ, Magee PT, Barton R, Chu W, Kwon-Chung KJ, Grindle S, Homma M, Iwaguchi S, Kelly R, Lasker BA, Marrinan J, Monk B, Kurtz MB, Perlin D, Scherer S, Schmidt D, Tanaka K. 1992. The molecular genetics of Candida albicans. J Med Vet Mycol. **30**, supplement 1: 77-85.
42. Magee PT, Rikkerink EHA, Magee BB. 1988. Methods for the genetic and molecular biology of Candida albicans. Anal Biochem. **175**: 361-372.
43. Manning M, Snoddy CB, Frontling RA. 1984. Comparative pathogenicity of auxotrophic mutant of Candida albicans. Can J Microbiol. **30**: 31-35.
- 44.- Maresca B, Kobayashi GS. 1989. Dimorphism in Histoplasma capsulatum: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol Rev. **53**:186-209.

- 45.- Maresca B, Lambowitz AM, Kumar GA, Grant GS, Kobayashi GS, Medoff G. 1981. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus Histoplasma capsulatum. Proc Natl Acad Sci USA. 78: 4596-4600.
- 46.- Mariat F, De Brieve C. 1968. Caractères de la croissance et évolution de la teneur en constituants cellulaires des phases levadure et filamenteuse de Sporothrix schenckii, champignon dimorphique pathogène pour l'homme. Ann Inst Pasteur. 115:1082-1092.
47. Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, Carratu LA. 1986. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of Histoplasma capsulatum. J Clin Invest. 78: 1638-1647.
- 48.- Medoff G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S. 1987. Morphogenesis and pathogenicity of Histoplasma capsulatum. Infect. Immun. 55: 1355-1358.
49. Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, Carratu L. 1986. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of Histoplasma capsulatum. Science. 231: 476-479.
50. Medoff G, Painter A, Kobayashi GS. 1987. Mycelial-to-yeast-phase transitions of the dimorphic fungi Blastomyces dermatitidis and Paracoccidioides brasiliensis. J Bacteriol. 169: 4055-4060.
- 51.- Mendonça L, Gorin PAJ, Lloyd KO, Travassos LR. 1976. Polymorphism of Sporothrix schenckii surface polysaccharides as function of morphological differentiation. Biochemistry. 15: 2423-2431.
- 52.- Obregón A. 1988. Cambios ultraestructurales en esporas y germinulas de zigomicetos producidos por compuestos que inhiben la germinación o el crecimiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Gajuato. Guanajuato, Gto.
53. Ogrzydziak DM. 1988. Development of genetic map of non-conventional yeasts. J Basic Microbiol 28: 185-196.
54. Olson MV. 1989. Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. J Chromatogr. 470: 377-383.

- 55.- Paris S, Duran-González S, Mariat F. 1985. Nutritional studies on Paracoccidioides brasiliensis the role of organic sulfur in dimorphism. *J Med Vet Mycol.* 23: 85-92.
56. Peterson EM, Calderone RA. 1978. Inhibition of specific amino acid uptake in Candida albicans by lysosomal extracts from rabbit alveolar macrophages. *Infect Immun.* 21: 506-513.
- 57.- Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans. *J Bacteriol.* 150: 1212-1220.
58. Polacheck I, Rosenberger RF. 1977. Aspergillus nidulans mutant lacking α -(1,3)-glucan, melanin, and cleistothecia. *J Bacteriol* 132: 650-656.
59. Polak A. 1989. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses.* 33: 215-223.
- 60.- Pomes R, Gil C, Nombela C. 1985. Genetic analysis of Candida albicans morphological mutants. *J Gen Microbiol.* 131: 2107-2113.
- 61.- Poulter RTM. 1987. Natural auxotrophic heterozygosity in Candida albicans. *CRC Crit Rev Microbiol.* 15: 103-110.
- 62.- Poulter RTM, Hanrahan V, Jeffery K, Markie D, Shepherd MG, Sullivan PA. 1982. Recombination analysis of naturally diploid Candida albicans. *J Bacteriol.* 152: 969-975.
63. Prasad R, Höfer M. 1987. The electrochemical gradient of H^+ in Candida albicans and its relevance to the uptake of nutrients. *Biochem Int.* 14: 617-626.
- 64.- Rippon JW. 1982. *Medical Mycology.* W. B. Saunders, Philadelphia.
65. Rippon JW. 1980. Dimorphism in pathogenic fungi. *CRC Crit Rev Microbiol.* 8: 49-97.
66. Rivera-Rodríguez N, Rodríguez del Valle N. 1992. Effects of calcium ions on the germination of Sporothrix schenckii conidia. *J Med Vet Mycol.* 30: 185-195.

