

00377

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**TESIS**

**CARACTERIZACION DE AISLADOS CLÍNICOS Y DE LA NATURALEZA DE  
*Sporothrix schenckii* POR EL POLIMORFISMO DEL DNA OBTENIDO POR  
AMPLIFICACIÓN AL AZAR UTILIZANDO INICIADORES ARBITRARIOS  
(RAPD-PCR) Y SU CORRELACIÓN CON MÉTODOS FENOTÍPICOS**

**QUE PRESENTA:**

**ANA CECILIA MESA ARANGO**

**PARA OBTENE EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
(Biología Experimental)**

**México, D.F., Septiembre del 2000**



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**" De cuantos trabajos me tomé, cuantas dificultades hube de sufrir, cuantas veces desesperé y cuantas otras desistí y empecé de nuevo, por el empeño de aprender, testigo es mi conciencia ".**

**Sor Juana Inés de la Cruz**

**INDICE**

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Epidemiología de la esporotricosis	3
1.1.2 Epidemiología molecular	3
2. Planteamiento del problema	7
3. Hipótesis	7
4. Objetivos	8
4.1 Objetivo general	8
4.2 Objetivos específicos	8
5. Materiales y métodos	9
5.1 Material fúngico	9
5.2 Identificación de los aislados	10
5.2.1 Morfología colonial	10
5.2.2 Morfología microscópica	10
5.2.3 Producción de pigmento de los aislados.	10
5.2.4 Conversión de la forma micelial a la forma de levadura	10
5.2.5 Identificación de los aislados por medio de exoantígenos específicos	10
5.3 Caracterización fenotípica	11
5.3.1 Tamaño de conidios	11
5.3.2 Termotolerancia	11
5.3.3 Determinación de la virulencia de aislados de <i>S. schenckii</i>	11
5.4. Caracterización genotípica	13
5.4.1 Extracción del DNA genómico	13
5.4.2 Determinación de la concentración de DNA	14
5.4.3 RAPD-PCR	14
5.4.4 Programa de amplificación	16
5.4.5 Electroforesis	16
5.4.6 Determinación de la concentración de los iniciadores	16
5.4.7 Curva de MgCl <sub>2</sub>	16
5.4.8 Análisis de datos	17
6. Resultados	19
6.1 Identificación de las cepas	19

6.1.1	Morfología colonial	19
6.1.2	Morfología microscópica	19
6.1.3	Producción de pigmento de los aislados	19
6.1.4	Transición de la forma micelial a levadura	19
6.1.5	Caracterización de las cepas por medio de exoantígenos específicos	20
6.2	Caracterización fenotípica	20
6.2.1	Tamaño de conidios	20
6.2.2	Termotolerancia	20
6.2.3	Virulencia de cepas de <i>S. schenckii</i>	21
6.3	Caracterización genotípica	24
6.3.1	Concentración de DNA en las muestras estudiadas	24
6.3.2	Concentración de los iniciadores	25
6.3.3	Selección de los iniciadores para RAPD-PCR	25
6.3.4	Concentración de MgCl <sub>2</sub>	26
6.3.5	RAPD-PCR	27
7.	Discusión	34
8.	Conclusiones	38
9.	Recomendaciones	39
10.	Referencias	40
11.	Anexos	41

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla I</b>	Cepas de <i>S. schenckii</i> estudiadas	12
<b>Tabla II</b>	Iniciadores utilizados y secuencias respectivas	15
<b>Tabla III</b>	Programas de amplificación ensayados	16
<b>Tabla IV</b>	Tamaño de conidios y termotolerancia a 35 y 37°C de las cepas de <i>S. schenckii</i>	21
<b>Tabla V</b>	Dosis Letal Media ( DL50) de cepas de <i>S. schenckii</i> representativas de cada fuente y procedencia	23
<b>Tabla VI</b>	Porcentajes empleados para el análisis de componentes principales (ACP)	31

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1a</b>	Morfología colonial	19
<b>Figura 1b</b>	Morfología microscópica	19
<b>Figura 2a</b>	Producción de pigmento en el medio Rodríguez del Valle	20
<b>Figura 2b</b>	Levaduras <i>S. schenckii</i> a 35°C en el medio Rodríguez del Valle	20
<b>Figura 3</b>	Exoantígenos de <i>S. schenckii</i> (A1- A19) con cepas representativas de los grupos estudiados (México, MX (clínicos y naturaleza), Guatemala GT, y Colombia CO)	21
<b>Figura 4a</b>	Distribución porcentual de las cepas de origen clínico con %IC > 70	22
<b>Figura 4b</b>	Distribución porcentual de cepas de la forma fija de la esporotricosis con %IC > 70	23
<b>Figura 5</b>	Distribución de la DL50 de cepas de <i>S. schenckii</i> de MX, GT y CO de acuerdo a los grupos de virulencia encontrados	23
<b>Figura 6</b>	Concentración de DNA en gel de agarosa al 0.8% de diferentes cepas de <i>S. schenckii</i>	24
<b>Figura 7</b>	Concentración óptima del iniciador OPBG-01 con la cepa de referencia EH-143 de <i>S. schenckii</i>	25
<b>Figura 8</b>	Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR del DNA de la cepa EH-143 generados con 19 iniciadores del Kit Operon	26
<b>Figura 9</b>	Curva de MgCl <sub>2</sub>	26
<b>Figura 10</b>	Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para cepas de <i>S. schenckii</i>	27
<b>Figura 11</b>	Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cepas de <i>S. schenckii</i> de MX de origen clínico (C) y naturaleza (N), con el iniciador OPBG-14	28
<b>Figura 12</b>	Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para cepas de <i>S. schenckii</i> de CO de origen clínico obtenidos con el oligonucleótido OPBG-14	28
<b>Figura 13</b>	Relación entre los grupos obtenidos por RAPD-PCR con tres iniciadores (OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19) para 44 cepas de <i>S. schenckii</i>	29
<b>Figura 14</b>	Comparación de matrices por la prueba de Mantel	31
<b>Figura 15</b>	Análisis de componentes principales	32
<b>Figura 16</b>	Árbol de tendido mínimo	33

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron 54 aislados de *Sporothrix schenckii*, obtenidos de pacientes con esporotricosis fija y linfangítica, procedentes de México (MX), Guatemala (GT) y Colombia (CO), así como 11 aislados de la naturaleza de México, con base en características fenotípicas (tamaño de conidios, termotolerancia a 35 y 37°C, y virulencia por determinación de DL50 en un modelo murino experimental). A 44 cepas se les realizó análisis genotípico mediante el método de amplificación al azar del DNA polimórfico, utilizando iniciadores arbitrarios y la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Se midió el ancho y el largo de diez conidios mediante un micrómetro ocular calibrado. Se determinó la termotolerancia de todos los aislados a 35 y 37°C, midiendo el diámetro (mm) de la colonia a los 15 días de incubación, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC), tomando como referencia el crecimiento a 28°C. El RAPD-PCR se llevó a cabo con tres iniciadores: OPBG01, OPBG14 y OPBG19. Los resultados del análisis fenotípico mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el largo de los conidios de los aislados clínicos MX ( $2.04 \pm 0.53 \mu\text{m}$ ), GT ( $2.54 \pm 0.78 \mu\text{m}$ ) y CO ( $4.0 \pm 0.95 \mu\text{m}$ ); así como diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición del crecimiento a 35 y 37°C, entre los aislados clínicos MX ( $60.6 \pm 9.0 \% \text{IC}$ ), GT ( $69.4 \pm 6.20 \% \text{IC}$ ) y CO ( $70.1 \pm 10.8 \% \text{IC}$ ). Los aislados de la naturaleza MX mostraron la mayor termotolerancia ( $59.2 \pm 11 \% \text{IC}$ ) a 37°C, y los CO la menor. Se determinó virulencia alta, media y baja en aislados de cada país, correspondiendo la mayor a los aislados de la naturaleza MX(N). Se observó variabilidad entre las cepas de *S. schenckii* y, por tanto, diferentes patrones polimórficos. Con estos, se construyó un dendrograma por el método UPGMA (método de agrupación de pares relacionados basado en promedios aritméticos no ponderados) que mostró la formación de cuatro grupos de acuerdo a su origen geográfico. No se encontró relación entre los patrones polimórficos y las formas clínicas de la enfermedad. La integración de los resultados sugieren que las cepas de *S. schenckii* comparten características tanto feno como genotípicas de acuerdo a la región geográfica.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

*Sporothrix schenckii* Hektoen y Perkins 1900 es el agente etiológico de la esporotricosis, micosis subcutánea crónica o subaguda de amplia distribución mundial que afecta al hombre y algunos animales. Fue descrita por primera vez en 1898 por Benjamín Schenck y a partir de ese momento, se han hecho aportes relevantes relacionados con los aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos de la enfermedad.

*S. schenckii* es un hongo dimórfico que se encuentra en la naturaleza (musgos, plantas, corteza de árboles, algunos animales y material vegetal en descomposición) en forma saprobia, como micelio y conidios. Esta forma también se puede obtener fácilmente en el laboratorio en medios de cultivo a 28°C y 35°C. Al infectar al hospedero el hongo se transforma en levadura que corresponde a la forma parasitaria. La forma de levadura se obtiene en el laboratorio en medios de cultivo ricos en nutrientes a 35°C, y a 28°C en medios con bicarbonato de amonio como única fuente de nitrógeno y hexosas como única fuente de carbono, a un pH de 7.2 (Rodríguez del Valle *et al.*, 1983). La morfología colonial del estado micelial puede variar ampliamente, desde colonias de color blanco o beige al inicio que llegan a ser grises, marrón o negras, de textura serosa, y algunas con hifas aéreas cortas. Dentro de las características microscópicas se observan conidióforos elongados que terminan con un ensanchamiento el cual en forma simpodial da origen a conidios ovalados, hialinos, de 1.4 a 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo. En algunos medios de cultivo se pueden observar tanto conidios hialinos como pigmentados de pared gruesa (Mariat *et al.*, 1978) unidos directamente a la hifa formando acúmulos a lo largo del micelio (Kwon-Chung, 1992).

Los conidios del hongo entran a un hospedero susceptible generalmente por un trauma con material contaminado con conidios del hongo. La enfermedad se caracteriza por ser una infección ulcerativa crónica del tejido cutáneo y subcutáneo que se manifiesta como nódulos o gomas en lesiones fijas o múltiples a lo largo de la vía linfática, localizadas principalmente en las extremidades. En ocasiones la micosis puede ser extracutánea o sistémica, pulmonar primaria o mucocutánea (Lavalle, 1979; Werner y Werner, 1994; Sugita *et al.*, 1998; Schell, 1998). También se han informado casos asociados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Shaw *et al.*, 1989), aunque es poco frecuente.

Las diferencias en la forma clínica se atribuyen a aspectos tales como el estado inmunológico del paciente, al tamaño y profundidad del inóculo, y a la virulencia de la cepa (Plouffe *et al.*, 1979; Albornoz *et al.*, 1986; Restrepo-Gutiérrez *et al.*, 1993; Rodríguez, 1993). Se ha demostrado que pacientes que presentan la forma diseminada de la enfermedad tienen defectos en la respuesta inmune mediada por células a diferencia de los que presentan la forma linfangítica (Plouffe *et al.*, 1979). Este hongo es sensible a temperaturas superiores a 35°C por lo que cepas con capacidad de crecer a 37°C pueden causar la forma fija, linfangítica y diseminada, a diferencia de las que crecen solamente a 35°C que causan únicamente la forma fija (Kwon-Chung, 1979). Esto sugiere que la termotolerancia de *S. schenckii* pudiera estar implicada en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Restrepo-Gutiérrez *et al.* (1993) evaluaron la importancia de la profundidad del inóculo en la forma clínica de la esporotricosis en un modelo murino Balb/c, utilizando dos vías de inoculación, la intradérmica y la subcutánea. Estos autores observaron que en las dos vías había una tendencia a desarrollar la forma linfangítica de la enfermedad, sin embargo, hubo diferencias clínicas e histopatológicas, así como en el tiempo de resolución de la enfermedad, con respecto a las diferentes vías de inoculación, sugiriendo que la profundidad del inóculo podría influir en la patogénesis de la enfermedad.

En la naturaleza se encuentra el hongo ascomiceto *Ophiostoma (Ceratocystis) stenoceras* compartiendo el nicho ecológico de *S. schenckii*, además de presentar similitud en cuanto a las características morfológicas. Debido a que *S. schenckii* podría representar el estado anamórfico de algunas especies de *Ophiostoma* se han generado una serie de polémicas que han conducido a estudios bioquímicos y moleculares para comparar cepas de *S. schenckii* y de diversas especies de *Ophiostoma* (Mariat, 1971; Toriello *et al.*, 1973; Toriello y Mariat *et al.*, 1974; Mendonca-Hagler *et al.*, 1974; Mendonca-Previato *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1988; Berbee y Taylor, 1992; de Beer *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos a la fecha en cuanto a la relación entre estos dos hongos siguen causando controversia ya que no se ha podido observar la fase sexual de *S. schenckii*. Sin embargo evidencias bioquímicas, moleculares y ultraestructurales sugieren que este hongo se ubica dentro del Phylum Ascomycota (Berbee y Taylor, 1992; Chua *et al.*, 1994;).

### 1.1.1 Epidemiología de la esporotricosis

La esporotricosis es una enfermedad cosmopolita y es probablemente la micosis subcutánea más frecuente en el mundo. La mayoría de los casos se presentan en regiones tropicales como países de Centro y Sudamérica (Velázquez *et al.*, 1976; Lavalle, 1979; Conti-Diaz, 1981; Cuadros *et al.*, 1990; Bonifaz, 1990; Uribe *et al.*, 1993; Rodríguez, 1993). Estudios que se han llevado a cabo sobre la epidemiología de la esporotricosis en México, Guatemala y Colombia muestran la frecuencia de alguna de las dos formas clínicas (fija y linfangítica) en cada sitio geográfico. En el caso de México, Lavalle (1979) estudió 220 pacientes, de los cuales, el 58.6% correspondieron a la forma linfangítica y el 28.2% a la fija. Resultados similares informaron Carrada *et al.* (1995) con una frecuencia del 70% para la forma linfangítica. Otro estudio realizado por Mayorga-Rodríguez *et al.* (1997) de 822 casos de esporotricosis en el estado de Jalisco, el 68.98% correspondió a la forma linfangítica y el 22.38 % a la fija.

En Guatemala, la esporotricosis es una micosis frecuente (Logemann, 1995) y se ha informado de epidemias, como la descrita en la laguna de Ayarza (Mayorga *et al.*, 1978), donde de 53 individuos infectados, el 45.3% refirieron la aparición de lesiones posterior a la manipulación de pescado en la laguna. En este caso, la forma clínica más frecuente fue la linfangítica (86.8%). Por otro lado, en Colombia la esporotricosis es también la micosis subcutánea más frecuente (Velásquez *et al.*, 1976). A diferencia de lo encontrado en México y Guatemala, estos últimos autores al analizar 150 casos de esta enfermedad, encontraron un 39.3% de la forma linfangítica y 45.3 % de la fija. Vélez *et al.* (1984) en 78 pacientes con diagnóstico de esporotricosis observaron que el 53.8% presentaron la forma fija y el 42 % la forma linfangítica. Otro estudio (Mesa-Arango, comunicación personal) en Antioquia, Colombia, mostró un mayor porcentaje de la forma fija (75.9%) sobre la linfangítica (24.1%) en 116 casos de esta micosis. Estos trabajos registran un predominio de la forma fija de la esporotricosis en Colombia.

