



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOGENÉTICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ELDA DEL CARMEN CORTÉS GONZÁLEZ**

TUTORA DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: M. EN C. MARÍA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO  
FACULTAD DE MEDICINA

DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOGENÉTICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ELDA DEL CARMEN CORTÉS GONZÁLEZ**

TUTORA DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: M. EN C. MARÍA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO  
FACULTAD DE MEDICINA

DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2013

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CORTÉS GONZÁLEZ ELDA DEL CARMEN** con número de cuenta **99054711** con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN MORFOGENÉTICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix***" realizada bajo la dirección de la **DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ:**

Presidente: **DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**  
Vocal: **DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS**  
Secretario: **DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**  
Suplente: **DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR**  
Suplente: **M. EN C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de mayo de 2013

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al programa de Becas para Estudios de Posgrado del CONACyT con número 369788, por el apoyo económico otorgado.

Al apoyo financiero que recibí por parte del CONACyT para asistir al VI Congreso Nacional de Micología Médica “Dr. Pedro Lavalle Aguilar”.

Asimismo agradezco la beca que me fue otorgada por parte del posgrado de la Facultad de Medicina para cursar el Diplomado de Micología Médica “Dr. Gastón Guzmán”.

Por último agradezco las valiosas aportaciones de mi tutora de tesis, Dra. Francisca Hernández Hernández, y mi Comité Tutoral, M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso y Dra. Magda Carvajal Moreno.

## Agradecimientos a personas

A la Dra. Francisca Hernández Hernández, de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, directora de esta tesis, muchas gracias por todas las enseñanzas, dedicación y apoyo que recibí de usted para el desarrollo y culminación de este proyecto. Es usted una gran maestra y le agradezco infinitamente haberme tomado en cuenta para su proyecto.

A la M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso, de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, miembro de mi Comité Tutorial, le agradezco por todas sus sugerencias y apoyo durante cada tutorial.

A la Dra. Magda Carvajal Moreno, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, miembro de mi Comité Tutorial por sus valiosas sugerencias para este trabajo y la minuciosidad con la que reviso mi escrito de tesis.

A los miembros de mi Jurado Dra. Concepción Toriello Nájera, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos, Dra. Magda Carvajal Moreno, Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor y a la M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso, por el tiempo que destinaron a la revisión de mi tesis y por todas sus aportaciones que permitieron mejorarla.

A la Maestra María del Carmen Loyola Blanco, del Laboratorio de Fotografía, Instituto de Biología, UNAM. Por el tiempo que dedicó para tomar las fotografías macroscópicas de los cultivos de *Sporothrix* spp. Maestra, le agradezco además su amabilidad y disposición, fue muy agradable trabajar con usted y sus alumnos.

A la M. en C. Laura Márquez Valdemar por el trabajo de secuenciación.

A las personas que me proporcionaron los aislados clínicos de *Sporothrix* spp. que se incluyeron en este trabajo: M en C. Alicia Zavalza Stiker de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; al Q.F.B. Alexandro Bonifaz del Servicio de Dermatología del Hospital General de México (SS); a la Dra. María del Carmen Padilla Desgarenes del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua"; al Químico Cudberto Contreras de la Micoteca del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE); al Dr. Luis Javier Méndez, del Centro Médico Nacional; al Dr. Víctor Tarango del Centro Dermatológico de Occidente, Jalisco; al M en C. Jaime Vargas Arzola de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, sin cuya colaboración no hubiera sido posible la realización de la presente tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Micología Médica y Micología Molecular, QFB Erika Córdoba Martínez, Biól. Elva Bazán Mora, por sus enseñanzas en el laboratorio, por sus valiosos aportes a este trabajo y por su amistad.

**A MIS PADRES VÍCTOR Y ELDA DE QUIENES HE RECIBIDO LO MEJOR**

**A MIS HERMANOS MARÍA LUISA Y VICTOR**

**A OMAR**

## ÍNDICE

Índice de tablas	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	15
I.1 Marco histórico	15
I.2 <i>Sporothrix schenckii</i>	16
I.2.1 Aspectos taxonómicos	16
I.2.2 Hábitat	18
I.2.3 Morfología macroscópica de la fase micelial	18
I.2.4 Morfología microscópica de la fase micelial	19
I.2.5 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme	21
I.2.6 Morfología microscópica de la fase levaduriforme	21
I.2.7 Características fisiológicas	22
I.2.8 Estudios moleculares para la identificación de <i>S. schenckii</i>	22
I.3 Marcadores moleculares utilizados para reconstrucciones filogenéticas	24
I.4 Calmodulina como un marcador molecular	26
I.5 $\beta$ -tubulina como un marcador molecular	26
I.6 Métodos de reconstrucción filogenética	26
I.6.1 Métodos de distancia	27
I.6.1.1 UPGMA	27
I.6.1.2 Neighbour-Joining	27
I.6.2 Parsimonia	27
I.6.3 Máxima Verosimilitud (MV)	28
I.6.4 Inferencia Bayesiana	28
I.7 Esporotricosis	29
I.7.1 Concepto de esporotricosis	29
I.7.2 Epidemiología	29
I.7.2.1 Epidemiología en México	30
I.7.3 Fisiopatogenia	30
I.7.4 Manifestaciones clínicas	31
I.7.5 Diagnóstico	34
I.7.6 Tratamiento	35
II. HIPÓTESIS	36
III. OBJETIVOS	36
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
IV. METODOLOGÍA	37
IV.1 Cultivo Monospórico	37

<b>IV.2 Estudio molecular</b>	<b>42</b>
IV.2.1 Extracción y purificación del DNA	42
IV.2.2 Cuantificación y visualización de DNA	42
IV.2.3 Lectura a 260 nm x Factor de dilución (500) x 50/ 1000	42
IV.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa	43
IV.2.5 Visualización del producto de PCR	44
IV.2.6 Purificación del producto de PCR	44
<b>IV.3 Secuenciación</b>	<b>44</b>
<b>IV.4 Análisis de las secuencias</b>	<b>44</b>
IV.4.1 Alineamiento	44
<b>IV.5 Análisis Filogenético</b>	<b>45</b>
IV.5.1 Edición del árbol	45
<b>IV.6 Estudio morfológico</b>	<b>45</b>
IV.6.1 Estudio morfológico macroscópico de la fase micelial	45
IV.6.2 Estudio morfológico microscópico de la fase micelial	46
IV.6.3 Reversión a la fase levaduriforme	46
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>V.1 Estudio Molecular</b>	<b>48</b>
V.1.1 Extracción de DNA	48
IV.1.2 Amplificación de un fragmento del gen que codifica para la calmodulina	49
IV.1.2.1 Purificación de los productos de PCR- Calmodulina	49
V.1.3 Amplificación del gen de $\beta$ -tubulina	50
V.1.3.1 Purificación de los productos de PCR- $\beta$ -tubulina	51
V.1.4 Revisión de la secuencias	51
<b>V.2 Análisis filogenético</b>	<b>52</b>
V.2.1 Análisis filogenético bajo el criterio de Parsimonia aplicado a las secuencias parciales del gen de calmodulina.	52
V.2.2 Análisis filogenético bajo el criterio de Parsimonia aplicado a las secuencias parciales del gen de la $\beta$ -tubulina.	58
V.2.3 Análisis filogenéticos simultáneos	62
<b>V.3 Estudio morfológico</b>	<b>69</b>
V.3.1 Morfología macroscópica	69
V.3.2 Morfología microscópica	70
V.3.3 Reversión a la fase levaduriforme	71
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	<b>106</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>107</b>

## Índice de figuras

- Figura 1. (A, B y C). Aspecto macroscópico de la colonia de la fase micelial de tres aislados de *Sporothrix schenckii*, a los 14 días de incubación a temperatura ambiente en ADS. A: Colonia aterciopelada, con pliegues radiales, blanca al centro y marrón en la periferia. B: Colonia blanca, umbilicada, con pliegues radiales. C: Colonia blanca y vellosa. Tomada de Cortés-González, 2010. \_\_\_\_\_ 18
- Figura 2. Esquematación de la morfología microscópica de la fase micelial de *S. schenckii*. \_\_\_\_ 19
- Figura 3 A-F. Morfología que presentan los conidios sésiles de miembros del complejo *S. schenckii* (A) *S. brasiliensis*, (B) *S. mexicana*, (C) *S. globosa*, (D y E) *S. schenckii* y morfología de conidios simpodiales de *S. luriei* (F). Modificado de Marimon et al. (2007,2008) \_\_\_\_\_ 20
- Figura 4. Colonia de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii*. Colonia blanca cremosa en agar infusión cerebro corazón incubado 14 días a 37°C. Tomada de Cortés-González 2010. \_\_\_\_ 21
- Figura 5. Esquemas de la morfología microscópica de la fase levaduriforme del complejo *S. schenckii*, observada en caldo infusión cerebro corazón a 37° C. \_\_\_\_\_ 21
- Figura 6. Clave morfo-fisiológica para identificar a las especies del complejo *Sporothrix*. APD: agar papa dextrosa, AHM: agar harina de maíz. Tomada de Bastos de Lima Barros et al., 2011. \_\_\_\_ 22
- Figura 7 (A, B). Bandas de DNA de 10 (A) y 7 (B) aislados de *Sporothrix* spp (tablas 3-6). Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etido. M: marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III Fragments (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden al número de aislado . \_\_\_\_\_ 48
- Figura 8. Productos de la PCR del gen de la Calmodulina con los oligonucleótidos CL1 y CL2A. M: marcador de 100pb; B: blanco; los números corresponden al número de aislado (ver tablas 3 y 4). \_\_\_\_\_ 49
- Figura 9. Productos de amplificación del gen de la calmodulina purificados. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular de 100 pb (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden a los números de algunos de los aislados problema de *Sporothrix* spp de la tablas 3 y 6 (3 $\mu$ L). \_\_\_\_\_ 49
- Figura 10. Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. B: blanco; M: marcador de peso molecular de 100 pb (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden a los números de los aislados problema de *Sporothrix* spp. (3 $\mu$ L). \_\_\_\_\_ 50
- Figura 11. Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. M: marcador de peso molecular de 100 pb (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden a algunos de los aislados problema de *Sporothrix* spp. de las tablas 3 y 4. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 12. Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. M: marcador de peso molecular de 100 pb (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden a algunos de los aislados problema de las tablas 3 y 4. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 13. Representación de uno de los árboles más parsimoniosos, basado en secuencias parciales del gen de la calmodulina. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 70. En rojo: aislados problema. Números romanos: número de clado. \_\_\_\_\_ 54
- Figura 14. Árbol de consenso de mayoría, basado en las secuencias parciales del gen de la calmodulina. La distribución de los aislados problema y de las secuencias de referencia se sigue conservando. \_\_\_\_\_ 55

Figura 15. Uno de los 17 árboles más parsimoniosos, construido con datos parciales del gen de la calmodulina procesados con el programa G-blocks. _____	56
Figura 16. Árbol de consenso construido con los datos del gen que codifica para la calmodulina, procesados con el programa G-blocks. _____	57
Figura 17. Representación de uno de los árboles más parsimoniosos, basado en secuencias parciales del gen de la $\beta$ -tubulina. _____	59
Figura 18. Representación del árbol consenso, basado en las secuencias parciales del gen de la $\beta$ -tubulina. _____	60
Figura 19. Uno de los árboles más parsimoniosos construidos con secuencias del gen que codifica para la $\beta$ -tubulina, procesadas con el programa G-blocks. _____	61
Figura 20. Árbol de consenso estricto construido con secuencias del gen que codifica para la $\beta$ -tubulina, procesados con el programa G-blocks. _____	62
Figura 21. Uno de los árboles más parsimoniosos construidos con secuencias concatenadas de los genes codificantes para la calmodulina y $\beta$ -tubulina. _____	63
Figura 22. Árbol de consenso estricto de datos concatenados. _____	64
Figura 23. Uno de los árboles más parsimoniosos construido a partir de los datos concatenados de los genes codificantes para la $\beta$ -tubulina y la calmodulina, procesados con G-blocks. _____	65
Figura 24. Árbol de consenso estricto construido a partir de los datos concatenados de los genes codificantes para la $\beta$ -tubulina y la calmodulina, procesados con G-blocks. _____	66
Figura 25. Registro fotográfico del estudio morfológico. A continuación se observa la morfología micelial que presentaron los aislados; la primera y segunda columna (A y B) corresponden a la morfología observada a los 21 días de incubación a 30°C en medio APD, la tercera columna (C) corresponde a la morfología observada bajo las condiciones anteriores pero en medio de cultivo HM, y la cuarta columna (D) corresponde a la morfología microscópica en medio HM incubados durante 14 días a 30°C. _____	71

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del complejo <i>Sporothrix schenckii</i> (sólo incluye especies de interés médico humano o veterinario). Tomado de Hibbett et al. (2007) y Marimon et al. (2007).	17
Tabla 2. Clasificación clínica de la Esporotricosis. Tomado y modificado de Bastos de Lima-Barros et al. (2011), complementada con datos de Arenas (2010).	33
Tabla 3. Datos de los aislados clínicos provenientes del Hospital General de México (México D.F.).	38
Tabla 4. Datos de los aislados clínicos provenientes de la Universidad de San Luis Potosí.	39
Tabla 5. Datos de los aislados clínicos provenientes de la Micoteca del InDRE.	40
Tabla 6. Datos de aislados clínicos de origen diverso: Universidad Autónoma Benito Juárez (1 aislado), Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS (2 aislados), Universidad de Veracruz (1), Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua (8), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (3), y Centro dermatológico occidente: Jalisco (1).	41
Tabla 7. Mezcla de reacción con kit PyroStart Fast PCR Master Mix (2X).	43
Tabla 8. Nombre clave en los árboles filogenéticos, tamaño y calidad de las secuencias.	67
Tabla 9. Características morfológicas.	87

## RESUMEN

El complejo *Sporothrix schenckii* incluye 6 especies fúngicas que han sido asociadas a la esporotricosis: *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*, s.s.), *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* (previamente consideradas como *S. schenckii*), *S. albicans* y *S. luriei*. Los caracteres morfológicos que se observan en especies del complejo *Sporothrix schenckii* no han sido útiles para resolver su taxonomía, ya que las diferencias suelen ser muy escasas o difusas entre éstas, o incluso dentro de una misma especie se observan polimorfismos. Con base en esta diversidad morfológica, en años recientes se inició la búsqueda de marcadores moleculares útiles para definir especies filogenéticas. Recientemente se utilizaron tres marcadores moleculares (calmodulina,  $\beta$ -tubulina y quitina sintetasa) para proponer nuevas especies filogenéticas dentro del complejo de especies de *Sporothrix*. La esporotricosis es una micosis cosmopolita de localización subcutánea, de curso subagudo o crónico, que afecta a personas de cualquier género, edad y raza. En México es la micosis subcutánea más frecuente. Esta enfermedad se adquiere por inoculación traumática con objetos contaminados con conidios y/o filamentos; en individuos inmunosuprimidos es adquirida por inhalación, afectando los pulmones y otros órganos por diseminación. Las formas clínicas más frecuentes son la fija y la linfocutánea; las formas diseminadas se observan particularmente en pacientes con inmunosupresión. Debido a la importancia que tiene la esporotricosis en México, la finalidad de este trabajo fue conocer la frecuencia de las diferentes especies de *Sporothrix* causantes de esta micosis. En este estudio se incluyeron 74 aislados clínicos provenientes de diferentes estados de la República Mexicana. Se extrajo el DNA y se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes a los genes de la calmodulina y  $\beta$ -tubulina. Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis filogenético por el método de parsimonia utilizando el programa TNT. Se observó que los aislados problema se distribuyeron en dos clados: uno que agrupa a las secuencias de referencia de la especie *S. schenckii* y la mayoría de los aislados problema, y otro que agrupa a las secuencias de referencia de la especie *S. globosa* y a un aislado problema. Además, se estudiaron los caracteres morfológicos de todos los aislados problema, con particular énfasis en la forma y tamaño de los conidios sésiles, caracteres que fueron sobrepuestos en la filogenia construida con el gen de la calmodulina en el trabajo de Marimon *et al.* (2007). En el estudio morfológico se observó que *S. schenckii* presenta una amplia variación morfológica. El estudio molecular demostró que la especie *S. schenckii* (s.s.) es la especie predominante en los aislados obtenidos de pacientes con diagnóstico de esporotricosis. La morfología de los aislados clínicos fue diversa y no es un dato que fortalezca la identificación de especies filogenéticas del complejo *S. schenckii*.

## ABSTRACT

*Sporothrix schenckii* complex includes six fungal species which have been associated to sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*), *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* (previously considered as *S. schenckii*), *S. albicans* and *S. luriei*. Morphological characters observed in species of the *Sporothrix schenckii* complex have not been helpful to clarify their taxonomy, because differences are usually poor or not well defined among different species, or within a same species many polymorphisms are observed. Based on this morphological diversity in recent years a search for molecular markers useful to define the phylogenetic species, have been initiated. Therefore Marimon *et al.* (2006 and 2007), using three molecular markers (calmodulin,  $\beta$ -tubulin and chitin synthase) proposed new phylogenetic species within the *Sporothrix* species complex. Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis with worldwide distribution, with a sub-acute or chronic course, affecting people of any sex, age and race. In Mexico it is the most common subcutaneous mycosis. The disease is acquired by traumatic inoculation with materials contaminated with conidia and/or filaments; in some cases it is acquired by inhalation, affecting the lungs. The most frequent clinical forms are fixed and lymphocutaneous; the disseminated forms are observed particularly in immunosuppressed patients. Due to the importance of the sporotrichosis in Mexico, the purpose of this study was to determine the frequency of *Sporothrix* species causing this mycosis. This study included 74 clinical isolates coming from different states of the Mexican Republic. DNA was isolated and fragments of calmodulin and  $\beta$ -tubulin genes were amplified by PCR. Sequences obtained were phylogenetically analyzed by the parsimony method using the TNT program. It was observed that the clinical isolates were distributed in 2 clades: one grouping the *S. schenckii* reference sequences and most of the problem isolates, and the other one grouping reference sequences of *S. globosa* and 1 problem isolate. In addition, morphological characters of all isolates were studied, emphasizing the shape and size of sessile conidia, characters that were overlapped in the phylogeny constructed with the calmodulin gene in the works of Marimon *et al.* In this study we found that *S. schenckii* presents a wide morphological diversity. The molecular study showed that *S. schenckii* (*sensu stricto*) is the predominant species within the isolates obtained from patients with sporotrichosis diagnosis. The morphological characters are not reliable data to differentiate phylogenetic species in the *Sporothrix* complex.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Marco histórico

En 1898, Benjamin Schenck (EUA) reportó el primer caso clínico humano de esporotricosis de un paciente con múltiples lesiones nodulares, localizadas en la mano y el antebrazo, dispuestas de manera lineal y ascendente. El afectado informó que “los nódulos aparecieron después de astillarse las manos al trabajar con madera”. Schenck aisló al hongo causante de esta micosis y envió el cultivo a Erwin Smith, micólogo del Departamento de agricultura de EUA, quien por la morfología lo relacionó con el género *Sporotrichum*. Dos años más tarde en EUA, Hektoen y Perkins reportaron el segundo caso de esporotricosis y después del estudio morfológico que hicieron del hongo, descubrieron que se trataba de un hongo dimórfico al que nombraron *Sporothrix schenckii*, en honor a Schenck (Belknap, 1989; Howard & Orr, 1963; Rippon, 1990; Shadomy & Wang, 1988; Schubach *et al.*, 2008).

En Europa, las primeras descripciones sobre esporotricosis y su agente etiológico iniciaron a principios del siglo XX. Beurmann y Ramond, en 1903, reportaron el primer caso clínico, describieron al agente etiológico y observaron características morfológicas distintas a las descritas por Hektoen y Perkins, por lo que en 1905 Beurman y Matruchot renombraron a *Sporothrix schenckii* como *Sporotrichum beurmanni* (Kwon-Chung & Bennett, 1992). En 1908, De Beurmann y Gougerot, aislaron por primera vez a *S. schenckii* de la naturaleza, y observaron que este aislado era indistinguible del que causaba la esporotricosis; además demostraron que algunos de los aislados de la naturaleza eran virulentos en ratas (Howard & Orr, 1963; Schell, 1988).

En Brasil, en 1908, Splendore publicó el reconocimiento de una nueva especie de hongo causante de lesiones esporotricoides, al que nombró *Sporotrichum splendore* ó *Sporotrichum asteroide*. Splendore observó una estructura parasitaria distinta morfológicamente a las previamente reportadas. Poco tiempo después se publicó que el cuerpo asteroide es una estructura que puede formarse en la fase parasitaria, pero que la fase micelial del hongo sigue correspondiendo a la antes descrita y que por lo tanto no se trata de otra especie (Michel da Rosa *et al.*, 2005; Rippon, 1990).

En 1940, aproximadamente 3000 mineros africanos desarrollaron esporotricosis, después de infectarse con *Sporothrix schenckii* que crecía como saprobio en la madera de los túneles de la mina de oro en la que trabajaban (Belknap, 1989; Winn, 1995).

En México, el primer caso de esporotricosis fue diagnosticado y publicado por Gayón en 1914 (Padilla-Desgarenes *et al.*, 2002). Las publicaciones que realizaron Lavalle-Aguilar y González-Ochoa entre 1960 y 1970, contribuyeron al conocimiento de la epidemiología

de esta micosis en la República Mexicana (González-Ochoa, 1965; Lavalle-Aguilar, 1968). De acuerdo a estas contribuciones, los estados con mayor número de casos fueron: Distrito Federal, Guanajuato, Puebla, Jalisco, Hidalgo, Veracruz de Ignacio de la Llave y México. Estos autores observaron que era una micosis principalmente ocupacional, la micosis subcutánea más frecuente en México y además lograron aislar a *S. schenckii* de los lugares de juego y trabajo de pacientes con esporotricosis (Lavalle-Aguilar & Padilla-Desgarannes, 2000; Mayorga-Rodríguez *et al.* 1997).

Otro hecho relevante es la descripción que hizo Carmichael en 1962, quien después de los estudios sobre las formas de conidiogénesis de las diferentes especies del género *Sporotrichum* y aislados de lesiones esporotricoides, determinó que eran géneros distintos, por lo que se retomó la propuesta de Hektoen y Perkins de considerar solamente a *Sporothrix schenckii* como agente etiológico de la esporotricosis (Howard & Orr, 1963; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007; Rippon, 1990; Schell, 1998).

Si se analizan cada una de las descripciones hechas para el agente etiológico de la esporotricosis a lo largo de su historia, resulta evidente que existe una gran variabilidad morfológica en *S. schenckii*. Sin embargo, esta variabilidad no ha sido considerada un factor suficiente para proponer nuevas especies. Recientes estudios filogenéticos de aislados con diferente origen geográfico caracterizados morfológicamente como *S. schenckii*, demuestran la existencia de diferentes especies, lo que convierte a *S. schenckii* en un complejo de especies (De Meyer *et al.*, 2008; Marimon *et al.*, 2007; Marimon *et al.*, 2008; Michel da Rosa *et al.*, 2005).

## **I.2 *Sporothrix schenckii***

### **I.2.1 Aspectos taxonómicos**

En 1900, Hektoen y Perkins, clasificaron a *S. schenckii* dentro de la división Deuteromycota, clase Hyphomycetes, pero esta se considera una clasificación artificial y por lo tanto errónea, debido a que está basada solo en el anamorfo del hongo. Los primeros trabajos realizados con la finalidad de encontrar a su teleomorfo y agruparlo en una clasificación natural, se basaron en estudios serológicos y morfológicos. El primer género con reproducción sexual al que se asoció *S. schenckii*, fue *Ceratocystis sp.*, debido a que comparte nicho ecológico y características morfológicas con *S. schenckii* al igual que el género *Ophiostoma* (Ishizaki *et al.*, 1976; Ishizaki *et al.*, 1978; Travassos & Lloyd, 1980).

Sigue sin conocerse la fase teleomorfa de *S. schenckii*; sin embargo, se han encontrado características que se utilizan como marcadores que evidencian las relaciones entre hongos aunque se desconozca la fase sexual. El estudio de la ultraestructura del poro de

los septos y la composición de carbohidratos de la pared celular, son estudios que han hecho evidente la relación de *Sporothrix schenckii* con el género *Ophiostoma* (Vélez *et al.*, 1996; Zipfel *et al.*, 2006).

Actualmente, se ha puesto mayor énfasis en formalizar la taxonomía del reino *Fungi* con el uso de múltiples marcadores moleculares analizados a través de una metodología cladística que genera hipótesis robustas, se ha conseguido tener un mejor conocimiento sobre este reino. Existen múltiples proyectos de clasificaciones, los más rigurosos por estar en continua revisión son: la clasificación taxonómica del GenBank, el proyecto web del árbol de la vida (The Tree of Life Web Project) y Myconet. Por supuesto existen desacuerdos sobre ciertos grupos taxonómicos y aún hay sinonimia en la nomenclatura de muchos taxa. El artículo de Hibbett *et al.* (2007) es una revisión completa sobre los trabajos taxonómicos realizados sobre este reino, donde hacen una evaluación y con base en los mejores datos construyeron una clasificación por encima del nivel taxonómico de orden. En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica del complejo *S. schenckii*, considerando la clasificación que se propone en este artículo. Además se incluyen las nuevas especies descritas por Marimon *et al.* (2007, 2008) como causantes de esporotricosis.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del complejo *Sporothrix schenckii* (sólo incluye especies de interés médico humano o veterinario). Tomado de Hibbett *et al.* (2007) y Marimon *et al.* (2007).

Reino <b>Fungi</b>
Subreino <b>Dicaria</b>
Phylum <b>Ascomycota</b>
Subphylum <b>Pezizomycotina</b>
Clase <b>Sordariomycetes</b>
Subclase <b>Sordariomycetidae</b>
Orden <b>Ophiostomatales</b>
Familia <b>Ophiostomataceae</b>
Género <b><i>Sporothrix</i></b>
Especies <b><i>Sporothrix schenckii</i></b>
<b><i>S. brasiliensis</i></b>
<b><i>S. globosa</i></b>
<b><i>S. mexicana</i></b>
<b><i>S. luriei</i></b>
<b><i>S. albicans</i></b>

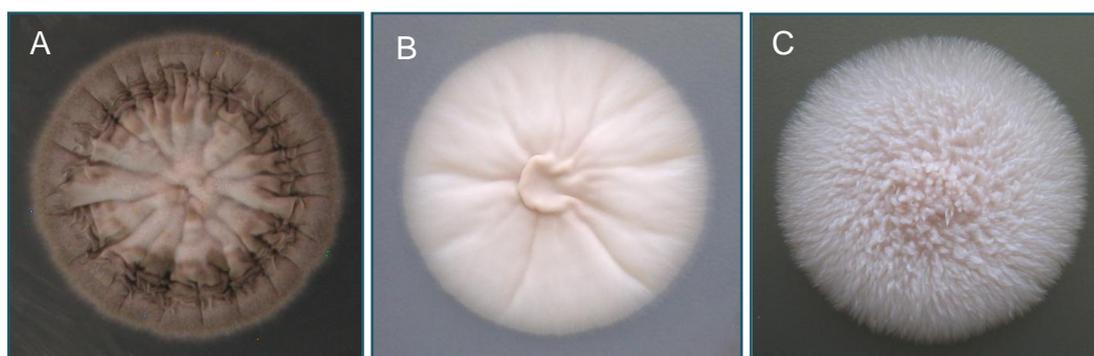
### I.2.2 Hábitat

El complejo *Sporothrix schenckii* está formado por un conjunto de especies dimórficas, cuya fase micelial se puede aislar de la naturaleza (Rippon, 1990) y la fase levaduriforme se aísla del tejido humano y de otros animales (Carfachia *et al.*, 2007; De Oliveira-Nobre *et al.*, 2005).

La fase micelial está representada por hifas y conidios; que pueden ser obtenidos de diversas fuentes, principalmente del suelo, detritus, madera, plantas como el musgo, rosas, paja, pasto, buganvillas, zacate, claveles, cafetos (Dixon *et al.*, 1991; Lavalle-Aguilar & Padilla-Desgarenes, 2000; Rippon, 1990; Travasos & Lloyd, 1990).

### I.2.3 Morfología macroscópica de la fase micelial

El complejo *S. schenckii* comparte características morfológicas. La forma micelial puede obtenerse *in vitro* en el laboratorio a partir de muestras ambientales o clínicas, en medios como agar de dextrosa Sabouraud (ADS), con o sin cloranfenicol y cicloheximida, incubados a una temperatura de 28°C durante 5 a 14 días. Al quinto día de incubación, se observan pequeñas colonias de aspecto húmedo o membranoso, de color blanco o beige, rodeadas de un halo filamentoso. Con el paso del tiempo las colonias pueden adquirir una tonalidad más oscura, amarillenta, marrón, gris, negra o permanecer blanca. También es común observar colonias con pigmento marrón o negro combinado con zonas blancas. Estudios morfológicos del complejo *S. schenckii* realizados en agar de papa y dextrosa (APD) y agar harina de maíz (AHM), describen que todas las especies presentan colonias pigmentadas a los 21 días, excepto la especie *S. albicans* cuyas colonias permanecen blancas (Marimon *et al.*, 2007). La mayoría de las colonias conservan su aspecto membranoso; en otras se observa micelio aéreo con aspecto veloso o aterciopelado, o bien glabro. Las colonias pueden formar pliegues radiales o cerebriformes, algunas umbilicadas, otras planas o crateriformes (Belknap, 1989; Howard & Orr, 1963; Shadomy & Wang, 1988; Schell, 1998; Travassos & Lloyd, 1980; Vélez *et al.*, 1996). **Figura 1 (A, B y C).**

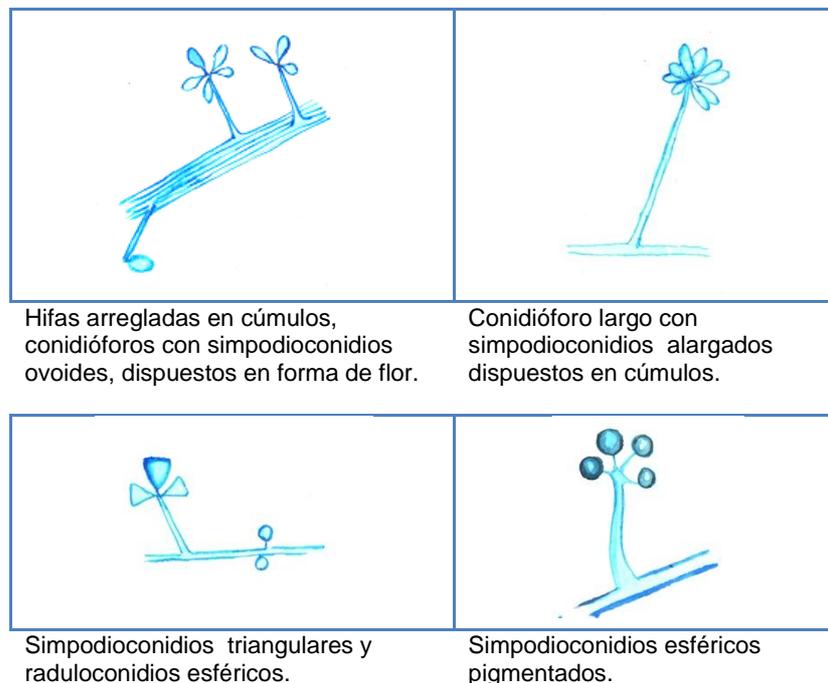


**Figura 1 (A, B y C).** Aspecto macroscópico de la colonia de la fase micelial de tres aislados de *Sporothrix schenckii*, a los 14 días de incubación a temperatura ambiente en ADS. A: Colonia aterciopelada, con pliegues radiales, blanca al centro y marrón en la periferia. B: Colonia blanca, umbilicada, con pliegues radiales. C: Colonia blanca y vellosa. Tomada de Cortés-González, 2010.

#### I.2.4 Morfología microscópica de la fase micelial

Microscópicamente las colonias se caracterizan por abundantes hifas y conidios. Las hifas son hialinas, septadas, con un diámetro de 1-2  $\mu\text{m}$  y frecuentemente forman conjuntos de hifas (Travassos & Lloyd, 1980).

Los conidióforos son estructuras poco diferenciadas de la hifa, que generalmente se forman en ángulo recto o agudo respecto a ésta; en el ápice de los conidióforos se disponen los conidios, que pueden estar agrupados, dando la apariencia de una flor, generados por un mecanismo simpodial. Este mecanismo consiste en que después de la formación del conidio terminal, el crecimiento del conidióforo continúa como una pequeña rama lateral que se origina debajo del conidio; esta rama pronto produce otro conidio terminal y el proceso de ramificación se repite por lo que son llamados simpodioconidios (Ulloa & Hanlin, 2006). Los conidios pueden ser pigmentados o hialinos. La forma de los conidios es variable: esféricos, alargados, piriformes o triangulares. El tamaño de los conidios oscila entre 3-6 X 1.5-3  $\mu\text{m}$  (Belknap, 1989; Howard & Orr, 1963; Ramírez-Gaona, 2005; Shadomy & Wang, 1988; Schubach *et al.*, 2008). En la **Figura 2** se muestra un esquema de la morfología micelial microscópica.



**Figura 2.** Esquemización de la morfología microscópica de la fase micelial de *S. schenckii*.

Los conidios también pueden emerger directamente de la hifa (anteriormente conocidos como raduloconidios, actualmente conocidos como conidios sésiles) y en este caso están sujetos a la hifa mediante un dentículo. El estudio de la morfología en este tipo de conidios es indispensable para diferenciar las especies del complejo.