- 67.- Rodríguez Del Valle N, Rosario N, Torres-Blasini. 1983. Effects of pH, temperature, aeration and carbon source on the development of the mycelial or yeast forms of Sporothrix schenckii from conidia. Mycopathologia. 82: 83-88.
- 68.- Ruiz-Herrera J, Ruiz A, López-Romero E. 1983. Isolation and biochemical analysis of Mucor bacilliformis monomorphic mutants. J Bacteriol. 156: 264-272.
69. Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. 1990. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of Candida albicans. J Bacteriol. 172: 1276-1283.
- 70.- San Blas G. 1982. The cell wall of the fungal pathogens: Its possible role in host-parasite relationships. Mycopathologia. 79: 159-184.
71. San Blas G, San Blas F. 1984. Molecular aspects of fungal dimorphism. CRC Crit Rev Microbiol. 11: 101-127.
- 72.- San Blas F, San Blas G, Cova LJ. 1976. A morphological mutant of Paracoccidioides brasiliensis strain IVIC pb 9. Isolation and wall characterization. J Gen Microbiol. 93: 209-218.
- 73.- Shepherd MG. 1985. Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of Candida albicans in experimental infections. Infect Immun. 50: 541-544.
- 74.- Shepherd MG, Poulter RT, Sullivan PA. 1985. Candida albicans: biology, genetic and pathogenicity. Ann Rev Microbiol. 39: 579-614.
- 75.- Sherman F, Fink GR, Hicks JB. 1981. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 76.- Sing M, Jakakumar A, Prasad R. 1978. The effect of altered lipid composition on the transport of various aminoacids in Candida albicans. Arch Biochem Biophys. 191: 680-686.
77. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. 1985. High-frequency switching system in Candida albicans. Science. 230: 666-669.
78. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. J Bacteriol. 169: 189-197.

79. Soll DR. 1985. Candida albicans. In: Szaniszló PJ, Harris JL. (Eds.). Fungal dimorphism amount with emphasis on fungi pathogenic for human and animals. Plenum Press New York.
80. Soll DR. 1988. High frequency switching in Candida albicans: the white-opaque transition. In: Torres Rodríguez JM. (Ed.). Proceedings X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology-ISHAM. JR Prous Science, Barcelona. pp.180-184.
- 81.- Stewart E, Gow NAR, Bowen DV. 1988. Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in Candida albicans. J Gen Microbiol. 134: 1079-1087.
82. Stewart E, Hawser S, Gow NAR. 1989. Changes in internal and external pH accompanying growth of Candida albicans: studies of non-dimorphic variants. Arch Microbiol. 151:149-153.
83. Sun SH, Huppert M. 1976. A cytological study of morphogenesis in Coccidioides immitis. Sabouraudia. 14: 185-198.
- 84.- Suzuki TI, Kobayashi I, Kanbe T, Tanaka K. 1989. High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast Candida albicans. J Gen Microbiol. 135: 425-434.
- 85.- Sypherd PS, Borgia PT, Paznokas JL. 1978. Biochemistry of dimorphism in the fungus Mucor. Adv Microbiol Physiol. 18: 67-103.
86. Szaniszló PJ. 1985. An introduction to dimorphism among zoopathogenic fungi. In: Fungal Dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Szaniszló PJ, Harris JL. (Eds.). Plenum Press, New York. pp.3-13.
87. Toriello C, Mariat F. 1974. Etude comparée des polysides des champignons Ceratocystis stenoceras et Sporothrix schenckii. Composition chimique et analyse immunologique. Ann Microbiol (Inst. Pasteur). 125A: 287-307.
- 88.- Travassos L. 1985. Sporothrix schenckii. In: Fungal Dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Szaniszló PJ, Harris JL. (Eds.). Plenum Press, New York. pp.121-163.
- 89.-Travassos L, Lloyd KO. 1980. Sporothrix schenckii and related species of Ceratocystis. Microbiol Rev. 44: 683-721.

- 90.-Tsuboi R, Sanada T, Takamori K, Ogawa H. 1987. Isolation and properties of extracellular proteinases from Sporothrix schenckii. J Bacteriol. 169: 4104-4109.
91. Van Brunt J. 1987. Jumping phenotypes are hard to keep up with. Bio/Technology. 5:315.
- 92.-Whelan WL. 1987. The genetics of medically important fungi CRC. Crit Rev Microbiol 14: 99-170.
- 93.-Whelan WL, Magee PT. 1981. Natural heterozygosity in Candida albicans. J Bacteriol 145: 896-903.
- 94.-Whelan WL, Partridge RM, Magee PT. 1980. Heterozygosity and segregation in Candida albicans Molec Gen Genet. 180:107-113.