### 1.1.2 Epidemiología molecular

Los primeros estudios que se realizaron para tipificar cepas de *S. schenckii* se basaron en sus características fenotípicas (Howard y Orr, 1963; Rippon, 1990; Dixon *et al.*, 1991; Vélez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997). Sin embargo, estas características pueden ser influenciadas por muchas variables, por lo que se ha recurrido a métodos genotípicos aplicando técnicas de biología molecular, lo que ha permitido que se obtengan estudios de mayor sensibilidad que complementan los métodos fenotípicos.

Estas técnicas han llegado a ser una importante herramienta en la micología para el estudio de sistemática, evolución molecular y genética de poblaciones entre otras aplicaciones (Möler *et al.*, 1999).

A pesar de que *S. schenckii* no ha sido un hongo tan estudiado desde el punto de vista molecular como otros modelos fúngicos, se tienen algunos resultados. Suzuki *et al.* (1988) tipificaron varias cepas de *S. schenckii* y hongos asociados mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA). Takeda *et al.* (1991) llevaron a cabo un estudio sobre la epidemiología molecular y filogenia de *S. schenckii* utilizando también RFLP, el cual les permitió clasificar 257 aislados clínicos procedentes de cuatro lugares diferentes en Japón en 10 tipos. De estos tipos, algunos se restringieron a uno de los cuatro sitios estudiados y otros se encontraron en todos los lugares de procedencia de los aislados.

Posteriormente, Cooper *et al.* (1992) tomando como base el estudio realizado por Dixon *et al.* (1991) y considerando aspectos fenotípicos de aislados clínicos y de la naturaleza de *S. schenckii* de una epidemia de esporotricosis en Estados Unidos en 1988, utilizaron también el método de RFLP del mtDNA y DNA total. Cooper *et al.*, (1992) eligieron aislados representativos de cada uno de los grupos fenotípicos (A - H) establecidos por Dixon *et al.* (1991) y formaron ocho grupos de acuerdo a los patrones polimórficos revelados. Un aspecto importante de este estudio fue la determinación de la similitud entre las cepas aisladas de pacientes con un grupo de la naturaleza (grupo A) y diferencias con los demás aislados de la naturaleza (B-H). Este trabajo sugiere que los individuos ubicados dentro del grupo A posiblemente fueron los agentes etiológicos (*S. schenckii*) responsables de la epidemia. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dixon *et al.* (1991) quienes encontraron que los microorganismos obtenidos de casos clínicos eran idénticos fenotípicamente a los del grupo I de la naturaleza. Por otro lado, el estudio realizado por Cooper *et al.* (1992) mediante el uso de RFLP mostró mayor discriminación entre cepas, que el realizado por Dixon *et al.* (1991) quienes basaron sus estudios en características fenotípicas. En otro estudio epidemiológico a través de RFLP, Hajjeh *et al.* (1997) analizaron aislados clínicos y de la naturaleza de un brote de esporotricosis en trabajadores de tres viveros en Florida, y a diferencia de lo encontrado por Dixon *et al.* (1991) y Cooper *et al.* (1992), los aislados clínicos presentaron patrones muy similares entre ellos y diferentes con los aislados ambientales. Estas observaciones hechas entre la caracterización fenotípica y genotípica de aislados clínicos y ambientales donde las

cepas aisladas de casos clínicos son diferentes de las aisladas en la naturaleza, sugiere que se trata de diferentes subtipos o variedades del hongo.

Por otro lado, Ishizaki *et al.* (1996, 1998, 2000) han realizado varios trabajos utilizando RFLP para evaluar la variabilidad entre cepas de diferentes orígenes geográficos (América, Asia y Oceanía), encontrando 24 tipos clasificados en dos grupos, A y B. Dentro del grupo A, se ubican la mayoría de los aislados de América y dentro del B los de Asia y Oceanía. Complementando este estudio, Kawasaki *et al.* (2000) estudiaron aislados de Brasil, México y España, con el mismo método molecular, y encontraron que todos los aislados de España se ubicaron dentro del grupo B (previamente establecido) a diferencia de los de Norte y Sudamérica que se ubicaron principalmente en el A, coincidiendo estos resultados con los hallazgos de Ishizaki *et al.* (1996, 1998, 2000).

Desde el inicio de la década de los 90, el uso del polimorfismo del DNA amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) ha sido ampliamente utilizado para estudios epidemiológicos en varios modelos fúngicos (Bostock *et al.*, 1993; Boekhout y Belkum, 1997; Lin *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1999; Molinari *et al.*, 1999). La técnica se basa en la amplificación de segmentos al azar del DNA blanco utilizando la técnica de la PCR, y uno o varios iniciadores cortos (9-10 bases) cuya construcción no requiere del conocimiento de la secuencia específica del DNA a estudiar, a diferencia de la PCR original (Williams *et al.*, 1990; Lehman *et al.*, 1992; Ellsworth *et al.*, 1993; Bostock *et al.*, 1993). El método requiere cantidades mínimas de DNA, se considera una técnica sensible, reproducible, rápida, económica y con un alto nivel de discriminación, lo que la convierte en una buena opción para el análisis de variabilidad entre microorganismos. Además tiene las ventajas de no requerir librerías genéticas o transferencia tipo Southern (Ellsworth *et al.*, 1993).

A pesar de ser una técnica utilizada en los últimos años, ha sido poco usada con *S. schenckii* en los últimos años. Reis *et al.* (2000) llevaron a cabo un estudio para identificar la relación genética por RAPD-PCR entre cepas de *S. schenckii* aisladas de pacientes y gatos involucrados en agresiones a estas personas, lo cual dio origen a un brote de esporotricosis. Sus resultados mostraron gran similitud genética entre los 15 casos estudiados, el DNA de la cepa aislada de un paciente presentó un perfil idéntico al DNA aislado de un gato. Los patrones polimórficos obtenidos de los aislados de otros tres pacientes fueron muy similares a los patrones obtenidos de los aislados de los gatos estudiados, lo que sugiere una fuente común de infección y se plantea como

un mecanismo de transmisión. Lee *et al.* (2000) analizaron diez aislados clínicos de *S. schenckii* además de otros hongos por RAPD-PCR. Los resultados mostraron que de los diez aislados clínicos, ocho presentaron un patrón polimórfico idéntico.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado varios estudios con el propósito de conocer la variabilidad genética de cepas de *S. schenckii* de diferentes orígenes geográficos con fines epidemiológicos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el comportamiento de cepas de este hongo procedentes de países como México, Guatemala y Colombia, lugares donde la esporotricosis es una micosis subcutánea frecuente. Por otra parte, la forma clínica de la esporotricosis que predomina en México y Guatemala es la linfangítica, hecho que coincide con los hallazgos a nivel mundial. En contraste, la forma cutánea fija predomina en Colombia. El factor que determina la distribución de estas formas clínicas aún no ha sido establecido. En consecuencia, es de interés determinar tanto la variabilidad entre aislados de *S. schenckii* provenientes de estos tres países, como la relación entre la forma clínica y algún patrón polimórfico que pudiera servir de marcador molecular para definir la predilección del hongo por alguna forma clínica.

## 3. HIPÓTESIS

Los aislados de *S. schenckii* presentan diversidad genotípica y fenotípica, dependiendo de su origen geográfico y de la forma clínica (fija y linfangítica) de la esporotricosis.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado varios estudios con el propósito de conocer la variabilidad genética de cepas de *S. schenckii* de diferentes orígenes geográficos con fines epidemiológicos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el comportamiento de cepas de este hongo procedentes de países como México, Guatemala y Colombia, lugares donde la esporotricosis es una micosis subcutánea frecuente. Por otra parte, la forma clínica de la esporotricosis que predomina en México y Guatemala es la linfangítica, hecho que coincide con los hallazgos a nivel mundial. En contraste, la forma cutánea fija predomina en Colombia. El factor que determina la distribución de estas formas clínicas aún no ha sido establecido. En consecuencia, es de interés determinar tanto la variabilidad entre aislados de *S. schenckii* provenientes de estos tres países, como la relación entre la forma clínica y algún patrón polimórfico que pudiera servir de marcador molecular para definir la predilección del hongo por alguna forma clínica.

## 3. HIPÓTESIS

Los aislados de *S. schenckii* presentan diversidad genotípica y fenotípica, dependiendo de su origen geográfico y de la forma clínica (fija y linfangítica) de la esporotricosis.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Caracterizar y comparar diversos aislados de *S. schenckii*, procedentes de diferentes fuentes (pacientes y de la naturaleza) y orígenes geográficos (México, Guatemala, Colombia), mediante fenotipificación y genotipificación por RAPD-PCR.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar aislados de *S. schenckii* por métodos fenotípicos (morfológicos, bioquímicos, de virulencia en animales (DL50) e inmunológicos).
2. Caracterizar aislados de *S. schenckii* por métodos genotípicos: polimorfismo del DNA obtenido por amplificación al azar utilizando iniciadores arbitrarios (RAPD-PCR).
3. Analizar y comparar los fenotipos y genotipos de las cepas de *S. schenckii* de diversas procedencias (México, Colombia y Guatemala) y fuentes (clínico y naturaleza).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material fúngico

Los aislados de *S. schenckii* estudiados pertenecen a las colecciones de las siguientes instituciones: Laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Universidad Autónoma de Puebla; Universidad de San Carlos de Guatemala; y Universidad de Antioquia, Colombia. Se estudiaron 52 aislados de pacientes con esporotricosis y once aislados de la naturaleza (N) obtenidos en México. Las claves, el origen geográfico: México (MX), Guatemala (GT) y Colombia (CO) y la fuente (clínica-linfangítica o clínica-fija y naturaleza) y las personas que gentilmente donaron los aislados se muestran en la Tabla I. Se utilizó como referencia la cepa EH-143 caracterizada previamente en el laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, UNAM. Los aislados del hongo están conservados en su forma micelial en agua destilada estéril, aceite mineral, y en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para su utilización las cepas se mantuvieron en medio sólido que contenía dextrosa (Merck, México) al 2%, peptona de caseína (Bioxon, México) al 2%, extracto de levadura (Yestál, México) al 1% y agar (Bioxon) al 1.5% (DPEL).

### 5.2 Identificación de los aislados

**5.2.1 Morfología colonial.** Para observar las características de la colonia fúngica, todos los aislados se sembraron en cinco medios de cultivo sólidos: agar papa dextrosa (APD) (Bioxon), Sabouraud dextrosa (Bioxon), Agar micobiotico (Bioxon), harina de maíz (Bioxon), y extracto de malta ( BBL, México). Los cultivos se incubaron durante 60 días a  $28^{\circ}\text{C}$ . Las características de las colonias (textura, color) se registraron a los 30 días, y al final del periodo de incubación se hicieron preparaciones con azul de algodón para buscar peritecios, forma sexual del género *Ophiostoma*, el cual se relaciona morfológica y ecológicamente con *S. schenckii*.

**5.2.2 Morfología microscópica.** Se realizaron exámenes directos con azul de algodón de cada uno de los aislados, cultivados en APD a los 15 días de incubación a  $28^{\circ}\text{C}$ , y se observaron al microscopio óptico, anotando las estructuras morfológicas.

**5.2.3 Producción de pigmento de los aislados.** Una de las características de *S. schenckii* es la producción de conidios triangulares pigmentados en cultivos de varios días de incubación así como en medios que favorecen la producción del pigmento.

Para observar esta característica en los aislados estudiados, se sembró cada uno en tres medios: a) Rodríguez del Valle *et al.* (1983) adicionado de tirosina al 2%, b) Rodríguez del Valle *et al.* (1983) adicionado de L-Dopa (L-3,4 dihidroxifenil-alanina) al 2%, y c) caseína (leche descremada al 7.5% Svelty- Nestlé, México). Se colocaron 10 gotas de un volumen de 10  $\mu$ L de una suspensión conidial de cada aislado, sobre la superficie de una caja de Petri con cada uno de los tres medios. Cada aislado se repitió por triplicado. Las cajas se incubaron a 28°C durante 15 días, y se observó la presencia del pigmento en los tres medios de cultivo.

**5.2.4 Conversión de la forma micelial a la forma de levadura.** Se realizó una suspensión conidial de cada aislado de  $1 \times 10^6$  conidios/mL a partir de cultivos en DPEL incubados a 28°C durante siete días. Se preparó una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark) agregando 100  $\mu$ L de medio Rodríguez del Valle *et al.* (1983) pH 7.2 en cada uno de los pozos. Se depositaron 50  $\mu$ L de la suspensión de conidios en cada pozo, utilizando diez pozos por aislado. Se incubó la placa a 35°C durante 72 h, y al cabo de este tiempo se llevó la placa al microscopio para la observación de las levaduras.

**5.2.5 Identificación de los aislados por medio de exoantígenos específicos.** Se obtuvieron exoantígenos de todos los aislados estudiados de acuerdo al método de Kauffman y Standard (1987), así como de la cepa de referencia EH-143. Se utilizaron matraces de 250 mL con 75 mL de medio Rodríguez del Valle *et al.* (1983) pH 5.0, los cuales fueron sembrados con una suspensión conidial de cada aislado. Los matraces se incubaron 20 días en agitación a 28°C para obtener la forma micelial del hongo. Se agregó timerosal a una concentración final de 1:5000 para inactivar el cultivo y se incubó durante 24 h. La masa micelial se separó por filtración con embudo Büchner y papel Whatman N° 1. El filtrado obtenido se dializó y concentró 10 veces de su volumen inicial, con el sistema de ultrafiltración Amicon (Amicon, Colerkington, MA), utilizando membranas Amicon PM10. El concentrado se almacenó en alícuotas de 2 mL a -70°C hasta su uso. La prueba se realizó por doble inmunodifusión en gel según la técnica de Ouchterlony y Nilsson (1987) con suero hiperinmune de conejo anti-*S. schenckii*, preparado y estandarizado en el laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, UNAM (Arenas y Toriello, 1986). La identificación inmunológica de los aislados se efectuó con base en la aparición de las bandas de identidad con la cepa de referencia, utilizando solución salina como testigo negativo.

### 5.3 Caracterización fenotípica

**5.3.1 Tamaño de conidios.** La medición de los conidios se determinó en exámenes directos de cultivos del hongo en el medio DPEL incubados durante 15 días a 28°C. Se midió el ancho y largo ( $\mu\text{m}$ ) de diez conidios, de cada aislado, mediante un micrómetro ocular calibrado.

**5.3.2 Termotolerancia.** Para determinar la tolerancia de los aislados a diferentes temperaturas, se sembraron los aislados del hongo en medio DPEL durante siete días a 28°C. A partir de estos cultivos se realizó una suspensión conidial de  $1 \times 10^6$  conidios/mL. Se elaboró un pozo central en 30 cajas de Petri con APD por aislado, inoculando 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión conidial en cada pozo. Se incubaron 10 cajas a 28, 10 a 35 y 10 a 37°C. El experimento se repitió dos veces. El diámetro de la colonia (mm) se midió a los 15 días, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (IC%), a 35 y a 37°C, mediante la siguiente fórmula:

$$\%IC = \frac{\text{Diámetro de la colonia a } 28^{\circ}\text{C (mm)} - \text{Diámetro de la colonia a } 35 \text{ ó } 37^{\circ}\text{C (mm)}}{\text{Diámetro de la colonia a } 28^{\circ}\text{C (mm)}} (100)$$

Los datos del largo de los conidios y porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC) a 35°C y 37°C se sometieron a análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) para detectar significancias.