*Sporothrix brasiliensis* Marimon, Gené, Cano & Guarro, se caracteriza por conidios sésiles, pigmentados y globosos, de 2.5-5 µm X 2-3 µm; las células conidiógenas son en su mayoría terminales o intercalares. Estos conidios se encuentran dispuestos en conidióforos que son ligeramente más gruesos que la hifa (Marimon *et al.*, 2007).

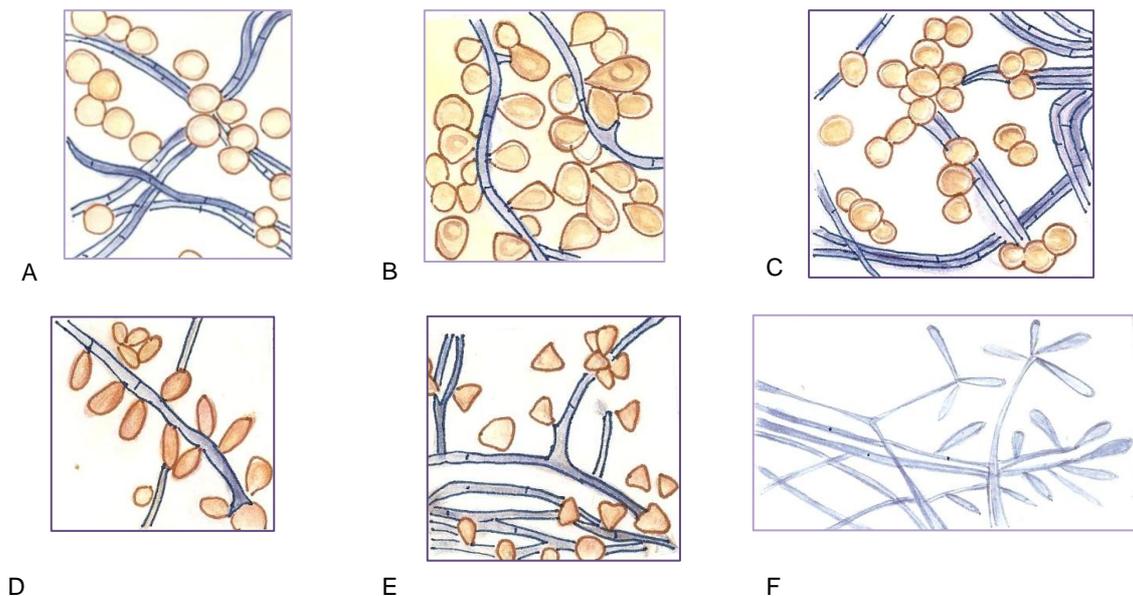
*Sporothrix globosa* Marimon, Gené, Cano & Guarro, forma conidios sésiles, globosos, pigmentados, de pared gruesa, de 3-4 µm X 2-3.5 µm. Las células conidiógenas son terminales o intercalares más o menos diferenciadas (Marimon *et al.*, 2007).

*Sporothrix mexicana* Marimon, Gené, Cano & Guarro, forma conidios simpodiales, hialinos, ovoides de 3-5.5 µm X 2-2.5 µm, además de conidios sésiles pigmentados, subglobosos, ovoides, elipsoidales que miden 3-4 µm X 2- 3.5 µm (Marimon *et al.*, 2007).

*Sporothrix schenckii* Hektoen & Perkins, presenta conidios sésiles con forma triangular o de cuña; en algunas ocasiones forma conidios ovoides alargados (Kwong-Chung & Bennett, 1992).

*Sporothrix luriei* (Ajello & Kaplan) Marimon, Gené, Cano & Guarro, se distingue de las otras especies porque no produce conidios sésiles; sin embargo, sus conidios simpodiales tienen una forma característica ovoide muy alargada (Marimon *et al.*, 2008).

En la **Figura 3 A-F** se observan ilustraciones de la morfología de conidios sésiles de *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* y *S. globosa* y la morfología de los conidios simpodiales de *S. luriei* hechas con base en las publicaciones de Marimon *et al.* (2007, 2008).



**Figura 3 A-F.** Morfología que presentan los conidios sésiles de miembros del complejo *S. schenckii* (A) *S. brasiliensis*, (B) *S. mexicana*, (C) *S. globosa*, (D y E) *S. schenckii* y morfología de conidios simpodiales de *S. luriei* (F). Modificado de Marimon *et al.* (2007,2008)

### I.2.5 Morfología macroscópica de la fase levaduriforme

Los miembros del complejo *S. schenckii* son hongos dimórficos y este fenómeno está determinado por cambios de temperatura y disponibilidad de algunos nutrientes. Sólo las hexosas son fuentes de carbono útiles para el desarrollo de esta fase, además se requiere tiamina y biotina en altas concentraciones para su mantenimiento (Travassos & Lloyd, 1980). Para estudiar la fase levaduriforme o parasitaria en el laboratorio, es necesario inocular este hongo en medios como son el caldo o agar infusión cerebro corazón, e incubarlo a 37° C. En el agar infusión cerebro corazón se observan colonias de aspecto cremoso, de color blanco a beige, plegadas o de superficie lisa o rugosa (Figura 4).



**Figura 4.** Colonia de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii*. Colonia blanca cremosa en agar infusión cerebro corazón incubado 14 días a 37°C. Tomada de Cortés-González 2010.

### I.2.6 Morfología microscópica de la fase levaduriforme

En la literatura se ha descrito una morfología variable en los aislados, la cual consiste de células ovoides, esféricas o fusiformes, que miden de 3.5-6.5 X 2.5-5  $\mu\text{m}$ , con gemaciones únicas o múltiples (Figura 5).



Levaduras ovoides.

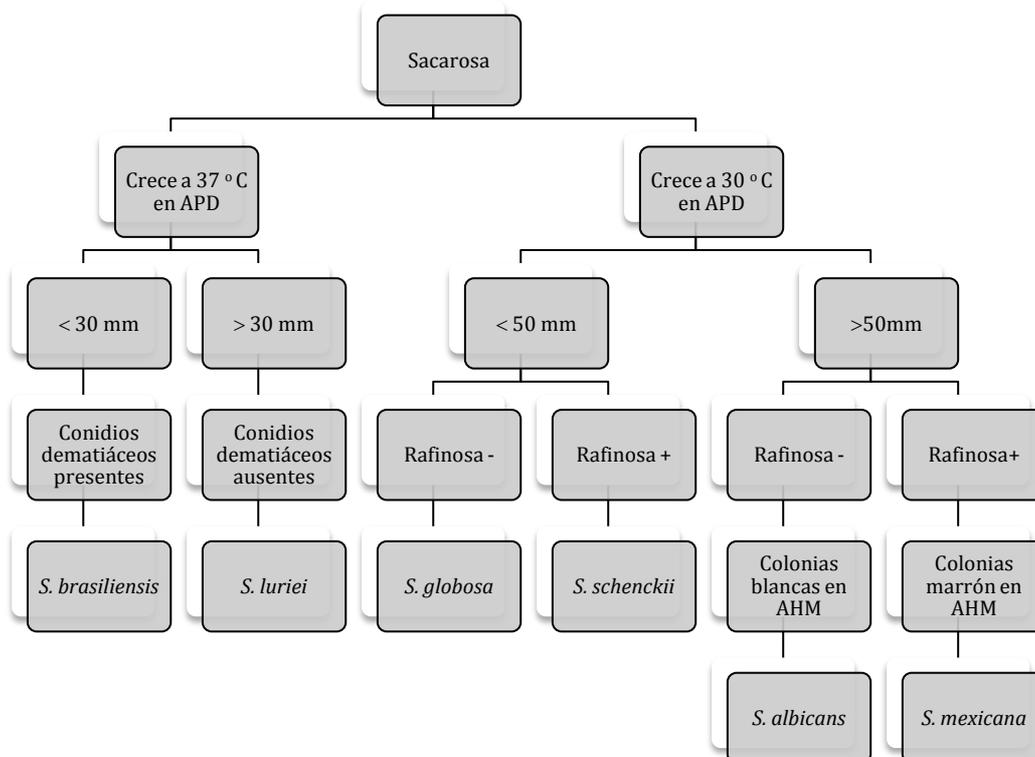
Levaduras fusiformes uni, bi o multigemantes.

Levaduras esféricas

**Figura 5.** Esquemas de la morfología microscópica de la fase levaduriforme del complejo *S. schenckii*, observada en caldo infusión cerebro corazón a 37° C.

## I.2.7 Características fisiológicas

En los últimos años se ha recurrido al uso de algunas pruebas bioquímicas que permitan caracterizar a las especies del complejo *S. schenckii*. Entre ellas se encuentran: la tasa de crecimiento durante 21 días a 30 ° C, temperatura máxima de crecimiento (generalmente 37 °C), asimilación de tres fuentes de carbono (sacarosa, rafinosa y ribitol). En la Figura 6 se muestra una clave esquemática para identificar las diferentes especies de *Sporothrix* con base en sus características morfofisiológicas.



**Figura 6.** Clave morfo-fisiológica para identificar a las especies del complejo *Sporothrix*. APD: agar papa dextrosa, AHM: agar harina de maíz. Tomada de Bastos de Lima Barros *et al.*, 2011.

## I.2.8 Estudios moleculares para la identificación de *S. schenckii*

*S. schenckii* ha sido identificado principalmente por sus características morfológicas, pero estos datos con frecuencia son insuficientes para diferenciar especies. Un factor limitante para la diferenciación de especies es la existencia de especies crípticas que morfológicamente son idénticas y sólo con el uso de otro tipo de datos se pueden diferenciar. Ante esta problemática, se ha recurrido al uso de otros caracteres como son: los fisiológicos, ecológicos y a partir de los años noventa el uso de datos moleculares (Marimon *et al.*, 2008, Watanabe *et al.*, 2004).

Entre los marcadores moleculares utilizados para el estudio de *S. schenckii* existen diferentes tipos dependiendo de la pregunta que se quiera resolver. Por ejemplo, para el diagnóstico de la esporotricosis, el análisis de la secuencia del gen que codifica para la quitina sintasa (gen que tiene una secuencia altamente conservada para cada especie), es una prueba considerada exitosa, ya que es posible detectar hasta 10 picogramos de DNA de *S. schenckii* en una muestra de paciente con esta enfermedad (Kano *et al.*, 2001). Procedimientos como la amplificación de las regiones espaciadoras de transcritos internos (internal transcribed spacers, ITS) de la subunidad 28S del rDNA, cuyo producto posteriormente es tratado con enzimas de restricción para analizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP), logran distinguir a *S. schenckii* de especies estrechamente relacionadas como *S. luriei*, *S. curviconia*, *S. inflata* y *Ophiostoma stenoceras*. Además evidencian la existencia de tipos dentro de la especie (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

Existen trabajos en donde se hace correlación entre caracteres morfológicos y moleculares; por ejemplo en el trabajo de O' Reilly *et al.* (2006), llevaron a cabo la identificación morfológica y de tipificación mediante análisis por macrorrestricción, utilizando el método de electroforesis en campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) de 70 aislamientos clínicos y ambientales en Australia. Las características morfológicas de los 70 aislados, permitieron esclarecer que dentro de los aislados ambientales también existen especies relacionadas con *S. schenckii* como *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum*. Todos los aislamientos presentaron conidios ovoides de origen simpodial con arreglo en flor. Basados en características como la presencia de peritecios, producción de melanina, conidios pigmentados, crecimiento a 35° C y la transformación a fase levaduriforme, los autores clasificaron a los aislados en 6 grupos. Un grupo particularmente interesante caracterizado por formar masas de conidios pigmentados y la transformación a fase levaduriforme, incluía únicamente a los aislados clínicos y ambientales obtenidos de las áreas de vivienda y trabajo de los pacientes. Los aislados clínicos mostraron un patrón de bandeo indistinguible al de los aislados ambientales provenientes de los lugares de trabajo y vivienda de los pacientes. Sin embargo; este patrón de bandeo fue diferente de acuerdo al origen. Por lo anterior, este método resulta ideal para estudios epidemiológicos. Este método también es muy eficiente para la diferenciación de *S. schenckii* de especies relacionadas como *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum*.

### I.3 Marcadores moleculares utilizados para reconstrucciones filogenéticas

Las reconstrucciones filogenéticas tienen como objetivos resolver las relaciones evolutivas entre organismos. Las filogenias con caracteres moleculares se construyen principalmente partiendo de secuencias de fragmentos de genes; estos son elegidos de acuerdo a la tasa de cambio que tengan, es indispensable que sean homólogos y se debe considerar el nivel jerárquico de las unidades taxonómicas operativas (UTOs) que se estudian (Wägele, 2004).

Además, es de suma importancia incluir más de un gen en el análisis, con la finalidad de corroborar las hipótesis filogenéticas que arroje cada gen. Una hipótesis filogenética realizada con más de un tipo de datos es más robusta que una filogenia hecha a partir de un gen, ya que en muchas ocasiones se obtiene la filogenia del gen más que la filogenia de la especie. Es por esto que el trabajo de Marimon *et al.* (2006) resultó relevante para resolver la taxonomía de *S. schenckii*, ya que los 3 fragmentos de genes utilizados (calmodulina,  $\beta$ -tubulina y quitina sintetasa) reflejaron los mismos agrupamientos en los árboles filogenéticos.

Las filogenias moleculares se fundamentan en la teoría de que los cambios de nucleótidos se acumulan de manera constante en el tiempo. En consecuencia, las diferencias entre nucleótidos que se obtienen al comparar secuencias de diferentes taxones aportan información sobre el tiempo transcurrido desde que estos evolucionaron a partir de un ancestro común (Hillis, 1994).

Existen estudios filogenéticos de *S. schenckii* utilizando genes ribosomales (Criseo & Romeo, 2010); sin embargo, el uso de rDNA tiene algunos problemas: se ha observado que las secuencias de rDNA carecen de suficiente variación informativa para hacer análisis filogenéticos a nivel de especie en hongos y se sabe que tiene regiones no ortólogas (O' Donnell *et al.*, 2000) por lo que se sugiere que las filogenias hechas con estas secuencias sean confrontadas con los resultados obtenidos con otro tipo de genes.

A continuación se mencionan dos trabajos en los cuales se confrontan genes ribosomales y genes codificantes:

Criseo & Romeo (2010), construyeron un dendrograma con el método de distancia UPGMA, partiendo de secuencias del dominio D1-D2 (28S rDNA) de un conjunto de aislados clínicos y ambientales identificados morfológicamente como *S. schenckii*. Sus resultados muestran la formación de dos grupos: uno exclusivo para aislados ambientales y el otro para clínicos. Al ingresar las secuencias al BLASTn, los aislados problema tuvieron porcentajes muy altos de similitud con las especies *Ophiostoma stenoceras*, *Endomyces scopularum* y *Ophiostoma nigrocarpum*. Al introducir las secuencias de estas especies en la construcción del dendrograma, los aislados ambientales se agruparon con

estas especies. Un año más tarde Romeo *et al.* (2011), publicaron un estudio con el mismo grupo de aislados, pero esta vez utilizando secuencias parciales del gen que codifica para la calmodulina; construyeron un dendrograma con el método de distancia Neighbor-Joining, en donde nuevamente se formaron dos grupos: uno que incluyó aislados clínicos y el segundo formado por dos subgrupos que incluía a los ambientales. La comparación de las secuencias problema en el BLASTn mostró que todos los aislados ambientales tuvieron porcentajes de similitud muy altos con la especie *S. pallida* (sinónimo de *S. albicans* y *S. nivea*). Al utilizar las secuencias de esta especie en la construcción del dendrograma quedaron dentro del grupo de aislados ambientales, por lo que se confirmó la identidad de las muestras ambientales como *S. pallida*. Con estos trabajos los autores verificaron que la calmodulina fue un mejor marcador molecular para resolver la identidad de las especies bajo estudio, e invitan a tener precaución al utilizar genes ribosomales ya que se puede incurrir en errores.

La filogenia del complejo *Gibberella fujikuroi* ha sido construida con múltiples genes; el rDNA 28S, ITS y cuatro genes codificantes para proteínas: calmodulina,  $\beta$ -tubulina, factor de elongación alfa (EF-1  $\alpha$ ), y la subunidad menor mitocondrial. Este estudio aporta varios aspectos importantes respecto al tipo de marcadores utilizados: los genes codificantes para proteínas son mejores que los genes de rDNA para resolver relaciones filogenéticas a nivel específico, sobre todo los genes codificantes para calmodulina y  $\beta$ -tubulina, que además mostraron concordancia. Estos genes contribuyeron con un 82% de las sinapomorfías (caracteres informativos) en el análisis combinado; en contraste, el rDNA 28S es una región altamente conservada y carece de variación informativa para la reconstrucción filogenética de este grupo (O' Donnell *et al.*, 2000).

La reciente caracterización de las nuevas especies de *Sporothrix* (Marimon *et al.* 2007) se llevó a cabo a través del análisis de la secuencia de los genes que codifican para tres proteínas: calmodulina,  $\beta$ -tubulina y quitina sintasa. El análisis mostró que los aislados se dividen en seis clados; cada uno correspondía a una especie filogenética putativa distinta. Sin embargo, del gen que codifica para la calmodulina se obtuvo el mayor número de regiones informativas para diferenciar entre especies filogenéticas, seguido por las secuencias del gen de la  $\beta$ -tubulina. Ante estos resultados Marimon *et al.* (2007), realizaron un estudio de aislados de *Sporothrix* provenientes de diferentes zonas geográficas estudiando las secuencias del gen de calmodulina y los datos fueron correlacionados con la morfología de los conidios sésiles; sus resultados los llevaron a proponer tres nuevas especies: *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. mexicana* (Marimon *et al.*, 2007; Marimon *et al.*, 2006).

En otro estudio (Madrid *et al.*, 2009) se incluyeron aislados de *Sporothrix* provenientes de Colombia, Guatemala y México, de los cuales se estudió la secuencia parcial del gen de

la calmodulina, con la finalidad de determinar la frecuencia de cada especie. Los autores concluyeron que *S. globosa* es una especie de distribución cosmopolita basados en sus resultados y los obtenidos por Marimon *et al.* (2007).

#### **I.4 Calmodulina como un marcador molecular**

La función de los genes no es tan importante para la reconstrucción filogenética, lo que importa más es la tasa de cambio o comportamiento del marcador, es decir que proporcione información filogenética. Sin embargo, la función puede estar directamente relacionada con la tasa de cambio como se ve a continuación.

La calmodulina es miembro de una familia de proteínas intracelulares de bajo peso molecular que actúan como mediadores en acciones biorregulatorias del calcio, para el cual posee cuatro dominios de unión. Tiene funciones altamente conservadas y una distribución ubicua en eucariontes, lo que la hace un marcador molecular ideal (Baba *et al.*, 1984).

La marcada conservación evolutiva de la calmodulina puede ser explicada al considerar la extraordinaria versatilidad funcional en la regulación de diversas actividades en las células eucariontes. Para ejecutar su papel regulador, la calmodulina une secuencialmente cuatro iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a sus dominios, lo que promueve cambios en su conformación. Esta proteína interactúa con un amplio conjunto de enzimas que incluyen la fosforilasa kinasa (PHK), la nucleótido cíclico fosfodiesterasa, la adenilato ciclasa, ATPasa, miosina cinasa, etc (Baba *et al.*, 1984).

#### **I.5 $\beta$ -tubulina como un marcador molecular**

La tubulina es el mayor componente de los microtúbulos, es un dímero formado por la  $\alpha$ -tubulina y la  $\beta$ -tubulina. Es un proteína esencial del cito-esqueleto debido a que participa en procesos como la mitosis, citocinesis, transporte de vesículas etc. Al igual que la calmodulina, la  $\beta$ -tubulina es una proteína muy conservada evolutivamente, esto se debe a la alta especificidad que se requiere para el ensamblaje y des-ensamblaje de la tubulina, además es una proteína que se encuentra en todos los eucariontes por lo que resulta un buen marcador molecular.

#### **I.6 Métodos de reconstrucción filogenética**

Además del planteamiento del problema taxonómico, de la elección del grupo de estudio (tanto grupo interno como externo) y del o los marcadores moleculares más adecuados, es muy importante definir bajo qué método de reconstrucción filogenética se realizará el

estudio. El resultado de una reconstrucción filogenética será un árbol en el que se reflejará la hipótesis de relaciones filogenéticas entre los taxa estudiados. Cada método filogenético se rige bajo distintos conceptos y principios, por lo que su elección debe ser congruente con nuestros objetivos.

Los diferentes métodos se pueden agrupar de acuerdo al tipo de datos que utilizan (como las matrices de distancia y los caracteres discretos) y al algoritmo con el que se aproximan: utilizando un algoritmo de agrupamiento que resulte en un árbol o utilizando un criterio de optimización para evaluar diferentes topologías de árbol (Vandamme, 2009).

### **I.6.1 Métodos de distancia**

Existen dos métodos de distancia: UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) y Neighbour-Joining. En ninguno se incluye el concepto de homología. La premisa de estos métodos es que la diferencia entre dos especies refleja el tiempo de divergencia y este tiempo se estima utilizando modelos evolutivos. (Wägele, 2005).

#### **I.6.1.1 UPGMA**

Es el método de reconstrucción filogenético de árboles más antiguo y simple. Con este método se comparan distancias entre taxa y esta comparación se hace por pares. El par más semejante es el primer grupo hermano que se agrega al dendrograma, a partir de esto se calcula una nueva matriz donde el par agregado al dendrograma se incluye como un solo taxón en la matriz y se une a un nuevo taxón terminal, y así de manera sucesiva. Este método requiere que las distancias genéticas sean proporcionales al tiempo de divergencia y sean ultramétricas (mismo reloj molecular) (Wägele, 2005).

#### **I.6.1.2 Neighbour-Joining**

Este método puede ser utilizado cuando las distancias no son ultramétricas. Para utilizar este método, primero se estiman las distancias evolutivas por par de taxa, se elige la distancia menor. Posteriormente el par de menor distancia se agrega al árbol estrella y se vuelven a calcular las distancias de ramas. En el árbol Neighbor Joining no hay grupo externo, las ramas no están sustentadas por caracteres sino por sus diferencias (Wägele, 2005).

### **I.6.2 Parsimonia**

Con este método se reconstruyen hipótesis filogenéticas a partir de caracteres homólogos. La homología es un tipo especial de similitud que resulta de los eventos de

cladogénesis, los caracteres homólogos que son aquellos compartidos por un ancestro y sus descendientes inmediatos (de Pinna, 1991; Nixon *et al.*, 2001).

El principio de parsimonia en cladística consiste en evaluar todas las observaciones de manera simultánea, aceptando las agrupaciones que minimicen las explicaciones innecesarias para éstas, en donde de dos hipótesis que proveen explicaciones igualmente válidas para un fenómeno, la más simple siempre será la preferida (“navaja de Ockham”). La finalidad de esta metodología es encontrar para un conjunto de secuencias alineadas, la topología del árbol con el menor número de cambios de caracteres. Se preferirá el árbol que requiera el menor número de cambios (Vandamme, 2009).

El criterio de optimización que utiliza la escuela cladista para inferir hipótesis filogenéticas, es el de corroboración-refutación, este criterio se vuelve más riguroso mientras más caracteres se incluyan de manera simultánea (Nixon *et al.*, 2001).

### **I.6.3 Máxima Verosimilitud (MV)**

Este método se basa en la probabilidad de observar los datos (secuencias) dada una hipótesis (un árbol) y un modelo evolutivo (sustitución de nucleótidos). El análisis de MV siempre se inicia buscando un modelo evolutivo para las secuencias. El árbol que resulta de un análisis bajo el criterio de MV es aquel que maximiza la probabilidad de los datos. El criterio de optimización para este método es el de probabilidad-verificación, por lo que se considera un método deductivo (Nixon *et al.*, 2001). Para cada árbol en particular el cálculo de la verosimilitud involucra la suma de todas los posibles estados de carácter diferentes en los nodos internos o ancestrales. (Vandamme, 2009).

### **I.6.4 Inferencia Bayesiana**

Este método a diferencia de parsimonia y MV, no pretende encontrar el árbol filogenético óptimo, sino que busca al conjunto de árboles o hipótesis posibles que mejor se ajusten a los datos. Esta metodología requiere que el investigador especifique una distribución previa, en cuanto a parámetros del modelo de sustitución, longitud de ramas y topologías de árbol. Con este previo (prior) se tendrá una guía de cómo es que debería resolverse la filogenia. Pero puede usarse un previo en donde se asuman todas las probabilidades con la finalidad de hacer más objetivo el análisis. Las probabilidades posteriores se obtienen explorando el universo de árboles con el método de muestreo llamado cadenas de Markov Monte Carlo, en donde se utiliza una hipótesis con los datos previos y se asignan parámetros al azar. Con esta información se busca la hipótesis que más se ajuste a estos nuevos parámetros y se calcula el radio de verosimilitud y el radio previo; si estos son mejores a los de la primera hipótesis, se toman como buenos los parámetros y las

nuevas hipótesis y se vuelven a comparar con otros generados con datos al azar y así sucesivamente hasta que ya no se encuentre más mejoría. Las mejores hipótesis serán presentadas en un árbol de consenso (Vandamme, 2009).

## **I.7 Esporotricosis**

### **I.7.1 Concepto de esporotricosis**

La esporotricosis es una micosis subcutánea de curso subagudo o crónico, que puede afectar a personas de cualquier género, edad y raza, así como a algunos animales (Bastos de Lima-Barros *et al.*, 2011; Crothers *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Schubach *et al.*, 2008). Esta enfermedad inicia después de que alguno de los miembros del complejo *Sporothrix* spp, entra en contacto con la dermis ó el tejido subcutáneo posterior a la inoculación traumática a través de la piel, con objetos contaminados con conidios de cualquiera de estos hongos. También existen reportes de transmisión zoonótica causada por el rasguño o mordedura de animales, principalmente gatos y armadillos (Conti-Díaz, 1989, López-Martínez *et al.*, 2004; Munguía-Pérez *et al.*, 2007) . Schubach *et al.* (2008) destacaron la transmisión por gatos, donde el 83.4% de los pacientes con esporotricosis estuvo en contacto con gatos infectados.

### **I.7.2 Epidemiología**

La esporotricosis es una micosis cosmopolita; la distribución geográfica del complejo *S. schenckii* sugiere una amplia adaptabilidad a condiciones de temperatura y humedad ambiental, aunque se ha aislado con mayor frecuencia en climas templados que tienen temperaturas de 20 a 25° C y con humedad relativa superior al 90%. La mayoría de los casos ocurre en personas que viven en regiones tropicales y subtropicales. Los países con mayor número de casos al año son México, Uruguay, Brasil y Venezuela. (Bonifaz, 2000; Schell, 1998).

La esporotricosis causada por *S. schenckii* (*sensu stricto*) es de distribución cosmopolita. La frecuencia y distribución de la esporotricosis causada por *S. globosa* y *S. brasiliensis* se empieza a conocer debido a su reciente caracterización. *S. globosa* es una especie cosmopolita que ha sido aislada de: España, Reino Unido, Japón, Italia, India, Estados Unidos (Marimon *et al.*, 2007), México (1 aislamiento), Colombia, Guatemala (Madrid, 2009) y Brasil (de Oliveira *et al.*, 2010). *S. brasiliensis* es una especie aislada exclusivamente de casos en Brasil (Marimon *et al.*, 2007). La especie *S. mexicana* como causante de esporotricosis solo ha sido reportada en Portugal (Marques-Dias *et al.*, 2011).

### **I.7.2.1 Epidemiología en México**

En México se considera como la micosis subcutánea más frecuente y afecta principalmente a dos regiones de la República Mexicana: la zona occidente (Nayarit y Jalisco) y la zona centro (D.F., Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala) (Bonifaz, 2000). Se manifiesta con mayor frecuencia al finalizar la temporada de lluvias, a finales de otoño y principios de invierno; se considera que en esos periodos se tienen las mejores condiciones para el desarrollo del complejo *S. schenckii* (Arvizu-Ramírez *et al.*, 2010). Los datos de morbilidad de acuerdo a los casos clínicos registrados en centros dermatológicos y al número de consultas por año, difieren en los países y regiones de Latinoamérica. México tiene una tasa de morbilidad entre 0.1 al 0.5%. (Bonifaz, 2000; Munguía-Pérez *et al.*, 2007).

Los hongos del complejo *S. schenckii* habitualmente viven en el suelo y en vegetales, hábitat en que estos hongos desarrollan su forma micelial que constituye la fase infectante. Por lo tanto, los sujetos que tienen mayor contacto con el hongo y en consecuencia tienen mayor riesgo de contraer esta infección, son los agricultores, floricultores, jardineros, granjeros, floristas, cazadores de armadillos y amas de casa que trabajan su jardín; es por esto que la esporotricosis se considera como una micosis ocupacional (Bonifaz, 2000; De Meyer *et al.*, 2008). En México se ha observado una frecuencia de esporotricosis infantil del 33 al 55% de los casos; esto se relaciona con las actividades de juego de los niños, principalmente de los que habitan en ambientes rurales (García *et al.*, 2008, Padilla-Desgarenes *et al.*, 2004). Esto corresponde con los estudios que confirman que las hormonas no tienen influencia en el desarrollo de esta micosis, a diferencia de lo que ocurre en otras micosis (Belknap, 1989), por lo que la frecuencia con que se presenta en hombres y mujeres se relaciona directamente con la actividad que estos desarrollen.

Debido a que *Sporothrix schenckii* es un hongo que en su fase micelial vive como saprobio en la naturaleza, se han realizado estudios epidemiológicos a partir de fuentes ambientales; sin embargo, la existencia de especies fúngicas con morfología similar y que no provocan lesiones esporotricósicas ha disminuido la eficiencia de este método de estudio epidemiológico (Conti-Díaz, 1989).

### **I.7.3 Fisiopatogenia**

Algunos glicopéptidos que forman parte de la pared celular de *S. schenckii*, resultan moléculas indispensables para la interacción huésped-parásito. Las peptidoramnomanas son los antígenos que desencadenan la respuesta inmune de tipo celular en el huésped, entre otros componentes. Después de la presentación antigénica se desencadena una respuesta celular linfocítica de tipo TH1 que clínicamente

corresponde con una lesión inicial denominada chanco esporotricósico (López-Romero *et al.*, 2011; Saúl & Bonifaz, 2011).

Otros componentes de la pared celular actúan como adhesinas e inductores inmunogénicos, tal es el caso de la glicoproteína de 70 kDa, que además se considera específica de *S. schenckii*, por lo que se ha pensado en su potencial para realizar inmunodiagnóstico. Las adhesinas tiene un papel muy importante en las infecciones de tipo sistémico, ya que ayudan al hongo en la invasión de nuevos tejidos (Lopes-Bezerra, 2011; López-Romero *et al.* 2011).

Entre los factores de virulencia de *S. schenckii*, se encuentra su capacidad para producir melanina principalmente por la vía 1-8 dihidroxinaftaleno, aunque también puede sintetizarse a partir de la vía L-DOPA. Se ha demostrado que los aislados que tienen la capacidad de producir más melanina son más virulentos (López-Romero *et al.* 2011).

#### **I.7.4 Manifestaciones clínicas**

Existen diversas clasificaciones clínicas de la esporotricosis; algunas se basan en el aspecto clínico, otras en la vía de infección con *S. schenckii* y otras de acuerdo a los órganos afectados (Rippon, 1990). En la **Tabla 2** se muestra una clasificación de las formas clínicas de la esporotricosis descrita por Bastos de Lima-Barros *et al.* (2011), complementada con datos de Arenas (2010).

Saúl y Bonifaz, 2011, publicaron una clasificación de la esporotricosis de acuerdo al comportamiento inmunológico del huésped, donde explican que el polimorfismo en las formas clínicas se debe a los diferentes tipos de respuesta inmune que presenta el paciente y están directamente relacionadas con el grado de exposición al o los agentes etiológicos y la calidad de la respuesta inmunológica. Ellos reconocen dos grupos: 1) el primero hiperérgico-normérgico, que incluye a todos los pacientes con una respuesta inmune normal al antígeno intradérmico o esporotricina M y en cuyos tejidos hay muy poca cantidad de formas parasitarias; en este grupo se incluye a las variedades clínicas más frecuentes como la cutánea linfangítica y la cutánea fija. 2) El hipoérgico-normérgico que tiene baja o nula respuesta al antígeno intradérmico y presencia de levaduras; incluye las formas clínicas menos frecuentes y con comportamiento oportunista como son la cutánea diseminada, cutánea superficial, osteoarticular, pulmonar y visceral.

La mayoría de los estudiosos de la esporotricosis consideran que la forma clínica que se presenta depende de la respuesta inmune del paciente (Rippon, 1990; Saúl y Bonifaz 2011). Sin embargo, existen estudios en donde se relaciona la forma clínica con el genoma del patógeno. Un estudio reciente analizó los aislamientos clínicos de pacientes con esporotricosis diseminada, linfangítica y fija, así como su relación entre el genotipo y

la virulencia: Por RAPD los autores observaron un patrón diferente de bandeo entre los aislados de las diversas formas clínicas; además la virulencia se relacionó con el genotipo. Los aislados de *S. schenckii* correspondientes a esporotricosis diseminada, mostraron mayor virulencia en ratones, seguida por los aislados causantes de esporotricosis linfocutánea. Finalmente los aislados de lesiones fijas causaron menor grado de infección (Kong *et al.*, 2006). En otro trabajo realizado por Arrillaga-Moncrieff *et al.* (2009), con la finalidad de observar si existe diferente grado de virulencia entre las distintas especies del complejo *S. schenckii*, se realizaron pruebas inoculando dos concentraciones distintas de conidios de *S. schenckii*, *S. albicans*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* y *S. mexicana* en ratones inmunocompetentes. Concluyeron que las especies *S. brasiliensis* y *S. schenckii* son las más virulentas, ya que todos los ratones inoculados con la concentración más alta de conidios murieron, e histológicamente presentaron más órganos afectados y regiones necróticas, a diferencia de los ratones infectados con otras especies.