**5.3.3 Determinación de la virulencia de aislados de *S. schenckii*.** La determinación de la virulencia se llevó a cabo por medio de la dosis letal media (DL50) en un modelo experimental murino. Se utilizaron conidios obtenidos de la fase logarítmica de crecimiento del aislado a probar, de un cultivo líquido de medio DPEL (250 mL en un matraz de un litro) incubado durante 20 días a 28°C. El cultivo se filtró a través de papel Whatman N° 1, el cual deja pasar solamente los conidios. La suspensión conidial se centrifugó a 400 x g por 20 min. El paquete celular se lavó tres veces con solución salina, se ajustó a dos unidades de densidad óptica, y los conidios se contaron en cámara de Neubauer. A partir de una suspensión conidial inicial aproximada de  $1 \times 10^8$  conidios/mL se realizaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , y  $10^{-4}$ . La viabilidad del hongo y la cantidad de conidios se verificó calculando unidades formadoras de colonias (UFC) de cada dosis por dilución en placa en el medio de Sabouraud. Se inocularon por grupo 10 ratones Taconic machos de 25g aproximadamente por vía intraperitoneal, con 1 mL de cada dosis y un mL de solución

salina estéril en 10 ratones utilizados como testigo. La DL50 se calculó a los 45 días después de la inoculación con base en análisis Probit, ajustado a un programa Windows para computadora personal por Alberto Pérez Arista.

Tabla I  
Cepas de *S. schenckii* estudiadas

Número De clave	Procedencia <sup>a</sup>	Fuente <sup>b</sup>	Tamaño de conidios (µm) ancho x largo	%IC <sup>c</sup> (35°C)	%IC <sup>c</sup> (37°C)	DL50 (x 10 <sup>7</sup> conidios/mL)
EH-143 <sup>d,1</sup>	Puebla, MX	C/L	1.8 x 2.5	35.9	75.9	7.25
EH-176 <sup>2</sup>	D.F, MX.	C/F	2.4 x 2.9	23.1	65.2	
EH-178 <sup>2</sup>	D.F, MX.	C/L	1.8 x 1.8	37.8	63.2	
EH-179 <sup>2</sup>	D.F, MX.	C/L	2.0 x 2.1	27.9	70.9	
EH-180 <sup>2</sup>	D.F, MX.	C/L	2.0 x 2.1	20.2	65.9	
EH-184 <sup>2</sup>	D.F, MX	C/L	2.5 x 2.6	47.1	68.7	135
EH-189 <sup>3</sup>	Chiapas, MX	C/L	2.5 x 2.5	37.4	47.6	
EH-190 <sup>2</sup>	Oaxaca, MX	C/L	1.6 x 1.8	35.3	54.8	
EH-192 <sup>1</sup>	San Luis Potosí, MX	C/F	0.9 x 0.9	34.6	45.7	41.9
EH-197 <sup>1</sup>	Puebla, MX	C/F	1.5 x 1.6	29.4	54.6	237
EH-198 <sup>1</sup>	Puebla, MX	C/L	2.1 x 2.1	33.9	56.5	
EH-199 <sup>1</sup>	Puebla, MX	C/L	1.5 x 1.5	30.7	49.1	
EH-200 <sup>1</sup>	Puebla, MX	C/L	1.4 x 1.5	24.0	57.5	
EH-212	D.F, MX	C/L	1.8 x 1.8	44.7	48.7	6
EH-213	D.F, MX.	C/F	2.0 x 2.5	31.9	46.7	
EH-217 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/F	1.7 x 1.7	50.4	63.1	7
EH-218 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/L	2.7 x 2.7	55.1	65.2	
EH-220 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/L	2.0 x 2.1	36.5	55.3	
EH-221 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/F	2.1 x 2.1	44.3	62.6	
EH-241 <sup>2</sup>	Guanajuato, MX	C/F	1.6 x 1.6	55.4	69.3	
EH-247 <sup>4</sup>	Zacatecas, MX	C/F	1.2 x 1.3	31.0	74.1	
EH-248 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/L	1.2 x 1.3	46.0	66.4	
EH-249 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/L	1.2 x 1.3	49.0	67.6	
EH-250 <sup>4</sup>	Jalisco, MX	C/F	2.5 x 2.5	42.2	66.7	
EH-224 <sup>5</sup>	Ayarza, GT	C/F	1.9 x 1.9	37.5	64.9	
EH-227 <sup>5</sup>	Ayarza, GT	C/F	2.2 x 2.2	50.1	61.4	62.2
EH-228 <sup>5</sup>	Ayarza, GT	C/L	1.3 x 1.3	49.5	66.2	
EH-230 <sup>5</sup>	Ayarza, GT	C/L	3.0 x 3.0	16.4	69.1	
EH-232 <sup>5</sup>	Jutiapa, GT	C/F	1.3 x 1.3	39.2	70.2	
EH-233 <sup>5</sup>	GT	C/L	3.0 x 3.5	33.6	66.2	
EH-234 <sup>5</sup>	GT	C/F	3.0 x 3.3	25.6	66.7	
EH-235 <sup>5</sup>	GT	C/F	2.5 x 2.8	25.0	69.9	
EH-242 <sup>5</sup>	GT	C/F	2.0 x 2.5	38.6	83.1	65
EH-243 <sup>5</sup>	Chimaltenango, GT	C/F	2.5 x 3.0	18.2	70.7	
EH-244 <sup>5</sup>	Chimaltenango, GT	C/F	3.0 x 3.1	24.7	77.0	
EH-245 <sup>5</sup>	GT	C/L	3.5 x 3.8	29.3	69.8	24.5
EH-246 <sup>5</sup>	GT	C/L	1.6 x 1.6	30.7	66.7	
022 <sup>6</sup>	Antioquia, CO	C/F	1.6 x 4.1	51.8	63.7	
6067 <sup>6</sup>	Antioquia, CO	C/F	1.6 x 3.3	68.0	74.0	

Tabla I (Cont.)

Número	Procedencia <sup>a</sup>	Fuente <sup>b</sup>	Tamaño de conidios ( $\mu\text{m}$ ) ancho x largo	%IC <sup>c</sup> (35°C)	%IC <sup>c</sup> (37°C)	DL50 (x 10 <sup>7</sup> Conidios/mL)
6780 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.6 x 3.3	31.9	68.9	
9421 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	2.8 x 3.8	41.6	73.3	
12926 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.6 x 3.3	28.0	79.5	
14879 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.6 x 3.5	66.5	76.4	
15741 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.9 x 3.8	40.2	68.3	
15895 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.9 x 3.8	71.0	74.5	
10937 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.9 x 4.1	30.8	70.9	
9805079 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / F	1.6 x 3.8	56.0	71.9	
6450 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / L	1.9 x 3.6	52.4	73.6	
6514 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / L	1.6 x 4.0	48.2	80.3	
9362 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / L	1.9 x 4.8	68.4	81.8	
15565 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / L	1.6 x 4.3	34.5	66.2	170
9806027 <sup>d</sup>	Antioquia, CO	C / L	2.2 x 5.4	51.9	79.1	
EH-193 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.8 x 1.8	30.9	45.9	6.67
EH-194 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.5 x 1.5	24.8	24.7	1.39
EH-195 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.3 x 4	33.2	54.3	2.48
EH-196 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.5 x 1.5	37.1	54.2	0.5
EH-251 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	2.7 x 2.8	47.2	70.1	
EH-252 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.6 x 1.6	40.9	61.2	
EH-253 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	2.4 x 2.5	53.9	70.8	
EH-254 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.3 x 1.3	24.5	61.2	
EH-255 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	1.2 x 1.2	28.9	63.4	
EH-256 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	3.0 x 3.1	23.7	62.5	
EH-257 <sup>1</sup>	Puebla, MX	N	3.2 x 3.5	23.6	66.6	

<sup>a</sup> MX, México; GT, Guatemala; CO, Colombia. <sup>b</sup> (C/L = Clínico linfagítica, C/F = Clínico fija y N = Naturaleza), <sup>c</sup> %IC = porcentaje de inhibición del crecimiento; <sup>d</sup> Cepa de referencia.

<sup>1</sup> Cepas donadas por A. Espinosa (Universidad Autónoma de Puebla); <sup>2</sup> Cepas donadas por R. Arenas (Hospital Manuel Gea González SS, MX); <sup>3</sup> Cepas donadas por A. Bonifaz (Hospital General de México SS, MX); <sup>4</sup> Cepas donadas por Dora Martínez (Instituto Dermatológico de Guadalajara, MX) <sup>5</sup> Cepas donadas por H. Logemann (Universidad San Carlos de Guatemala); <sup>6</sup> Cepas donadas por Micoteca de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Medellín, CO.

## 5.4 Caracterización genotípica

**5.4.1 Extracción del DNA genómico.** Para caracterizar las cepas de *S.schenckii* por RAPD-PCR, se obtuvo DNA de todas las cepas. Se probaron tres métodos de extracción de DNA, el descrito a continuación presentó los mejores resultados. El micelio de un cultivo de siete días en medio líquido de Sabouraud a 28°C se obtuvo por filtración con papel Whatman No. 1. La masa micelial se lavó con agua destilada estéril utilizando el mismo sistema de filtración. El micelio se colocó en un mortero estéril y frío, se agregó nitrógeno líquido en cantidad suficiente para cubrir la masa y se procedió a macerar con un pistilo estéril y frío hasta lograr un polvo muy fino que se repartió en microtubos de 2 mL, de tal forma que cubriera la mitad de la parte cónica. Se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis (Tris-HCL 50 mM, EDTA 50mM, SDS

6%, Mercaptoetanol al 1%) a cada microtubo y se procedió a agitar firmemente hasta homogeneizar la muestra. Se centrifugó durante 3 min y al sobrenadante se le adicionó proteinasa K (200 µg/mL concentración final) (GIBCOBRL® Gaithersburg, MD), se homogeneizó y se incubó a 58°C durante una hora. Posteriormente, se agregó RNasa A (Qiagen, Alemania) a una concentración de 500 µg/mL y se incubó 1h a 37°C. Se ajustó el volumen a 500 µL con agua calidad miliQ (Millipore, MX). Posteriormente, se agregaron 500 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y manualmente se agitó firmemente por inversión, aplicando presión en la tapa para no perder volumen. Se centrifugaron los tubos 20 min a 12 000 rpm hasta que la fase acuosa (capa superior) se observó clara. Se transfirieron aproximadamente 400 µL de la fase acuosa a un nuevo microtubo, al cual se agregaron 10 µL de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol absoluto frío, y se invirtió cuidadosamente varias veces. La mezcla se mantuvo a -20°C de 2 a 24 horas hasta observar un precipitado. Después de esta incubación, los tubos se centrifugaron durante 2 min, se desechó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó durante 2 min y se descartó el etanol cuidadosamente. El DNA obtenido fue resuspendió en 50 ó 100 µL de agua calidad miliQ estéril de acuerdo al tamaño del botón. Para verificar la presencia y calidad del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % preparado en amortiguador TBE 0.5X (Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM [pH 8.3] ) y 2 µL de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL. Se cubrió el gel con el mismo amortiguador. Se depositaron las muestras con una mezcla de 2 µL del DNA y 2 µL de amortiguador de la muestra. El gel se corrió a 100 V hasta que el colorante avanzó a la mitad y se observó en un transiluminador. Después de verificar la calidad del DNA las muestras se conservaron a -40°C para su uso posterior. Este método permitió obtener buen rendimiento y grado de pureza.

**5.4.2 Determinación de la concentración de DNA.** Para determinar la concentración de los DNA, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en el cual se corrieron diferentes concentraciones del fago λ ( GIBCOBRL®) de 50, 100, 150 y 250 ng. Se compararon estas concentraciones con 2 µL de los DNA problema adicionados con el mismo volumen de amortiguador de carga y se asignó la concentración a cada muestra.

**5.4.3 Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).** Los estudios de genotipificación reportados en la literatura para *S. schenckii* se habían llevado a cabo por medio de RFLP, por lo que no

existía ningún antecedente de trabajos con RAPD-PCR para este modelo fúngico en el momento en que se realizó este estudio. Por tal motivo, la estandarización del método se inició con la cepa de referencia EH-143 y bajo las condiciones establecidas para el hongo *Histoplasma capsulatum* (*Taq pol* 1U,  $MgCl_2$  2.5mM, B1X, dNTPs 200 $\mu$ M, 10 ng de DNA) con los iniciadores 1283, 1281 y 1253 (Kersulyte *et al.*, 1992 ). Además, se aplicaron las condiciones antes mencionada a 20 iniciadores de la serie OPBG del KIT Operon (Operon Technologies, Alameda, CA) (Tabla II).

**Tabla II**  
**Iniciadores utilizados y secuencias respectivas**

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>
1283	5' GCGATCCCCA 3'
1281	5' AACGCGCAAC 3'
1253	5' GTTCCGCC 3'
OPBG-01	5' GTGGCTCTCC 3'
OPBG-02	5' GGAAAGCCCA 3'
OPBG-03	5' GTGCCACTTC 3'
OPBG-04	5' GTTCCCGACA 3'
OPBG-05	5' CAAGCCGTGA 3'
OPBG-06	5' GTGGATCGTC 3'
OPBG-07	5' CAGAGGTTCC 3'
OPBG-08	5' GACCAGAGGT 3'
OPBG-09	5' GGCTCTGGGT 3'
OPBG-10	5' GGGATAAGGG 3'
OPBG-11	5' ACGGCAATGG 3'
OPBG-12	5' CCCGAGAAAC 3'
OPBG-13	5' GGTGGGCCA 3'
OPBG -14	5' GACCAGCCCA 3'
OPBG-15	5' ACGGGAGAGA 3'
OPBG-16	5' TGCTTGGGTG 3'
OPBG-17	5' TCCGGGACTC 3'
OPBG-18	5' TGGCGCTGGT 3'
OPBG-19	5' GGTCTCGCTC 3'
OPBG-20	5' TGGTACCTGG 3'

**5.4.4 Programa de amplificación.** Se probaron tres programas de amplificación en un termociclador iCycler™ (BioRad, Hercules, CA) que se detallan en la Tabla III.

**Tabla III**  
**Programas de amplificación ensayados**

A	B	C
1 Ciclo 94°C - 5 min	1Ciclo 94°C - 5 min	38 Ciclos 94°C - 5 min 36°C - 2 min 73°C - 2 min
45 Ciclos 92° C - 1 min 35° C - 1 min 72° C - 1 min	35 Ciclos 94° C - 10 s 36° C - 30 s 72° C - 1 min	
1 Ciclo 72°C - 5 min		

**5.4.5 Electroforesis.** La separación de los fragmentos obtenidos por RAPD, se realizó en geles de agarosa al 1.4% en amortiguador TBE 0.5 X a 40 V durante 6 horas. Para visualizar las bandas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL. El estándar de pares de bases fue el 123 bp en escalera (123 bp DNA Ladder, GIBCOBRL®). La imagen de los geles se capturó con un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge) y se imprimió en una impresora térmica SONY 650 (Tokio). El tamaño de los fragmentos se calculó con ayuda del programa Bio Image por comparación con el 123pb DNA en escalera.

**5.4.6 Determinación de la concentración de los iniciadores.** Para conocer la concentración adecuada de los iniciadores se eligió al azar uno de los iniciadores del Kit Operon (OPBG-01) y se realizó una curva con las concentraciones de 30, 50, 100, 150 y 200 pmoles/µL y se llevó a cabo el RAPD-PCR bajo las condiciones antes mencionadas.

**5.4.7 Curva de MgCl<sub>2</sub>.** Se realizó una curva de magnesio con las concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mM usando DNA de la cepa de referencia EH-143. El RAPD-PCR se realizó bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

**5.4.8 Análisis de datos.** A partir de las imágenes digitalizadas de los geles que muestran los productos de la amplificación separados por electroforesis por medio del programa Adobe Photoshop™ 3.0 (Adobe Systems, Inc., U.S.A), se calculó el peso molecular de cada uno de los fragmentos por interpolación, a partir de una curva teórica construida con los pesos moleculares de los diferentes segmentos que despliegan los marcadores mediante el uso del programa Advanced Quantifier 1D-match BiImage (Ann Arbor, MI, USA).

Posteriormente se construyeron tablas de datos de presencia-ausencia dando origen a una matriz básica de cepas con variables (Anexo 1). Directamente de la matriz básica se construyó una matriz de similitud genética pareada entre las cepas mediante el índice de Jaccard (Real y Vargas, 1996) (Anexo 2).

La relación que describe este coeficiente es la siguiente:

$$J = \frac{a}{a+b+c}$$

donde:  $a$ , es la banda presente en ambas cepas;  $b$ , es la banda presente en la primera y ausente en la segunda; y  $c$ , es la banda presente en la segunda pero ausente en la primera.

La fórmula sólo considera los marcadores presentes (1,1), los que están presentes en una cepa determinada y ausentes en otra (1,0) y viceversa. No considera aquellos casos de dobles ausencias (0,0), es decir, cuando el marcador no está presente en ninguna de las dos cepas.

La representación gráfica de la relación de similitud entre las cepas fue establecida por métodos multivariados de agrupación (dendrograma) y ordenación (Análisis de Componente Principales). La agrupación de las cepas se llevó a cabo por el método de promedios aritméticos no ponderados UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average).

La estimación del grado de significancia estadística entre la matriz de distancia original (Jaccard) y la de distancia terminal (dendrograma) se calculó mediante el coeficiente de correlación cofenético y por la prueba de Mantel (Manly, 1997), la cual arroja un valor de correlación ( $r$ ) y de probabilidad ( $p$ ).

Finalmente se construyó un árbol de tendido mínimo el cual se sobrepuso en la configuración espacial de las cepas obtenido por el ACP

Todos estos análisis se llevaron a cabo con el programa NTSYS-pc versión 2.0 (Rohlf, 1998).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación de las cepas

**6.1.1 Morfología colonial.** Se encontró una gran variabilidad en cuanto al color. Se observaron colonias que variaron desde el color beige y marfil hasta un pardo oscuro y negro. También se encontraron colonias combinadas (mosaico). En el medio de agar micobiótico solo se observaron colonias de blanco-gris. En relación a la textura, predominó el aspecto seroso en colonias tanto lisas como rugosas (Figura 1a).

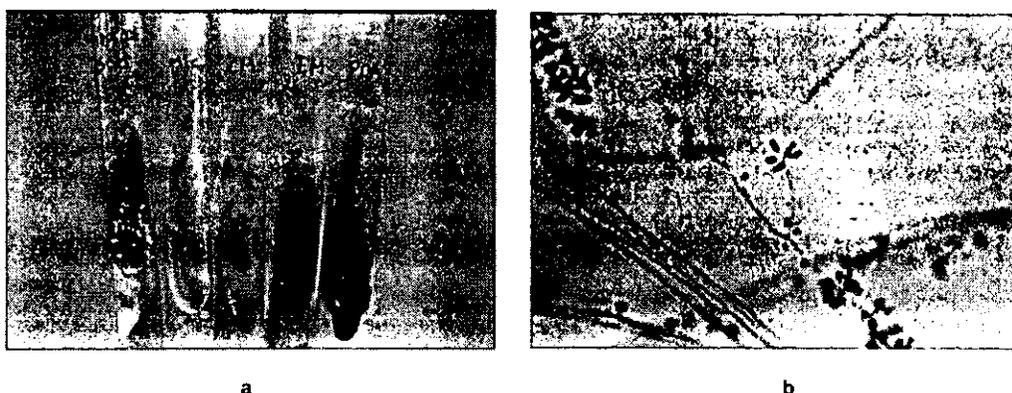


Fig 1. a) Morfología colonial de la cepa 9806027 (CO) de *S. schenckii* en los medios de Sabouraud (Sab), Agar micobiótico (Mic), harina de maíz (CM), extracto de malta (EM) y Agar papa dextrosa (APD); b) Morfología microscópica. Organización de conidios de *S. schenckii* (cepa 6067, CO) rodeando el extremo de un conidióforo. Conidios triangulares pigmentados alrededor de una hifa (350X).

**6.1.2 Morfología microscópica.** Se observó la clásica disposición de los conidios emergiendo en forma simpodial de un conidióforo y la presencia de conidios triangulares pigmentados organizados alrededor de las hifas (Figura 1b). Ninguna cepa presentó estructuras de reproducción sexual (peritecios).

**6.1.3 Producción de pigmento de los aislados.** Se observó producción de pigmento en todas las cepas estudiadas en los medios de estimulación del pigmento (tirosina, dopa y caseína). Sin embargo, el color observado varió desde beige tenue hasta negro sin encontrar algún patrón que pudiera definir un grupo. En la Figura 2a se muestra un ejemplo de la producción de pigmento en dopa y tirosina.

**6.1.4 Transición de la forma micelial a levadura.** Todas las cepas estudiadas presentaron la conversión de micelio a levadura en el medio de cultivo previamente

descrito a 35°C, a las 72 h de incubación. Se observó la presencia de levaduras uni y bigemantes (Figura 2b).

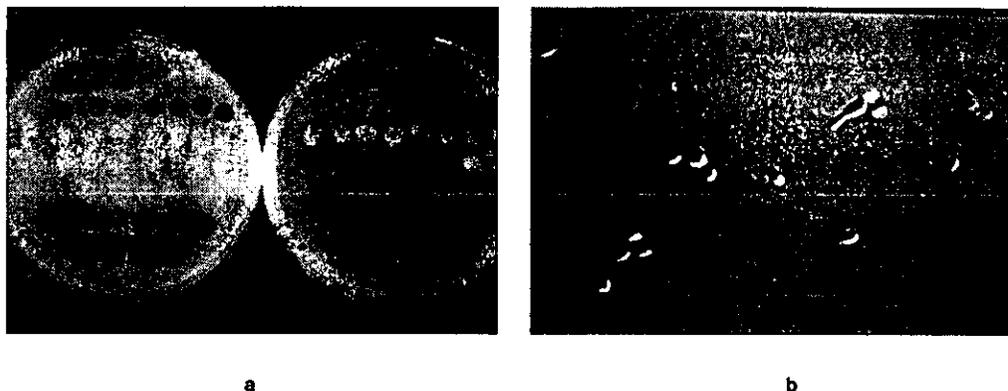


Fig 2. a) Producción de pigmento en el medio Rodríguez del Valle *et al.* (1983) suplementado con dopa (2%) (derecha) y de tirosina (2%) (izquierda) de las cepas 10937 (CO), 245 (GT) y 197(MX) de *S. schenckii* (cada 10 círculos corresponden a una cepa); b) Levaduras de la cepa 022 (CO) de *S. schenckii* a 35°C en el medio Rodríguez del Valle *et al.* (1983) (pH 7.2) a las 72 h de incubación (300X).

#### 6.1.5 Caracterización de las cepas por medio de exoantígenos específicos.

Para la totalidad de las cepas, se confirmó la identificación inmunológica. En la Figura 3 se muestran las bandas de identidad entre los exoantígenos de cepas representativas de cada país estudiado y la cepa de referencia EH-143, las cuales se evidenciaron con suero hiperinmune de conejo anti-*S. schenckii*.

### 6.2 Caracterización fenotípica

**6.2.1 Tamaño de conidios.** En la Tabla I se muestra el promedio del largo y ancho de 10 conidios de cada aislado. Para comparar la variación en el tamaño de ellos se utilizó solamente el largo de los conidios donde se observan las mayores diferencias. Se detectó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el largo de los conidios entre las cepas de MX, GT y CO. Los conidios de las cepas de CO fueron los más largos de todas las cepas estudiadas con una media de  $4.0 \pm 0.95 \mu\text{m}$  (Tabla IV).

**6.2.2 Termotolerancia.** Se determinó mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) tanto a 35 como a 37°C. En ambas temperaturas se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cepas de MX (clínicos y de la naturaleza), GT y CO. El mayor %IC, es decir, la menor termotolerancia fue exhibida por las cepas de CO.

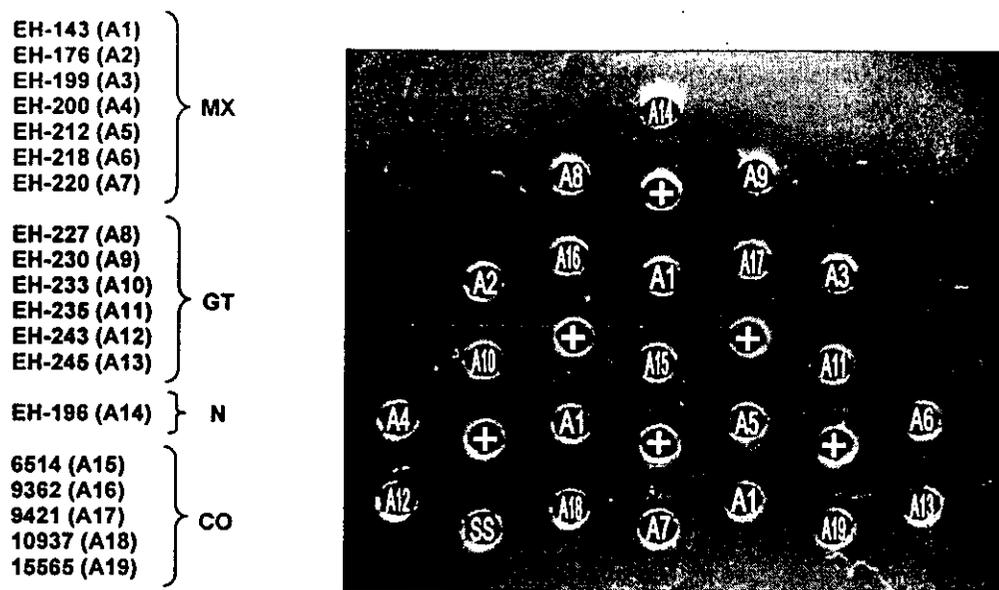


Fig 3. Exoantígenos de *S. schenckii* (A1- A19) con cepas representativas de los grupos estudiados (México, MX (clínicos y naturaleza), Guatemala GT, y Colombia CO). Las esporotricinas se obtuvieron por el método de Kauffman y Standard (1987). La prueba se realizó por doble inmunodifusión en gel, según el método de Ouchterlony (1987); EH-143 (A1) = cepa de referencia; SS = solución salina; + = suero de conejo anti- *S. schenckii*.

Tabla IV

Tamaño de conidios y termotolerancia a 35 y 37°C de las cepas de *S. schenckii*

Procedencia	Largo de conidios (μm) <sup>a</sup>	Termotolerancia % IC <sup>b</sup> a 35°C	Termotolerancia % IC <sup>b</sup> a 37°C
MX (N)	1.97 ± 0.49	35.5 ± 11.5	60.6 ± 9.0
MX (C)	2.33 ± 1.00	33.0 ± 11.1	59.2 ± 11.0
GT	2.54 ± 0.78	32.7 ± 11.7	69.4 ± 6.20
CO	4.00 ± 0.95	48.4 ± 15.2	70.1 ± 10.8

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar

<sup>b</sup> % IC = porcentaje de inhibición del crecimiento

% IC =  $\frac{\text{Diámetro de la colonia a 28°C (mm)} - \text{Diámetro de la colonia a 35 ó 37°C (mm)}}{\text{Diámetro de la colonia a 28°C (mm)}} (100)$

En la Figura 4a se presenta el porcentaje de las cepas de origen clínico de MX, GT y CO que presentaron un %IC a 37°C mayor de 70. En la Figura 4b se representa la distribución porcentual de las cepas procedentes de la forma clínica fija de la esporotricosis con un %IC > de 70 según la procedencia. En ambos casos se destaca el mayor porcentaje de cepas de CO que son las más termosensibles.

**6.2.3 Virulencia de cepas de *S. schenckii*.** Debido a la cantidad de ratones requerida para cada DL50, el análisis de la virulencia solamente se llevó a cabo en

algunos aislados de cada procedencia y origen. Se establecieron tres grupos de acuerdo a los resultados obtenidos: virulencia alta  $DL_{50} < 10 \times 10^7$  conidios/mL; virulencia mediana,  $DL_{50}$  entre 10 y  $100 \times 10^7$  conidios/mL; y virulencia baja,  $DL_{50}$  mayor de  $100 \times 10^7$  conidios/mL. La Figura 5 muestra la distribución de las cepas estudiadas por

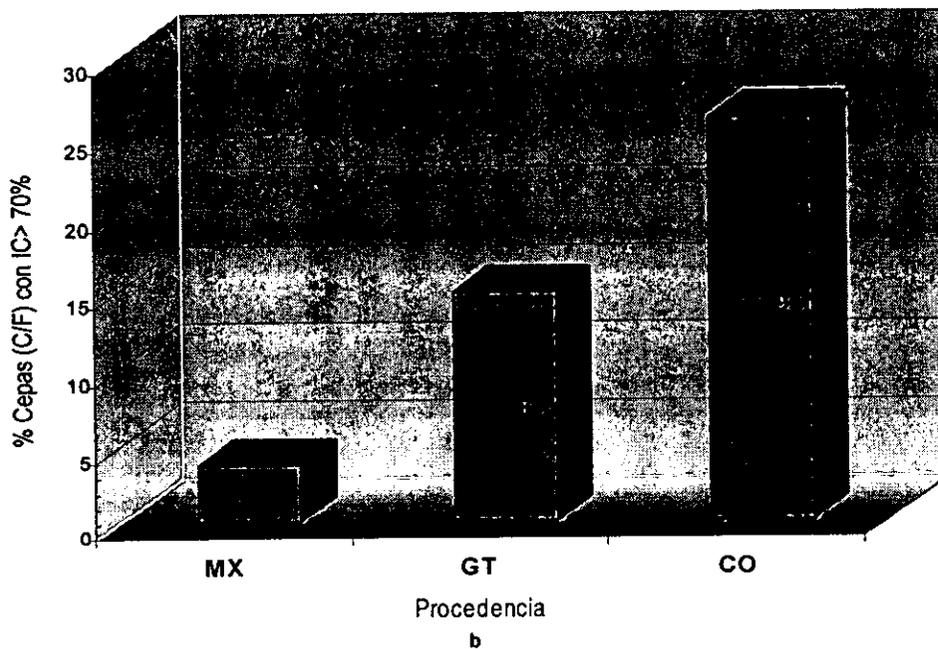
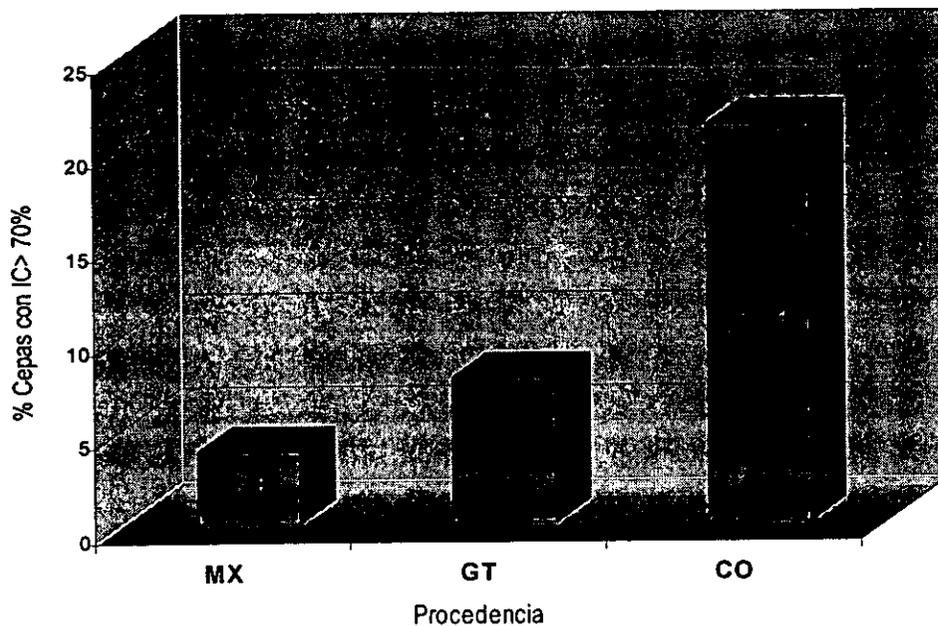


Fig 4. a) Distribución porcentual de las cepas de origen clínico con %IC > 70. b) Distribución porcentual de cepas de la forma fija de la esporotricosis con %IC > 70.

medio de la DL50 según la categoría de la virulencia (Tabla V). Se destaca el hecho que entre las cepas de mayor virulencia se encuentran aquellas aisladas de MX, tanto de la naturaleza (EH-193 y EH-196) como de formas clínicas (EH-143 referencia, EH-212, EH 217) de esporotricosis. Entre las de virulencia mediana se encuentran tanto cepas de MX (EH-192) como de GT (EH-227, EH-242 y EH-245) y entre las cepas de menor virulencia se encuentran las cepas de CO evaluadas (022, 10937, 15565) con una DL50 de  $237 \times 10^7$  conidios/mL para la 15565 y mayor a  $100 \times 10^7$  conidios/mL para las otras dos. También están incluidas con las últimas, dos cepas de MX (EH-184 y EH-197).