**Tabla 2.** Clasificación clínica de la Esporotricosis. Tomado y modificado de Bastos de Lima-Barros *et al.* (2011), complementada con datos de Arenas (2010).

Forma clínica	Tipos	Vía de entrada	Manifestaciones clínicas	Frecuencia	Regiones afectadas
Formas cutáneas	Fija	Ruptura de la piel con objetos contaminados con conidios de <i>Sporothrix</i>	Lesión única de tipo vegetativa, verrugosa, placa, infiltrado o nodular.	Representa el 20-30% de los casos. Forma clínica más frecuente en niños.	Cara, cuello y tronco.
	Linfática		Inicia como un nódulo indoloro, rojo púrpura, que puede ulcerarse (chancro de inoculación), a partir del cual se forman nódulos que siguen el trayecto de los vasos linfáticos.	75% de los casos.	Inicia con mayor frecuencia en manos, antebrazos, cara, pies piernas y tronco.
	Diseminada	Diseminación vía hematógena, a partir de una lesión en piel.	Múltiples lesiones en la piel en sitios no contiguos, no involucra sitios extracutáneos.	Poco frecuente, asociado a inmunosupresión.	Afección de varias áreas del tegumento.
Forma mucosa		Auto-inoculación con manos contaminadas, diseminación hematógena o inhalación de conidios.	Mucosa nasal: involucra al septo, hay drenaje de sangre y secreciones, costras. Conjuntiva- enrojecimiento, descarga seropurulenta, y edema o no en párpados.	Es excepcional.	Mucosa nasal, conjuntiva ocular.
Formas extra-cutáneas	Osteoarticular	Diseminación hematógena	Hay tenosinovitis, periostitis y osteólisis.	Es excepcional	Rodillas, articulaciones interfalángicas, codos, metatarsianos y metacarpianos.
	Pulmonar primaria	Inhalación del hongo.	Tos productiva, con o sin hemoptisis, fiebre y pérdida de peso.	Es excepcional	Pulmones
	Sistémica	Diseminación hematógena	De foco pulmonar afectación de otros órganos internos y puede haber fungemia.	Pocos casos, asociados con factores de inmunosupresión (SIDA).	SNC, tubo digestivo, hígado, aparato genitourinario, miocardio, riñones y testículos.

### I.7.5 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la esporotricosis cutánea, el primer paso es la observación de las lesiones, pero debido a que existen otras enfermedades que tienen semejanza, es indispensable realizar el diagnóstico diferencial con otras patologías. Las lesiones de la esporotricosis linfocutánea son semejantes a algunas formas de leishmaniasis, paracoccidioidomicosis, cromoblastomicosis, blastomicosis, tuberculosis, pioderma bacteriano, absceso subcutáneo, tularemia y sífilis primaria. La esporotricosis fija puede confundirse con lesiones de pioderma gangrenoso (Rippon, 1990). Por lo tanto, es necesario confirmar o descartar el diagnóstico de esporotricosis con ayuda de diversos estudios de laboratorio.

La búsqueda de estructuras fúngicas en un examen directo o frotis hecho a partir del material purulento de la lesión, es un paso importante en el diagnóstico; algunas veces es posible observar levaduras. Este procedimiento diagnóstico tiene un porcentaje de éxito que varía entre 20 y 90%, debido a que la cantidad de estructuras fúngicas que se encuentran embebidas en la muestra suelen ser muy escasas y no siempre se sigue una metodología adecuada (Da Rosa *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2004; Espinosa-Taxis *et al.*, 2001).

Otro procedimiento útil es la obtención de tejido (biopsia), para su posterior estudio histopatológico en el que generalmente se observa una reacción inflamatoria granulomatosa y piógena, asociada a infiltrado de neutrófilos, algunas células plasmáticas y linfocitos. En la epidermis se observa hiperplasia pseudoepiteliomatosa. El hallazgo de estructuras fúngicas es muy poco frecuente, debido a la escasez de este en las muestras de tejido, aunque existen técnicas como la inmunofluorescencia que ayudan a detectar al hongo. Las levaduras que se observan pueden tener forma redonda, ovoide, alargada, cilíndrica (forma de "cigarro"); en el caso de la esporotricosis linfocutánea se pueden observar cuerpos asteroides (Rippon, 1990) que son estructuras constituidas por una levadura central rodeada de proyecciones radiadas que corresponden a restos de membranas de polimorfonucleares (Hiruma *et al.*, 1991). En el estudio de Novales *et al.* (1995) se demostró que realizando un mayor número de cortes en el bloque de tejido, mejora el resultado en la observación de la estructura parasitaria.

El recurso más confiable y eficaz para el diagnóstico de la esporotricosis sigue siendo el cultivo (López-Martínez *et al.*, 2004). Éste se realiza a partir de cualquiera de los especímenes biológicos dependiendo de la forma clínica de la enfermedad y los medios de cultivo más utilizados para obtener la fase micelial son agar dextrosa Sabouraud con o sin antibióticos. Los cultivos brindan aproximadamente el 95.2% de los diagnósticos (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

La intradermorreacción (IDR) con esporotricina metabólica o de la fase filamentosa, es un procedimiento que se puede emplear como apoyo para el diagnóstico en presencia de lesiones sugestivas de la esporotricosis fija y linfocutánea; a las 48 horas de su aplicación se observará una induración mayor a 5 mm si existe infección con *S. schenckii*. Una IDR negativa no significa necesariamente ausencia de infección; puede corresponder a una anergia inmunológica como sucede en los casos de inmunodepresión severa asociada a esporotricosis (Lavalle-Aguilar & Padilla-Desgarenes, 2000).

### **I.7.6 Tratamiento**

En México, el yoduro de potasio (KI) sigue siendo el tratamiento de elección por su alta eficacia, escasos efectos secundarios y su bajo costo. La dosis recomendada para adultos es de 3 a 6 g/día y para niños es de 1 a 3 g/día (Venadero-Albarrán *et al.*, 2010).

El KI está contraindicado en pacientes con sensibilidad conocida al producto, en nefrópatas, cardiópata y en pacientes con enfermedad tiroidea. En estos casos se puede utilizar azoles y alilaminas, como el itraconazol a dosis de 200 mg/día, el fluconazol 100-400 mg/día y la terbinafina 250 mg 2 veces al día. El KI no debe administrarse durante el embarazo y la lactancia (Torres-Mendoza *et al.*, 1997; Venadero-Albarrán *et al.*, 2010).

Debido a que el KI funciona únicamente si el sistema inmune del paciente es competente, ya que interactúa con este para lograr una mejor respuesta, en pacientes inmunosuprimidos no tiene ningún efecto. Para este tipo de pacientes con infecciones sistémicas, el tratamiento de elección es la anfotericina B que por su alto grado de toxicidad debe ser administrada intrahospitalariamente y bajo estricta vigilancia; estudios actuales (Marimon *et al.*, 2008) sugieren que en infecciones sistémicas el posaconazol es una droga que podría dar buenos resultados.

Se han realizado estudios (Marimon *et al.*, 2008) de sensibilidad ante diferentes antifúngicos para las distintas especies que conforman el complejo *Sporothrix schenckii* y se ha observado que los antifúngicos que muestran mejor actividad son la terbinafina, el ketoconazol y la anfotericina B; los medicamentos que tienen menor actividad son el fluconazol, la caspofungina y el voriconazol.

Para *S. mexicana* y *S. albicans* el ketoconazol es el antifúngico que tiene menor actividad, sin embargo es el segundo con mejor actividad contra las otras especies del complejo después de la terbinafina. *S. mexicana* es la especie contra la que menos actividad muestran los antifúngicos; la mejor respuesta se obtiene con la terbinafina (Marimon *et al.*, 2008).

Las especies *S. albicans* y *S. luriei* muestran resistencia al itraconazol y resistencia cruzada con todos los demás azoles, no obstante, *S. schenckii* s.s. es sensible al itraconazol (Marimon *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011).

## II. HIPÓTESIS

La variabilidad morfológica que se observa en los aislados de casos de esporotricosis en México, estará asociada a diferentes especies filogenéticas de *Sporothrix*.

## III. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar la frecuencia de las especies *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix schenckii* en un universo de 74 aislados de pacientes mexicanos con diagnóstico de esporotricosis.

### Objetivos particulares

- Analizar filogenéticamente bajo el criterio de parsimonia las secuencias de los genes de la calmodulina y  $\beta$ -tubulina de *Sporothrix* obtenidas a partir de pacientes mexicanos.
- Determinar si las diferencias morfológicas observadas en los aislados incluidos en este estudio corresponden al mismo o diferentes linajes.

## IV. METODOLOGÍA

Se estudió un total de 74 aislados clínicos de pacientes mexicanos con diagnóstico de esporotricosis, proporcionados por diferentes instituciones educativas y de salud. Se incluyeron: 17 aislados provenientes del Servicio de Dermatología del Hospital General de México (SS); 16 de la Universidad de San Luis Potosí; 25 de la Micoteca del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE); 1 de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca; 2 del Centro Médico Nacional; 1 de la Universidad de Veracruz; 8 del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”; 3 de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 1 del Centro Dermatológico de Occidente, Jalisco. Además se incluyó una cepa ATCC (201681) correspondiente a un aislado de un paciente brasileño diabético con esporotricosis diseminada. En las **Tablas 3 a 6** se encuentran los datos epidemiológicos correspondientes a los aislados estudiados en este trabajo.

Antes de iniciar el estudio se verificó la pureza de los aislados recibidos y en el caso de estar contaminados (generalmente con bacterias), fueron cultivados en medio líquido adicionado con cloranfenicol y gentamicina.

### IV.1 Cultivo Monospórico

De cada uno de los aislados incluidos en este estudio se realizó un cultivo monospórico, por el método de dilución y aislamiento por estría, de acuerdo al siguiente procedimiento:

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

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

Las placas se mantuvieron a TA y se revisaron a las 48 y 72 horas, tiempo en que se observaron las primeras colonias; de éstas se eligió una colonia para ser resembrada de manera masiva en ADS en tubo. Este cultivo se utilizó para realizar los subcultivos necesarios para el estudio morfológico y molecular y para conservar las cepas en viales de 20 mL con solución salina estéril.

**Tabla 3.** Datos de los aislados clínicos provenientes del Hospital General de México (México D.F.).

Nº. de aislado *(núm. original)	Datos del paciente				Esporotricosis		Tratamiento	
	Ciudad de origen	Edad en años	Sexo	Ocupación	Tipo de esporotricosis	Tiempo de evolución	Medicamento prescrito	Resultado
1 (1)	Oaxaca	33	M	Campesino	Linfagítica	4 meses	KI	Curación
2 (2)	Puebla	38	M	Campesino	Fija	1 año	KI	Curación
3 (4)	Tlaxcala	23	F	Hogar	Fija	9 meses	KI	Curación
4 (5)	D.F.	25	M	Obrero	Linfagítica	3 meses	KI	Curación
5 (6)	Michoacán	43	M	Campesino	Linfagítica	2 meses	KI	Curación
6 (7)	Puebla	68	F	Hogar	Linfagítica	6 meses	Itraconazol	Mejoría (No acudió más)
7 (8)	Hidalgo	55	M	Campesino	Linfagítica	8 meses	KI	Curación
8 (9)	Puebla	34	M	Hogar, campesina	Linfagítica	6 meses	KI	Curación
9 (10)	Veracruz	8	F	Escolar	Fija	3 meses	Termoterapia	Curación
10 (11)	Puebla	33	M	Campesino, floricultor	Linfagítica	5 meses	KI	Curación
11 (12)	Michoacán	48	M	Agricultor	Hematógena	10 meses	Anfotericina B, Itraconazol	Muerte
12 (13)	Veracruz	19	F	Hogar y campesina	Linfagítica	3 meses	Itraconazol	Curación
13 (14)	Edo de México	72	M	Campesino	Linfagítica	8 meses	KI + Itraconazol	Curación
14 16 (785/90)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
15 18 (24/05)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
16 (20)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
17 (21)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD

\*Número de la colección de origen. SD: sin datos. KI: yoduro de potasio.

**Tabla 4.** Datos de los aislados clínicos provenientes de la Universidad de San Luis Potosí.

Nº. de aislado *(núm. original)	Datos del paciente				Esporotricosis		Tratamiento	
	Ciudad de origen	Edad en años	Sexo	Ocupación	Tipo de esporotricosis	Tiempo de evolución	Medicamento prescrito	Resultado
18 (R01)	Villa de Reyes SLP	SD	F	Obrera	Linfangítica	SD	KI	Curación
19 (R02)	Ciudad de San Luis Potosi	SD	F	Artesanía paja	Hematógena diseminada	2 meses	SD	SD
20 (R03)	Sta María del Río SLP	SD	F	Ama de casa	Lifangítica	SD	KI	SD
21 (R04)	Villa de Arriaga SLP	44	M	Jornalero	Linfangítica	SD	KI	SD
22 (R05)	Mexquitic de Carmona SLP	9	M	Estudiante	Linfangítica	SD	KI	SD
23 (R06)	Michoacán	77	F	Ama de casa	Linfangítica	SD	KI	SD
24 (R07)	Pino Suárez Zacatecas	14	M	Estudiante	desconocida	SD	KI	SD
25 (R08)	Villa de Arriaga SLP	18	M	Estudiante/ Jornalero	Linfangítica	SD	KI	SD
26 (R09)	Ojuelos, Jalisco	77	M	Jornalero/ Peluquero	Linfagítica	1 año	KI	SD
27 (R10)	Laguna de San Vicente, Villa de Reyes SLP	75	F	Ama de casa	Linfangítica	SD	KI	SD
28 (R11)	Xilitla SLP	61	M	Campesino	Fija (brazo)	SD	KI	SD
29 (R12)	Xilitla SLP	54	M	Jornalero	Linfangítica	SD	KI	SD
30 (R13)	Cerritos SLP	72	F	Ama de casa	Linfangítica	SD	KI	SD
31 (R14)	Ojuelos , Jalisco	38	M	Comerciant e/ agricultor	Cutánea verrucosa (frente y párpado)	Mes y medio	SD	SD
32 1843)	Sta Maria del Río	49	M	Jornalero	Linfangítica miembro superior	6 meses	SD	SD
33 1796)	Sierra Nueva	36	M	Chofer	Linfangítica ascendente, miembro superior	4 meses	SD	SD

\*Número de la colección de origen. SD- sin datos. KI- yoduro de potasio.

**Tabla 5.** Datos de los aislados clínicos provenientes de la Micoteca del InDRE.

Nº. de aislado *(número original)	Ciudad de origen	Sexo	Tipo de esporotricosis
34 (6004)	Aguascalientes	M	Linfangítica
35 (6006)	Edo. México	F	Fija
36 (6007)	Guanajuato	M	Linfangítica
37 (6010)	Oaxaca	F	Linfangítica
38 (6015)	Edo. México	M	Linfangítica- Hematógena
39 (6016)	Guerrero	M	Linfangítica
40 (6017)	Hidalgo	M	Linfangítica
41 (6018)	Edo. México	M	Linfangítica
42 (6024)	Veracruz	F	Fija
43 (6025)	Guanajuato	F	Linfangítica
44 (6027)	Veracruz	F	Linfangítica
45 (6029)	Distrito Federal	M	Fija
46 (6036)	Distrito Federal	F	Linfangítica
47 (6039)	Edo. México	M	Linfangítica- hematógena
48 (6040)	Edo. México	F	Fija
49 (6041)	Veracruz	M	Linfangítica
50 (6042)	Querétaro	F	Linfangítica
51 (6044)	Guanajuato	F	Linfangítica
52 (6045)	Puebla	M	Linfangítica
53 (6046)	SD	SD	SD
54 (6047)	Puebla	M	Linfangítica
55 (6048)	Puebla	M	Linfangítica
56 (6050)	Veracruz	F	Linfangítica
57 (195)	SD	SD	SD
58 (12305)	Guanajuato	M	Linfangítica

\*Número de la colección de origen. Se omitieron datos desconocidos.

**Tabla 6.** Datos de aislados clínicos de origen diverso: Universidad Autónoma Benito Juárez (1 aislado), Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS (2 aislados), Universidad de Veracruz (1), Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua (8), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (3), y Centro dermatológico occidente: Jalisco (1).

Nº. de aislado * (núm. original)	Datos del paciente				Esporotricosis		Tratamiento	
	Ciudad de origen	Edad en años	Sexo	Ocupación	Tipo de esporotricosis	Tiempo de evolución	Medicamento prescrito	Resultado
59 (Jaime)	Tlacocoahuaya, Oaxaca	45	M	Campesino (cultivo y venta de ajos)	Linfangítica	3 años	No aceptó tratamiento con KI o Itraconazol (por alcoholismo)	SD
60 (274-101)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
61 (899-98)	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
62 VCR	Municipio Chichiquila Puebla	10 años	M	SD	Linfangítica	45 días	KI	curación
63 (774-00)	Aguascalientes	56	M	SD	Linfangítica	2 meses	SD	SD
64 (978-98)	Puebla	21	M	SD	Linfangítica	5 meses	SD	SD
65 (489-03)	Oaxaca	7	M	SD	Linfangítica	2 años	SD	SD
66 (577-94)	Edo México	4	M	SD	Linfangítica	7 meses	SD	SD
67 (1151-97)	Edo. México	65	F	SD	Linfangítica	3 meses 10 días	SD	SD
68 (827-99)	Veracruz	74	F	SD	Linfangítica	3 meses	SD	SD
69 (78-90)	Veracruz	10	M	SD	Linfangítica	1 años	SD	SD
70 (947-97)	Hidalgo	37	M	SD	Linfangítica	45 días	SD	SD
71 M (307)	Puebla	27	F	Campesino	Linfangítica	5 años	SD	SD
72 S (308)	Puebla	17	M	Campesino/Estudiante	Linfangítica	20 días	SD	SD
73 Z (400)	Puebla	25	F	Estudiante	Linfangítica	6 meses	SD	SD
74 Dr. Tarango	Ciudad Guzmán Jalisco	60	M	campesino	Diseminada sistémica	8 meses	AmB e Itraconazol	90% de mejoría

\*Número de la colección de origen. AmB- Anfotericina B. KI- yoduro de potasio. SD-sin datos.

## **IV.2 Estudio molecular**

Para el estudio molecular se utilizaron secuencias parciales de los genes que codifican para la calmodulina y  $\beta$ -tubulina. Pues se ha observado que tienen múltiples regiones parsimoniosamente informativas empleadas en la resolución de filogenias a nivel específico (O'Donnell et al., 2000; Marimon et al., 2007).

### **IV.2.1 Extracción y purificación del DNA**

Para este procedimiento se utilizó la metodología propuesta por Blin & Stafford (1976), el cual consistió en inocular 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud (MLS) con una suspensión de conidios preparada a partir de un sub-cultivo. Los cultivos fueron incubados a 26 °C, a 110 rpm durante 4-7 días. Una vez que se observó suficiente crecimiento, se separó la masa fúngica mediante centrifugación y se secó con papel filtro estéril.

Para romper la pared celular, la masa fúngica fue macerada en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido. El polvo obtenido fue transferido a un tubo de 1.5 mL y se trató con buffer de lisis y proteinasa K (Invitrogen), con la finalidad de digerir los componentes proteicos; la mezcla fue incubada a 65°C durante 1 hora. Posteriormente se adicionó un volumen fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25-24-1), se agitó vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea con aspecto lechoso; se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo, donde se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol al 100%. Esta mezcla fue agitada por inversión suave y una vez que ocurrió la precipitación del DNA, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos; se decantó el sobrenadante y el sedimento fue lavado con etanol al 70%, para después centrifugar por 5 minutos; se decantó el sobrenadante y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad. Una vez seco, se agregó un volumen de agua milli-Q estéril proporcional a la cantidad de DNA obtenido y se adicionaron 2  $\mu$ L de una solución de 100 mg/mL de RNAasa incubándose a 37°C por una hora.

### **IV.2.2 Cuantificación y visualización de DNA**

Para conocer la concentración de DNA obtenido en el proceso de extracción, se realizaron diluciones 1:500 de cada una de las muestras, por duplicado. Se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway, Genova), a 260 y 280 nanómetros para determinar la concentración de ADN en  $\mu$ g/ $\mu$ L de acuerdo a la siguiente fórmula:

### **IV.2.3 Lectura a 260 nm x Factor de dilución (500) x 50/ 1000**

Para verificar la calidad del DNA se depositaron 3  $\mu$ L de DNA con 1.6  $\mu$ L de buffer de carga y 5.4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, en un gel de agarosa al 0.8 %, teñido con bromuro de etidio; dependiendo

del tamaño del gel, se aplicó un voltaje entre 70 volts y 90 volts, aproximadamente durante 40-70 minutos. Por cada gel se incluyó un pozo con el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ Hind III Fragments. Una vez concluida la migración, el gel se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta UVP (Jenway Genova).

#### IV.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar un fragmento del gen que codifica para la calmodulina, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos 5' CL1- GA(AG) T(AT) CAA GGA GGC CTT CTC 3' y CL2A- 5' TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC- 3' (Marimon *et al.*, 2006). Un segundo gen amplificado fue el que corresponde a la  $\beta$ -tubulina utilizando los oligonucleótidos Bt2A 5' GGY AAC CAR ATH GGT GCY GCY TTC 3' y BT2B 5' ACC TCR GTG TAG TGA CCC TTG GC 3' (Marimon *et al.*, 2006).

Como mezcla de reacción se utilizó el PyroStart Fast PCR Master Mix (2X) kit (Fermentas). Para un volumen de reacción de 20  $\mu$ L, la mezcla contenía:

**Tabla 7.** Mezcla de reacción con kit PyroStart Fast PCR Master Mix (2X).

Componentes de reacción	Cantidad ( $\mu$ L)	Concentración final
Mix PCR Pyro Start	10	.5
CL1/Bt2A 10 $\mu$ M	2	1 $\mu$ M
CL2A/Bt2B 10 $\mu$ M	2	1 $\mu$ M
DNA 10ng	4	2 ng
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	2	

Posteriormente, para la amplificación se siguieron las condiciones de temperatura y tiempos propuestas por Marimon *et al.*, 2006:

Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos

Treinta ciclos con los siguientes tiempos y temperaturas:

Desnaturalización 95 °C por 30 segundos

Hibridación 60 °C por 1 minuto

Extensión 72 °C por 1 minuto

Un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 minutos

#### **IV.2.5 Visualización del producto de PCR**

De los productos amplificados, 3  $\mu$ L fueron depositados en un gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio y corridos en Buffer TAE 1X a 70 volts durante 50 minutos. Posteriormente fueron visualizados en un transiluminador.

#### **IV.2.6 Purificación del producto de PCR**

Para eliminar las impurezas de la mezcla, se realizó el protocolo de purificación con el QIAquick PCR Purification Kit (250) de QIAGEN.

### **IV.3 Secuenciación**

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. En este laboratorio el producto fue secuenciado utilizando el Big Dye Terminator Cycling Sequencing Ready Reaction v 3.1 kit (Murphy *et al.*, 2005) y estos fueron secuenciados con el equipo Applied Biosystems 3100 de 16 capilares.

### **IV.4 Análisis de las secuencias**

Antes de iniciar con el análisis de las secuencias, se verificó la calidad de éstas con el programa de prueba Sequencher 5.0.1 Demo, solo las secuencias que tuvieron más de un 70% de calidad fueron incluidas en el análisis.

#### **IV.4.1 Alineamiento**

Utilizando el programa BioEdit v7.1.3, las secuencias se pasaron a formato FASTA y se pegaron en un block de notas, junto con las secuencias de los aislados tipo de la colección CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal biodiversity center) y otros aislados de referencia, para las especies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S.globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* y *S. luriei*.

El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), incluido software MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008). Una vez que se obtuvo el alineamiento, se corroboró visualmente y en caso necesario se editaron las secuencias: confirmación de bases nucleotídicas dudosas, inserción de nucleótidos en sitios no detectados por el secuenciador, corte de los extremos para tener secuencias de una misma longitud. Por otro lado, las secuencias se ingresaron al programa G-blocks (Talavera & Castresana, 2007) con la finalidad de recuperar solo los fragmentos más informativos del alineamiento. El alineamiento completo y el alineamiento en bloques se sometieron al análisis filogenético.

## **IV.5 Análisis Filogenético**

Se realizó un análisis de Parsimonia utilizando el programa TNT (Tree analysis using New Technology, Goloboff *et al.*, 2008). Las secuencias ya alineadas se ingresaron en formato Nexus Tomando en cuenta el número de taxa, el método de búsqueda del árbol más parsimonioso más adecuado, fue una búsqueda heurística con adición de 100 secuencias al azar (“Random Addition Sequences”) seguida por el intercambio de ramas con TBR (Tree Bisection and Reconnection), guardando 10 árboles por cada replicación. Se asignó como grupo externo a la especie *S. albicans*, pues en trabajos previos se ha demostrado que es una especie distinta a *S. schenckii* pero cercanamente relacionada. Se registró el número de árboles más parsimoniosos encontrados y el número de pasos.

Se realizó el cálculo de los índices de consistencia (IC) y de retención (IR), con la finalidad de evaluar la homoplasia, presente en los árboles.

El soporte de los clados fue evaluado por el método de Bootstrap, utilizando 1000 matrices re-muestreadas con 100 RAS+TBR, guardando un árbol durante el intercambio. Sólo se consideraron valores superiores al 70%. También se hizo un árbol de consenso de mayoría.

### **IV.5.1 Edición del árbol**

Uno de los árboles más parsimoniosos y el árbol de consenso se exportaron en formato nexus, para ser editados con el programa FigTree (Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3.1, 2006-2009, Andrew Rambaut, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh), en el que se modificó el formato del árbol para fines de su presentación en este documento.

## **IV.6 Estudio morfológico**

### **IV.6.1 Estudio morfológico macroscópico de la fase micelial**

A partir del cultivo monospórico, se realizó una resiembra en medio Gorodkova o Agar Avena Sales, la cual fue incubada a 28°C de 5 a 7 días; cuando se observó suficiente crecimiento, se preparó una suspensión que se llevó a una concentración de 10<sup>5</sup> conidios/mL. Se inocularon 3 µL de esta suspensión en el centro de una placa de Agar Papa Dextrosa (APD) y una placa de Agar Harina de Maíz (AHM) por cada aislado; se incubaron por 21 días a 30° C, en condiciones de obscuridad. A los 21 días se midió el diámetro de cada colonia y se registraron las siguientes características: aspecto (glabro, aterciopelado, veloso, pulverulento, membranoso, húmedo), pigmento (la pigmentación de las colonias fue comparada con un catálogo de color “PANTONE”), superficie (lisa, cerebriforme, con elevación central, umbilicada, con pliegues radiales, etc). Se realizó un registro de imágenes en el Laboratorio de Fotografía, del Instituto de Biología de la UNAM.

#### **IV.6.2 Estudio morfológico microscópico de la fase micelial**

Se realizaron microcultivos en AHM y APD, siguiendo la técnica tradicional de microcultivo en portaobjetos (López-Martínez *et al.*, 2004) con algunas modificaciones. Esta técnica consistió en cortar cubos de AHM y APD de aproximadamente 5 mm por lado; se colocó el cubo sobre el agar y se depositaron 3  $\mu$ L de la suspensión de  $10^5$  conidios/mL en los cuatro lados superiores. Posteriormente se colocó un portaobjetos estéril sobre el medio inoculado. Estos microcultivos fueron incubados a 30°C por 14 días, en condiciones de oscuridad.

Los cubreobjetos resultantes fueron colocados sobre un portaobjetos que contenía un gota de lactofenol y se observaron con un microscopio óptico, utilizando los objetivos de 40x y 100x. Se registraron las siguientes características: forma, tamaño y pigmentación de los conidios que emergen directamente de las hifas, forma, tamaño y pigmentación de los conidios simpodiales y tamaño del conidióforo, disposición del micelio fértil (agregados de hifas o hifas aisladas). Se observaron 10 campos al azar y se anotó el predominio de las características previamente mencionadas para cada aislado. Se realizó registro fotográfico (Laboratorio de Micología Médica).y de datos de los microcultivos hechos con AHM por ser los que mostraron más datos morfológicos.

#### **IV.6.3 Reversión a la fase levaduriforme**

Para verificar la transformación de la fase micelial a la fase levaduriforme de cada uno de los aislados se utilizó el medio rico en nutrientes; caldo infusión cerebro corazón (BHI), el cual fue inoculado con 30  $\mu$ L de una suspensión de  $10^5$  conidios/mL e incubado a 37° C, a 120 rpm. Se registró la presencia o ausencia de dimorfismo.

## V. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 74 aislados clínicos más la cepa ATCC (201681).

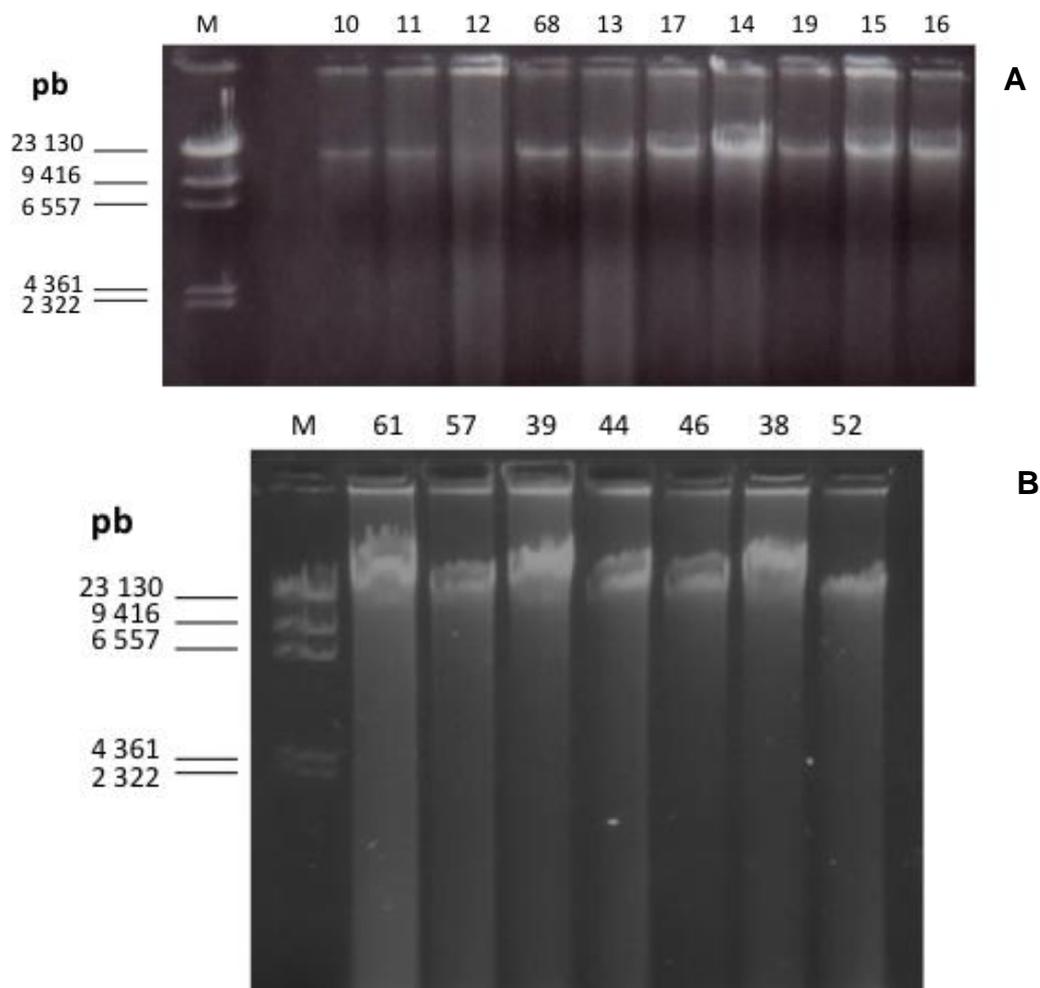
En las **Tablas 3 a 6** se muestran los datos epidemiológicos proporcionados por las diferentes instituciones que aportaron los aislados incluidos en este estudio. De acuerdo a su origen geográfico se procesaron un mayor número de aislados provenientes del estado de San Luis Potosí (12 aislados), seguidos por Puebla (11 aislados), Veracruz y el Estado de México (8 aislados), Oaxaca y el Distrito Federal (4 aislados), Michoacán, Hidalgo, Jalisco y Guanajuato (3 aislados), Aguascalientes (2 aislados) y Querétaro, Tlaxcala, Zacatecas y Guerrero en donde solo se procesó un aislado.

El 75.4% de los aislados provenían de pacientes con esporotricosis de tipo linfangítica, el 16.4% de esporotricosis de tipo fija y finalmente el 8% de esporotricosis de tipo diseminada. El 66% de los pacientes fue de género masculino y el 34% del género femenino. La mayoría de los pacientes se dedicaban a actividades agrícolas y de floricultura (58%), seguido del grupo de mujeres que se dedicaban a actividades del hogar (19%). La edad de las personas afectadas osciló entre los 4 y 77 años; los rangos de edad más afectados fueron de 4 a 10 años, 31 a 40 y 71 a 77, con 6 casos cada uno; en el rango de 41-50 años se encontraron 5 casos. De 28 casos en que se recibió el dato sobre el tiempo de evolución, en 18 fue menor de 6 meses, en 7 casos de 7 meses a 1 año y en 3 casos más de un año. El tratamiento elegido con mayor frecuencia para los casos de esporotricosis de tipo linfangítica y fija fue con KI con alto índice de curación. En segundo lugar, el médico tratante indicó itraconazol y termoterapia. Para los casos de esporotricosis diseminada se administró anfotericina B e itraconazol.

## V.1 Estudio Molecular

### V.1.1 Extracción de DNA

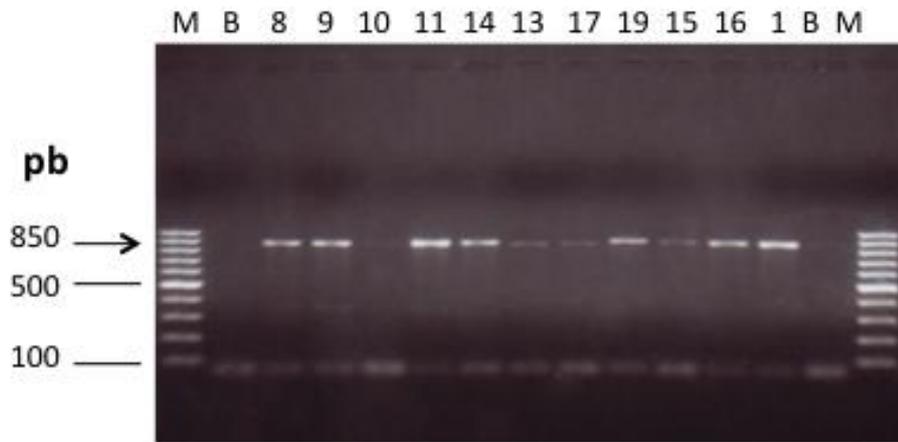
En la **Figura 7 (A,B)** se muestran las bandas de DNA obtenidas de algunos de los aislados incluidos en este estudio, la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, En general el DNA presenta una calidad aceptable para utilizarlo en el procedimiento de PCR subsecuente.



**Figura 7 (A, B).** Bandas de DNA de 10 (A) y 7 (B) aislados de *Sporothrix spp* (tablas 3-6). Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III Fragments (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden al número de aislado .

#### IV.1.2 Amplificación de un fragmento del gen que codifica para la calmodulina

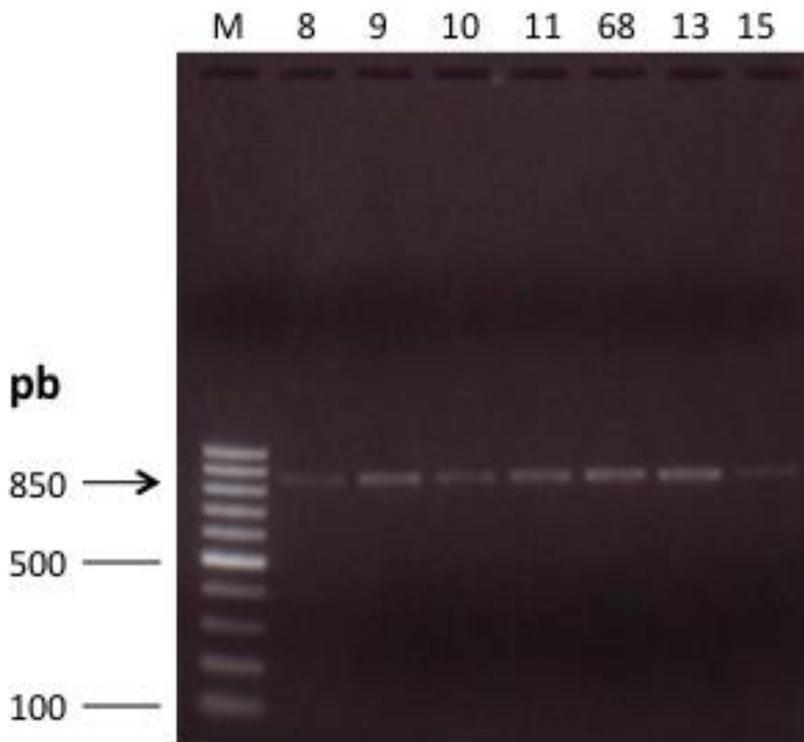
En la **Figura 8** se muestran los productos amplificados del fragmento del gen que codifica para la calmodulina, cuyo peso molecular es de aproximadamente 850 pares de bases. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.



**Figura 8.** Productos de la PCR del gen de la Calmodulina con los oligonucleótidos CL1 y CL2A. M: marcador de 100pb; B: blanco; los números corresponden al número de aislado (ver tablas 3 y 4).

#### IV.1.2.1 Purificación de los productos de PCR- Calmodulina

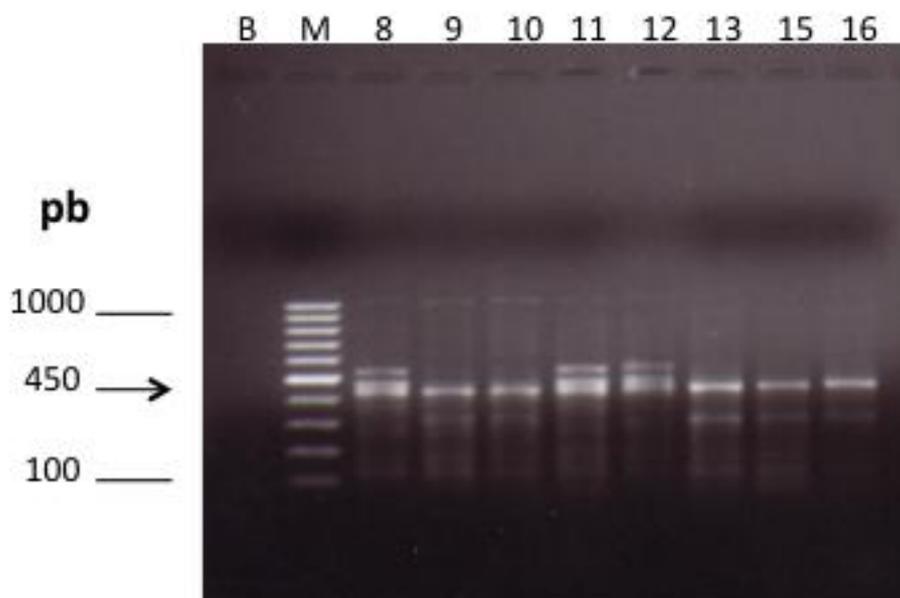
Los productos de la PCR de la calmodulina fueron purificados, algunos de estos se observan en la **Figura 9**. Estos productos se enviaron a secuenciar.



**Figura 9.** Productos de amplificación del gen de la calmodulina purificados. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular de 100 pb (1 $\mu$ L); los siguientes carriles corresponden a los números de algunos de los aislados problema de *Sporothrix* spp de la tablas 3 y 6 (3 $\mu$ L).

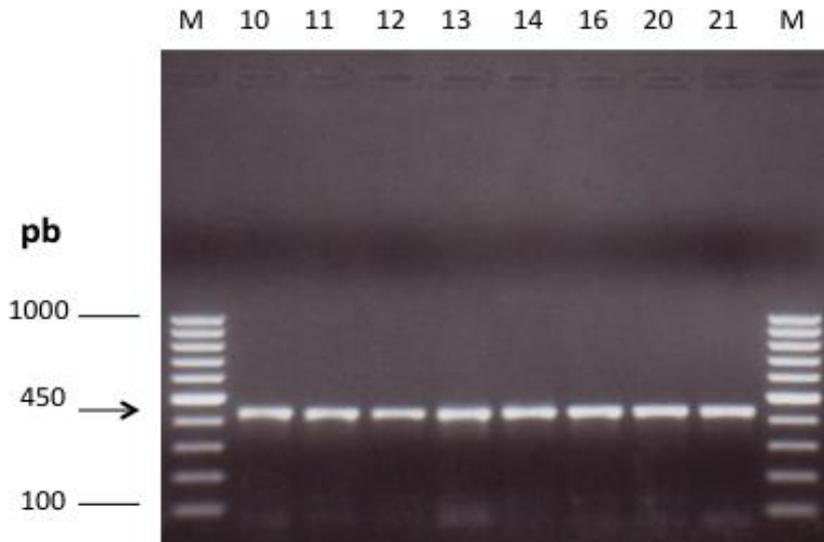
### V.1.3 Amplificación del gen de $\beta$ -tubulina

A continuación se observa una fotografía de los productos de PCR del gen de la  $\beta$ -tubulina, para algunas muestras. En la **Figura 10** se muestran los fragmentos de aproximadamente 450 pb y otros fragmentos más pequeños, que al parecer son bandas correspondientes a estructuras secundarias.



**Figura 10.** Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. B: blanco; M: marcador de peso molecular de 100 pb ( $1\mu\text{L}$ ); los siguientes carriles corresponden a los números de los aislados problema de *Sporothrix* spp. ( $3\mu\text{L}$ ).

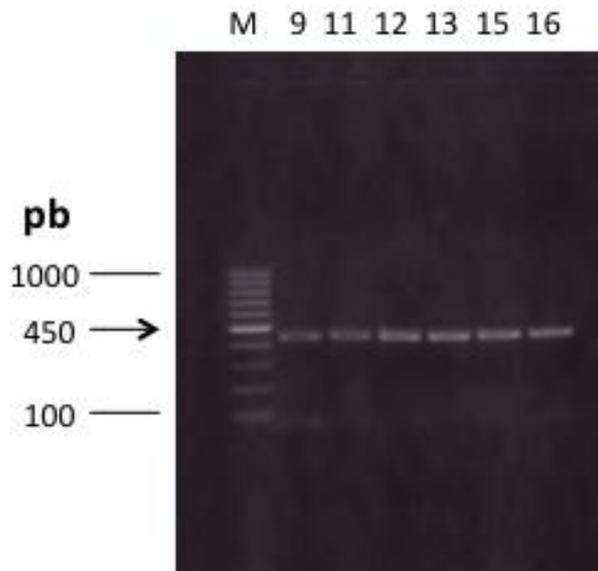
Con la finalidad de eliminar estas estructuras secundarias se realizó una PCR añadiendo albúmina en una concentración final de  $1.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en  $20\mu\text{L}$ . En la **Figura 11** correspondiente a la electroforesis de estos productos, desaparecen estas estructuras secundarias, y se observa únicamente la banda deseada que corresponde a los 450 pb. Este mismo problema se presentó para algunas de las muestras amplificadas con los iniciadores de calmodulina y de igual forma se logró eliminar la estructura secundaria.



**Figura 11.** Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. M: marcador de peso molecular de 100 pb ( $1\mu\text{l}$ ); los siguientes carriles corresponden a algunos de los aislados problema de *Sporothrix* spp. de las tablas 3 y 4.

#### V.1.3.1 Purificación de los productos de PCR- $\beta$ -tubulina

Los productos de PCR de la  $\beta$ -tubulina se purificaron y se enviaron a secuenciar. La **Figura 12** representa los productos purificados de algunos aislados.



**Figura 12.** Productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. M: marcador de peso molecular de 100 pb ( $1\mu\text{L}$ ); los siguientes carriles corresponden a algunos de los aislados problema de las tablas 3 y 4.

#### V.1.4 Revisión de la secuencias

Las secuencias obtenidas se ingresaron al programa Sequencher 5.0.1 Demo con la finalidad de observar la calidad de estas. Solamente se incluyeron en el análisis filogenético

aquellas secuencias con un porcentaje de calidad mayor o igual al 65% (Tabla 8). Esto con la finalidad de que los datos ingresados fueran confiables.

Algunas muestras se volvieron a procesar desde la extracción del DNA sin embargo las secuencias tuvieron muy mala calidad, por esto no se incluyeron en el análisis. En la **Tabla 8** se puede verificar el tamaño y calidad de las secuencias de los aislados problema.

## V.2 Análisis filogenético

Las secuencias que mostraron un porcentaje de calidad por encima de 70% fueron sometidas al análisis filogenético. Para el análisis del gen de la calmodulina se incluyeron 54 secuencias y para el gen de la  $\beta$ -tubulina 38.

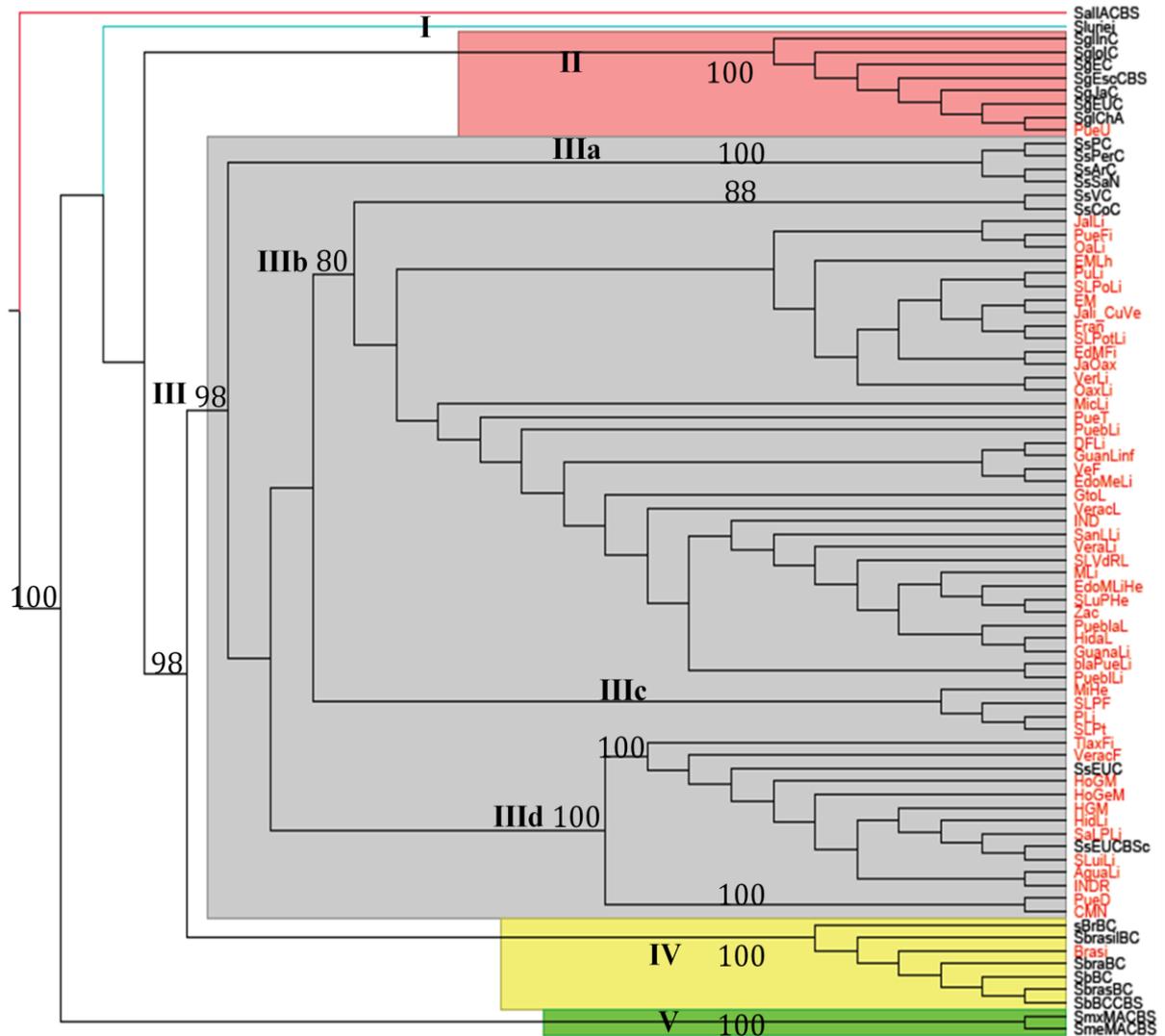
Todas las secuencias de calmodulina y  $\beta$ -tubulina de los aislados fueron comparadas con el GenBank, utilizando el algoritmo Blastn. Todas las secuencias mostraron un porcentaje de identidad entre el 96 y 100% con la especie *S. schenckii*, con dos excepciones: la secuencia Brasi (ATCC) que tuvo 98% de identidad con *S. brasiliensis* y la secuencia PueU con 99% de identidad con la especie *S. globosa*.

### V.2.1 Análisis filogenético bajo el criterio de Parsimonia aplicado a las secuencias parciales del gen de calmodulina.

Se analizó una matriz con 79 UTOs por 807 caracteres. De los 79 terminales, 54 fueron problema y 25 fueron de referencia. Entre las secuencias de referencia, se incluyeron 7 de la especie *S. globosa*, 8 secuencias de *S. schenckii*, 6 de *S. brasiliensis*, 2 de *S. mexicana*, una de *S. luriei* y una de *S. albicans*. Esta última fue considerada como grupo externo, por ser la especie más cercana. En la **Tabla 8**, se muestra el número de acceso de la base de datos GenBank/ EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania) de los aislados de referencia y la clave correspondiente que se les asignó en este estudio, además se indica el número de aislado problema y la clave utilizada para construir el árbol. De los 807 caracteres analizados, 606 fueron no informativos y 201 parsimoniosamente informativos. Se analizaron un total de 12 237 720 re-arreglos. El menor número de pasos encontrado fue de 356 y se retuvieron 90 árboles con esta longitud. Los árboles tuvieron un índice de consistencia (IC) de 0.807 y un índice de retención de 0.916, lo que refleja una baja cantidad de homoplasia.

En la **Figura 13** se presenta uno de los 90 árboles más parsimoniosos en el cual se indican los valores de Bootstrap después de mil re-muestreos. Los aislados problema están indicados en rojo y los aislados de referencia se encuentran en negro. Se observa la formación de 5 clados (I, II, III, IV, V). El clado I formado por *S. luriei*. El clado II agrupa las secuencias de referencia de *S. globosa* y uno de los aislados problema (PueU). La mayoría de los aislados problema se encuentran dentro del clado que incluye las secuencias de

referencia de *S. schenckii* (clado III). Este último clado está dividido en 4 subclados: uno (IIIa) está formado únicamente por secuencias de referencia (grupo conservado en el árbol de consenso estricto IIIa, Figura 14); el segundo (IIIb) incluye a dos cepas de referencia y a la mayoría de los aislados problema (conservado en el árbol de consenso, IIIb); el tercero (IIIc) incluye sólo aislados problema (grupo no resuelto en el árbol de consenso y se observa formando una politomía); y el cuarto (IIId) contiene aislados problema y dos secuencias de referencia CBS de *S. schenckii* (subclado IIIc, en árbol de consenso). El clado IV incluye las secuencias de referencia de *S. brasiliensis* y la cepa de referencia (ATCC 201681, indicada como "Brasi"), adquirida a la colección respectiva como *S. schenckii*. El clado VI está formado por las secuencias de referencia de *S. mexicana*.

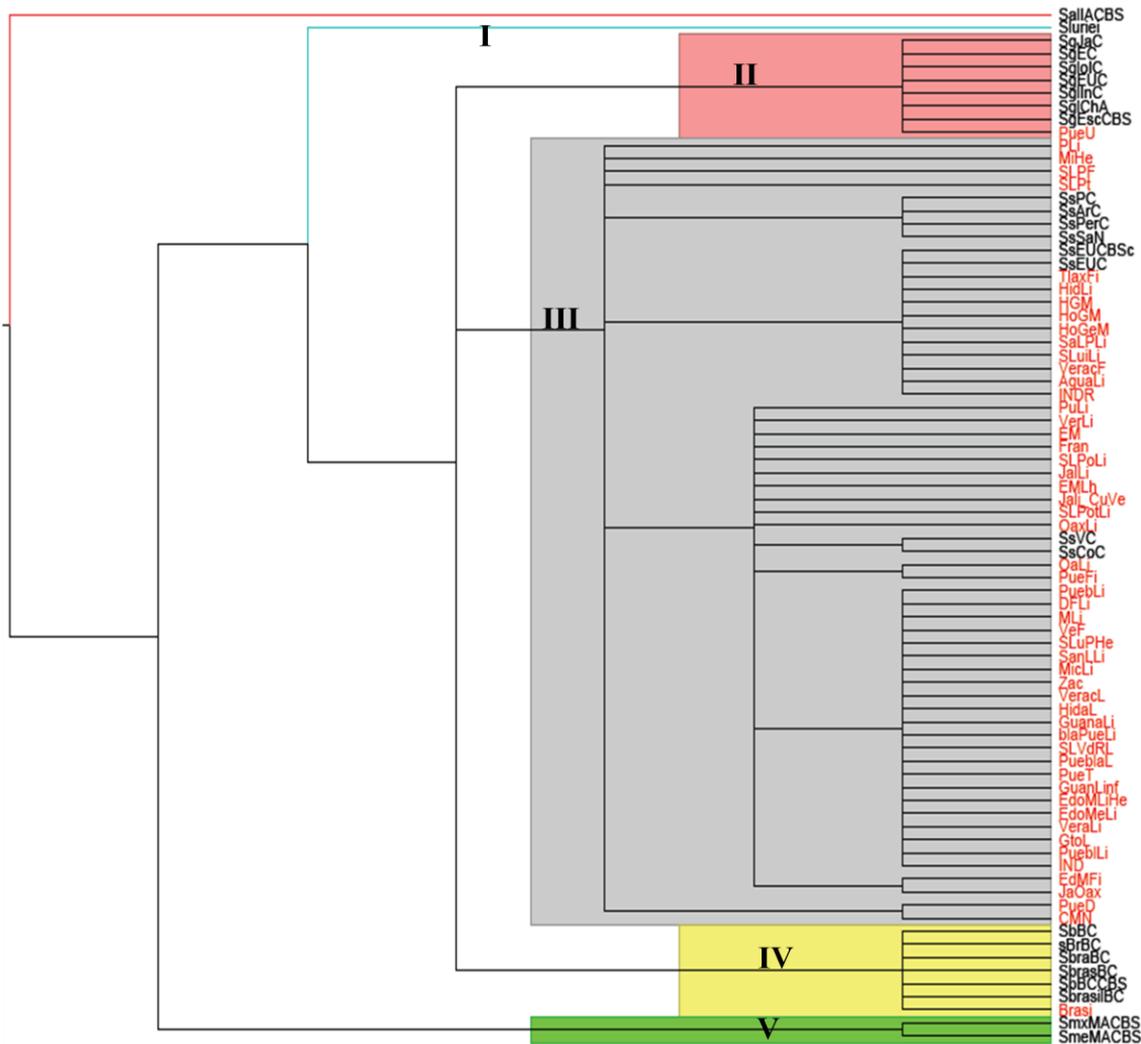


**Figura 13.** Representación de uno de los árboles más parsimoniosos, basado en secuencias parciales del gen de la calmodulina. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 70. En rojo: aislados problema. Números romanos: número de clado.

En la **Figura 14** se presenta el árbol de consenso de mayoría, donde se observa la formación del mismo número de clados que hay en uno de los árboles más parsimoniosos (Figura 13). Como se indicó anteriormente hay tres subclados del grupo de *S. schenckii* (IIIa, IIIb y IIIc) que se conservan en el árbol de consenso de mayoría.







**Figura 16.** Árbol de consenso construido con los datos del gen que codifica para la calmodulina, procesados con el programa G-blocks.

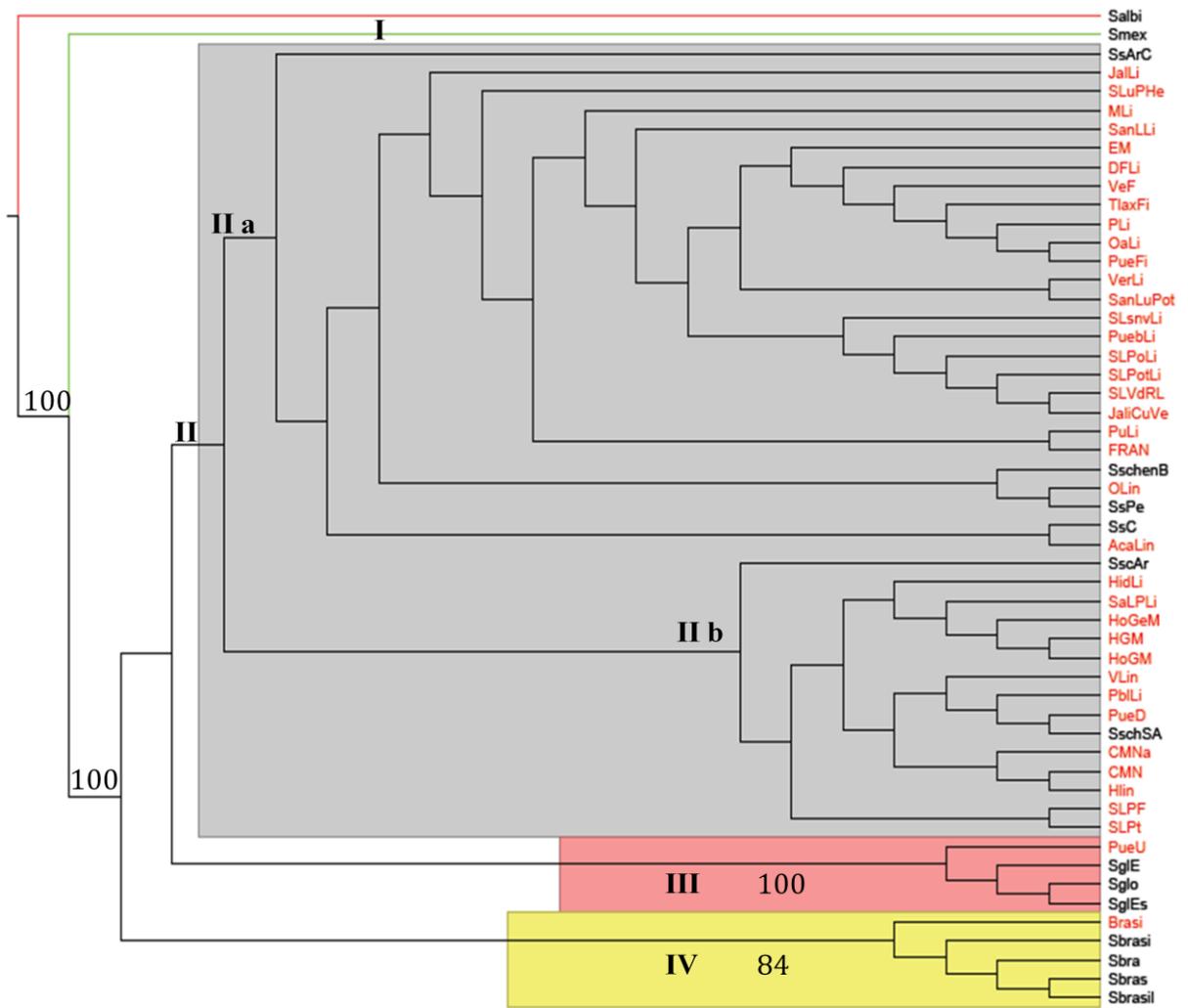
En las **Figuras 15** y **16** se muestran los árboles generados con las secuencias parciales del gen que codifica para la calmodulina cortadas en bloques con G-blocks; en general presentan el mismo patrón de agrupamiento que los árboles generados con las secuencias completas (Figuras 13 y 14). Se observa que el aislado PueU, sigue agrupándose dentro de la especie *S. globosa* (Clado II); la cepa tipo ATCC “Brasi” se agrupa con la especie *S. brasiliensis* (Clado IV), aunque el valor de Bootstrap para este clado fue muy bajo. Los demás aislados problema están dentro del Clado III que agrupa a todas las secuencias de referencia de la especie *S. schenckii*. En este árbol también se observaron principalmente 4 subclados con algunas diferencias respecto a árboles anteriores: el primero (IIIa), que a diferencia del árbol de la Figura 13, incluye aislados de referencia y aislados problema; este grupo no se conserva en el árbol de consenso estricto Figura 16; el segundo (IIIb) agrupa a los mismos taxa que el clado IIIId del árbol de la Figura 14; el clado IIIc agrupa a los mismos taxa que el clado IIIb, estos clados se siguen conservando en el árbol de consenso. Dentro

del clado III que agrupa a los taxa de referencia *S. schenckii* y a la mayoría de los aislados problema se observa la formación de 3 subclados principales, esto corroborados con secuencias completas y en bloques.

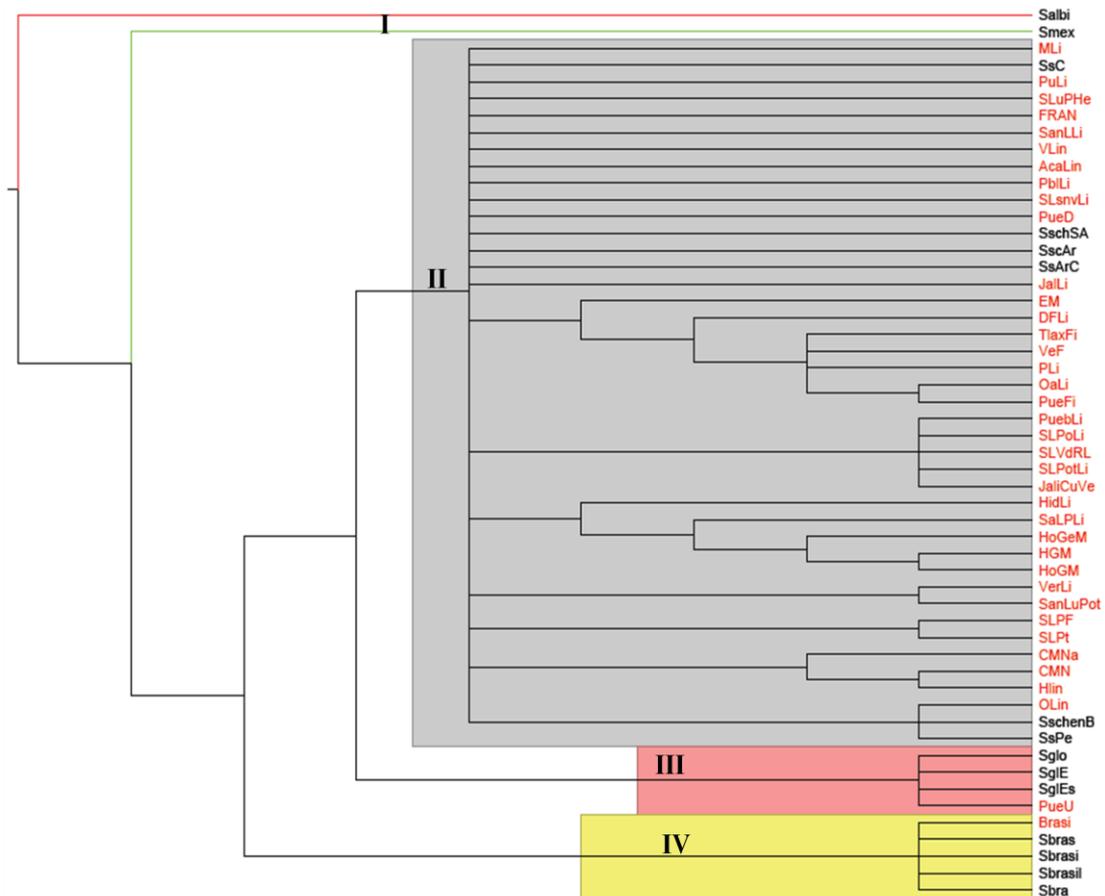
### **V.2.2 Análisis filogenético bajo el criterio de Parsimonia aplicado a las secuencias parciales del gen de la $\beta$ -tubulina.**

Se analizó una matriz con 53 UTOs y 473 caracteres. De los 53 UTOs, 38 correspondieron a aislados problema y 15 a cepas de referencia: 3 secuencias de la especie *S. globosa*, 6 de *S. schenckii*, 4 de *S. brasiliensis*, una de *S. mexicana* y una de *S. albicans*. Esta última fue considerada como grupo externo. En la **Tabla 8** se encuentra el número de acceso EMBL de los aislados de referencia y la clave de los UTOs que se utilizó para la construcción del árbol filogenético. De los 473 caracteres analizados, 391 fueron no informativos y 82 parsimoniosamente informativos. Se analizó un total de 8 503 782 re-arreglos. El menor número de pasos encontrado fue de 366 y se retuvieron 11 árboles con esta longitud. Para uno de los árboles más parsimoniosos se calculó el índice de consistencia (IC) que fue de 0.609 y el índice de retención (IR) de 0.757.

En la **Figura 17** se presenta uno de los 11 árboles más parsimoniosos. Se indican los valores de Bootstrap después de mil re-muestreos. Los aislados problema están indicados en rojo y los aislados de referencia se encuentran en negro. Como se observó en el árbol del gen de calmodulina, uno de los aislados problema está dentro del clado que agrupa a la especie *S. globosa*; la cepa tipo (ATCC 201681, indicada como "Brasi") determinada como *S. schenckii*, está dentro del grupo de *S. brasiliensis*. Los demás aislados se encuentran dentro del clado que incluye los aislados de referencia de *S. schenckii*. En la **Figura 18** se muestra el árbol de consenso del mismo gen, en donde se observa la misma distribución de cepas de referencia y aislados problema que en la figura anterior.