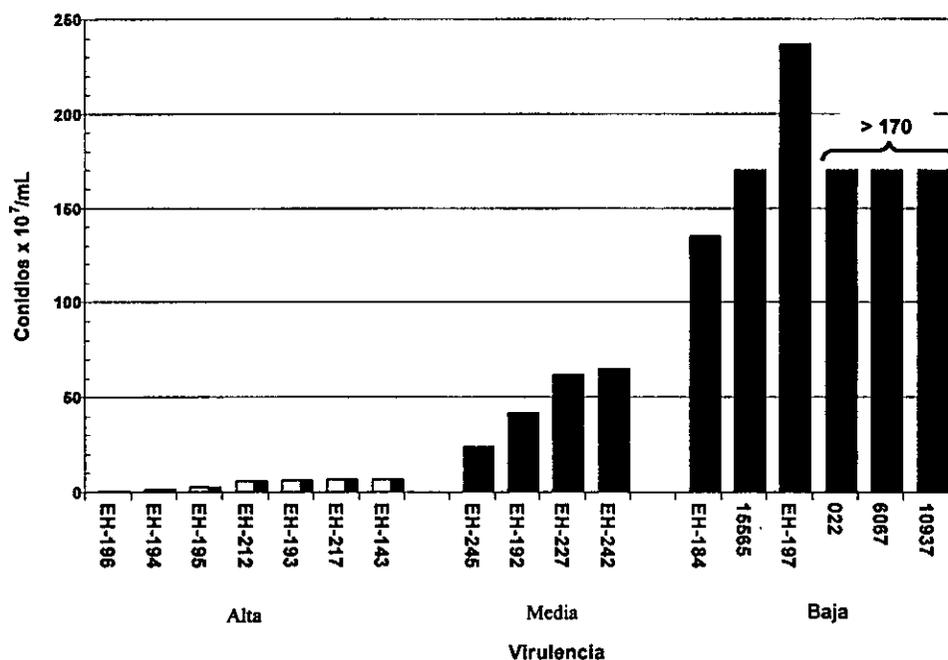


Fig 5. Distribución de la DL50 de cepas de *S. schenckii* de MX, GT y CO de acuerdo a los grupos de virulencia encontrados (alta, media y baja). La DL50 se calculó con base en el análisis probit ajustado a un programa Windows.

Tabla V

Dosis Letal Media ( DL50) de cepas de *S. schenckii* representativas de cada fuente y procedencia

Virulencia	DL50 (x 10 <sup>7</sup> conidios/mL)	Fuente <sup>a</sup>	Procedencia
<b>Alta</b>			
EH-193	6.67	N	MX
EH-194	1.39	N	MX
EH-195	2.48	N	MX
EH-196	0.50	N	MX
EH-212	6.00	C/L	MX

Tabla V (Cont.)

Virulencia	DL50 (x 10 <sup>7</sup> conidios/mL)	Fuente <sup>a</sup>	Procedencia
EH-217	7.00	C/F	MX
EH-143	7.25	C/L	MX
<b>Media</b>			
EH-245	24.5	C/L	GT
EH-192	41.9	C/F	MX
EH-227	62.2	C/F	MX
EH-242	65.0	C/F	GT
<b>Baja</b>			
EH-184	135	C/L	MX
15565	170	C/L	CO
EH-197	237	C/F	MX
022	>170	C/F	CO
6067	>170	C/F	CO
10937	>170	C/F	CO

<sup>a</sup> N = naturaleza; C/L = Forma clínica linfangítica; C/F = Forma clínica fija; MX = México; GT = Guatemala; CO = Colombia.

### 6.3 Caracterización genotípica

**6.3.1 Concentración de DNA en las muestras estudiadas.** En la Figura 6 se muestra un ejemplo del método utilizado para la determinación de la concentración de DNA de todas las cepas. La concentración de los DNAs obtenidos presentó un rango entre 50 y 500 ng/μL.

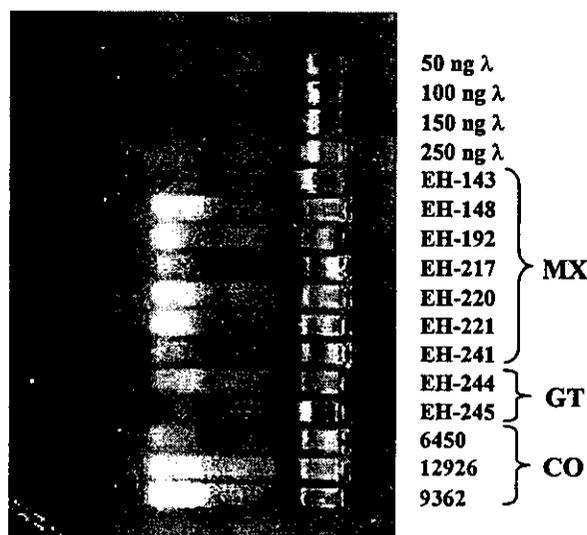


Fig 6. Concentración de DNA en gel de agarosa al 0.8% de diferentes cepas de *S. schenckii*. La electroforesis se realizó a 100 V por 45 min, los geles se colorearon con bromuro de etidio. Los cuatro carriles superiores muestran diferentes concentraciones del fago λ. Los demás muestran las concentraciones de DNA obtenidas para muestras representativas de cada procedencia (MX, GT, CO).

**6.3.2 Concentración de los iniciadores.** Los iniciadores 1253, 1281 y 1283 utilizados para amplificar DNA del hongo *H. capsulatum* por RAPD-PCR, mostraron un polimorfismo pobre al usarlos con el DNA de *S. schenckii*, por este motivo se procedió a estandarizar las condiciones para 20 iniciadores del Kit Operon. En la Figura 7 se puede apreciar la estandarización de la concentración del iniciador OPBG-01, la cual se llevó a cabo con diferentes concentraciones del iniciador y utilizando el DNA de la cepa de referencia EH-143. El RAPD se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. Solo tres concentraciones dan polimorfismo (100, 150 y 200 pmol/ $\mu$ L), sin embargo, la concentración de 100 pmol/ $\mu$ L mostró un bandeo más claro. En consecuencia, se eligió esta concentración para realizar los experimentos posteriores.



**Fig 7.** Concentración óptima del iniciador OPBG-01 con la cepa de referencia EH-143 de *S. schenckii*. La electroforesis de los productos de RAPD-PCR se realizó en gel de agarosa al 1.4% coloreado con bromuro de etidio a 60V durante 6 h. Los carriles muestran los perfiles obtenidos con cada concentración del iniciador. M= 123 pb DNA en escalera.

**6.3.3 Selección de los iniciadores para RAPD-PCR.** La Figura 8 muestra el ensayo general donde se probaron los demás iniciadores del Kit Operon (OPBG 2 al 20) a una concentración de 100 pmol/ $\mu$ L, bajo las condiciones descritas en la Figura 7 con la cepa EH-143 de *S. schenckii*.

Cuando se ensayaron estos iniciadores se observó que la intensidad de los productos de amplificación varió considerablemente. De los 20 iniciadores probados el se eligieron los mejores de acuerdo al numero e intensidad de las bandas. Los que mejor cumplieron con estos requisitos fueron el OPBG-01, el OPBG-14 y el OPBG-19. con un numero de bandas comprendido entre 2 y 11. Posteriormente, se procedió a evaluar el comportamiento de los tres iniciadores seleccionados con DNAs obtenidos de cepas de pacientes de diferentes procedencias y fuentes.

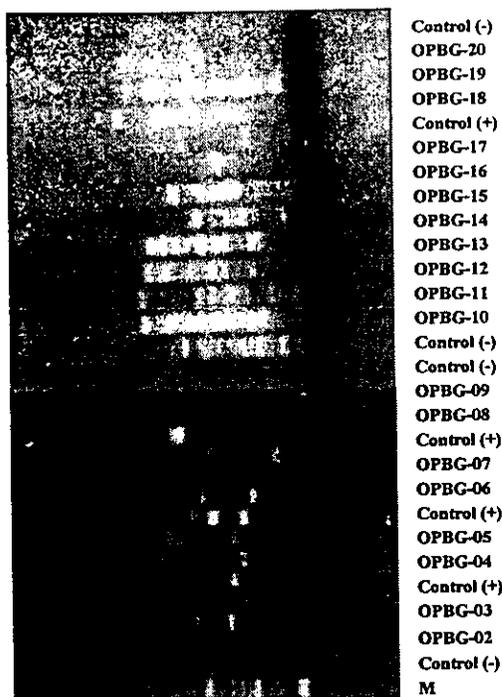


Fig 8. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR del DNA de la cepa EH-143 generados con 19 iniciadores del Kit Operon. Las condiciones de corrida fueron las mismas de la Figura 7. M= 123pb DNA en escalera.

**6.3.4 Concentración de  $MgCl_2$**  Para optimizar la concentración de  $MgCl_2$  y evitar reacciones inespecíficas, se realizó una curva bajo las condiciones señaladas en la Figura 7 (Figura 9).

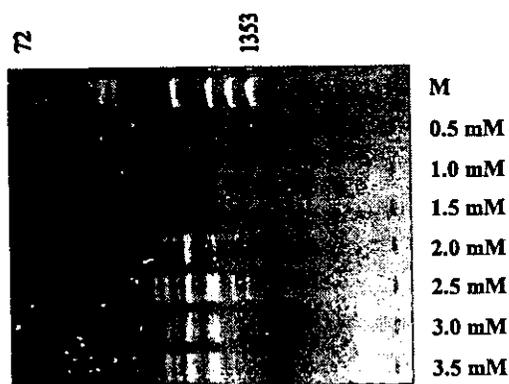
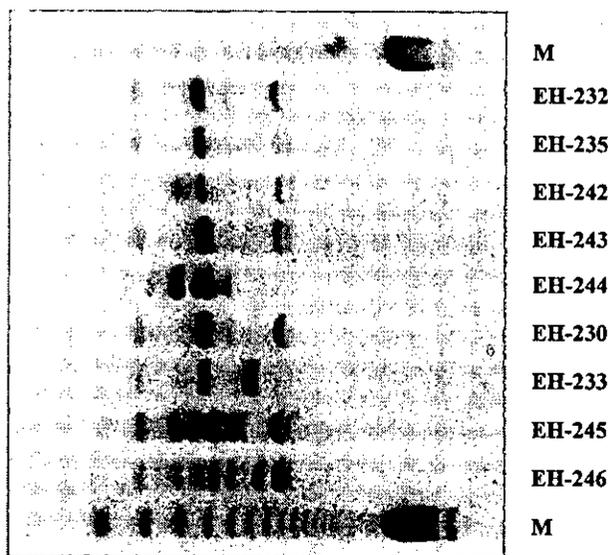


Fig 9. Curva de  $MgCl_2$ . Se utilizó el DNA de la cepa de referencia EH-143 con diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ . El gel de agarosa a una concentración de 1.4% se corrió a 90 V durante 90 minutos. M=DNA de  $\phi X174$  RF cortado con *Hae* III (GIBCOBRL<sup>®</sup>).

Finalmente, las condiciones establecidas para los experimentos finales fueron: 25  $\mu L$  de volumen de reacción, 10 ng DNA, 100 pmol del iniciador, 200 mM de dNTPs, 1U

de Taq pol y 2.5 mM de  $MgCl_2$ . El programa de amplificación que mostró mejores resultados fue el A de la Tabla III (1 ciclo: 94°C, 5 min; 45 ciclos: 92°C, 1 min/35°C, 1 min/72°C, 1 min; 1 ciclo: 72°C, 5 min).

**6.3.5 Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa.** Una vez que se eligieron los iniciadores y se establecieron las condiciones para el RAPD-PCR, se procedió a analizar genotípicamente un total de 44 cepas con los tres iniciadores seleccionados (OPBG-01, OPBG-14 y OPBG-19). De México (MX), 17 cepas de origen clínico (C) y 10 de la naturaleza obtenidas del suelo y plantas (N); de Guatemala (GT), siete; y de Colombia (CO) 10, en los dos últimos casos las cepas son de origen clínico. El iniciador OPBG-01 generó 20 marcadores, 23 el OPBG-14 y nueve el OPBG-19 para un total de 52 productos de amplificación con un rango entre 131 y 1685pb (Anexo 1). El iniciador OPBG-9 dio origen a una banda de aproximadamente 810 pb en el 91% de las cepas y una de 636 pb en el 93.2%, asimismo el OPBG-14 produjo una de 467 pb en el 93.2%. Las Figuras 10, 11 y 12 muestran ejemplos de los perfiles obtenidos con RAPD-PCR, para cepas de las diferentes procedencias y fuentes con el iniciador OPBG-14.



**Fig 10.** Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para cepas de *S. schenckii* de GT obtenidos con el oligonucleótido OPBG-14. La electroforesis se realizó a 40V durante 6 h. Los gels se colorearon con bromuro de etidio y se obtuvo la imagen con un fotodocumentador. M = 123 pb DNA en escalera.

Finalmente, las condiciones establecidas para los experimentos finales fueron: 25  $\mu$ L de volumen de reacción, 10 ng DNA, 100 pmol del iniciador, 200 mM de dNTPs, 1U de Taq pol y 2.5 mM de  $MgCl_2$ . El programa de amplificación que mostró mejores

resultados fue el A de la Tabla III (1 ciclo: 94°C, 5 min; 45 ciclos: 92°C , 1 min/35°C ,1 min/72°C, 1 min ; 1 ciclo: 72°C, 5 min ).