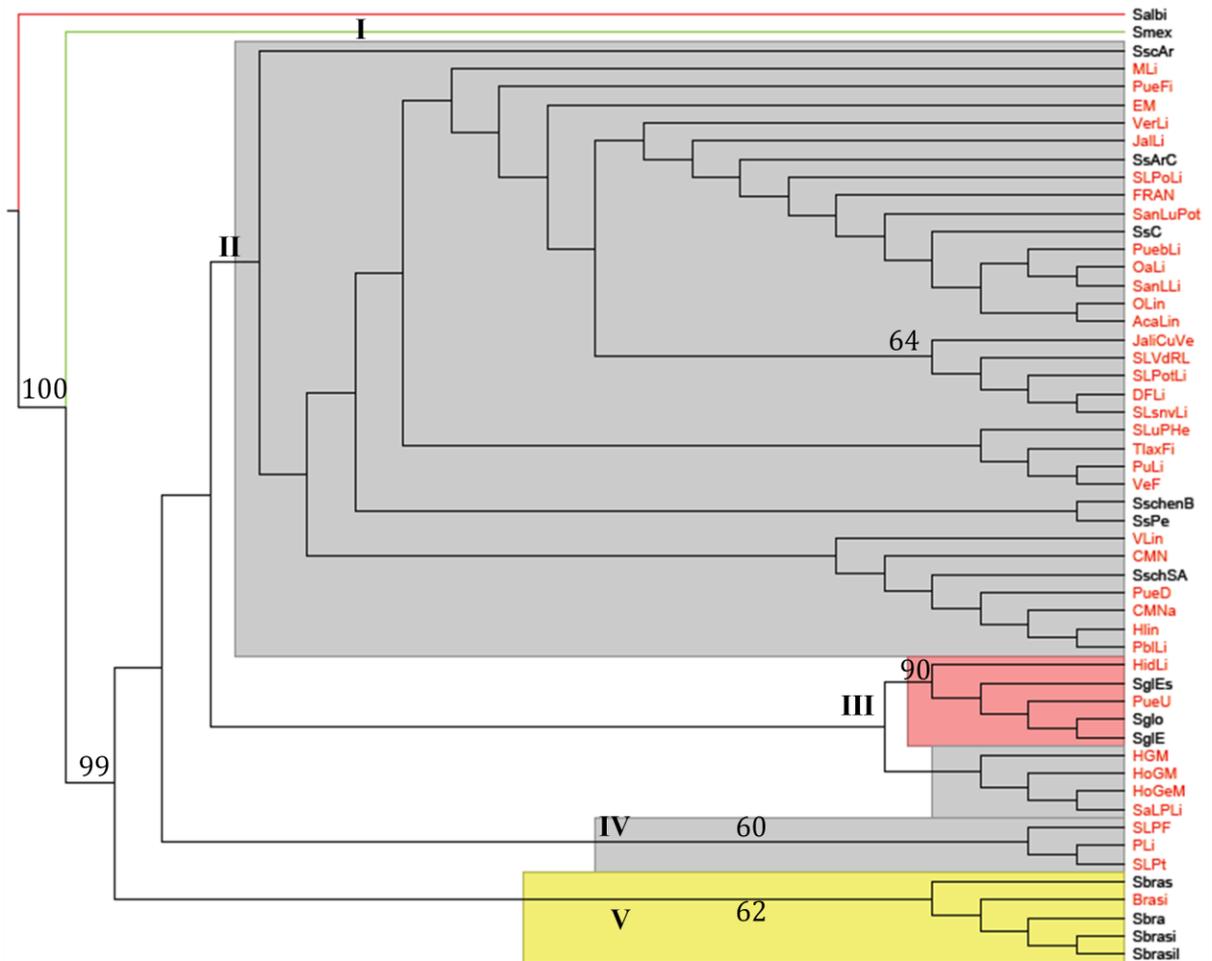
**Figura 17.** Representación de uno de los árboles más parsimoniosos, basado en secuencias parciales del gen de la  $\beta$ -tubulina.



**Figura 18.** Representación del árbol consenso, basado en las secuencias parciales del gen de la  $\beta$ -tubulina.

Con la finalidad de explorar si las relaciones entre los aislados se resolvía mejor el alineamiento de las secuencias de  $\beta$ -tubulina se ingresaron los datos al programa G-blocks; este programa eligió 7 bloques del alineamiento original con un total de 258 posiciones (54% de la información original).

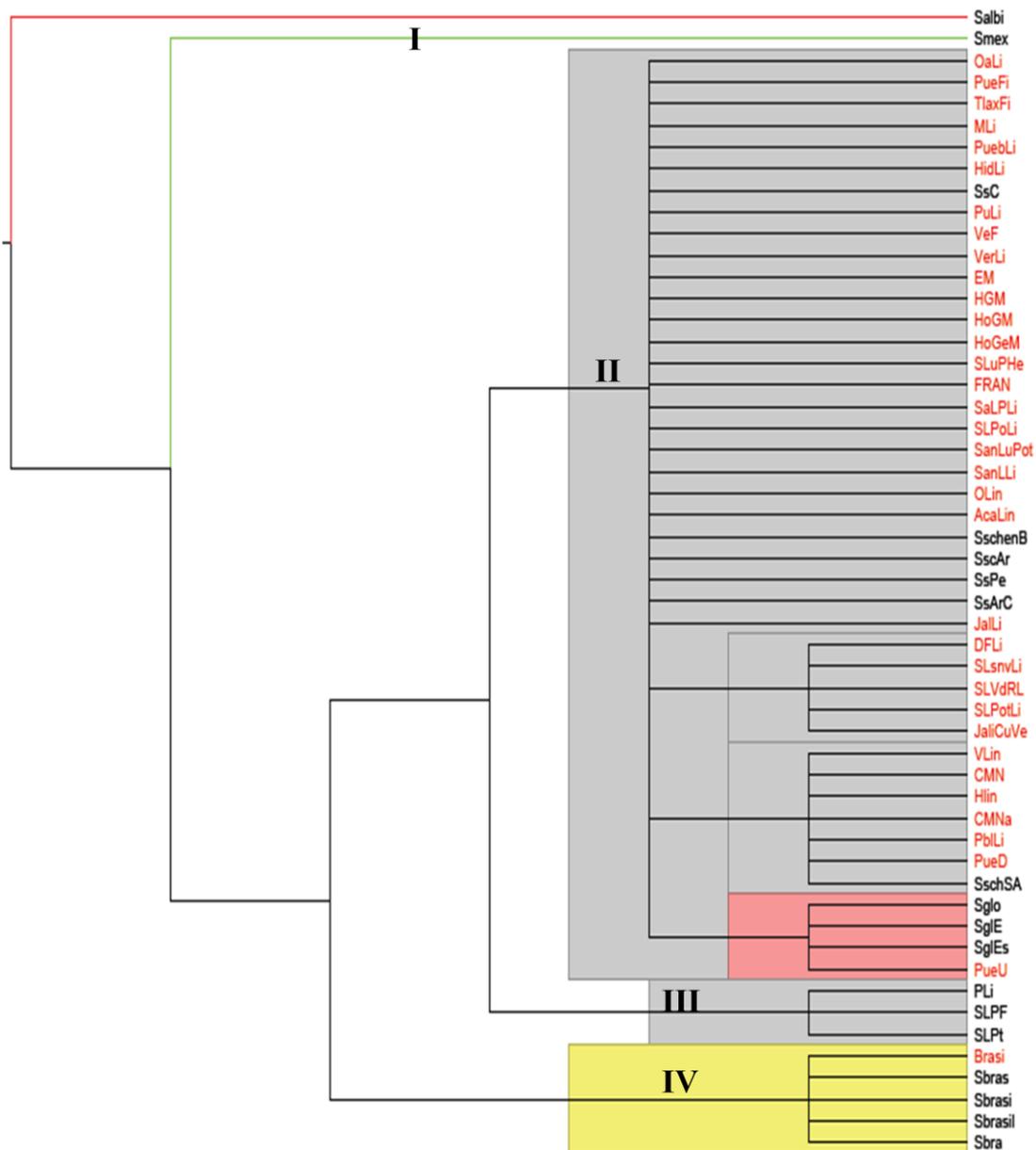
Con el programa TNT se analizó una matriz de 258 caracteres x 53 UTOs. De los 258 caracteres, 24 se consideraron parsimoniosamente informativos, pero el análisis se llevó a cabo con todos los caracteres. Se analizaron 711, 904 re-arreglos. Se retuvieron 10 árboles de 85 pasos. El IC fue de .871 y el RI de .940.



**Figura 19.** Uno de los árboles más parsimoniosos construidos con secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina, procesadas con el programa G-blocks.

En la **Figura 19** se muestra el resultado del análisis de las secuencias en bloques. Se observa una distribución distinta de los UTOs; el caso más notorio es el clado III que agrupa UTOs de referencia de *S. globosa* y 5 UTOs problema, agrupados en análisis anteriores en el clado *S. schenckii*. Además, el clado IV agrupa solo aislados problema y como vecinos tiene el clado de *S. brasiliensis* y el clado III (*S. globosa* y aislados problema).

En el árbol consenso (**Figura 20**) construido con secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina se observa la formación de 5 clados: el clado II agrupa a UTOs de referencia de la especie *S. globosa* y *S. schenckii*; el clado III agrupa únicamente aislados problema; los clados restantes permanecen sin cambios sustanciales.



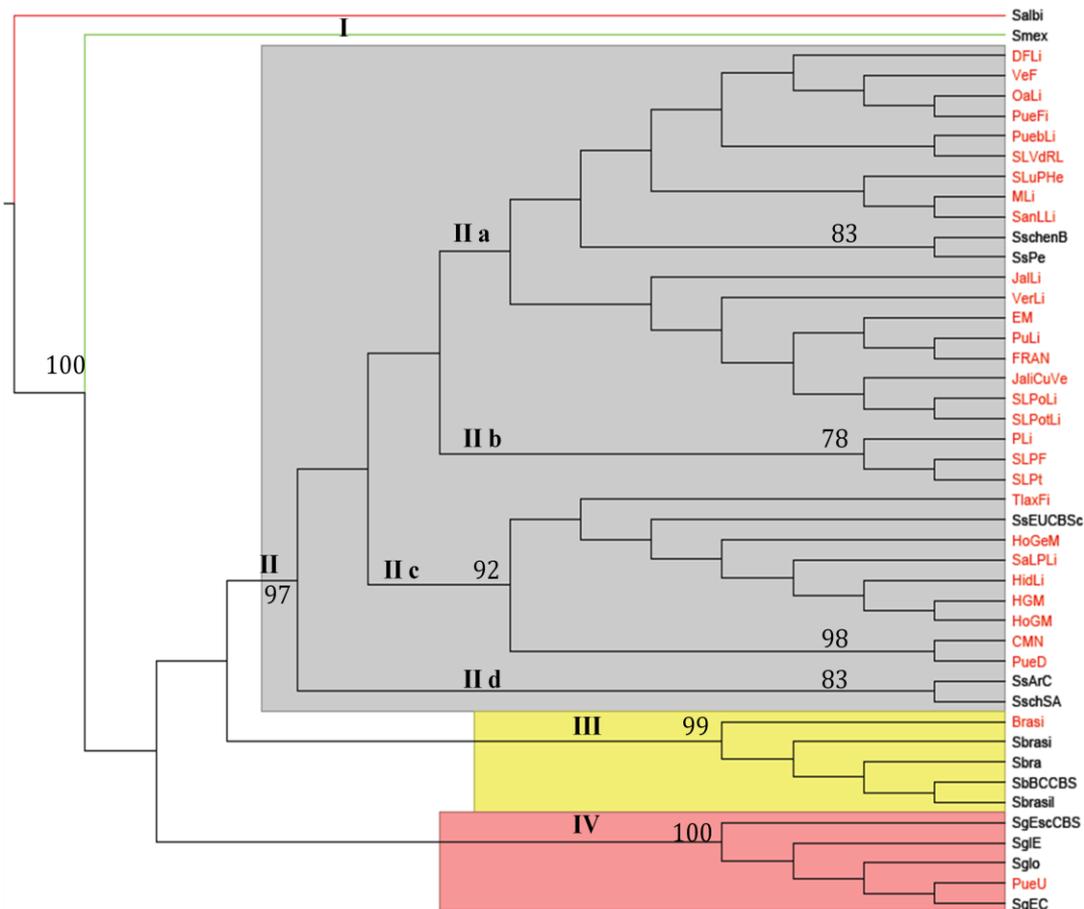
**Figura 20.** Árbol de consenso estricto construido con secuencias del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina, procesados con el programa G-blocks.

### V.2.3 Análisis filogenéticos simultáneos

Se hizo un análisis filogenético con datos combinados, utilizando los UTOs que coincidieron en secuencias con una calidad superior al 70% para ambos genes por lo que se ingresaron un total de 30 UTOs problema (incluyendo la cepa ATCC) y 15 secuencias de referencia.

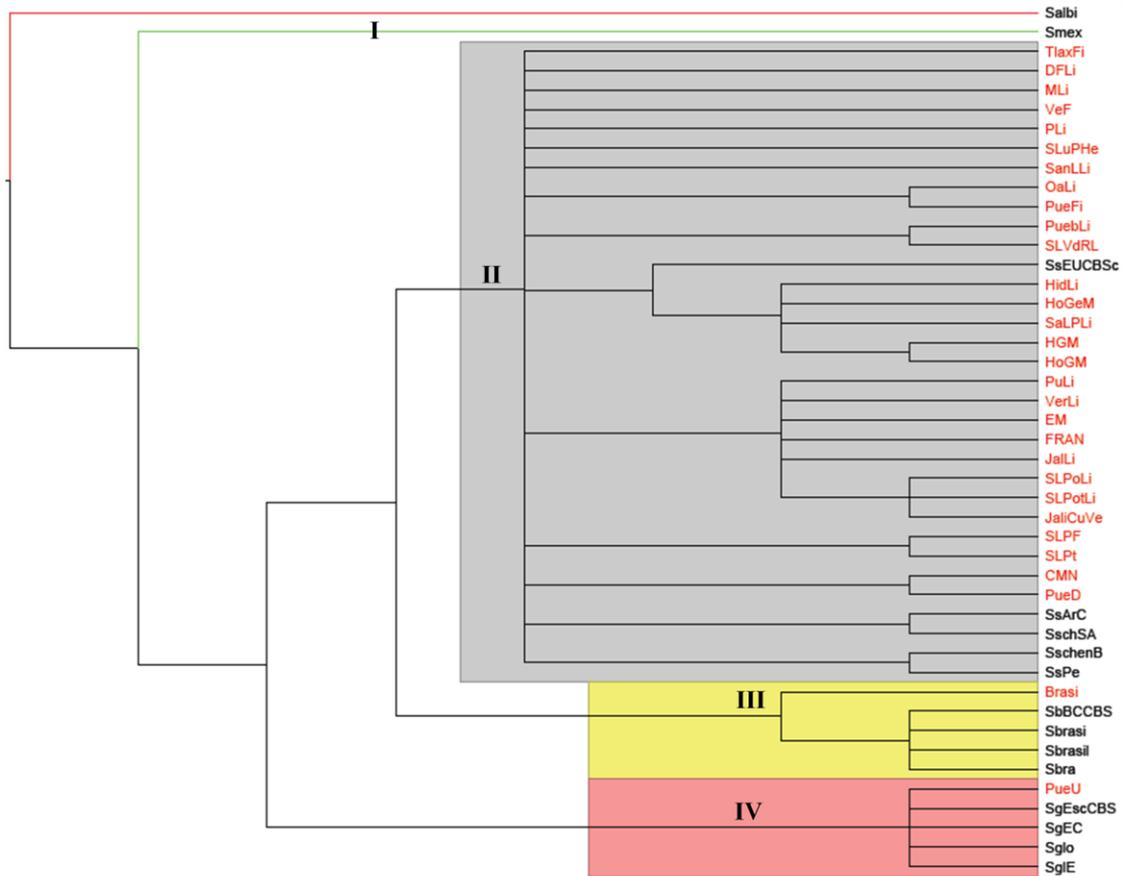
Las secuencias de calmodulina y  $\beta$ -tubulina se concatenaron y se obtuvo una matriz de 1257 caracteres por 45 UTOs. De los caracteres 251 fueron parsimoniosamente informativos. El menor número de pasos observados después de una búsqueda heurística de 10 000 repeticiones con la adición de secuencias al azar y un algoritmo TBR, fue de 555 pasos y se retuvieron 60 árboles. El IC = 0.605 y el IR = 0.819.

En la **Figura 21** se observa uno de los 60 árboles más parsimoniosos, con número se indican los valores de Bootstrap después de 1000 re-muestréos. Se observa la formación de cuatro cladós: en clado I, está la especie *S. mexicana*; el clado II incluye a todos los UTOs de referencia de la especie *S. schenckii* y a la mayoría de los UTOs. Este clado II está formado principalmente por cuatro subclados: el IIa incluye secuencias problema y dos de referencia, aunque no tiene un valor significativo de Bootstrap; el clado IIb incluye únicamente secuencias problema; el clado IIc contiene una secuencia de referencia CBS y otros aislados problema; finalmente el clado IId está formado únicamente por aislados de referencia. El clado III agrupa a los aislados de referencia de la especie *S. brasiliensis* y a la cepa ATCC; el clado IV agrupa a la especie *S. globosa* y a un aislado problema.



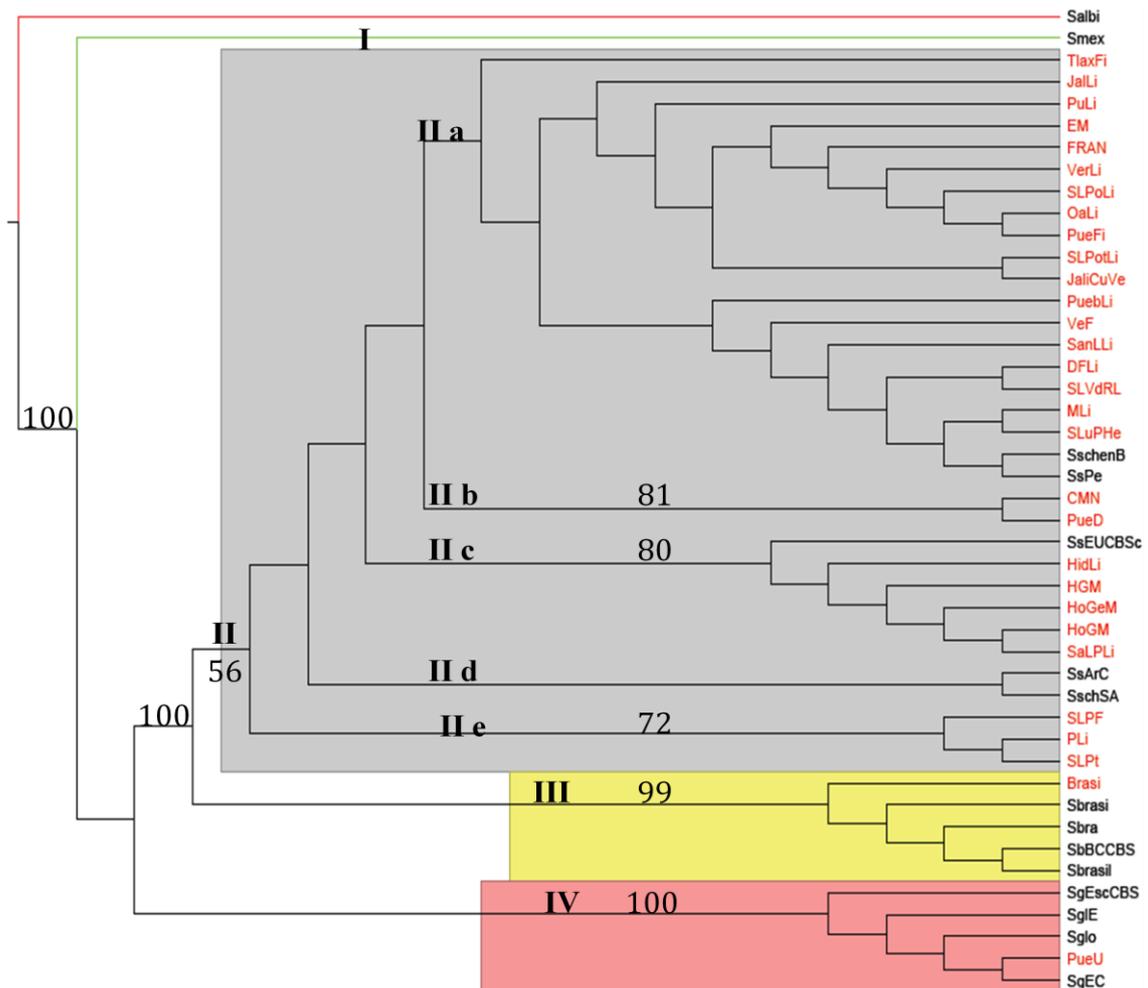
**Figura 21.** Uno de los árboles más parsimoniosos construidos con secuencias concatenadas de los genes codificantes para la calmodulina y  $\beta$ -tubulina.

En la **Figura 22** se muestra el árbol de consenso para los datos concatenados. De forma similar al árbol más parsimonioso, se observa la formación de 4 cladós. Sin embargo ninguno de los sub-cladós del clado II se conservó.



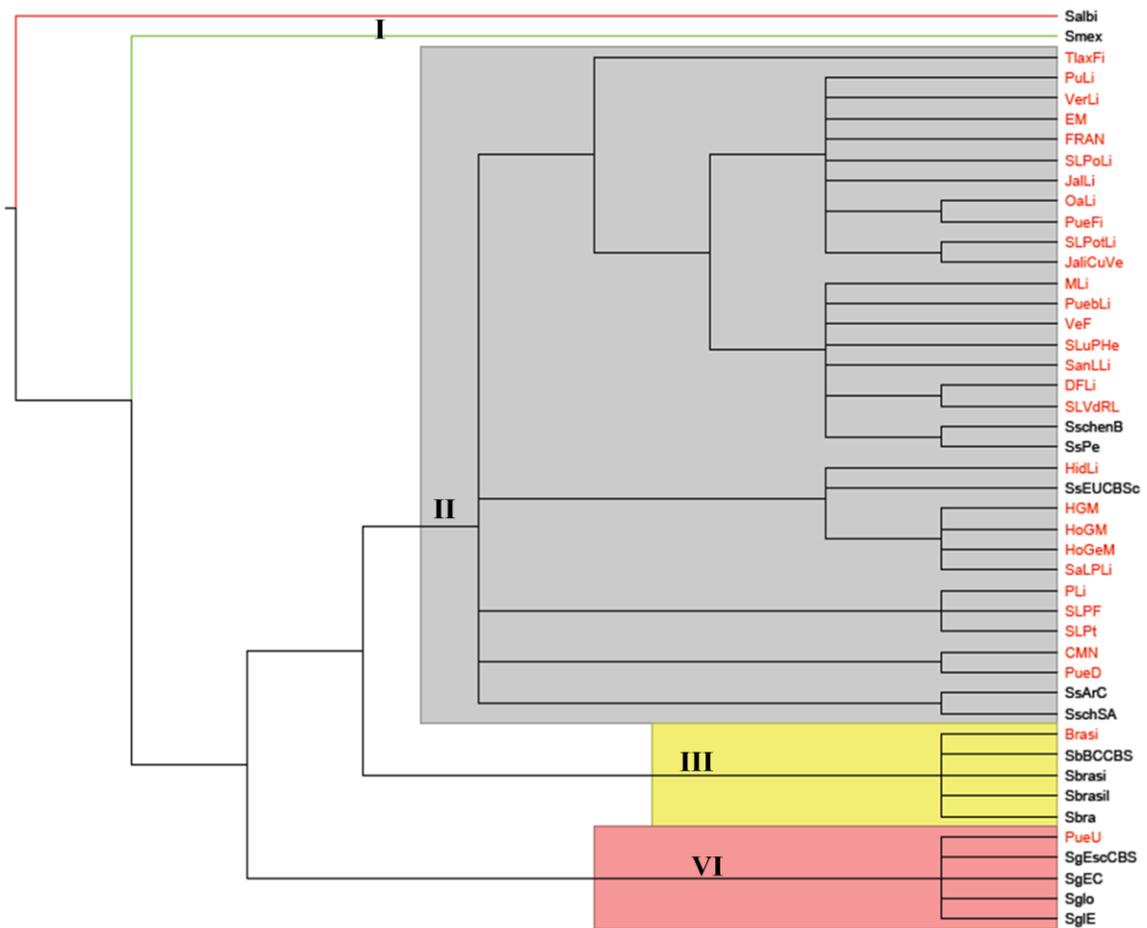
**Figura 22.** Árbol de consenso estricto de datos concatenados.

Al igual que en los análisis de datos separados, las secuencias concatenadas de calmodulina y  $\beta$ -tubulina se ingresaron al programa G-blocks. Se analizó una matriz de 618 caracteres por 45. De los 618 caracteres, 110 fueron parsimoniosamente informativos según el programa TNT. El menor número de pasos para resolver el árbol fue de 256 y se retuvieron 8 árboles. Se analizó un total de 385 842 re-arreglos. El IR = 0.819 y el IC = 0.745. En la **Figura 23** se observa uno de los árboles más parsimoniosos, que sigue el mismo patrón de agrupamiento que el árbol generado con las secuencias completas.



**Figura 23.** Uno de los árboles más parsimoniosos construido a partir de los datos concatenados de los genes codificantes para la  $\beta$ -tubulina y la calmodulina, procesados con G.blocks.

En la **Figura 24** se observa el árbol de consenso generado con los datos concatenados cortados con G-blocks. Se observa la formación de 4 clados, correspondientes a las 4 especies de referencia ingresadas, además dentro del clado II, se observa la formación de muchos grupos.



**Figura 24.** Árbol de consenso estricto construido a partir de los datos concatenados de los genes codificantes para la  $\beta$ -tubulina y la calmodulina, procesados con G-blocks.

**Tabla 8.** Nombre clave en los árboles filogenéticos, tamaño y calidad de las secuencias.

No. aislado/ clave EMBL	Nombre en cladograma	% de calidad calmodulina	No. de pares de bases	% de calidad $\beta$ - tubulina	No. de pares de bases
1	OaLi	67	848	86.7	412
2	PueFi	67	840	84.1	409
3	TlaxFi	94.1	841	<50	----
4	DFLi	77.6	836	70.3	489
5	MLi	91.1	844	88.2	406
6	PuebLi	82.8	633	70.5	482
7	HidLi	86.8	646	90	408
8	PuLi	84.3	637	89.7	406
9	VeF	77.9	787	86.4	412
10	PLi	79.3	773	88	415
11	MiHe	76.2	790	<50	----
12	VerLi	83.7	809	88.1	412
13	EM	92.1	813	86	414
14	HGM	93.3	815	88.6	414
15	----	<50	----	<50	----
16	HoGM	89.5	784	88.6	411
17	HoGeM	90.8	791	88.6	413
18	SaLPLi	85.5	768	91	409
19	SLuPHe	91	759	90.4	406
20	SLPoLi	84.5	600	76.4	483
21	SanLuPot	86.7	362e	87.5	408
22	SanLLi	86.5	786	88.2	408
23	MicLi	94.7	786	<50	----
24	Zac	92	766	<50	----
25	SLuiLi	89.9	793	<50	----
26	JalLi	62	825e	87	407
27	SLVdRL	70	831	69.9	409
28	SLPF	89.9	845	88.9	405
29	SLPt	78.6	482	82.4	669
30	SLPotLi	92.5	828	76.9	407
31	Jali-CuVe	82.8	757	73.5	483
32	----	<50	----	<50	----
33	SLsnvLi	<50	----	89.3	411
34	AguaLi	87.2	791	<50	----
35	EdMFi	84	844	<50	----
36	GuaLi	78.6	477e	<50	----
37	OaxLi	81.3	841	<50	----
38	EdoMLiHe	91.7	846	<50	----
39	GueLi	86.3	844	<50	----
40	HidaL	94.5	829	<50	----
41	EdoMeLi	77.4	840	<50	----
42	VeracF	92.2	840	<50	----
43	GuanaLi	93.4	828	<50	----
44	----	<50	----	<50	----
45	----	58	833	<50	----
46	----	<50	----	<50	----
47	EMLh	93	830	<50	----
48		<50	----	<50	----
49	VeraLi	86.7	844	<50	----
50	----	<50	----	<50	----
51	GtoL	89.3	803	<50	----
52	PueblLi	86.3	846	<50	----
53	IND	70	660	<50	----
54	PueblaL	84	798	<50	----
55	blapueLi	76	830	<50	----
56	----	<50	----	<50	----
57	INDR	<50	840	<50	----
58	GuanLinf	71	698	<50	----
59	JaOax	82	842	<50	----
60	CMN	90.3	844	89	408
61	CMNa	<50	----	90.2	407
62	Vic	68.2	356	<50	----
63	AcaLin	<50	----	79.3	410
64	PblLi	<50	----	94.9	409
65	OLin	<50	----	73.2	467
66	----	<50	----	<50	----

No. aislado/ clave EMBL	Nombre en cladograma	% de calidad calmodulina	No. de pares de bases	% de calidad $\beta$ - tubulina	No. de pares de bases
67	----	<50	----	87.6	356
68	VeraclL	95.5	831	<50	-----
69	VLin	<50	----	88.8	411
70	HLin	<50	----	87.2	352
71	PueD	87.7	836	89.6	412
72	PueU	93.5	834	83.4	404
73	PueT	79.7	851	90.2	409
74	----	<50	----	<50	----
ATCC	Brasi	73	----	90.2	387
R00	FRAN	92	820	89.2	409
Aislados de Referencia					
Clave GenBank	UTOs	Gen correspondiente	No. de pares de bases	intrones	exones
AM116946.1	SbBCCBS	$\beta$ -tubulina	376	1-119, 170-227	120-169, 228-376
AM116953.1	Sbrasi	$\beta$ -tubulina	378	1-121,172-229	122-171,230-378
AM116935.1	Sbrasil	$\beta$ -tubulina	379	1-122, 173-230	123-172, 231-379
AM116956.1	Sbra	$\beta$ -tubulina	379	1-122, 173-230	123-172, 231-379
AM116886.1	SbBC	calmodulina	748	1-91,107-222,349-748	92-106,223-348
AM116897.1	SbrBC	calmodulina	751	1-92, 108-224, 351-751	93-107, 225-350
AM116898.1	SbraBC	calmodulina	751	1-92, 108-224, 351-751	93-107, 225-350
AM116888.1	SbrasBC	calmodulina	750	1-91, 107-223, 350-750	92-106, 224-349
AM116899.1	SbrasiBrC	calmodulina	751	1-92, 108-224, 351-751	93-107, 225-350
AM116892.1	SbrasilBC	calmodulina	751	1-92, 108-224, 351-751	93-107, 225-350
AM116921.1	Ssc	$\beta$ -tubulina	393	1-116, 167-244	117-166, 245-393
AM116925.1	SschSA	$\beta$ -tubulina	400	1-122,173-251	123-172, 252-400
AM116916.1	SschenB	$\beta$ -tubulina	398	1-121, 172-249	122-171, 250-398
AM116918.1	SsPe	$\beta$ -tubulina	394	1-117, 168-245	118-167, 246-394
AM116920.1	SsArc	$\beta$ -tubulina	398	1-121, 172-249	122-171, 250-398
AM117437	SsEUCBSc	calmodulina	745	1-90, 106-219	91-105, 220-345
AM399006.1	SsPC	calmodulina	627	100-216	85-99, 217-342
AM116960	Sglo	$\beta$ -tubulina	394	1-121, 172-245	122-171, 246-394
AM116964.1	SglE	$\beta$ -tubulina	395	1-121, 172-245	122-171, 246-394
AM116966	SgEscCBS	$\beta$ -tubulina	395	1-122, 173-246	123-172, 247-395
AM116902.1	SgEC	calmodulina	749	1-91, 107-242, 369-749	92-106, 243-368
AM398994.1	SgJaC	calmodulina	629	98-233, 360-483	83-97, 234-359, 484-629
AM3990002.1	SglChA	calmodulina	579	104-240, 367-433	89-103, 241-366, 434-579
AM399018.1	SgIoC	calmodulina	633	102-237, 364-487	87-101, 238-363, 488-633
AM398992.1	SgEUC	calmodulina	632	102-237	87-101, 238-363
AM490363.1	SgInC	calmodulina	619	92-228	77-91, 229-354
AM116908.1	SgEscCBS	calmodulina	747	1-90, 106-241, 368-747	91-105, 242-367
AM117436.1	SsArC	calmodulina	747	1-89, 105-221	90-104, 222-347
AM117429.1	SsPerC	calmodulina	745	1-90, 106-219	91-105, 220-

					345
AM490347.1	SsVC	calmodulina	628	104-221	89-103,222-347
AM117447.1	SsCoC	calmodulina	746	1-89, 105-220	90-104, 221-346
AM117435.1	SsSaN	calmodulina	749	1-91, 107-242, 369-749	92-106, 243-368
AM399012.1	SsEUC	calmodulina	627	102-215, 342-481	87-101, 216-341, 482-627
AM498344.1	Smex	$\beta$ -tubulina	426	28-121, 206-284	1-27, 122-205, 285-425
AM398393.1	SmexMA	calmodulina	575	104-238, 365-429	89-103, 239-364, 430-575
AM398392.1	SmeMACBS	calmodulina	575	104-238, 365-429	89-103, 239-364, 430-575
AM398396.1	SalbIA	calmodulina	579	104-240, 367-433	89-103, 241-266, 434-579

NOTA: El nombre clave de los aislamientos usada en los árboles, se construyó con los datos de su procedencia y el tipo de esporotricosis causada. Ejemplo: OaLi: Oa-Oaxaca, Li-esporotricosis linfangítica. El número de pares de bases para las secuencias con porcentajes de calidad por debajo de 50, no está indicado, en su lugar hay -----.

### V.3 Estudio morfológico

#### V.3.1 Morfología macroscópica

Las características macroscópicas fueron registradas a los 21 días de incubación en APD a 30°C. Los datos para cada aislado son mostrados en la **Tabla 9**, y las fotografías se encuentran en la **Figura 25**.

Diámetro de la colonia. El diámetro más pequeño registrado fue de 1.2 cm y el mayor fue de 4.7 cm; el diámetro promedio fue de 3.13 cm con una desviación estándar de 0.74. La cepa ATCC (201681) alcanzó un diámetro de 4 cm.

Color. De acuerdo a su coloración, las colonias fueron agrupadas en pigmentadas y no pigmentadas; 43 aislamientos produjeron colonias pigmentadas y 31 colonias no pigmentadas. Las colonias pigmentadas variaron en los tonos de marrón claro a marrón oscuro; entre las colonias pigmentadas se observó una colonia con coloración gris. Las colonias no pigmentadas variaron también en tonalidad que osciló entre el blanco y el beige. En la **Tabla 9** se encuentra la clave de color que se obtuvo al comparar la colonia con el catálogo de colores PANTONE.

Algo que resulta interesante es que algunas colonias no presentaron un tono uniforme en algunos de los aislados estudiados (ver Figura 25, aislados: 2, 4, 9, 14, 15, 28, 29, 34, 40, 46). En 3 aislados (4,14 y 29) se observa un 1/8 de la colonia con una tonalidad distinta a la que presenta el resto de la colonia, y en dos de estos aislados este fenómeno se observa también en la morfología en AHM (4 y 14). Existen colonias en donde se observan zonas donde pareciera que el hongo está pasando por un proceso de autólisis (14, 40 y 46), entendiéndose este proceso como una autodigestión por factores intrínsecos como el

envejecimiento o extrínsecos como estrés por desecación, falta de nutrientes, incremento en la turbulencia del aire efectos de vibración, los cultivos se mantuvieron bajo condiciones relativamente estables y aun así se encontró este fenómeno.

Textura. La textura o aspecto de las colonias fue variable; el más frecuente fue el veloso que se presentó en 32 aislados, seguido por el aterciopelado en 21, membranoso 8, pulverulento 3 y algodonoso 2.

### **V.3.2 Morfología microscópica**

Las características microscópicas fueron registradas a los 14 días de incubación a 30° C en AHM; fueron evaluados la pigmentación, la forma y el tamaño de los conidios simpodiales y los conidios sésiles. Las características que presentaron cada uno de los aislados se encuentran en la Tabla 9 y el registro fotográfico en el **Figura 25**.

Nueve de los aislados no formaron conidios, sólo presentaron hifas. Por lo tanto la descripción sobre la morfología microscópica hace referencia a 65 aislados (de forma separada se describirá la cepa ATCC).

La presencia de conidios simpodiales se observó en sólo 26 aislados; en su mayoría correspondieron a conidios ovoides hialinos, y en menor proporción a conidios ovoides pigmentados.

Los 65 aislados produjeron conidios sésiles. Se observaron conidios de tres formas predominantes: ovoide, globosa y triangular, los cuales eran pigmentados o hialinos. A pesar de que la mayoría de aislados produjo más de una forma de conidios, 17 aislados dieron origen a conidios de una sola forma: 14 ovoides pigmentados y 3 formaron conidios ovoides hialinos. Veintidós aislados dieron origen a dos formas de conidios: predominando la combinación ovoide y globoso ambos pigmentados, seguida por la combinación ovoide y triangular ambos pigmentados; fueron pocos los aislados que presentaron conidios hialinos ovoides y globosos. Veintitrés aislados formaron conidios con 3 morfologías, predominando la combinación ovoide, globoso y triangular, todos pigmentados. Cuatro aislados solamente formaron conidios hialinos.

El tamaño promedio de los conidios ovoides pigmentados fue de  $3.35 \pm .41 \times 2.3 \pm .31$ , el de los globosos pigmentados de  $2.66 \pm .37 \times 2.57 \pm .39$ , triangulares pigmentados  $3.04 \pm .53 \times 1.93 \pm .61$ , ovoides hialinos  $2.9 \pm .37 \times 1.95 \pm .24$ , globoso hialinos  $2.36 \pm .45 \times 2.17 \pm .27$  y triangulares hialinos  $2 \times 3.6$ . Se realizó un análisis de las características morfológicas de los aislados problema contrastados con las formas clínicas, origen geográficos y distribución en los cladogramas; no se encontró ninguna correlación.

### V.3.3 Reversión a la fase levaduriforme

La mayoría de los aislados revirtieron a la fase levaduriforme, excepto los aislados que solo formaron micelio estéril.

**Figura 25.** Registro fotográfico del estudio morfológico. A continuación se observa la morfología micelial que presentaron los aislados; la primera y segunda columna (A y B) corresponden a la morfología observada a los 21 días de incubación a 30°C en medio APD, la tercera columna (C) corresponde a la morfología observada bajo las condiciones anteriores pero en medio de cultivo HM, y la cuarta columna (D) corresponde a la morfología microscópica en medio HM incubados durante 14 días a 30°C.

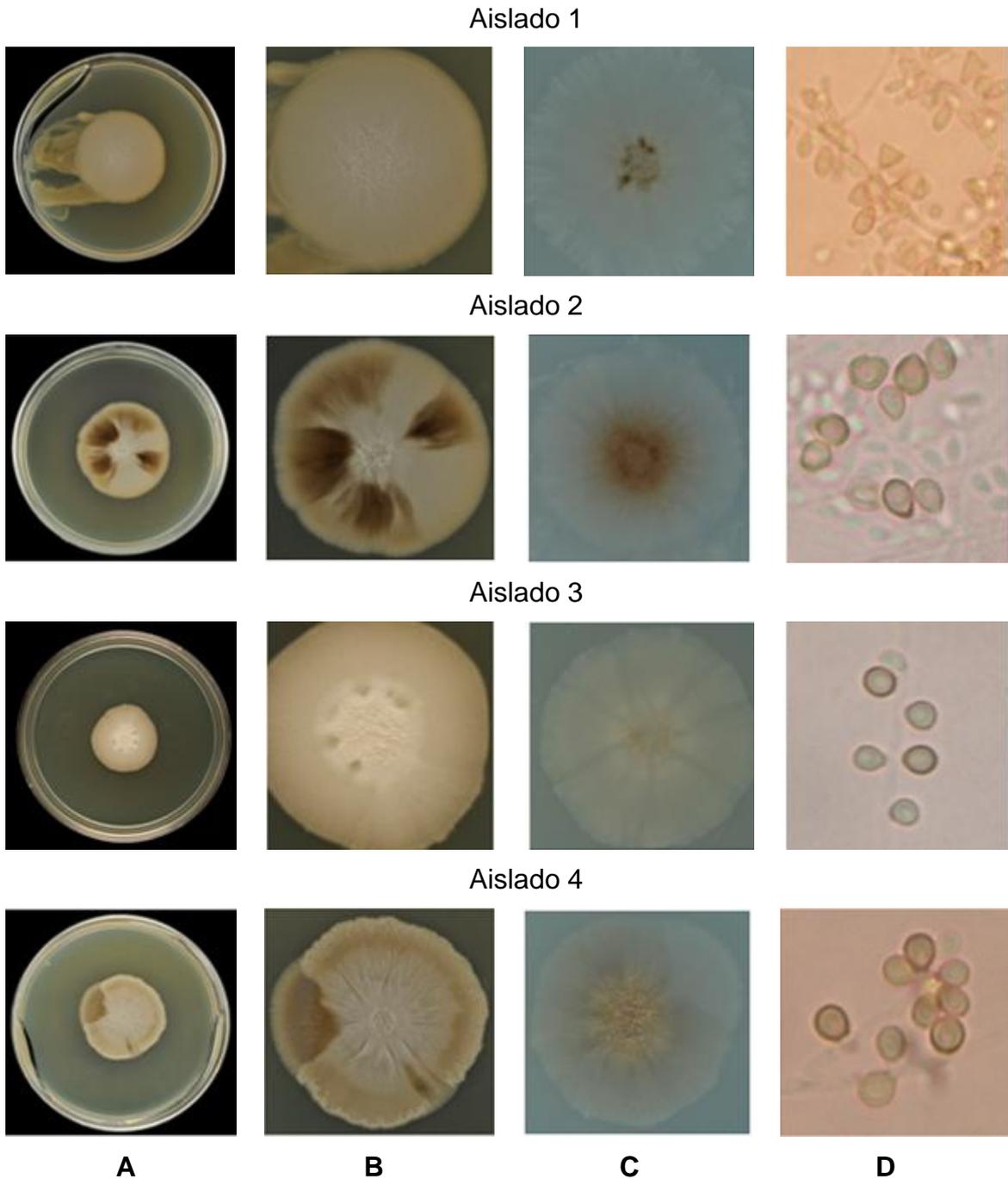
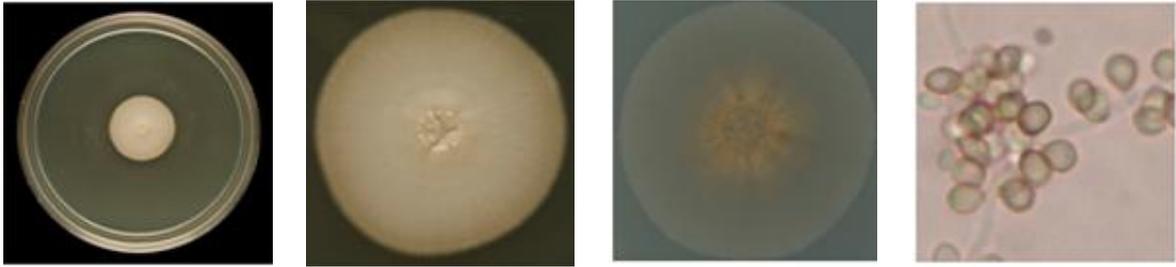
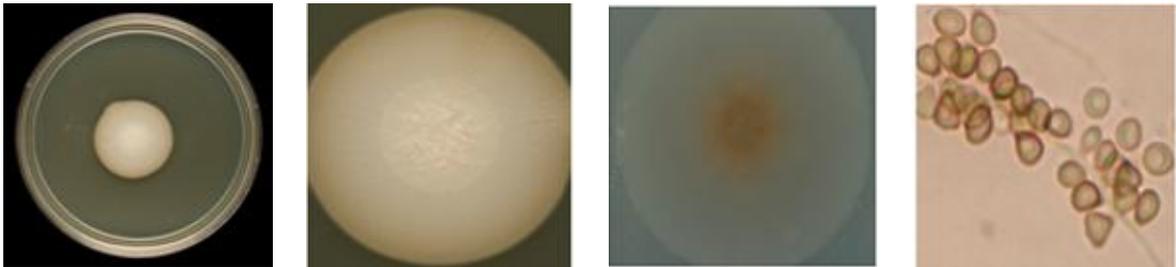


Figura 25: continuación

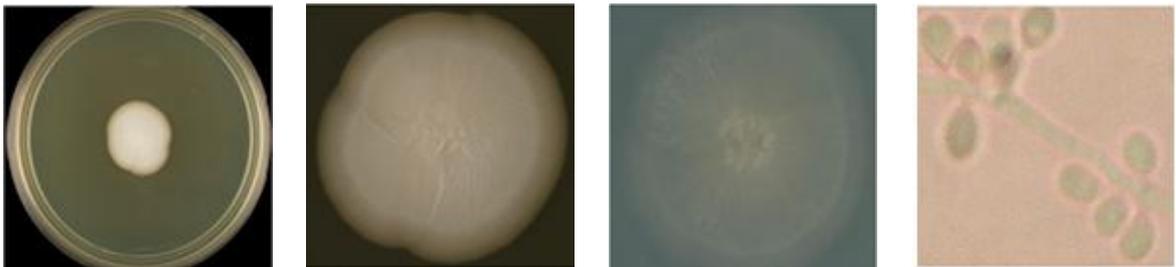
Aislado 5



Aislado 6



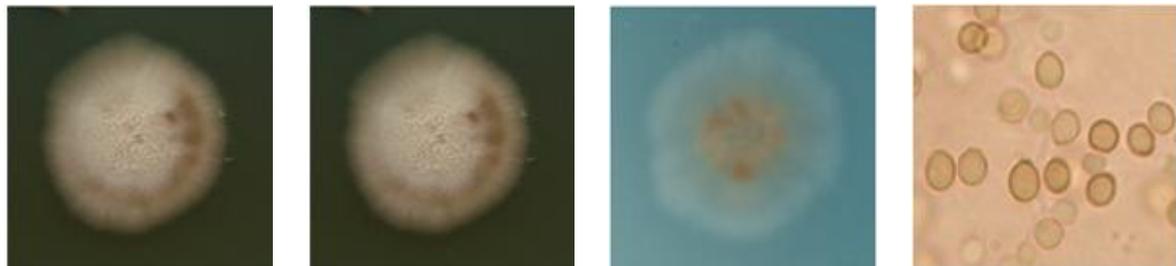
Aislado 7



Aislado 8



Aislado 9



**A**

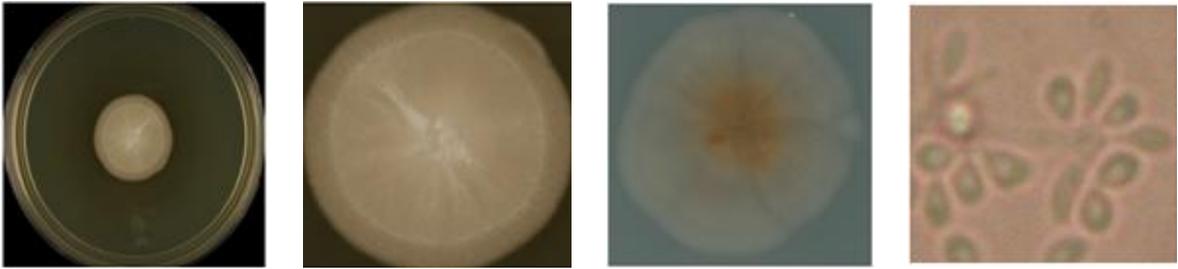
**B**

**C**

**D**

Figura 25: continuación

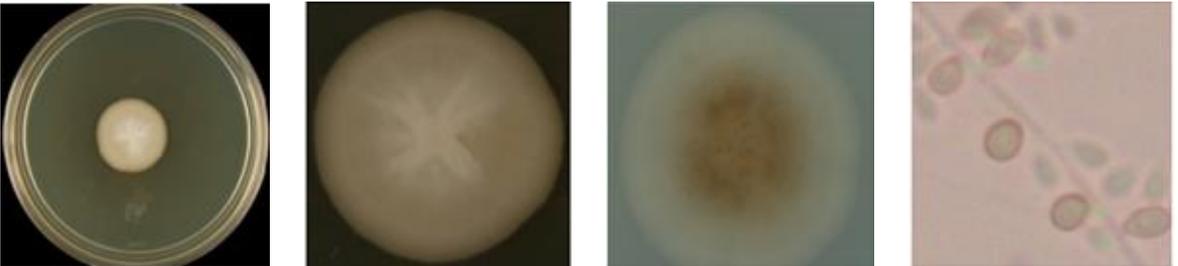
Aislado 10



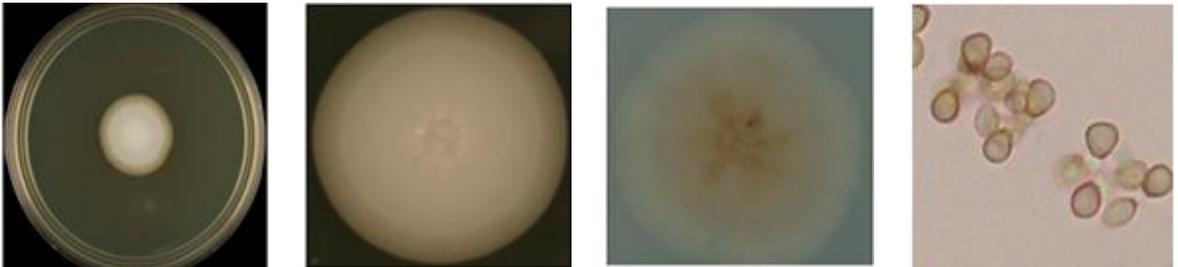
Aislado 11



Aislado 12



Aislado 13



Aislado 14



**A**

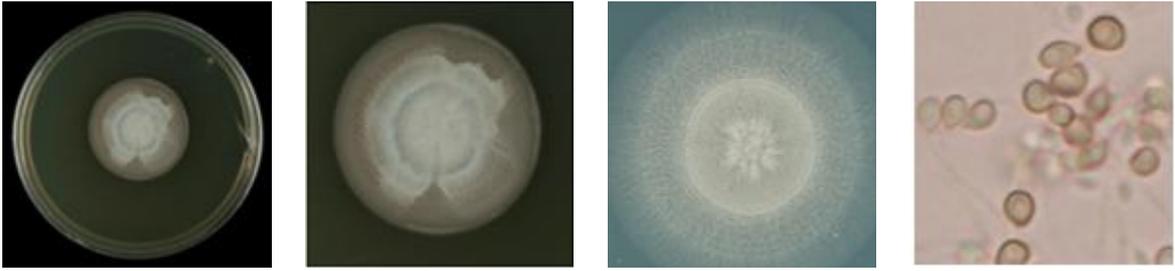
**B**

**C**

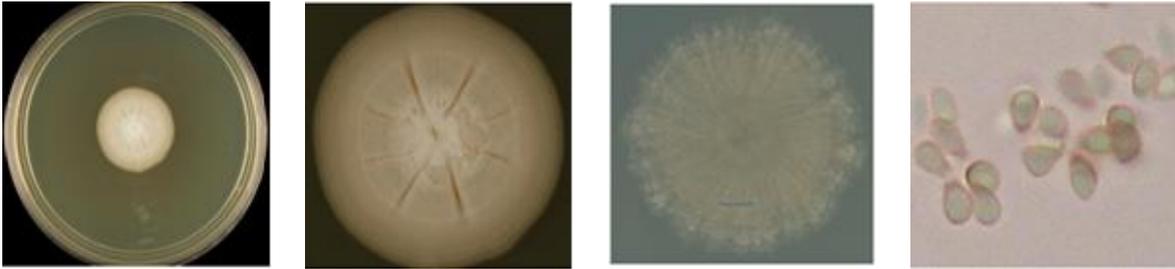
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 15



Aislado 16



Aislado 17



Aislado 18



Aislado 19



**A**

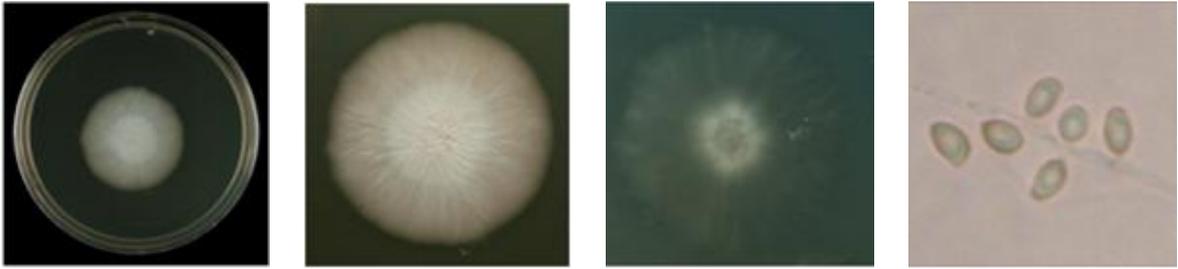
**B**

**C**

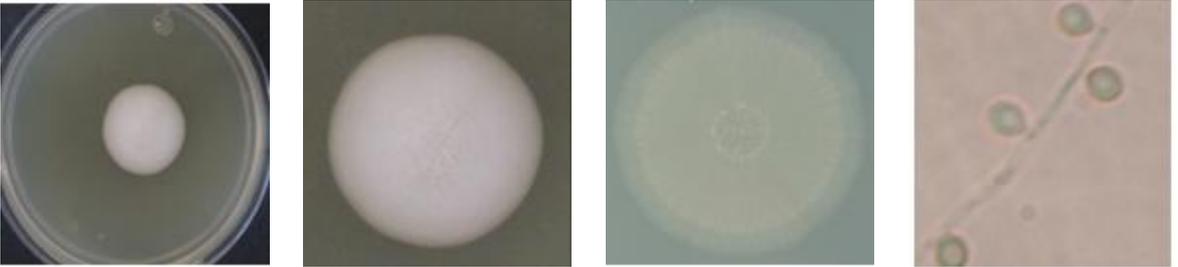
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 20



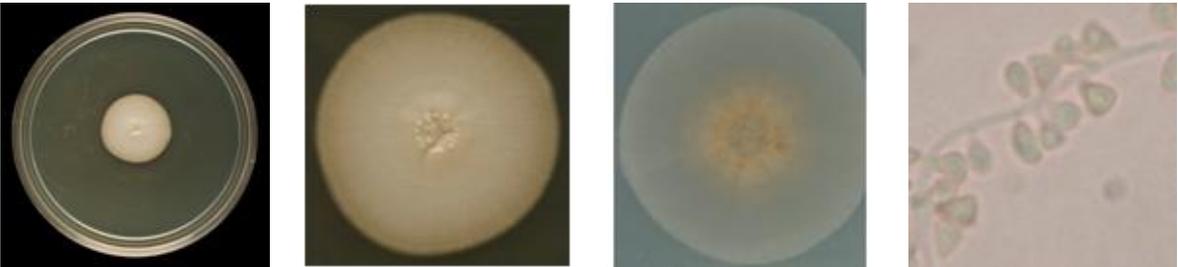
Aislado 21



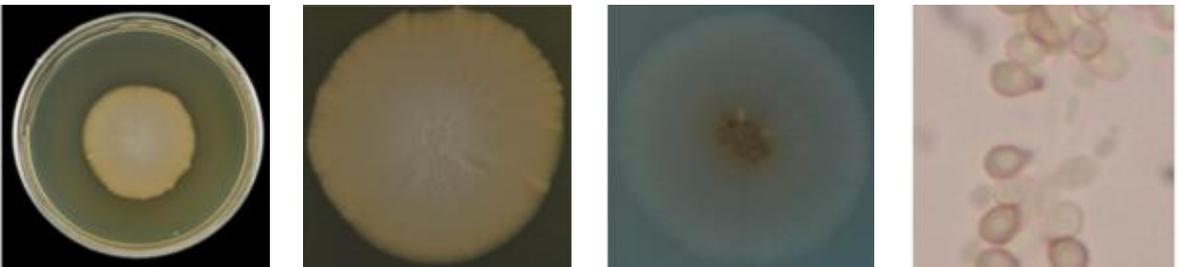
Aislado 22



Aislado 23



Aislado 24



**A**

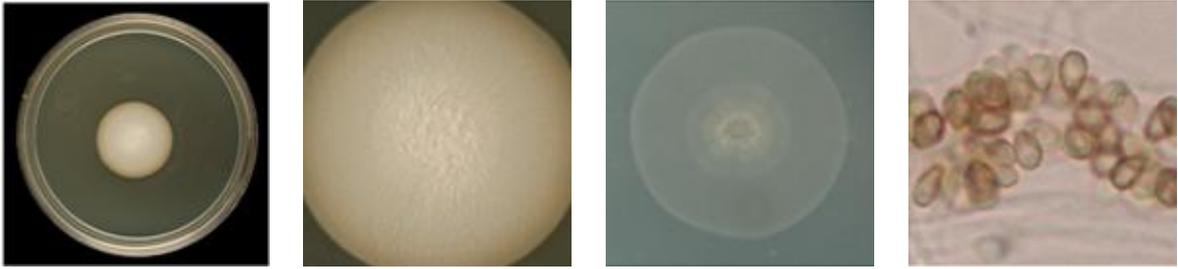
**B**

**C**

**D**

Figura 25: Continuación.

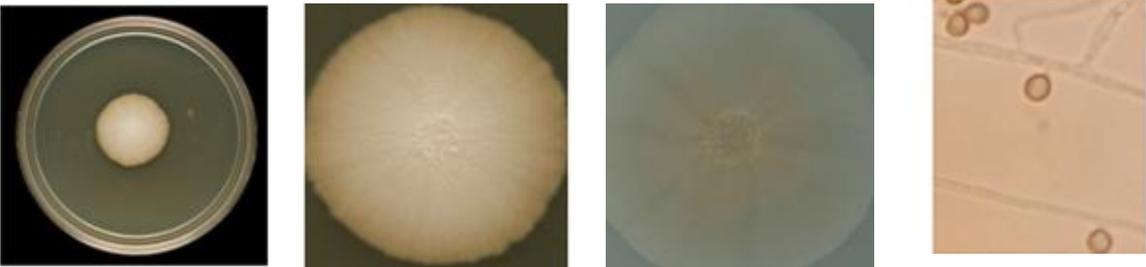
Aislado 25



Aislado 26



Aislado 27



Aislado 28



Aislado 29



**A**

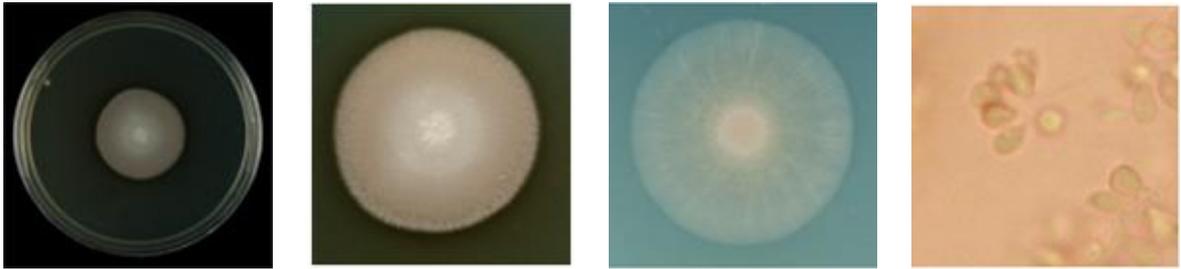
**B**

**C**

**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 30



Aislado 31



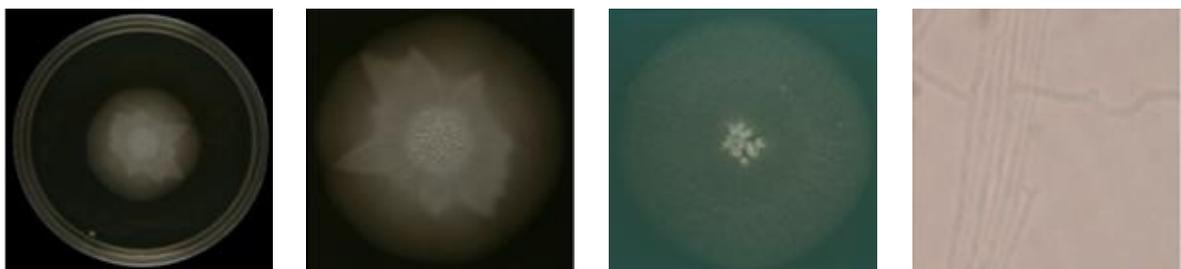
Aislado 32



Aislado 33



Aislado 34



**A**

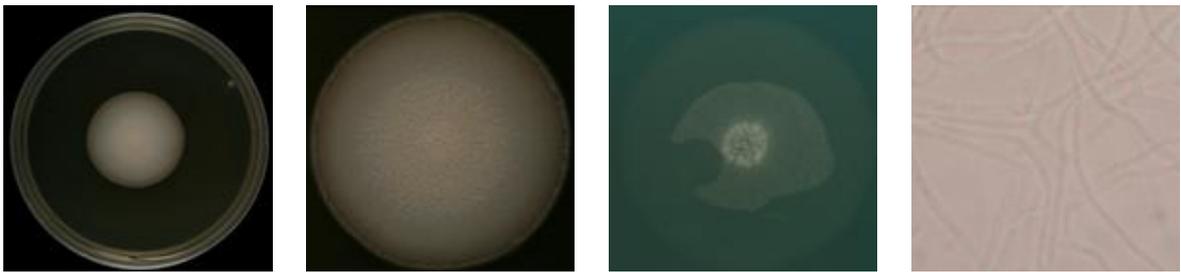
**B**

**C**

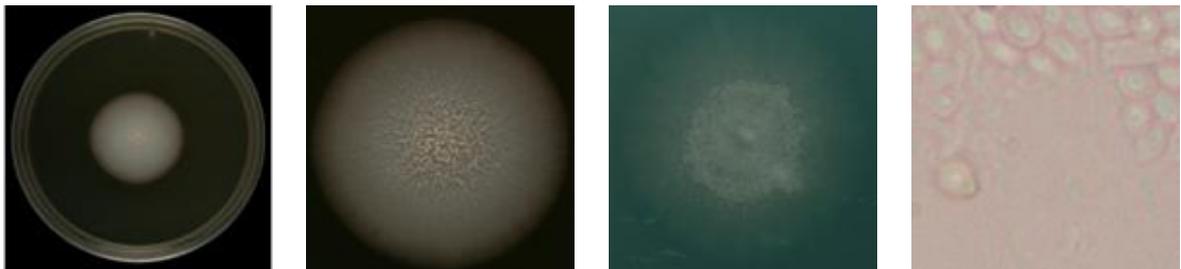
**D**

Figura 25: Continuación.

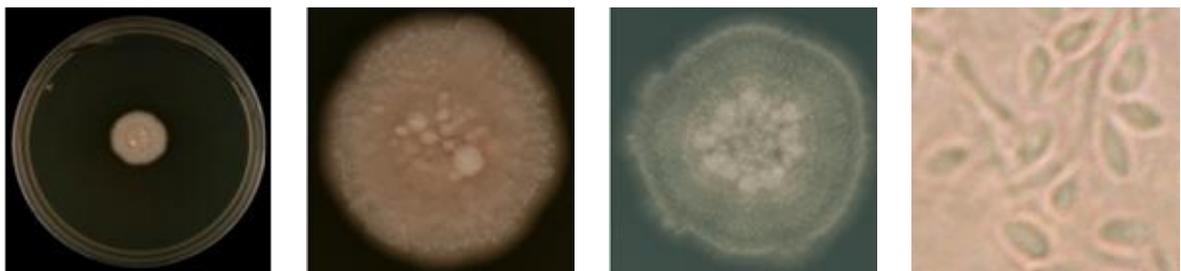
Aislado 35



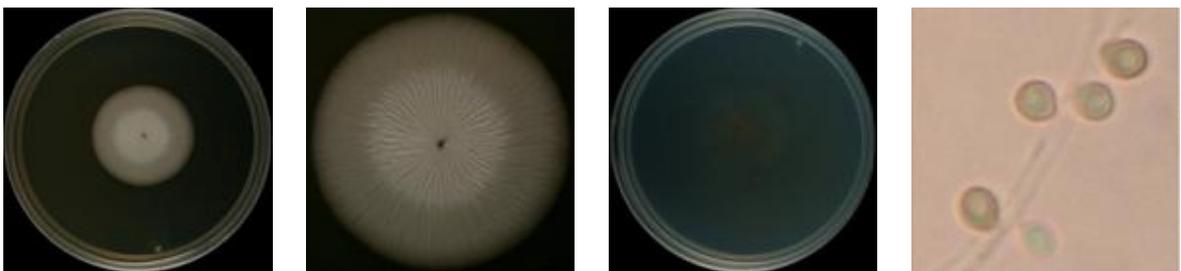
Aislado 36



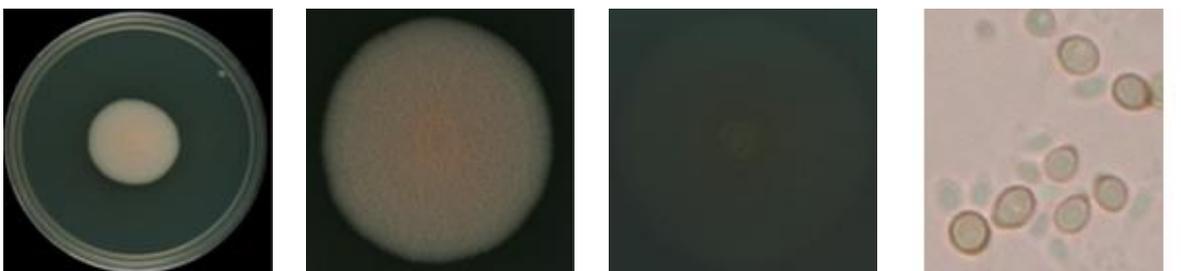
Aislado 37



Aislado 38



Aislado 39



**A**

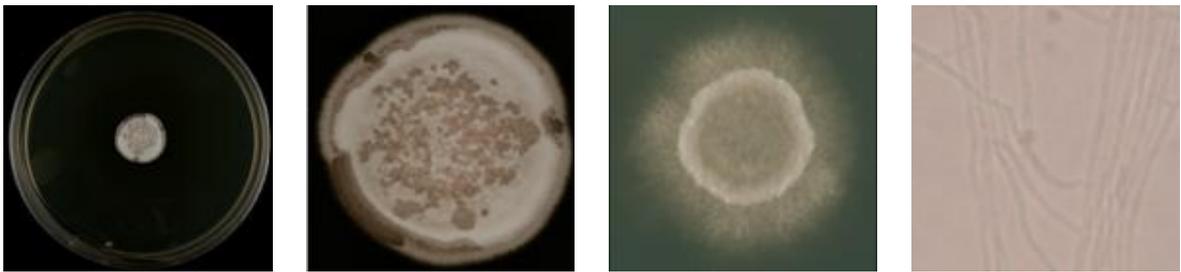
**B**

**C**

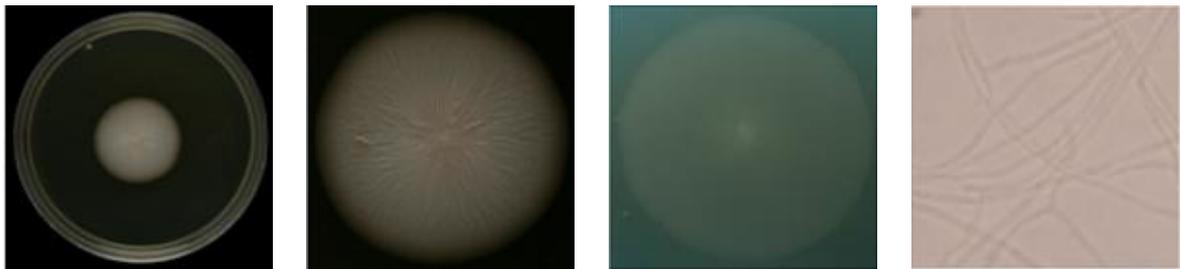
**D**

Figura 25: Continuación.