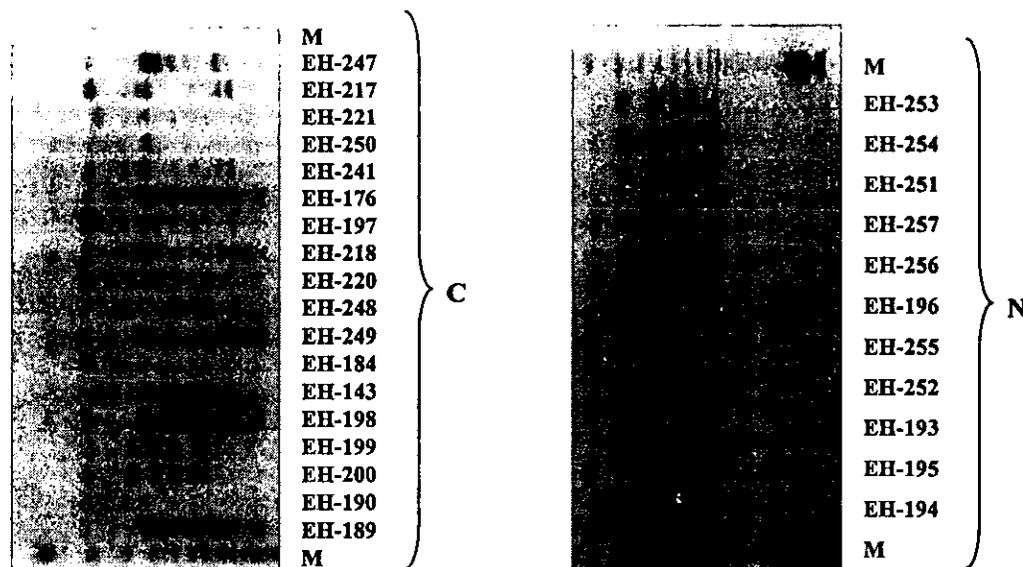


Fig 11. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cepas de *S. schenckii* de MX de origen clínico (C) y naturaleza (N), con el iniciador OPBG-14. Las condiciones de corrido fueron las descritas en la Figura 10. M = 123 pb DNA en escalera.

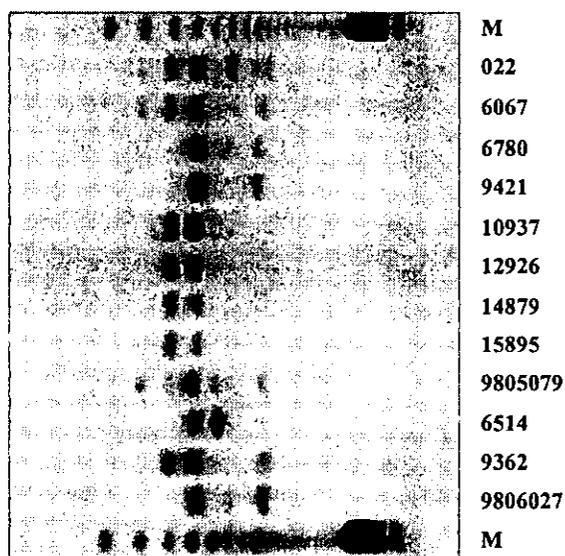


Fig 12. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para cepas de *S. schenckii* de CO de origen clínico obtenidos con el oligonucleótido OPBG-14. Las condiciones de corrido fueron las descritas en la Figura 10. M = 123 pb DNA en escalera

Con los perfiles obtenidos para todas las cepas con los tres iniciadores, se construyó una matriz de presencia (1) y ausencia (0) obteniéndose un total de 52 bandas de DNA (Anexo 1), ésta se utilizó para el análisis de agrupamiento de los caracteres obtenidos por RAPD de 44 cepas de *S. schenckii* aisladas de diferentes

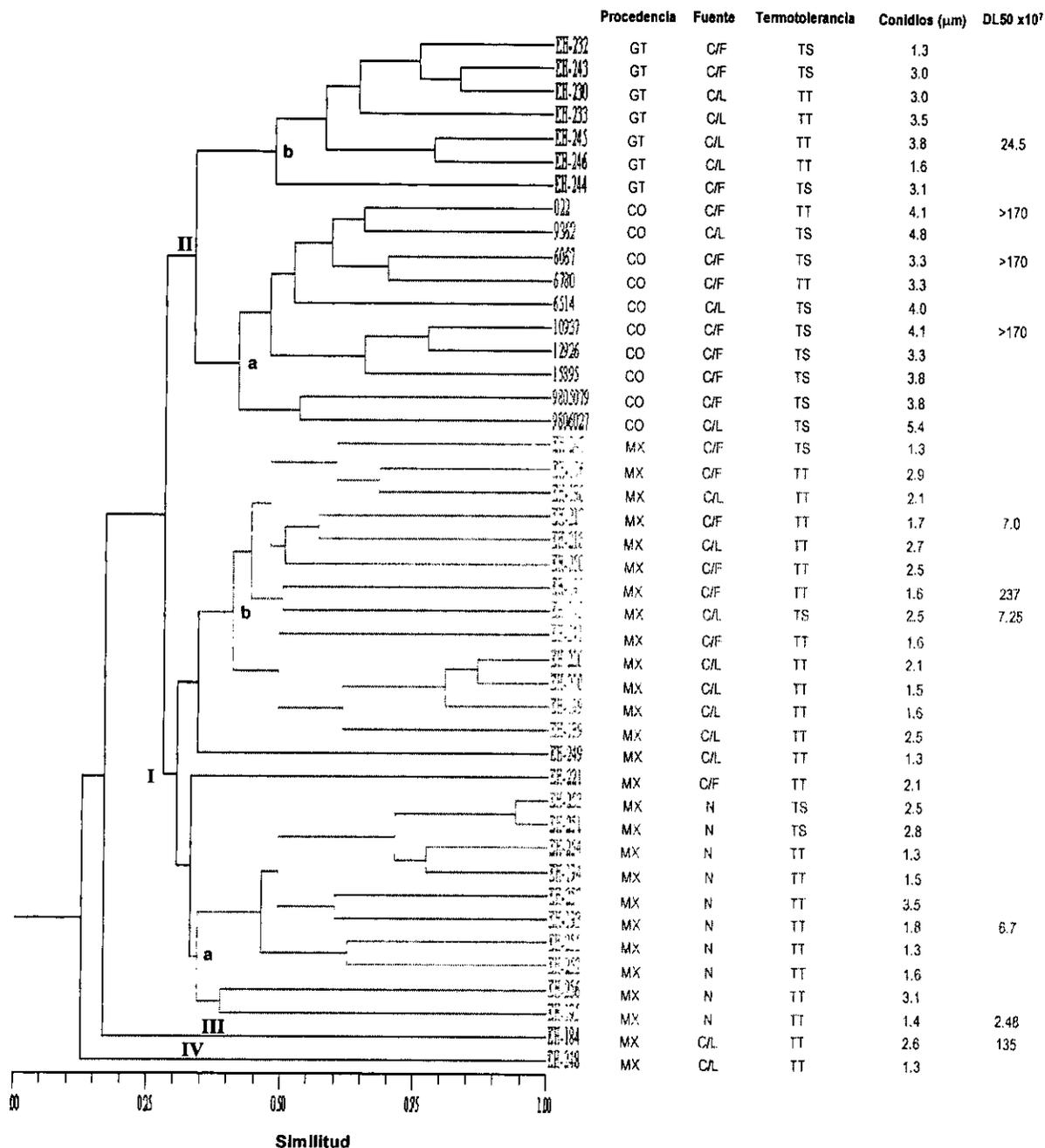


Fig 13. Relación entre los grupos obtenidos por RAPD-PCR con tres iniciadores (OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19) para 44 cepas de *S. schenckii* con la procedencia (MX, GT, CO), fuente (C/L, C/F, N), termotolerancia a 37 °C (TT= termotolerante, IC ≤ 70%; TS= termosensible, IC > 70%) y DL50. El dendrograma fue generado a partir de la matriz de similitud de un total de 52 bandas de DNA, basado en el método de UPGMA.

fuentes (clínicos y naturaleza) así como de diferente procedencias (MX, GT y CO).

El dendrograma ordenó las cepas en cuatro grupos de acuerdo con su origen geográfico (Figura 13). El grupo I presenta un 31% de similitud y está integrado por 25 cepas de México (origen clínico y naturaleza) de un total de 27, este a su vez se divide en dos subgrupos: el Ia integrado por cepas de la naturaleza con excepción de la cepa EH-221 que tiene un origen clínico; este subgrupo presentó un 35% de similitud; el subgrupo Ib formado por todas las cepas de origen clínico. El grupo II está formado por dos subgrupos, los cuales se relacionan en 33% de similitud. El subgrupo IIa está formado por todas las cepas de CO cuyo porcentaje de similitud es 42% y el subgrupo IIb formado por las cepas de GT. Los grupos III y IV los forman las cepas EH-184 (clínico, MX) y la EH-248 (clínico, MX) respectivamente con un porcentaje de similitud bajo con respecto a los demás grupos (13 y 17% respectivamente). La formación de los grupos mostró ser estadísticamente significativo ( $t$ ,  $0.05, 42 = 11.3$ ).

El porcentaje de similitud de las cepas varió entre 30% y 93% (Figura 13) lo que demuestra considerable variabilidad entre los grupos. En esta figura también se observa que hay una relación entre los métodos de caracterización fenotípica (tamaño de conidios, termotolerancia y la virulencia de las cepas) y la caracterización de las cepas por RAPD, con respecto al origen geográfico y el predominio de una forma clínica en cada país, así como aquellas cepas aisladas de la naturaleza. El grupo Ia del dendrograma incluye cepas aisladas de la naturaleza (N) de MX, termotolerantes, con conidios pequeños y de alta virulencia. El grupo Ib incluye cepas de MX de origen clínico con predominio de la forma linfangítica, termotolerantes, con conidios pequeños y no se encontró relación con la virulencia (pocos resultados de la DL50 hasta la fecha). En el subgrupo IIa se encuentran las cepas de CO, en su mayoría de la forma clínica fija, termosensibles, con conidios grandes y de baja virulencia. El subgrupo formado por las cepas de GT (IIb), la mayoría de la forma clínica linfangítica, termotolerantes, con conidios pequeños y a la cepa que se cuantificó DL50 presentó baja virulencia.

Las pruebas de Mantel ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.001$ ) y del mejor corte del árbol ( $t$   $0.005, 42 = 11.3$ ) muestran que la estructura del dendrograma y los grupos que se forman son resultado de una verdadera relación biológica entre las cepas y no producto del azar. (Figura 14).

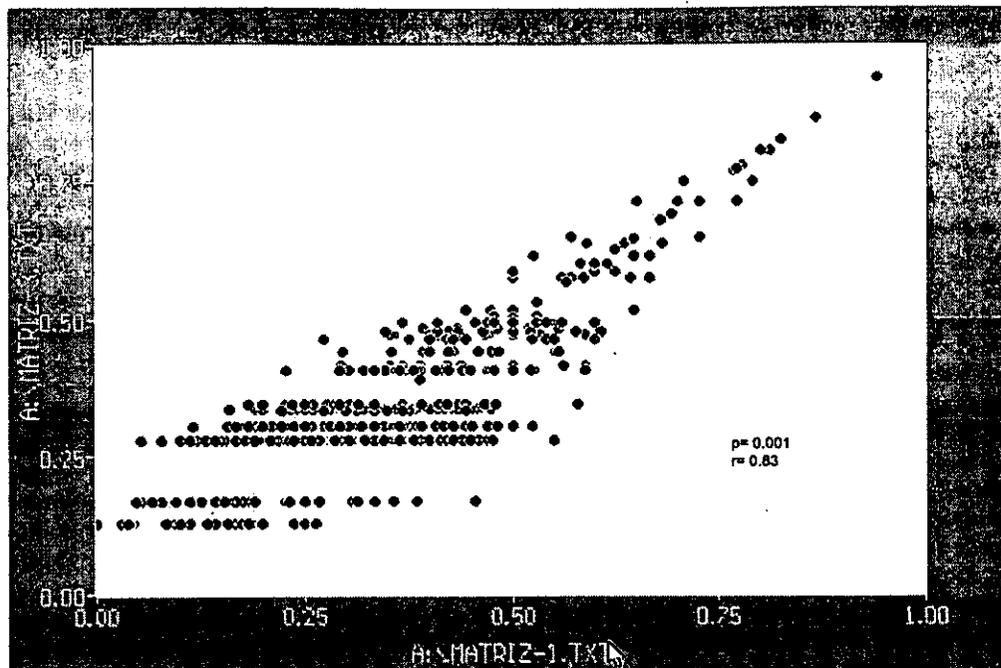


Fig 14. Comparación de matrices (original y final) por la prueba de Mantel

Los tres primeros componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP), explican el 50% de la variación observada. El primer componente explica el 34 % de la variación, el segundo el 8.3% y el tercero el 7% (Figura 15 y Tabla VI). Los grupos que se observan son discretos y reflejan la cercanía geográfica de las cepas. La sobreposición del árbol de tendido mínimo (Figura 16), muestra que las cepas de origen mexicano que en dendrograma quedan separadas de los grupos, realmente mantienen cierta relación con el grupo de cepas de MX.

Tabla VI

Porcentajes empleados para el análisis de componentes principales (ACP)

Componente	Valor del Componente	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	14.98929327	34.0666	34.0666
2	3.67248207	8.3466	42.4131
3	3.08224594	7.0051	49.4182
4	2.19134047	4.9803	54.3985
5	1.58124187	3.5937	57.9923
6	1.40725427	3.1983	61.1906
7	1.34388571	3.0543	64.2449
8	1.20592957	2.7407	66.9856

Tabla VI (Cont.)

Componente	Valor del Componente	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
9	1.04985387	2.3860	69.3717
10	0.98841563	2.2464	71.6181
11	0.86548047	1.9670	73.5851
12	0.81048916	1.8420	75.4271
13	0.76567595	1.7402	77.1672
14	0.70708912	1.6070	78.7743

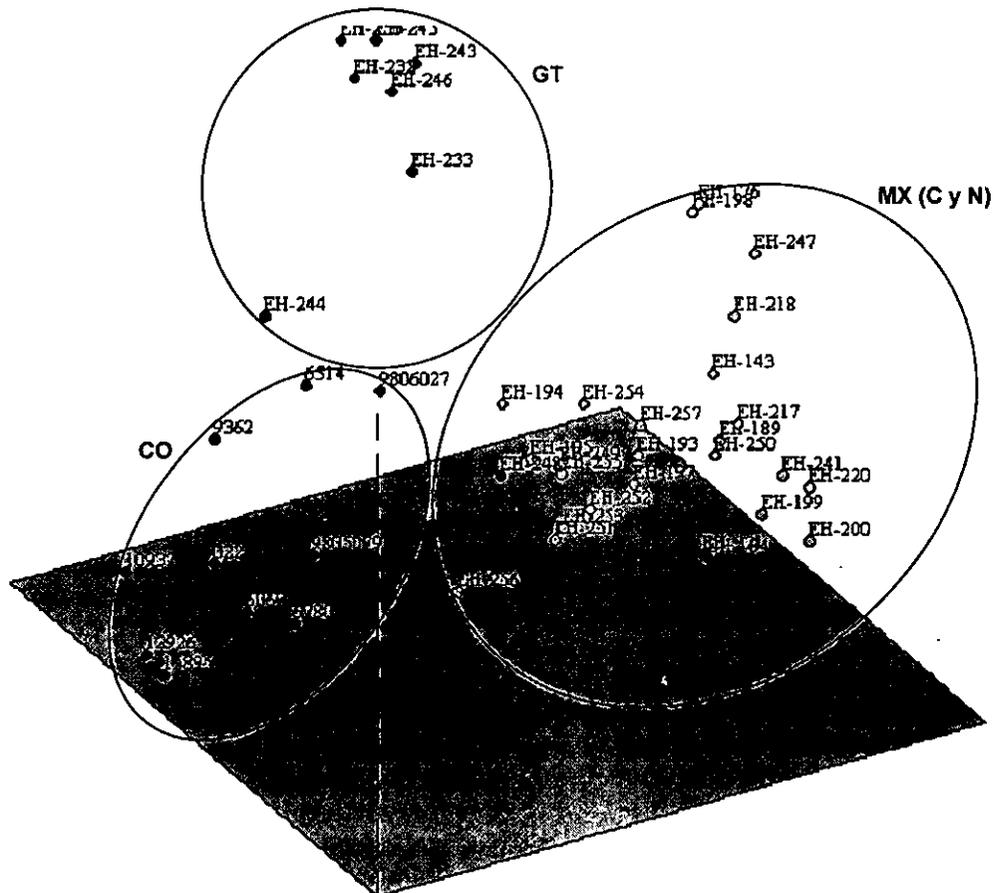


Fig 15. Análisis de componentes principales obtenido a partir de una matriz de similitud.