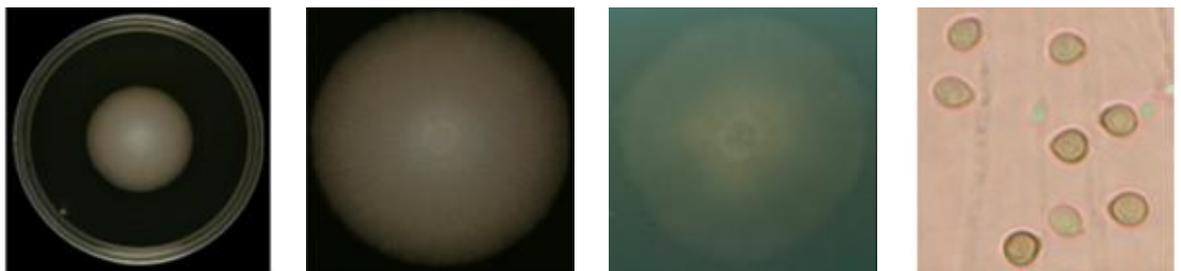
Aislado 40



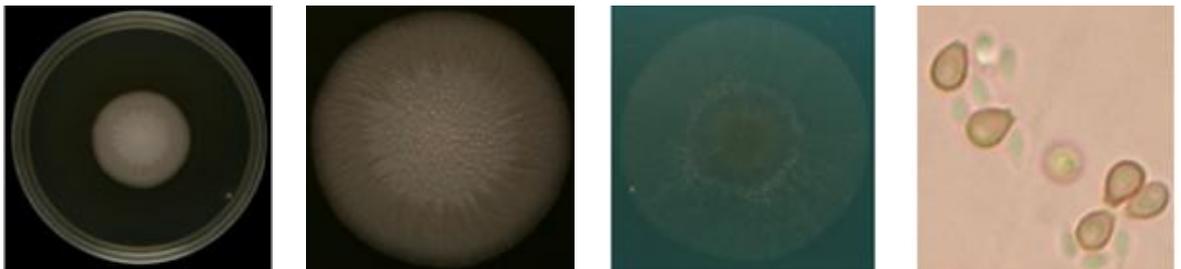
Aislado 41



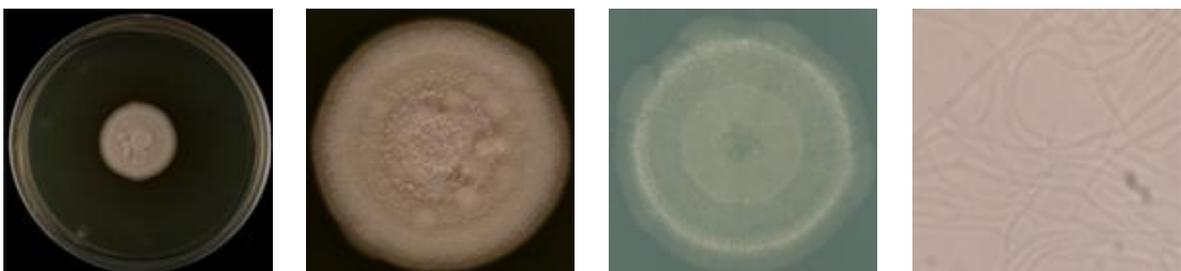
Aislado 42



Aislado 43



Aislado 44



**A**

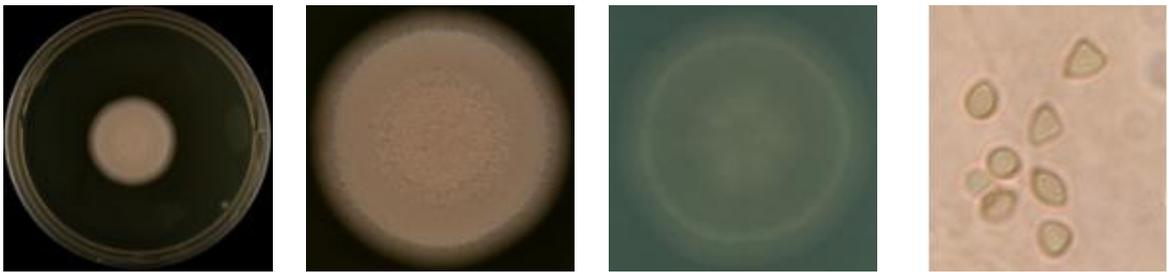
**B**

**C**

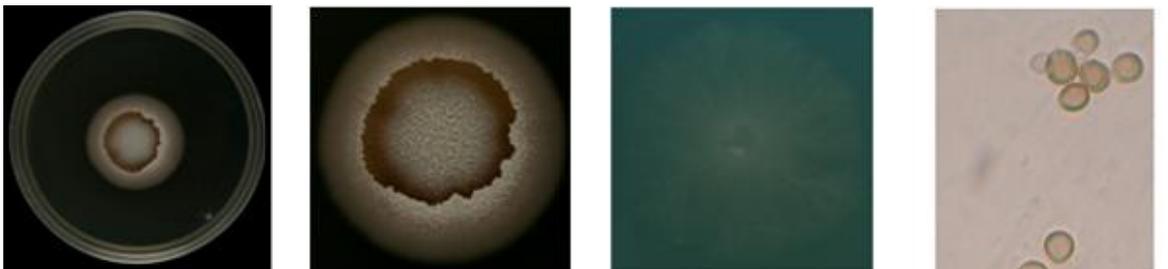
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 45



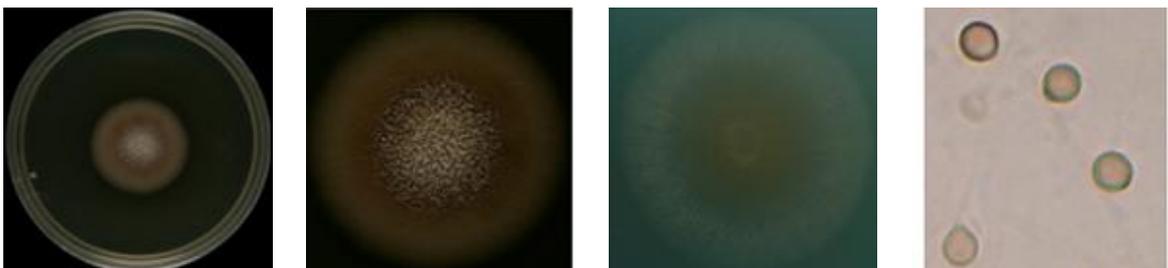
Aislado 46



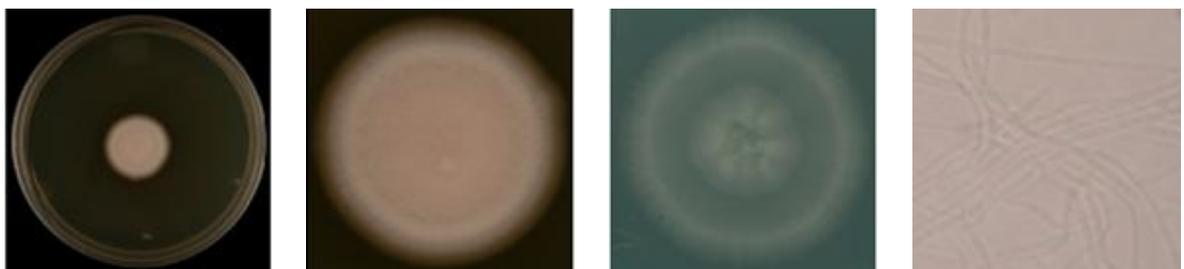
Aislado 47



Aislado 48



Aislado 49



**A**

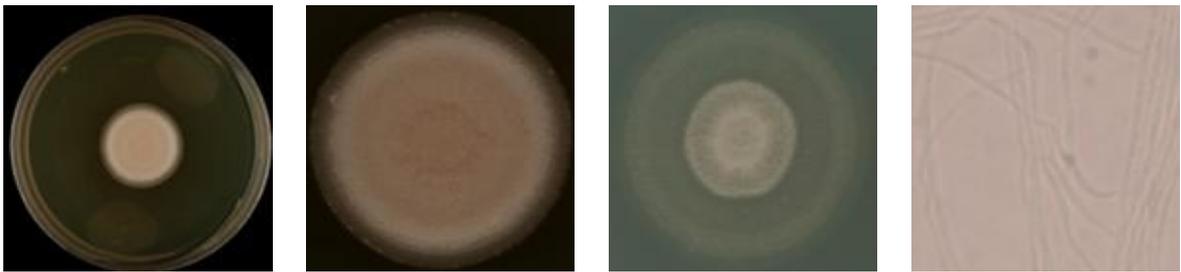
**B**

**C**

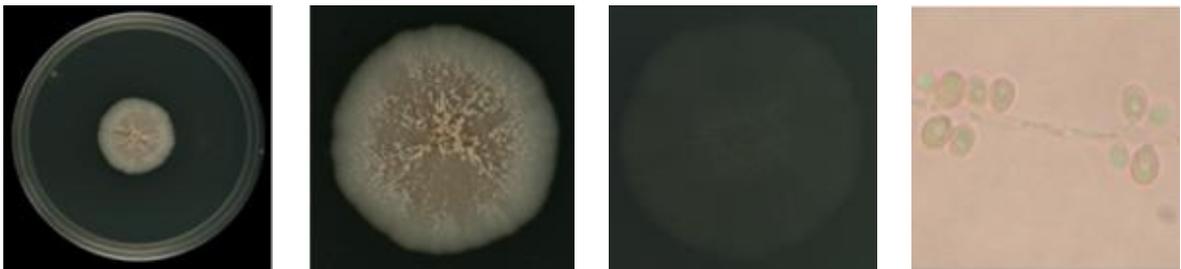
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 50



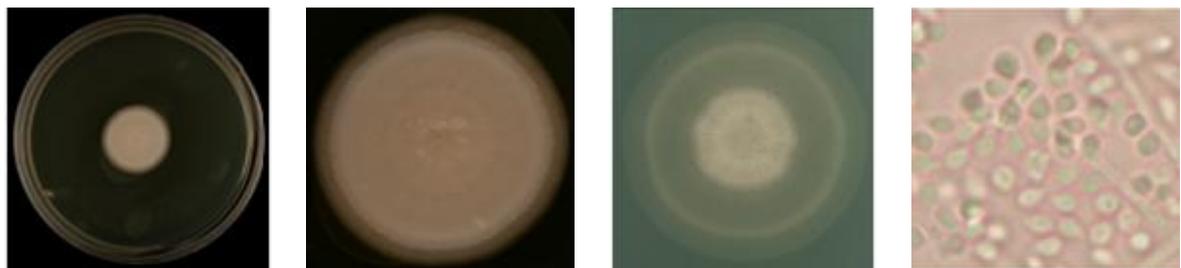
Aislado 51



Aislado 52



Aislado 53



Aislado 54



**A**

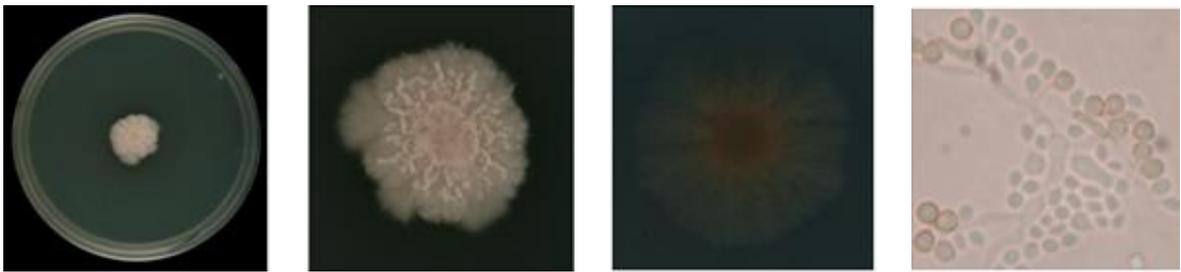
**B**

**C**

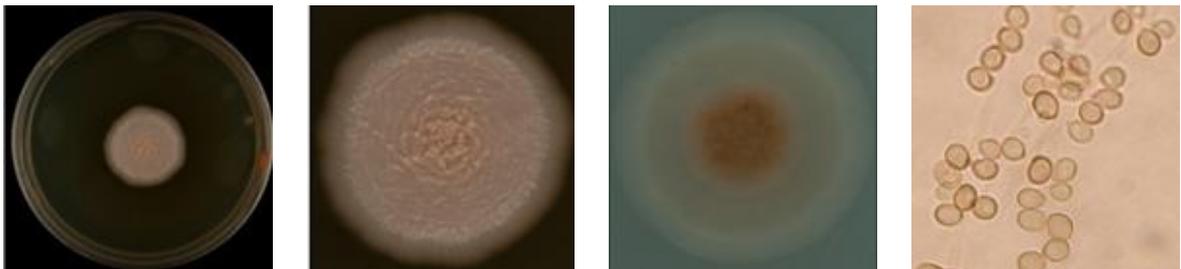
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 55



Aislado 56



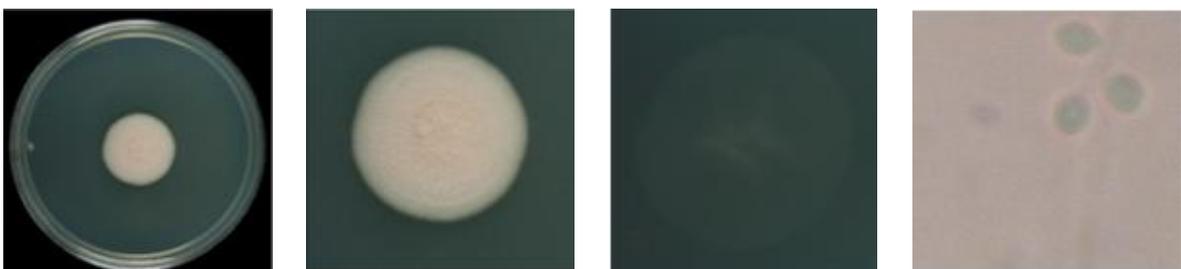
Aislado 57



Aislado 58



Aislado 59



**A**

**B**

**C**

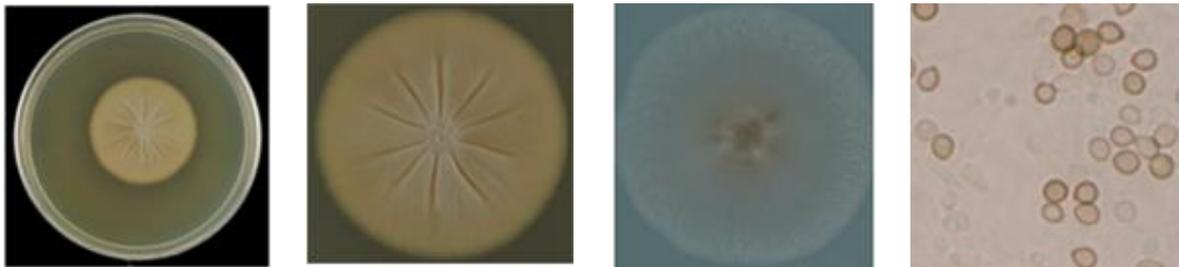
**D**

Figura 25: Continuación.

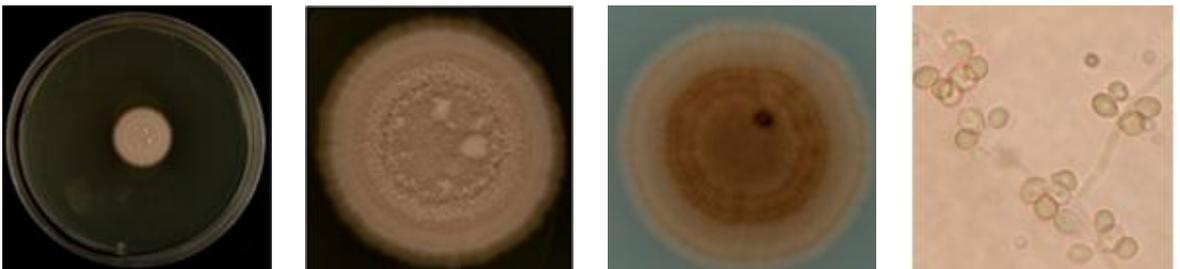
Aislado 60



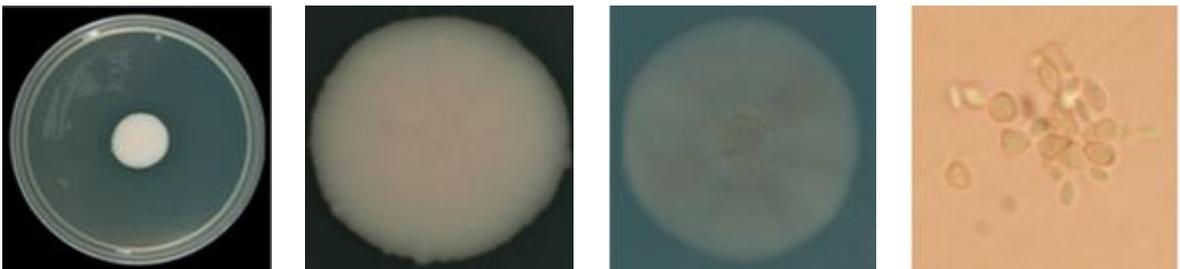
Aislado 61



Aislado 62



Aislado 63



Aislado 64



**A**

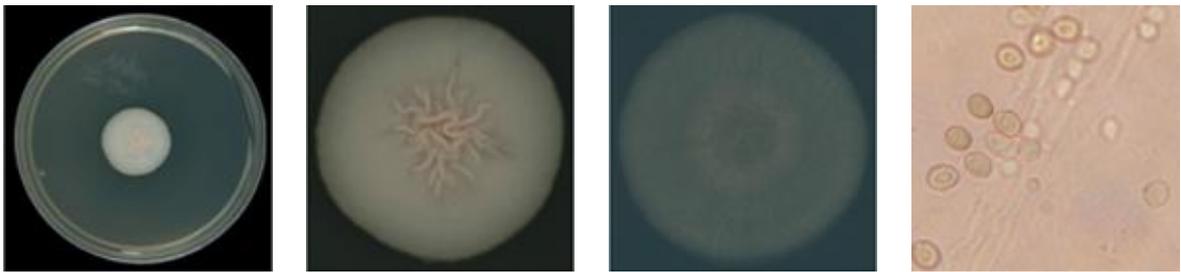
**B**

**C**

**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 65



Aislado 66



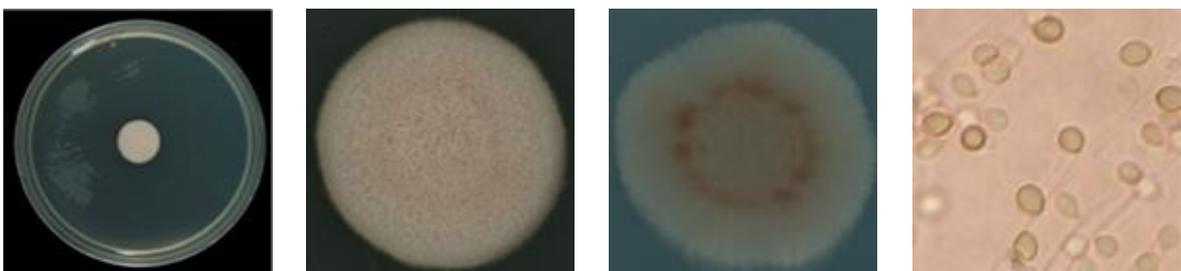
Aislado 67



Aislado 68



Aislado 69



**A**

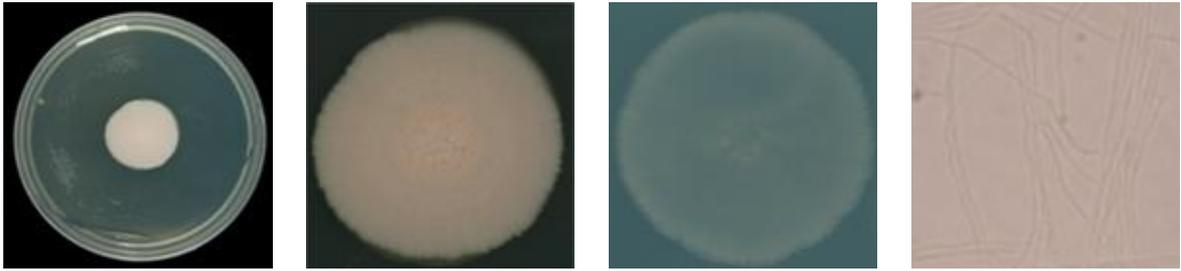
**B**

**C**

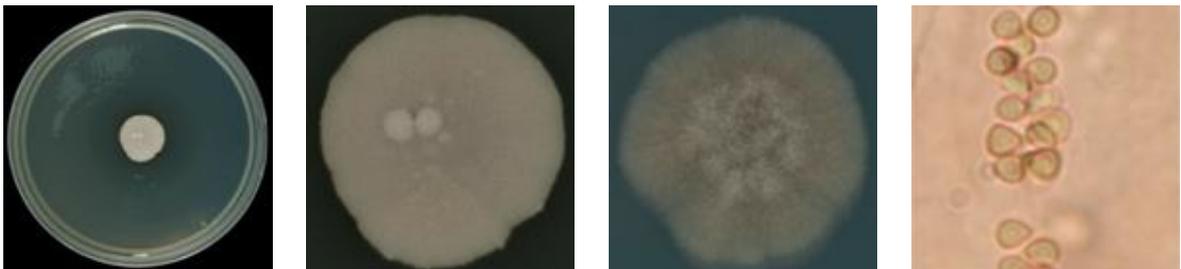
**D**

Figura 25: Continuación.

Aislado 70



Aislado 71



Aislado 72



Aislado 73



Aislado 74



**A**

**B**

**C**

**D**

Figura 25: Continuación.

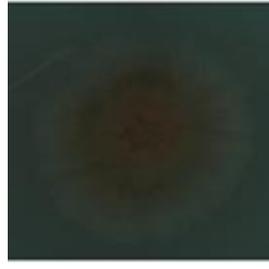
ATCC



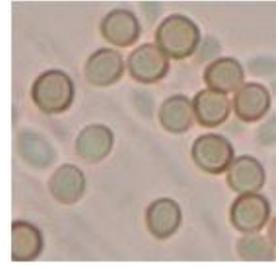
**A**



**B**



**C**



**D**

**Tabla 9.** Características morfológicas.

No. de aislado	Morfología de la colonia (APD)			Pigmento visible en HM	Morfología Microscópica en AHM	
	Color	Textura	Diámetro (cm)		Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
1	Beige (warm gray-01) y un línea marrón (468-U) en la periferia	Membranosa, elevación central	4	Si (++)	Ausentes	<b>OP</b> 3.6 x 2.26 $\pm$ .23 <b>TP</b> 2.26 $\pm$ .2 x .83 $\pm$ .19 <b>GP</b> 2.4 x 2
2	Beige con sectores marrón oscuro (462 U)	Membranosa	4.2	Si (++)	Ausentes	<b>GP</b> 2.32 $\pm$ .17 x 2.24 $\pm$ .21 <b>TP</b> 2.4 x .4
3	Beige con bordes marrón claro(482c)	Velosa con elevación central	3	Si (+)	Ausentes	<b>OP</b> 3.4 $\pm$ .33 x 2.35 $\pm$ .2 <b>GP</b> 2.88 $\pm$ .58 x 2.88 $\pm$ .58 <b>TP</b> 3.2 x 2.05 $\pm$ .5
4	Beige (warm gray-c1), periferia y 1/8 de la colonia marrón claro (466 U)	Elevación central pliegues periféricos	3.6	Si (++)	<b>OP</b> 2.3 $\pm$ .2 x 1.75 $\pm$ .5 <b>Cf</b> 18.4 $\pm$ 13.74	<b>OP</b> 3.2 $\pm$ .56 x 2.34 $\pm$ .27 <b>GP</b> 2.4 x 2.4
5	Centro y borde marrón (468u) el resto beige	Centro crateriforme, membranosa, glabra	2.5	Si (++)	<b>OH</b> 3.08 $\pm$ .33 x 2.25 $\pm$ .38 <b>Cf</b> 10.7 $\pm$ 1.16	<b>OP</b> 3.7 $\pm$ .33 x 2.25 $\pm$ .38 <b>OH</b> 3.12 $\pm$ .36 x 1.9 $\pm$ .44 <b>TP</b> 3.3x 2.38 $\pm$ .11
6	Beige (warm gray1c)	Velosa	2.8	Si (++)	<b>TP</b> 2.05 $\pm$ .58 x 1.2 $\pm$ .58 <b>OP</b> 1.6x .8 <b>Cf</b> 7.8 $\pm$ 1.7	<b>OP</b> 3.45 $\pm$ .32 x 2.47 <b>TP</b> 2.6 $\pm$ .61 x 1.09 $\pm$ .4

Abreviaturas. OP= ovoides pigmentado; GP=globosos pigmentados; TP= triangulares pigmentados; OH= ovoides hialinos;GH= globosa hialina SgP= subgloboso pigmentado. Cf= conidióforos. APD= agar papa dextrosa; AHM= agar harina de maíz.

Tabla 9: continuación

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
7	Blanca (cool gray 1c)	Velosa, húmeda, membranosa	2.5	No	<b>OP</b> 2.4 x 1.8 $\pm$ .23 <b>Cf</b> 20	<b>GP</b> 2.7 $\pm$ .14 x 2.7 $\pm$ .14 <b>OP</b> 3.6 x 2.8 <b>OH</b> 2.53 $\pm$ .23 x 1.86 $\pm$ .3
8	Coloración mixta, beige con marrón (478U, 482 U)	Membranosa y vellosa	3.2	Si (++)	Ausentes	<b>OP</b> 3.8 $\pm$ .28 x 2.8 $\pm$ .23 <b>GP</b> 2.9 $\pm$ .6 x 2.6 $\pm$ .46
9	Mixta marrón claro. Halo beige (420c) con líneas (462 c)	Velosa húmeda	2.4	Si (+++)	<b>TP</b> 3.6x 3.6 <b>OP</b> 3.6x2.4 <b>Cf</b> 10 $\pm$ 2.8	<b>OP</b> 3.5 $\pm$ .39 x 2.4 <b>GP</b> 2.4 x 2.2 $\pm$ .2 <b>TP</b> 2.4 x1.6
10	Mixta marrón (warm gray 2u) con blanco	Aterciopelada	3	Si (+++)	<b>OP</b> 3.6 $\pm$ .56 x 2.4 <b>Cf</b> 7 $\pm$ 1.4	<b>OP</b> 4.25 $\pm$ .7 x 2.15 $\pm$ .29 <b>TP</b> 3.4 $\pm$ .9 x 1.8 $\pm$ .23
11	Beige con halos marrón (481 c)	Centro crateriforme de aspecto aterciopelado	3.7	No	<b>OH</b> 3 $\pm$ .7 x 1.4 $\pm$ .4 <b>Cf</b> 14.6 $\pm$ 2.4	<b>OH</b> 3.2 $\pm$ 1.13 x 2
12	Mixta marrón (warm gray3u) con blanco	Membranosa, vellosa	3.7	Si (+++)	<b>OP</b> 3.4 $\pm$ .28 x 2.4 <b>Cf</b> 9 $\pm$ 1.4	<b>GP</b> 2.5 $\pm$ .32 x 2.4 $\pm$ .25 <b>OP</b> 3.2 x 2.4 <b>TP</b> 2.4 x1.6
13	Beige con borde marrón (warm gray 3u)	Aterciopelada	3.8	Si (+++)	Ausentes	<b>OP</b> 3.9 $\pm$ .47 x 2.4 <b>GP</b> 3.3 $\pm$ .6 x 3.3 $\pm$ .6 <b>TP</b> 3.06 $\pm$ .6 x1.2
14	1/8 de la colonia marrón oscuro (476 U), beige482U	Velosa	3.7	Si (+++)	<b>OH</b> 2 x 1.2 <b>CF</b> 10 $\pm$ 5.6	<b>OP</b> 3.36 $\pm$ .5 x 2.34 $\pm$ .45

Tabla 9: continuación.

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
15	Blanca, beige y marrón (482 C,478 U)	Aterciopelada	4	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.2 $\pm$ .3 x 2.1 $\pm$ .3
16	Mezcla de marrones (warm gray 1c y warm gray 2 c)	Aterciopelada con pliegues radiales.	3	Si (+)	<b>GH</b> 1.8 $\pm$ .28 x 1.8 $\pm$ .28 <b>CF30</b> $\pm$ 14.14	<b>OH</b> 3.36 $\pm$ .5 x 2.15 $\pm$ .2 <b>GH</b> 2.4 $\pm$ x 2.2 $\pm$ .23 <b>TP</b> 3.3 $\pm$ .4 x 2.2 $\pm$ .2
17	Blanca con halo beige (warm gray 1u)	Húmeda, membranosa.	3.7	Si (+)	Ausentes	<b>OP</b> 3.68 $\pm$ .17 x 2.4 <b>GP</b> 3.2 $\pm$ .69 x 2.93 $\pm$ .46
18	Beige con borde marrón 482 C	Centro veloso, periferia membranosa.	3	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.5 $\pm$ .35 x 1.9 $\pm$ .45 <b>TP</b> 3.3 x 1.4 $\pm$ .47
19	Blanca (cool gray), periferia marrón claro 482 U	Velosa	3	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.2 $\pm$ .69 x 2.5 $\pm$ .6 <b>GH</b> 2.1 $\pm$ .46 x 2.1 $\pm$ .21
20	Beige en el centro (warm gray 1u), marrón claro en periferia 482 U	Velosa	4.1	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.4 x 2.3
21	Blanca en centro, periferia marrón claro 482U	Aterciopelada	2.4	No	<b>OH</b> 3 $\pm$ .8 x 2.4 $\pm$ .56 <b>Cf</b> 11 $\pm$ 4.2	<b>OH</b> 2.85 $\pm$ .78 x 2.28 $\pm$ .59 <b>GP</b> 2.2 $\pm$ .23 x 2.1 $\pm$ .2
22	Beige	Velosa, elevación central, borde irregular.	2.4	Si (+)	Ausentes	<b>GP</b> 3.3 $\pm$ .6 x 3.3 $\pm$ .6 <b>OP</b> 3.4 $\pm$ .28 x 2.4 <b>GH</b> 2.4 x 2.4

Tabla 9: continuación

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
23	Beige con borde marrón claro (482 c)	Membranosa, centro crateriforme.	2.7	Si (+)	<b>OH</b> 3.3 x 2.05 $\pm$ .58 <b>Cf</b> 9.8 $\pm$ 3.45	<b>OP</b> 3 $\pm$ .29 x 1.6 <b>GH</b> 1.7 $\pm$ .18 x 1.7 $\pm$ .18 <b>OH</b> 2.4 $\pm$ .09 x 1.6 $\pm$ .13 <b>TP</b> 3.3 x 2.4
24	Centro blanco periferia beige (476-U)	Membranosa con elevación central y pliegues.	3.6	Si (++)	Ausentes	<b>OP</b> 4 x 2.08 $\pm$ .17 <b>TP</b> 4.4 $\pm$ 1 x 3.1 $\pm$ .8 <b>GP</b> 2.1 $\pm$ .14 x 2.1 $\pm$ .14
25	Beige con borde marrón (482c)	Velosa	3	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.6 $\pm$ .68 x 2.4 $\pm$ .25 <b>GP</b> 3.2 $\pm$ 1.13 x 3 $\pm$ .84 <b>OH</b> 3.6 $\pm$ .4 x 2.4
26	Beige con inter zona marrón (warm gray 1u)	Aterciopelada, centro radial.	3.2	Si (++)	<b>OH</b> 2.53 $\pm$ .9 x 1.3 $\pm$ .7 <b>Cf</b> 10 $\pm$ 3.5	<b>OP</b> 3.1 $\pm$ .61 x 1.96 $\pm$ .12
27	Beige con borde marrón claro (warm gray 1U, 481 C)	Aterciopelada	2.8	Si (+)	<b>OH</b> 1.6 x 1.23 <b>Cf</b> 8.2	<b>OP</b> 2.8 $\pm$ .3 x 2 $\pm$ .4 <b>TP</b> 2.7 $\pm$ .29 x 1.6 <b>OH</b> 2.7 $\pm$ .3 x 1.6 <b>GH</b> 2.5x2.5
28	Zonas blancas con zonas marrón oscuro (462U)	Centro pulverulento, periferia vellosa.	4.4	Si (+++)	Ausentes	<b>OP</b> 3.9 $\pm$ .26 x 2.3 $\pm$ .21 <b>GP</b> 2.4 $\pm$ .3 x 2.3 $\pm$ .2 <b>TP</b> 2.4 x 2.4
29	Beige (482c) con una zona marrón (478 U)	Aterciopelada	4.2	Si (+)	<b>OH</b> 2.4 x 1.6 <b>Cf</b> 12	<b>OP</b> 2.34 $\pm$ .46 x 1.75 $\pm$ .8

Tabla 9: continuación.