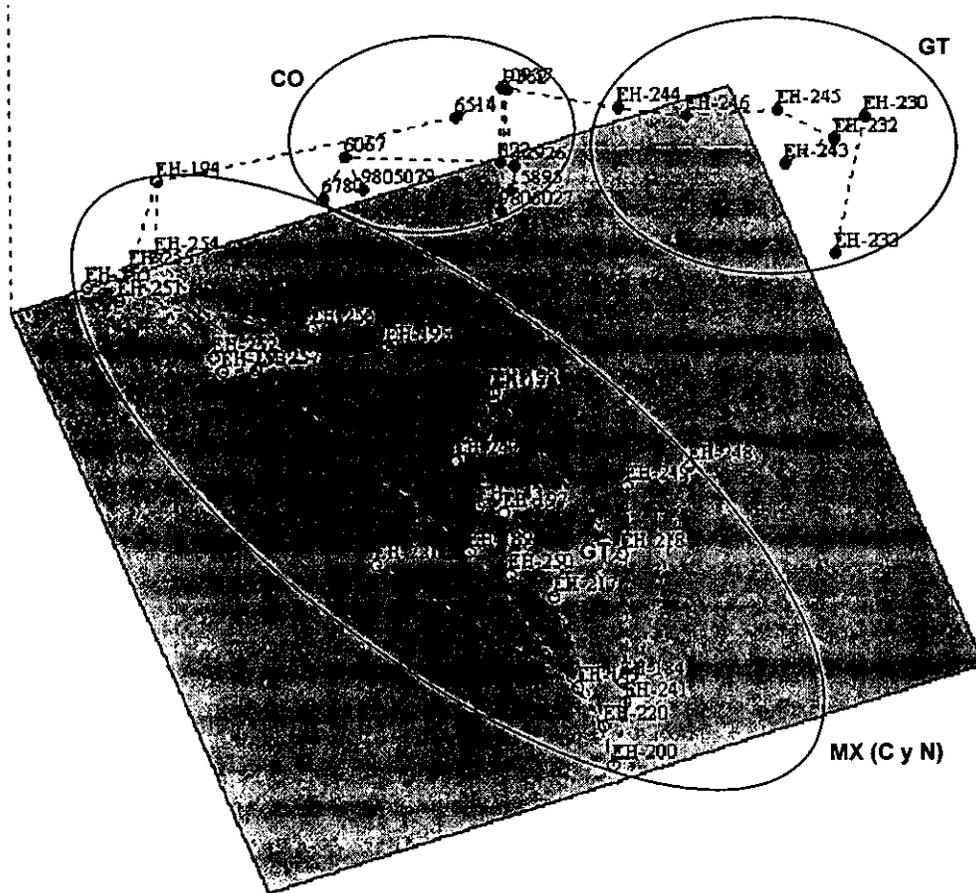


Fig 16. Árbol de tendido mínimo.

## 7. DISCUSIÓN

*S. schenckii* es un hongo de amplia distribución en el mundo y aunque se han realizado estudios para conocer su variabilidad poco se conoce de este aspecto en México, Guatemala y Colombia. Con el fin de aportar información al respecto, en este trabajo se compararon, feno y genotípicamente, diferentes aislados de *S. schenckii* de los tres sitios geográficos y de diferentes fuentes (clínicos y naturaleza). Los aislados estudiados se identificaron como *S. schenckii* por sus características morfológicas (micro y macroscópicas), transición de micelio a levaduras, y por exoantígenos comparados con una cepa de referencia. La caracterización fenotípica destacó un hecho interesante, no informado hasta la fecha, relativo al largo de los conidios, mostrando diferencias significativas dependiendo de la región geográfica (MX, GT, CO). Las cepas CO se distinguieron por presentar los conidios más largos ( $4.0 \pm 0.95 \mu\text{m}$ ). Dixon *et al.* (1991) en este mismo modelo, determinaron una media para el largo de conidios en aislados clínicos ( $2.4 \mu\text{m}$ ) y del ambiente ( $2.0 \mu\text{m}$ ) similar a la encontrada en este estudio para cepas MX de origen clínico ( $1.97 \pm 0.49 \mu\text{m}$ ), N ( $2.33 \pm 1.00 \mu\text{m}$ ) y GT ( $2.54 \pm 0.78 \mu\text{m}$ ).

En el presente estudio se determinó un valor cuantitativo de la termotolerancia para cada cepa basado en el %IC a 35 y 37°C, que se utilizó para comparar estadísticamente los distintos grupos (MX, GT, CO). Este análisis reveló diferencia significativa entre la termotolerancia de las cepas de MX, GT y CO para ambas temperaturas. El fenómeno de la termotolerancia es más claro a 37°C, donde el promedio del %IC de todas las cepas se encuentra alrededor del 70, valor por arriba del cual se presenta un predominio de cepas termosensibles, como se observa con mayor claridad en las cepas CO (Figuras 4a y 4b). Esta característica de las cepas de origen colombiano podría explicar el predominio de la forma fija de la esporotricosis en ese país (Velásquez *et al.*, 1976) a diferencia de México (Lavalle, 1979), Guatemala (Mayorga *et al.*, 1978) y otros países del mundo (Hajjeh *et al.*, 1997) donde prevalece la forma linfangítica. Estos hallazgos son semejantes a los reportados Kwon-Chung (1979), quien señala relación entre la termotolerancia y la forma clínica de la enfermedad. Sus resultados muestran que los aislados clínicos obtenidos de casos de esporotricosis fija solamente crecen a 35°C, a diferencia de aquéllos de formas diseminadas, que se desarrollan a 37°C.

Los resultados publicados a la fecha sobre virulencia de *S. schenckii* han sido sobre la mortalidad producida por el hongo en modelos murinos o hámsters (Dixon *et*

*al.*, 1991, Kwon-Chung, 1979, Howard y Orr, 1963). A diferencia del presente trabajo, en ninguno de ellos se establece el grado de virulencia por la DL50 como un parámetro de comparación entre diversas cepas. De acuerdo con los valores aquí obtenidos utilizando la DL50 (Tabla V), la virulencia de las cepas evaluadas fue heterogénea, y permitió la formación de tres grupos (alta, media y baja) (Figura 5). Esta heterogeneidad está relacionada, aparentemente, con la fuente del hongo, como es el caso de las cepas aisladas de la naturaleza en México (N), ubicadas dentro del grupo de alta virulencia (Tabla V). Este hecho podría explicarse por la interacción entre el hongo, su ambiente y el hospedero, propiciando un aumento o disminución de características que favorezcan o reduzcan su virulencia. En este sentido, Martínez-Rivera (1998) basándose en observación de cepas del hongo patógeno, *H. capsulatum*, sugiere una asociación entre la interacción del microorganismo con su ambiente y la virulencia. Las cepas aisladas de espacios cerrados (cuevas) y oscuros presentaron alta virulencia en comparación con otras aisladas en espacios abiertos y luminosos que muestran menor virulencia, sugiriendo la posible activación de las primeras por infecciones sucesivas en hospederos naturales, como el murciélago. Por otro lado, Berliner y Biundo (1973) demostraron que la esporulación en *H. capsulatum* se favorece en lugares cerrados y oscuros, propiciando una gran cantidad de inóculo infectante. Estos resultados apoyan lo descrito por Baturen *et al.* (1995) quienes han referido que algunos factores ambientales, tales como el pH en diferentes sitios corporales, ejerce un efecto marcado en la expresión de antígenos asociados al serotipo del hongo *C. albicans*. También se ha observado que el crecimiento y la virulencia de este último patógeno está asociado con el efecto que ejercen diferentes factores ambientales sobre la expresión de diversos genes. Dependiendo de la cepa, este hongo puede crecer e invadir en diferentes sitios del cuerpo humano, lo que se traduce en la respuesta del hongo a diferente tipos de ambientes (Muhlschlegal *et al.*, 1998). Otras observaciones que muestran una asociación entre la expresión de diferentes características fenotípicas del microorganismo con respecto al ambiente donde se desarrolla, son las realizadas por Kemker *et al.* (1991) con cepas de *Trichosporon beigelli*, tanto de casos de infecciones superficiales (mucosas y piel) y profundas (sangre), como de cepas de origen no clínico, a través de métodos fenotípicos y genotípicos. Estos autores señalan que las cepas causantes de enfermedad invasiva, son distintas (feno y genotípicamente) de las que causan enfermedad superficial, y de las cepas de origen no clínico, por lo que sugieren que estas cepas corresponden a un complejo de organismos genéticamente distintos. En el caso de las cepas de *S. schenckii*, la mayoría de las que presentan forma clínica fija presentaron baja virulencia, y las correspondientes a la forma linfangítica se

ubicaron dentro de los grupos de mediana a alta virulencia. Estas observaciones sugieren que se trata de cepas con diferentes características fenotípicas cuya presencia o ausencia se encuentra sujeta a la expresión de genes donde sus productos son críticos para la colonización y supervivencia en diferentes ambientes, como se ha observado para los hongos anteriormente referidos.

Los hongos dimórficos, al pasar de la forma micelial saprobia a su forma parasitaria en el hospedero, tienen que enfrentar diversos factores ambientales, entre otros, cambios de temperatura. En este caso se requiere de respuestas adaptativas del microorganismo, el cual debe detectar estos cambios para adaptarse a un nuevo ambiente, a través de la inducción de expresión de genes de choque térmico (Maresca y Kobayashi, 1993). En algunos casos el microorganismo carece de estos genes o no los expresa, lo que impediría que su proliferación en estos ambientes. Se ha observado en *H. capsulatum* una cepa termosensible y de baja virulencia, que muestra un retraso en su transición de micelio a levadura, en cambio, una cepa termotolerante y virulenta se transformó rápidamente a la fase levaduriforme. En estos dos casos se detectó un gen, *yps-3*, que solamente se expresó en la cepa termotolerante, y actúa favoreciendo la transición dimórfica hacia la fase levaduriforme del hongo (Keath *et al.*, 1989). Situaciones similares podrían suceder en las cepas de *S. schenckii* que son termosensibles, carecer o no expresar algún gen que les permita adaptarse a 37°C, permaneciendo superficialmente bajo la forma clínica fija. Sin embargo, los datos sobre virulencia (DL50) generados en este estudio (Figura 5 y Tabla I), son aún insuficientes para corroborar esta sugerencia en *S. schenckii*, y sería conveniente realizar estudios más finos, con técnicas de biología molecular, que permitan determinar la expresión de genes involucrados en la termotolerancia y su importancia en la virulencia.

No obstante la gran diversidad mostrada por los perfiles de RAPD-PCR (Figuras 10, 11 y 12), es posible agrupar las cepas de acuerdo a su origen geográfico (Figuras 13, 15 y 16). La Figura 13 muestra una estrecha relación entre las cepas MX(N) y MX(C), agrupándolas geográficamente (Grupo I) y subagrupándolas de acuerdo a la fuente (Grupos Ia y Ib). Asimismo, las cepas GT y CO se reunieron en el Grupo II, y se subagruparon de acuerdo a su procedencia en los Grupos IIa y IIb. La regionalización de las cepas también es evidente en el Análisis de Componentes Principales (Figura 15). Era de esperar que el grupo GT mostrara mayor similitud genética con el grupo MX por la proximidad entre estos países, situación que podría favorecer flujo genético en este hongo, sin embargo, presenta mayor similitud con el grupo CO. A la fecha, no

se tiene una explicación lógica que aclare este comportamiento. Las cepas EH-184 y EH-248 (MX(C)) se muestran como grupos separados, debido a que su porcentaje de similitud con los Grupos I y II es de 13%, no obstante, en el árbol de tendido mínimo, que es producto de un análisis estadístico sólido, estas cepas se agrupan con las de MX(C), lo cual resalta la importancia de complementar los dendrogramas con otras pruebas estadísticas, para confirmar los resultados que éste genera.

La estructura misma del dendrograma muestra que *S. schenckii* presenta niveles altos de variabilidad genética. Esta variabilidad podría explicarse por: 1) la presencia de una forma de reproducción sexual aún desconocida, a pesar de su ubicación entre los Ascomycota, como ocurrió hasta hace poco tiempo con *C. albicans* cuyo estado sexual no se había demostrado, y actualmente diversos autores han dado evidencias que indican que este hongo puede recombinarse sexualmente (Hull *et al.*, 2000; Magee y Magee, 2000; Gow *et al.*, 2000); 2) la presencia de un ciclo sexual críptico, como lo han reportado Burt *et al.* (1996) para *Coccidioides immitis*; 3) la presencia de un ciclo parasexual (recombinación no meiótica), como sucede en el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumoso-roseus* (Riba y Ravelojoana, 1984); 4) la presencia de una alta frecuencia de mutaciones inherentes al hongo.

Finalmente, se debe señalar que los resultados aquí presentados no permiten establecer asociación entre patrones polimórficos y formas clínicas de la enfermedad, es decir, una agrupación de acuerdo a la forma clínica, sin embargo, han sido publicadas otro tipo de asociaciones, como la hallada por Molinari-Madlum *et al.* (1998) con el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* entre patrones polimórficos por RAPD-PCR y el grado de virulencia de las cepas

## 8. CONCLUSIONES

RAPD-PCR es un método útil para caracterizar y comparar cepas de *S. schenckii*, procedentes de diferentes fuentes (pacientes y de la naturaleza) y orígenes geográficos permitiendo su agrupación de acuerdo a la procedencia.

El predominio de la forma fija de la esporotricosis en Colombia podría ser explicada por la tendencia a la termosensibilidad en las cepas de *S. schenckii* en ese país.

No fue posible relacionar la forma clínica de la esporotricosis con patrones polimórficos generados por RAPD-PCR.

La integración de los resultados sugiere que las cepas de *S. schenckii* comparten características tanto fenotípicas como genotípicas de acuerdo a la región geográfica.

RAPD-PCR es un método que requiere una estricta estandarización para obtener resultados reproducibles.

## 9. RECOMENDACIONES

Se propone realizar estudios posteriores para determinar la expresión de genes de choque térmico como una alternativa para explicar la termosensibilidad o termotolerancia en cepas de *S. schenckii*.

Como resultado de la caracterización genotípica, la presencia en la mayoría de las cepas de las bandas de 636 y 810 pb obtenidas con el iniciador OPBG-19 y la de 467 pb por el OPBG-14 (Anexo 1) sugiere estudiar su aplicación como marcadores para cepas de *S. schenckii* de México, Guatemala y Colombia.

Se recomienda realizar estudios posteriores de DL50 con mayor número de cepas de la naturaleza y de Colombia, para comprobar si la tendencia a la alta o baja virulencia se conserva.

Es de interés explicar la razón por la cual las cepas de Guatemala se ubican más próximas a las de Colombia que a las de México en los análisis de agrupamiento.

## 10. REFERENCIAS

- Albornoz M, Mendoza M y Torres E. 1986. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. *Mycopathologia*; 95: 81-83.
- Arenas G y Toriello C. 1986. Actividad inmunológica de antígenos miceliales-levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de *Sporothrix schenckii*. *Rev. Mex. Mic.*; 2: 131-144.
- Baturen B, Bikandi J, San Millán R, Moranguez MD, Regulez P, Quindóz G y Pontón J. 1995. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. *Microbiol.*; 141: 1535-1543.
- Berbee ML y Taylor JW. 1992. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp. Mycol.*; 16: 87-91.
- Berliner MD y Biundo N. 1973. Effects of continuous light and total darkness of culture of *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*; 11: 48-51.
- Boekhout T y Belkum A. 1997. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.*; 32: 203-208.
- Bonifaz A. 1990. *Micología Médica Básica*. México, D.F: Mendez y Cervantes.
- Bostock A, Khattak MN, Matthews R y Burnie J. 1993. Comparison of PCR fingerprinting by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*; 139: 2179-2184.
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93: 770-773.
- Carrada T, Corrales J y Corrales D. 1995. Avances en el conocimiento de las micosis subcutáneas y actinomicetomas (I). Agentes etiológicos y aspectos clínico-epidemiológicos. *Piel*; 10: 64-76.
- Conti-Diaz IA. 1981. La esporotricosis en el Uruguay. Aspectos epidemiológicos y clínicos. *An. Fac. Med. Montevideo*; 4: 137-146.
- Cooper CR, Breslin BJ, Dixon D y Salkin Y. 1992. DNA typing of isolates associated with the 1988 sporotrichosis epidemic. *J. Clin. Microbiol.*; 30: 1631-635.

- Cuadros RG, Vidotto V y Bruatto M. 1990. Sporotrichosis in the metropolitan area of Cusco, Peru and in its region. *Mycoses*; 33: 231-240.
- Chua SS, Momany M, Mendoza L y Szaniszló PJ. 1994. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. *Curr. Microbiol.*; 29: 151-156.
- de Beer WZ, Vismer HF, Harrington TC, Wingfield MJ y Wingfield BD. 2000. 18s rDNA sequences reveal significant differences between *Sporothrix schenckii* and *Ophiostoma stenoceras*. Abstract's Book of 4<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina, Mayo 8-12. p. 138.
- Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME y Coles FB. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.*; 29: 1106–1113.
- Ellsworth DE, Rittenhouse KD y Honeycutt RL. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*; 14: 214-216.
- Gow NA, Brown JO y Odds FC. 2000. Candida's arranged marriage. *Science*; 289: 256-257.
- Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, Hankins M, Toth B, Padhye A, Kauffman L, Pasarell L, Cooper C, Hutwagner L, Hopkins R y McNail M. 1997. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J. Inf. Dis.*; 176: 499-504.
- Howard DH y Orr GF. 1963. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. *J. Bacteriol.*; 85: 816-821.
- Hull CM, Raisner RM y Johnson AD. 2000. Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*; 289: 307-310.
- Ishizaki H, Aoki M, Lin J, Wu S y Kim JA. Molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in China and Korea. 2000. Abstract's Book of 4<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina, Mayo 8-12. p.120.
- Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Matsumoto T, Padhye AA, Mendoza M y Negróni R. 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia*; 142: 115-118.

- Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Miyaji M, Nishimura K y García Fernández JA. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in Costa Rica. 1996. J. Med. Vet. Mycol.; 34: 71-73.
- Kauffman L y Standard PG. 1987. Specific and rapid identification of medically important fungus by exoantigen detection. Ann. Rev. Microbiol.; 41: 209-225.
- Kawasaki M, Arenas R, Zaitz C, Yamashita JT y Rubio C. Molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Mexico, Brazil and Spain. 2000. Abstract's Book of 4<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina, Mayo 8-12. p 120.
- Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS y Medoff G. 1989. Variable expression of yeast phase specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. Infect. Immun.; 57: 1383-1390.
- Kemker BJ, Lehmann PF, Lee JW y Walsh TJ. 1991. Distinction of deep versus superficial and non clinical isolates of *Trichosporon beigelli* by isoenzymes and restriction fragment polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol.; 29: 677-683.
- Kersulyte D, Wood JP, Keath EJ, Goldman WE y Berg DE. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. J. Bacteriol.; 174: 7075-7079.
- Kwon Chung KJ y Bennett JE. 1992. Medical mycology. 3th ed. Philadelphia: Lea y Febiger.
- Kwon-Chung KJ. 1979. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. J. Infect. Dis.; 139: 424-431.
- Lavalle P. 1979. Esporotricosis. In: Instituto Syntex (Eds.), Simposio Syntex: Desarrollo y estado actual de la micología médica en México. México: Talleres gráficos de línea y color. pp. 115-135.
- Lee JB, Lee SC y Won HY. 2000. RAPD-PCR analysis for *Sporothrix schenckii* and related fungi. Abstract's Book of 4<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina, Mayo 8-12. p.144.
- Lehman PF, Lin D y Lasker BA. 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains with the genus *Candida* by using amplified polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol.; 30: 3249-3254.

- Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW y Lasker BA. 1995. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol.; 33: 1596-1601.
- Logemann HE. 1995. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer.
- Magee BB y Magee PT. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. Science; 2289: 310-312.
- Manly BFJ. 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman and Hall.
- Maresca B y Kobayashi G. 1993. Changes in membrane fluidity Modulate heat shock gene expression and produced attenuated strain the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Arch. Med. Res.; 24: 247-249.
- Mariat F. 1971. Adaptation de *Ceratocystis* a la vie parasitaire chez l'animal. Etude de l'adquisition d'un pouvoir pathogene comparable a celui de *Sporothrix schenckii*. Sabouradia; 9: 191-205.
- Mariat F, Garrison RG, Boyd KS, Rouffaud MA y Fromentin H. 1978. Premières observations sur les macrospores pigmentées de *Sporothrix schenckii*. C. R. Acad. Sc. Paris; 286: 1429-1432.
- Martínez-Rivera MA. 1998. Estudio fenotípico y genotípico de aislados de *Histoplasma capsulatum* de pacientes con histoplasmosis y aislados de diversos orígenes. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Mayorga R, Cáceres A, Toriello C, Gutiérrez G, Álvarez O, Ramírez ME y Mariat F. 1978. Etude d'une zone d'endemie sporotrichosique au Guatemala. Sabouraudia; 16: 185-198.
- Mayorga-Rodríguez JA, Barba Rubio J, Muñoz Estrada VF, Rangel Cortes A, García Vargas A, Magaña Camarena. 1997. Esporotricosis en el estado de Jalisco, estudio clínico-epidemiológico (1960-1996). Derm. Rev. Mex.; 41: 105-108.
- Melo AS, de Almeida LP, Colombo AL y Briones MR. 1998. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Mycopathologia; 142: 57-66.
- Mendonça-Hagler L, Travassos LR, Lloyd KO, Phaff HJ. 1974. Deoxyribonucleic acid base composition and hybridization studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species. Infect. Immun.; 9: 934-938.

- Mendonça-Previato L, Gorin PAJ, Travassos LR. 1980. Galactose-containing polysaccharides from the human pathogens *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras*. *Infect. Immun.*; 29: 934-939.
- Möler EM, Bahnweg G, Sandermann H y Geiger HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.*; 20: 6115-6116.
- Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS y Soares CMA. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be polymorphic DNA analysis. *J. Med. Vet. Mycol.*; 137: 269-276.
- Muhischlegel F, Fonzi W, Hoyer L, Payne T, Poulet FM, Clevenger J, Latgé JP, Calera J, Beauvais A, Paris S, Monod M, Sturtevant J, Ghannoum M, Nozawa Y y Calderone R. 1998. Molecular mechanisms of virulence in fungus-host interactions for *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Med. Mycol.*; 36: 238-248.
- Ouchterlony O y Nilsson LA. 1987. Immunodiffusion and immunoelectroforesis. In: D. M. Weir (ed.). *Handbook of experimental Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Pérez A, Martínez J, Espinosa TA, Toriello C. 1997. Diferencias en la virulencia de aislamientos de *Sporothrix schenckii*. In: Memorias del VI Congreso Nacional de Micología, IX Jornadas Científicas, Sociedad Mexicana de Micología, El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México, octubre. p.176.
- Plouffe JF, Silva JJ, Fekety R, Reinhalter E, Browne R. 1979. Cell-mediated Immune responses in sporotrichosis. *J. Infect. Dis.*; 139: 152-157.
- Real R y Vargas JM. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Syst. Biol.*; 45: 380-385.
- Reis RS, Schubach TMP, Guimaraes AJ, Monteiro PCF y Zancopé-Oliveira RM. 2000. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* strains isolated from clinical specimens in rio de Janeiro, Brazil. Abstract's Book of 4<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina, Mayo 8- 12. p.132.
- Restrepo-Gutiérrez S, Arango-Arteaga M, Uribe-Jaramillo F, Zuluaga-Cadena AI y Restrepo-Moreno A. 1993. Course of the experimental murine infection induced by *Sporothrix schenckii* conidia according to depth of inoculation. *J. Med. Vet. Mycol.*; 31: 411- 420.
- Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez MA, Rodríguez G, Maravilla E, Sifuentes J y Taylor ML, 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum*

- isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.*; 37: 1404-1408.
- Riba G y Ravelojoana AM. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown and Smith. *Can. J. Microbiol.*; 30: 922-926.
- Rholf FJ. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter software Inc.
- Rippon JW. 1990. *Medical Mycology*. 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Rodríguez del Valle N, Rosario M y Torres B. 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.
- Rodríguez J. 1993. Esporotricosis fija y su diagnóstico en Costa Rica. *Derm. Rev. Mex.*; 37: 496-499.
- Schell WA. 1998. Agents of chromoblastomycosis end sporotrichosis. In: Ajello L, Hay RJ (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Vol. 4, *Medical Mycology*. London: Arnold. pp. 315-336.
- Shaw JC, Levinson W y Montanaro A. 1989. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.*; 21: 1145-1147.
- Sugita Y, Fukushima J, Murakami M, Takahasi y Nakajima H. 1998. Identification of DNA fragment encoding a putative membrane transporter protein expressed in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*; 141: 101-104.
- Suzuki K, Kawasaki M y Ishizaki H. 1988. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia*; 103: 147-151.
- Takeda Y, Kawasakii M y Ishizaki H. 1991. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia*; 116: 9-14.
- Toriello C, Gorin PAJ y Mariat F. 1973. Similitude de structure chimique des polyosides de *Ceratocystis stenoceras* (Robak) C. Moreau et de *Sporothrix schenckii*, Hektoen et Perkins, demontre par la technique de la résonance magnétique protonique. *C.R. Acad. Sc. Paris*; 276(sér.D): 2785-2788.
- Toriello C y Mariat F. 1974. Étude comparée des polyoside des champignons *Ceratocystis stenoceras* et *Sporothrix schenckii*. Composition chimique et analyse immunologique. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*; 125: 287-307.

- Uribe F, Franco L, Gómez I, Robledo MA y Restrepo A: 1993. Esporotricosis-bases anatómicas y clínicas de su polimorfismo. Rev. Soc. Col. Derm.; 2: 252-258.
- Velázquez JP, Restrepo A y Calle G. 1976. Experiencia de 12 años con la esporotricosis. Polimorfismo clínico de la entidad. Ant. Med.; 26: 153-169.
- Vélez H, Santamaria L, Guzmán G y Escobar M. Esporotricosis. 1984. Aspectos clínicos en 78 pacientes. Act. Med. Col.; 9: 146-149.
- Vélez H, Santamaria L, Vargas M y Montoya F. 1996. Polimorfismo fenotípico de cepas autóctonas de *Sporotrix schenckii*. IATREIA; 9: 71-75.
- Werner A y B Werner. 1994. Sporotrichosis in man and animal. Int. J. Dermatol.; 33: 692-700.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA y Tinger SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids. Res.; 18: 2631-2635.





0.3928571 0.4815385  
 0.4071429 0.3478261 0.48  
 0.1333333 0.137931 0.2380952  
 0.3076923 0.2857143 0.4347826 0.3684211 0.1578947  
 0.1666667 0.3125 0.2272727 0.3333333 0.1428571 0.2307692 0.1666667  
 0.463871 0.5 0.5517241 0.5769231 0.52  
 0.68 0.4563333 0.5769231 0.1111111 0.3043478 0.1428571 0.5555556 0.48  
 0.3703704 0.3636364 0.44 0.8125 0.25 0.3157895 0.2666667 0.44 0.3333333  
 0.3846154 0.3809524 0.5217391 0.8966667 0.2831579 0.4117647 0.3846154 0.25 0.4074074 0.3793103 0.3949154 0.2916667 0.5283158 0.8470588  
 0.4074074 0.2916667 0.4230769 0.6966667 0.1818182 0.4444444 0.1578947 0.3793103 0.3949154 0.2916667 0.3333333 0.2963963 0.4230769 0.3913043  
 0.4285714 0.375 0.3 0.28 0.037037 0.2173913 0.125 0.4518128 0.4137931 0.3461538 0.2916667 0.3333333 0.3043478 0.3181818 0.3478261 0.9411765 0.7272727  
 0.4516129 0.3103448 0.2941176 0.3703704 0.03125 0.2272727 0.1666667 0.3928571 0.1578947 0.3333333 0.2083333 0.2 0.2105263 0.1904762 0.5 0.5416667  
 0.3928571 0.3913043 0.3103448 0.2916667 0.0384615 0.2272727 0.1578947 0.1578947 0.1538462 0.2222222 0.2083333 0.2 0.2105263 0.1904762 0.5 0.5416667  
 0.4285714 0.2222222 0.3684211 0.1851852 0.1904762 0 0.2352941 0.1538462 0.2222222 0.2083333 0.2 0.2105263 0.1904762 0.5 0.5416667  
 0.3571429 0.2916667 0.2756621 0.2 0.04 0.2380952 0.026316 0.3103448 0.36 0.2606695 0.2173913 0.3636364  
 0.2592593 0.2857143 0.2222222 0.1818182 0.1 0.1578947 0.0666667 0.3078923 0.3043478 0.25 0.2 0.2380952 0.4 0.375 0.4210526 0.2727273 0.2352941 0.625  
 0.4074074 0.24 0.2333333 0.3636364 0.04 0.2309852 0.1111111 0.4074074 0.4106667 0.3181818 0.2727273 0.4285714 0.4545455 0.5416667 0.4990909 0.6 0.25 0.4285714 0.4444444  
 0.3571429 0.24 0.2333333 0.3636364 0.0833333 0.2309852 0.1111111 0.3571429 0.36 0.3181818 0.2727273 0.3636364 0.48 0.2916667 0.3333333 0.3888889 0.2 0.1818182 0.5789474  
 0.4814815 0.2222222 0.269645 0.28 0.037037 0.1666667 0.047819 0.3333333 0.3846154 0.2916667 0.25 0.3913043 0.7 0.7727273 0.65 0.4 0.4545455 0.3913043