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
30	Blanca al centro (482c), periferia marrón (478 U)	Velosa	3.8	Si (+)	<b>OH</b> 2.4x1.6 <b>Cf</b> 14	<b>OP</b> 2.9 $\pm$ .67x 2 $\pm$ .3 <b>OH</b> 2.6 $\pm$ .69 x 1.9 $\pm$ .38 <b>TP</b> 3.6 x 2
31	Beige (warm gray )	Velosa con pliegues radiales.	4.3	Si (+)	<b>OP</b> 2.1 $\pm$ .2 x 1.2 $\pm$ .3 <b>Cf</b> 11 $\pm$ 3	<b>OP</b> 2.4 x 1.8 $\pm$ .34 <b>GP</b> 2.26 $\pm$ .23 x 2.3 $\pm$ .23
32	Beige al centro marrón en periferia (478 U)	Velosa	4.7	Si (++++)	Ausentes	<b>OP</b> 3.6 $\pm$ .46 x 2.26 $\pm$ .2 <b>GP</b> 2.45 $\pm$ .35 x 2.28 $\pm$ .44 <b>TP</b> 2.8 $\pm$ .32 x 1.6
33	Centro blanco, periferia marrón (481-U)	Velosa	3.9	Si (++)	<b>OH</b> 2.4 x 1.2 <b>Cf</b> 16	<b>OP</b> 3.6. x 1.2
34	Centro blanco periferia marrón claro (warm gray 5c)	Centro veloso, periferia membranosa.	4.3	No	Ausentes	Ausentes
35	Beige (warm gray 1c), borde marrón (4685 C)	Centro veloso	3.5	No	Ausentes	Ausentes
36	Beige (warm gray 1c), periferia marrón claro (warm gray 5c)	Velosa	3.5	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.5 $\pm$ .5x 2.26 $\pm$ .28
37	Beige (warm gray 1c)	Granular, velosa.	2.1	No	Ausentes	<b>OP</b> 2.7 $\pm$ .55x 1.9 $\pm$ .18 <b>TP</b> 3.6 x 2

Tabla 9: continuación.

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
38	Centro beige (warm gray 2c), periferia marrón claro (warm gray 3c9)	Velosa, plegada	3.6	Si (+)		<b>GP</b> 2.5 <sup>±</sup> .35 x 2.53 <sup>±</sup> .35 <b>OP</b> 3.6 x 2.4
39	Beige (warm gray 1 U)	Velosa, centro elevado.	3.1	No	<b>OH</b> 2.4 x 2 <b>Cf</b> 36 <sup>±</sup> 5.6	<b>OP</b> 3.2 <sup>±</sup> .32 x 2.8 <sup>±</sup> .32
40	Blanca con zonas marrón oscuro "autolisis"	Velosa	1.5	No	Ausentes	Ausentes
41	Beige (warm gray 2c), periferia marrón (warm gray 3c)	Membranosa	3.2	No	Ausentes	Ausentes
42	Beige (Warm gray 2c)	Centro elevado, velosa.	4	Si (+)	<b>OH</b> 2 x 1 <b>Cf</b> 40	<b>OP</b> 3.6 <sup>±</sup> .46 x 2.66 <sup>±</sup> .52
43	Centro blanco, periferia marrón claro (warm gray 3c)	Veloso	3.6	Si (+)	Ausentes	<b>OP</b> 3.5 <sup>±</sup> .4 x 2.7 <sup>±</sup> .4
44	Beige (Warm gray 2c), borde marrón claro (warm gray 3c)	Granular, aterciopelada	2.8	No	Ausentes	Ausentes
45	Beige y marrón claro en la periferia	Pulverulenta, velosa en la periferia.	3.3	No	Ausentes	<b>GP</b> 2.8 <sup>±</sup> .56 x 2.72 <sup>±</sup> .43 <b>OP</b> 3.7 <sup>±</sup> .21 x 2.34 <sup>±</sup> .15 <b>TP</b> 3.7 <sup>±</sup> .23 x 2.4

Tabla 9: continuación

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
46	Tonos mixtos de marrón claro (400 C), y oscuro (463 U) "autolisis"	Velosa al centro	3.6	No	Ausentes	<b>OP</b> 3.76 <sup>±</sup> .2 x 2.4
47	Beige (warm gray 2c)	Centro elevado, pliegues radiales, periferia vellosa	2.4	Si (+)	<b>AH</b> 3.6 x 1.6 <b>OH</b> 2 x 1.6 <b>Cf</b> 18 <sup>±</sup> 2.8	<b>OP</b> 3.12 <sup>±</sup> .52 x 2.32 <sup>±</sup> .43 <b>GP</b> 2.4 <sup>±</sup> .21 x 2.13 <sup>±</sup> .18 <b>TP</b> 3.6x 2
48	Centro marrón claro (warm gray 1c), periferia oscura (warm gray 3c)	Velosa con elevación central	3.7	Si (+)		<b>OP</b> 3.84 <sup>±</sup> .21 x 2.96 <sup>±</sup> .35 <b>GP</b> 3 <sup>±</sup> .74 x 2.9 <sup>±</sup> .63
49	Beige, borde marrón claro	Algodonosa, convexa	2.5	No	Ausentes	Ausentes
50	Beige	Velosa	3.1	No	Ausentes	Ausentes
51	Beige (warm gray 1c)	Velosa, periferia membranosa	2.9	No	<b>OH</b> 2.4 x 1.6 <b>Cf</b> 18	<b>OH</b> 2.57 <sup>±</sup> .63 x 1.62 <sup>±</sup> .29
52	Beige( warm gray 1c)	Velosa con bordes irregulares	3.7	Si (+)	Ausentes	<b>GP</b> 2.75 <sup>±</sup> .24 x 2.44 <sup>±</sup> .24 <b>TP</b> 3 <sup>±</sup> .84 x 2.2 <sup>±</sup> .28 <b>OP</b> 3.6x 2.4
53	Beige	Velosa, centro granular	2.6	Si (+)	Ausentes	<b>OH</b> 2.8 <sup>±</sup> .5 x 1.8 <sup>±</sup> .2

Tabla 9: continuación

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
54	Beige, (centro warm gray 1c; periferia Pantone 406)	Aterciopelada , depresión central	3.2	No	<b>OH</b> 2.4 x 1.6 <b>Cf</b> 8	<b>OP</b> 3.33 $\pm$ .48 x 2.33 $\pm$ .16 <b>TP</b> 3.2 $\pm$ .56 x 3 $\pm$ .84 <b>GP</b> 2.4x 2.4
55	Beige (Cool gray 1u)	Pliegues irregulares, borde irregular	2.8	Si (++)	<b>OH</b> 2 x 1.6 <b>Cf</b> 8	<b>GP</b> 2.35 $\pm$ .14 x 2.2 $\pm$ .28 <b>OP</b> 3 $\pm$ .28 x 2.2 $\pm$ .28
56	Beige	Velosa, húmeda	2.9	Si (++++9)	Ausentes	<b>OP</b> 3.7 $\pm$ .62 x 2.8 $\pm$ .44 <b>GP</b> 3.5 $\pm$ .47 x 3.5 $\pm$ .47
57	Beige (warm gray 1c)	Aterciopelada con gránulos	3.8	Si (+)	Ausentes	<b>OP</b> 3.46 $\pm$ .53x 2.4 $\pm$ .26
58	Beige	aterciopelada	2.8	No	Ausentes	<b>OH</b> 2.9 $\pm$ .9x 2
59	Beige	Aterciopelada	2.2	No	Ausentes	<b>GH</b> 3.07 $\pm$ .14 x 2.15 $\pm$ .29 <b>OH</b> 2. 53 $\pm$ .23 x 2
60	Beige (warm gray 1 U), periferia marrón claro (480U)	Velosa, centro pulverulento	3.9	Si (+++)	<b>OH</b> 3 $\pm$ .84 x 2 <b>Cf</b> 14 $\pm$ 2.8	<b>OP</b> 3.4 $\pm$ .49 x 2.2 $\pm$ .21 <b>GP</b> 3.42 $\pm$ .45 x 3.42 $\pm$ .45 <b>TP</b> 3.2 x 2.05 $\pm$ .5
61	Beige, blanca (warm gray 1U)	Membranosa con elevación central y pliegues radiales	3.8	Si (+)	Ausentes	<b>GP</b> 2.7 $\pm$ .55 x 2.7 $\pm$ .55 <b>OP</b> 2.66 $\pm$ .46 x 2.1 $\pm$ .23

Tabla 9: continuación.

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
62	Beige	Velosa con gránulos	2.2	Si (++++)	Ausentes	<b>OP</b> $3.2^{\pm} .16 \times 2.4^{\pm} .32$ <b>GP</b> $2.5^{\pm} .08 \times 2.49^{\pm} .067$
63	Beige (warm gray 1u)	Aterciopelada, convexa	2.1	Si (+)	Ausentes	<b>GP</b> $2.5^{\pm} .16 \times 2.5^{\pm} .16$ <b>OP</b> $3.2^{\pm} .56 \times 2.2^{\pm} .28$ <b>TP</b> $3.6 \times 2$
64	Beige	Velosa con bordes no uniformes.	2	Si (+)	Ausentes	<b>GP</b> $2.8^{\pm} .56 \times 2.8^{\pm} .56$ <b>OP</b> $3.86^{\pm} .23 \times 2.4$
65	Beige (Warm gray 1C)	Aterciopelada con pliegues al centro	2.5	Si (+)	Ausentes	<b>OP</b> $3.3^{\pm} .83 \times 2$
66	Beige (Pantone 482 U)	Aterciopelada con elevación central y pliegues radiales	3.1	No	<b>OH</b> $2.46^{\pm} .64 \times 1.43^{\pm} .49$ <b>Cf</b> $20.6^{\pm} 3$	<b>OP</b> $3.73^{\pm} .4 \times 2.44^{\pm} .24$ <b>TP</b> $2.4 \times 2.4$
67	Beige (warm gray 2u)	Húmeda con elevación central y pliegues radiales	2.3	Si (+++)	Ausentes	<b>OP</b> $2.95^{\pm} .69 \times 2.03^{\pm} .12$
68	Beige	Plegada, con centro elevado y rugoso	3	No	Ausentes	Ausentes

Tabla 9: continuación.

No. de aislado	Color	Textura	Diámetro (cm)	Si /No	Forma y tamaño de conidios y conidióforo	Forma y tamaño de conidios sésiles (L x A, $\mu\text{m}$ )
69	Beige (warm gray 1U)	Aterciopelada	1.6	Si (++)	Ausentes	<b>OP</b> $3.35^{\pm} .42 \times 2.55^{\pm} .36$ <b>GP</b> $2.4 \times 2.4$
70	Beige amarillenta (warm gray 1U)	Algodonosa, aterciopelada	2.7	No	Ausentes	Ausentes
71	Gris (warm gray 3U)	aterciopelada	1.2	Si (+++)	Ausentes	<b>OP</b> $3.42^{\pm} .6 \times 2.31^{\pm} .17$ <b>TP</b> $2.53^{\pm} .23 \times 2.13^{\pm} .23$
72	Beige con blanco (Pantone 482 U y Pantone Warm Gray 1U)	Aterciopelada con grumos	2.6	Si (++)	Ausentes	<b>OP</b> $2.44^{\pm} .13 \times 1.95^{\pm} .13$
73	Beige (warm gray 1U)	Aterciopelada y plegada	2.3	No	Ausentes	<b>OP</b> $3.12^{\pm} .49 \times 2.24^{\pm} .2$
74	Beige (warm gray 1U)	Velosa	3.7	Si (+++)	Ausentes	<b>GP</b> $2.55^{\pm} .18 \times 2.38^{\pm} .18$ <b>TP</b> $3.01^{\pm} .42 \times 2.42^{\pm} .41$ <b>OP</b> $3.01^{\pm} .47 \times 2.3^{\pm} .43$
ATCC	Beige (warm gray 1c)	Velosa	4	Si (++)	Ausentes	<b>SgP</b> $3.11^{\pm} .48 \times 2.66^{\pm} .43$ <b>GP</b> $2.44^{\pm} .105 \times 2.44^{\pm} .105$

## VI. DISCUSIÓN

En esta sección se comentan algunos de los aspectos más relevantes para este estudio, iniciando con los datos moleculares y su análisis, y terminando con aspectos morfológicos.

### Genes utilizados

La elección de caracteres para el desarrollo de un estudio filogenético es uno de los argumentos de más peso, ya que con base en estos es que se obtienen filogenias o simplemente se agrupan especies que comparten caracteres similares (Wägele, 2004), En este trabajo se eligieron dos genes que ya han sido utilizados para resolver filogenias a nivel específico, por tener mayor información filogenética que otros. Un ejemplo claro de esto se observa en el trabajo de O'Donnell *et al.*, 2000, quienes analizaron la filogenia del complejo *Gibberella fujikuroi* utilizando diferentes genes: rDNA 28S, ITS y cuatro genes codificantes para proteínas (calmodulina,  $\beta$ -tubulina, factor de elongación EF-1  $\alpha$ , y la subunidad menor mitocondrial). Las filogenias mejor resueltas fueron las que se construyeron con los genes codificantes, principalmente calmodulina y  $\beta$ -tubulina. El presente estudio tiene como principales antecedentes los trabajos de Marimon *et al.*, 2006 y 2007; donde utilizan fragmentos de los genes que codifican para la calmodulina,  $\beta$ -tubulina y quitina sintetasa; fue a partir del árbol filogenético más parsimonioso construido con secuencias del gen de la calmodulina que los autores propusieron las especies *S. globosa*, *S. mexicana* y *S. brasiliensis*.

Criseo & Romeo 2010 y Romeo *et al.*, 2011 realizaron filogenias de aislados identificados morfológicamente como *S. schenckii*, utilizando el gen 28S rDNA y el gen de la calmodulina respectivamente; los autores concluyeron que el gen de la calmodulina es más informativo que el gen 28S rDNA. En el trabajo de Cortés-González 2010, fue amplificado un fragmento del gen 28S rDNA de un conjunto de aislados clínicos identificados por morfología como *S. schenckii*; al ingresar las secuencias al Blast se obtuvieron porcentajes de similitud entre el 96 y el 99% con la especie *S. schenckii*. En el presente trabajo fueron incluidos

estos mismos aislados y al realizar la filogenia utilizando las secuencias del gen de la calmodulina se observó que dos de los aislados previamente identificados como *S. schenckii* se agruparon con las especies *S. globosa* y *S. brasiliensis*. Los ejemplos anteriores corroboran que para el estudio del complejo *Sporothrix schenckii* el gen con mayor poder explicativo es el de la calmodulina.

### Secuencias

Respecto a las secuencias se obtuvieron diferencias importantes. Aunque se logró una calidad aceptable para el análisis en 54 secuencias del gen de la calmodulina y en 38 del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina; 52 secuencias (20 para la calmodulina y 32 para  $\beta$ -tubulina) resultaron muy deficientes por lo que éstas no fueron consideradas para el análisis. Aunque el trabajo de secuenciación no se realizó en el laboratorio, se infiere que esta falla se debió a la naturaleza de los primers. Se emplearon primers degenerados, que son un conjunto de iniciadores similares pero no idénticos, y son útiles cuando se trabaja con distintas especies o cuando se amplifican regiones codificantes. La desventaja de utilizarlos es que con frecuencia se generan estructuras secundarias, mismas que interfieren en el proceso de secuenciación. Se realizaron cambios en la marca y naturaleza de la Taq polimerasa; curvas de concentración de oligonucleótidos, de  $MgCl_2$ , cantidad de DNA, kits de PCR, kits de purificación de fragmentos de PCR. La amplificación se llevó a cabo por PCR touchdown; se utilizaron aditivos como el DMSO y la albúmina sérica bovina, que mejoran el rendimiento de la PCR. Con el PCR touchdown y el uso de DMSO no se obtuvieron mejores resultados; se logró una mejoría en la calidad de algunas secuencias al utilizar albúmina sérica bovina. Las condiciones descritas en la metodología fueron las que dieron mejores resultados.

### **Datos filogenéticos**

#### Alineamiento

El alineamiento de las secuencias para un análisis filogenético es un paso de suma relevancia ya que representa la hipótesis de homología a partir de la cual se infiere la filogenia para el grupo en estudio. Es por esto que un alineamiento correcto conllevará a una hipótesis filogenética más acertada, ya que se

comparan los mismos sitios entre las diferentes secuencias. Las secuencias de los aislados incluidos en este trabajo fueron alineadas con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) y con el programa G-blocks (Castresana, 2000); ambos alineamientos fueron sometidos a un análisis filogenético.

En este trabajo se probaron dos algoritmos de alineamiento de secuencias, al someter los dos diferentes alineamientos a análisis filogenéticos. Con ambos algoritmos se observaron resultados similares, excepto en el árbol consenso de las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina cortadas con G-blocks, donde se obtuvo una hipótesis diferente: las secuencias de referencia de las especies *S. schenckii*, *S. globosa* y las secuencias problema se agruparon en un solo clado. Los valores de IC, IR, y Bootstrap de los árboles generados con las secuencias cortadas con G-blocks, fueron más bajos comparados con los estadísticos obtenidos de los árboles generados con los alineamientos completos. El objetivo de ingresar alineamientos al programa G-blocks es eliminar regiones que pueden ser no homólogas o sitios cargados de saturación; el programa elige bloques de la secuencia que cumplen con cierto tipo de requerimientos respecto al número de posiciones contiguas conservadas, como la ausencia de gaps y una baja tasa de cambio en las posiciones que flanquean estas secuencias (Castresana, 2000).

Existen trabajos de inferencia donde se experimenta una mejor resolución de las relaciones filogenéticas al tratar las secuencias con el programa G-blocks; sin embargo, al igual que en este trabajo, hay disminución en los valores de Bootstrap de los árboles construidos con secuencias cortadas con ese programa, a diferencia de los árboles que parten de secuencias completas (Talavera & Castresana, 2007). Los valores bajos de los estadísticos y la falta de resolución del árbol construido con las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina cortadas con G-blocks, posiblemente se relacionen con la pérdida de datos informativos; como se mencionó anteriormente, el programa busca bloques con ciertas características, conserva unos y elimina otros; puede ser que algunos de los bloques eliminados contengan caracteres homólogos y por lo tanto no sean considerados en el análisis, a diferencia de cuando ingresa todo el alineamiento. Este es el primer trabajo en donde se evalúan las relaciones

filogenéticas del complejo *S. schenckii* partiendo de alineamientos procesados con G-blocks y se considera que las hipótesis más correctas son las que parten de las secuencias completas, ya que se resolvieron de mejor manera los clados y se observan valores superiores a 70 en el bootstrap.

#### Análisis filogenético

Para el análisis del gen que codifica para la calmodulina se ingresó un alineamiento de 791 nucleótidos de los cuales 201 caracteres se consideraron parsimoniosamente informativos, un número mayor que los 180 caracteres (para un alineamiento de 685 nucleótidos) reportados en el trabajo de Marimon *et al.*, 2007 y los 160 caracteres (de un alineamiento de 573 pb) en el trabajo de Madrid *et al.*, 2009. Para el gen de la  $\beta$ -tubulina se obtuvo un alineamiento de 473 caracteres, de los cuales 82 fueron parsimoniosamente informativos, contra 37 (de un alineamiento de 410 pb) en el trabajo de Marimon *et al.*, 2006. Es claro que el gen más informativo es el que codifica para la calmodulina. La diferencia en el número de caracteres informativos en este trabajo se debe posiblemente a que se incluyeron secuencias de mayor longitud y con altos porcentajes de calidad; en consecuencia se cortaron pocos nucleótidos de los extremos del alineamiento.

#### Análisis filogenéticos utilizando el gen codificante para la calmodulina

El análisis realizado tanto con las secuencias completas como con el alineamiento generado con el programa G-blocks, generó agrupamientos similares.

Sólo un aislado problema se agrupó con las secuencias de referencia para la especie *S. globosa* lo que representa un 2%. Un resultado similar fue reportado por Madrid *et al.*, 2008 quienes encontraron que uno de 25 aislamientos mexicanos (4%) correspondió a la especie *S. globosa*. Esta es una especie considerada como cosmopolita, aunque hasta ahora estos dos estudios muestran que en México se presenta con muy baja frecuencia.

Los demás aislamientos problema se agruparon con la especie *S. schenckii*, pero dentro de 4 diferentes subclados. Este patrón se repitió en su mayoría en los dos árboles más parsimoniosos (el generado con secuencias completas y el construido con G-blocks). Aunque en su mayoría los subclados se conservaron;

especialmente tuvieron una distribución ligeramente diferente. Los valores de bootstrap, IC e IR fueron más altos en el árbol construido con secuencias completas. Esto indica que mientras más información filogenética se incluye, hay mayor corroboración de los clados.

Análisis filogenéticos utilizando el gen codificante para la  $\beta$ -tubulina

La distribución de los UTOs obtenida mediante el análisis del gen de la  $\beta$ -tubulina fue similar a la observada con el análisis del gen de la calmodulina, para la formación de clados. Sin embargo no se pudo corroborar la formación de subclados pues no se tenían las mismas secuencias para ambos genes. Algo que resulta importante es que para las secuencias en común ambos genes reflejan los mismos resultados en el estudio filogenético (congruencia taxonómica), esto coincide con los resultados de Marimon *et al.* 2006 para *S. schenckii*.

Se construyeron árboles filogenéticos con datos de los genes de la calmodulina y  $\beta$ -tubulina mediante un análisis simultáneo, con aquellos aislados para los cuales se tuvieron ambas secuencias. Y al igual que las filogenias construidas por separado, la mayoría de los aislados se distribuyeron en el clado de *S. schenckii*.

Observaciones morfológicas

Características morfológicas macroscópicas

En cuanto a la morfología colonial obtenida en APD, la mayoría de los aislados presentaron tonalidades marrón claro a oscuro; algunas colonias permanecieron blancas. Muchos aislados presentaron heterogeneidad en la pigmentación, se observaron bandas o sectores más o menos pigmentados que el resto de la colonia. Este polimorfismo fenotípico coincide con el reporte de Vélez *et al.*: 1996, quienes observaron diversos patrones de pigmentación en aislados clínicos de Colombia cultivados en agar malta y agar Mycosel. Por otro lado Ramirez-Gaona 2005 y Cortés-González 2010 también registraron esta variabilidad para aislados mexicanos en agar dextrosa Sabourad. Sin embargo los trabajos que reportan características morfológicas de cultivos de *S. schenckii* en APD: (Mesa *et al.* 2002; Marimon *et al.* 2007; Madrid *et al.* 2009), refieren que la coloración de las colonias varía de blanco a marrón o de

anaranjado pálido a anaranjado grisáceo. Estos autores no reportan heterogeneidad en la pigmentación. Un problema que se presenta frecuentemente al hacer un estudio comparativo con estudios similares es que no se utilizan los mismos términos para hacer las descripciones o no se utilizan herramientas universales para esto. Por tal motivo en este trabajo se decidió emplear la clave de colores PANTONE para que en un futuro sirva de referencia.

La heterogeneidad en la pigmentación que presentaron algunos de los aislados del presente estudio podría explicarse por fenómenos como la heterocariosis, que se refiere a la presencia de núcleos diferentes a consecuencia de anastomosis entre hifas de individuos distintos pero compatibles, proceso durante el cual se transfieren núcleos (Castro-Prado *et al.* 2007). Estos diferentes núcleos se transmiten a la células hijas mediante mitosis sin un proceso de disyunción, y por lo tanto las hijas reflejan la información genética de ambos núcleos, sin embargo la heterocariosis es un proceso poco estable y finalmente a través de generaciones mitóticas subsecuentes las células hijas terminan con material genético de un solo conidio parental y por lo tanto reflejando información genética distinta a la del heterocarionte, este fenómeno ha sido reportado para organismos como *Neurospora crassa*, donde un conidio puede tener más de un núcleo, sin embargo hay hongos como *Aspergillus spp.* en donde la heterocariosis se presenta en las hifas pero no en los conidios ya que sólo pueden albergar un núcleo (Fincham, 2001). La morfología colonial de los aislados 2, 4, 14 y 29 (ver figura 25) podría explicarse por la expresión de uno de los núcleos parentales en una zona a diferencia del resto de la colonia en donde se expresan los genes de ambos núcleos o viceversa. El fenómeno de heterocariosis podría llevarse a cabo en la naturaleza o cuando se recupera a *Sporothrix schenckii* de un paciente infectado. Las personas con esporotricosis generalmente adquieren esta micosis después de una inoculación traumática con conidios que se encuentran en la naturaleza, en donde hay diferentes individuos de *Sporothrix schenckii*. Cuando se recupera al agente causal de la infección, en el cultivo podrían estar presentes dos organismos diferentes pero compatibles y llevar a cabo el proceso de

heterocariosis en el mismo cultivo y generar conidios con núcleos heterocariontes. Cabe mencionar que existen reportes de diagnóstico molecular de esta micosis en donde se ha observado que un paciente puede tener hasta dos cepas distintas de *Sporothrix sp.* causando infección. O bien el individuo podría ser infectado por *S. schenckii* siendo heterocarionte. El fenómeno de heterocariosis solamente se ha observado en individuos haploides, la ploidía de *S. schenckii* no se conoce con exactitud pero se sugiere que podría corresponder a un organismo diploide o incluso aneuploide (Torres-Guerrero *et al.* 1999).

Como se mencionó anteriormente hay evidencia que indica que *S. schenckii* podría ser un hongo aneuploide (Torres-Guerrero *et al.* 1999). La aneuploidía es otra posible explicación a la heterogeneidad morfológica de las colonias de *S. schenckii*. La aneuploidía es una condición en la que un organismo tiene desviaciones en la ploidía normal (número anormal de cromosomas), esto puede ser consecuencia de errores en la mitosis como la no disyunción de cromosomas, y también debido al apareamiento entre células no haploides (Gladfelter & Berman, 2009). Generalmente las células aneuploides pasan a apoptosis, sin embargo se ha observado que ciertos hongos tienen mucha estabilidad en esta condición, y que además esto puede conferirles ciertas ventajas. Se ha observado que el 50% de los aislados de *C. albicans* resistentes al fluconazol tiene aneuploidías de cromosomas completos y de segmentos (Gladfelter & Berman, 2009). En *Aspergillus* se ha observado que es capaz de producir dos pigmentos diferentes en una misma colonia, fenómeno relacionado con la inestabilidad de su ploidía (Gladfelter & Berman, 2009).

De acuerdo al trabajo de Marimon *et al.* (2007) la mayoría de sus aislados crecidos en AHM produjeron pigmento de marrón claro a oscuro, con excepción del clado de *S. albicans* y un subclado de *S. schenckii* en donde dos aislados no produjeron pigmento. En el presente trabajo se observaron colonias con diferentes tonos de pigmento marrón; sin embargo un gran porcentaje no formó pigmento y ningún aislado se agrupó dentro del clado de *S. albicans* en el árbol filogenético. Los aislados problema que se agruparon dentro del clado de *S. brasiliensis* y *S. globosa* produjeron pigmento. En el

clado de *S. schenckii* se observaron aislados con colonias pigmentadas y no pigmentadas. Algunos de estos aislados que no produjeron pigmento en AHM, microscópicamente solo formaron hifas. Al igual que en el medio de cultivo APD, muchos aislados presentaron heterogeneidad en la pigmentación.

*Sporothrix schenckii* es un hongo que tiene plasticidad fenotípica, esta característica se ha observado a lo largo de la historia, en este trabajo se observaron características distintas en los dos medio de cultivo y esto se debe a que este hongo tiene la capacidad de reaccionar de distinta forma ante los diferentes de sustratos en el medio. En otros trabajos se han incluido otro tipo medio de cultivos para el estudio, además de otras variables como temperatura, y se observa que hay una diferencia en las características fenotípicas. Esta plasticidad fenotípica en la naturaleza hace que este tenga oportunidades de vivir bajo diferentes condiciones ambientales, y en el caso de *S.schenckii* que es un patógeno humano, esta plasticidad fenotípica también se ha relacionado con la virulencia.

#### Caracteres morfológicos microscópicos

Las características morfológicas que se sobreponen con la hipótesis filogenética del complejo *S. schenckii*, son la forma y el tamaño de los conidios sésiles, obtenidos bajo las condiciones propuestas por Marimon et al 2007 <sup>(39)</sup>. La cepa de referencia ATCC, 201681, previamente adquirida como *S. schenckii*, se agrupó dentro del clado de *S. brasiliensis* y correspondió morfológicamente con la descripción dada para esta especie <sup>(39)</sup>. Revisando el catálogo de cepas ATCC, se encontró que esta cepa fue obtenida de un paciente en Brasil. El aislado 72 marcado como PueU en los árboles filogenéticos, se agrupó con el clado de *S. globosa* y el estudio morfológico correspondió con la descripción previa <sup>(39)</sup>. En este trabajo la mayoría de los aislados problema se agruparon dentro del clado de *S. schenckii*; las características de los conidios sésiles fue muy variable: se observaron conidios de diferentes formas (triangular, ovoide, ovoide elipsoidal y globoso); algunos aislados presentaron hasta tres formas conidiales en un mismo microcultivo; otros aislados solo formaron micelio estéril.

Debido a la importancia que tiene *S. schenckii* como patógeno del hombre, existen diversos trabajos que se refieren a este. Uno de los aspectos que ha causado más impacto es el polimorfismo morfológico que se ha registrado desde las primeras observaciones como fueron las de Mariat hasta los recientes trabajos Marimon *et al.* (2006, 2007). Una población puede exhibir diferentes formas de un carácter y cuando estas formas se presentan con frecuencias altas se habla de un polimorfismo fenotípico. El trabajo de Mesa-Arango *et al.* 2002, es un claro ejemplo de esto pues se relacionaron medidas del largo de los conidios a diferentes orígenes geográficos, existe un polimorfismo fenotípico asociado al origen geográfico.

A diferencia de las publicaciones de Mesa-Arango *et al.* (2002), O'Reilly & Altman (2006) y Marimon (2007), donde registraron una correlación entre algunos caracteres morfológicos y los moleculares. En este trabajo no se encontró ningún tipo de relación a pesar de que se mapearon en los árboles filogenéticos caracteres como: producción de pigmento en AHM y en APD, forma y tamaño de conidios, presencia de conidióforos, y características clínicas de la micosis como tipo de esporotricosis, y origen geográfico. Por el contrario se observó mucha variabilidad morfológica en todos los subclados de *S. schenckii*.

Por otro lado no se pudieron estudiar las características morfológicas de todos los aislados, debido a que algunos solamente formaron micelio estéril. Se utilizaron medios de cultivo como el Gorodkova y agar avena-sales, que han servido para el estudio de hongos con un alto grado de pleomorfismo como son los dermatofitos, con la finalidad de estimular la conidiación; el resultado fue fallido en todos los casos. Probablemente la ausencia de conidiación esté relacionada con el tiempo de conservación y el número de resiembras en los laboratorios fuente.

## VII. CONCLUSIONES

- En un universo de 74 aislados clínicos de *Sporothrix* spp. La especie predominante como agente causal de la esporotricosis en México es *S. schenckii*, ya que sólo uno de 74 aislados estudiados correspondió a una especie diferente (*S. globosa*).
- Los caracteres morfológicos resultaron insuficientes para establecer una correlación con los clados formados en los árboles filogenéticos.

## VIII. PERSPECTIVAS

Este estudio estuvo enfocado en las características morfológicas y el estudio filogenético realizado con datos de los genes que codifican para la calmodulina y  $\beta$ -tubulina. Sin embargo es necesario realizar estudios basados en la asimilación de azúcares (sacarosa, rafinosa y ribitol) para determinar si los resultados son más informativos que la morfología. Además sería interesante buscar otro tipo de caracteres que no sean de tipo molecular para incluirlos en un análisis filogenético.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arenas R. 2010 Esporotricosis. Una micosis cosmopolita. *Más Dermatol.* 10:22-25.
2. Arrillaga-Moncraeff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, Cano J, Guarro J. 2009. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 15: 651-655.
3. Arvizu-Ramírez F, Valencia-Herrera A, Toledo-Bahena M, Altamirano-Barrera A, Mena-Cedillos CA, Bonifaz A. 2010. Esporotricosis cutánea fija en un adolescente causada por *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*) y revisión comparativa de la bibliografía. *Dermatología Rev Mex.* 54: 295-299.
4. Baba ML, Goodman M, Berger-Cohn J, Demaille JG, Matsuda G. 1984. The early adaptive evolution of Calmodulin. *Mol. Biol. Evol.* 1(6):442-455.
5. Bastos de Lima-Barros M, de Almeida-Paes R, Oliveira Schubach A. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 24(4):633-54.
6. Belknap BS. 1989. Sporotrichosis. *Dermatol Clin.* 7: 193-202.
7. Blin N, Stafford D. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukariotes. *Nucl Acids Res.* 3:2303-2308.
8. Bonifaz A. 2000. *Micología Médica Básica*. Segunda edición. México D.F. Méndez editores S.A. de C.V.
9. Cafarchia C, Sasanelli M, Lia RP, de Caprariis D, Guillot J, Otranto D. 2007. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case Report. *Mycopathol.* 163: 75-79.
10. Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 4: 540-552.
11. Castro-Prado MA, Querol CB, Sant'Anna JR, Miyamoto CT, Franco CCS, Mangolin CA, Machado MFPS. 2007. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. *Genetics and Molecular Research.* 6 (3): 634-642.
12. Conti-Díaz IA. 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathol.* 108: 113-116.
13. Cortés-González EC. 2010. Diversidad morfológica de aislamientos clínicos de *Sporothrix schenckii* y su identidad genética. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 72.
14. Criseo G, Romeo O. 2010. Ribosomal DNA sequencing and phylogenetic analysis of environmental *Sporothrix schenckii* strains: comparison with clinical isolates. *Mycopathol.* 169: 351-358.
15. Crothers SL, White SD, Inrke PJ, Affolter VK. 2009. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *Vet Dermatol.* 20:249-259.
16. Da Rosa DW, Gezuele E, Calegari L, Goñi F. 2008 Asteroid body in sporotrichosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. *Med Mycol.* 46: 433-448.
17. De Meyer E, de Beer W, Summerbell R, Moharran A, de Hoog S, Vismer H, Wingfiel M. 2008. Taxonomy and phylogeny of new wood and soil inhabiting

- Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. Mycol. 100:647-661.
18. De Oliveira-Nobre M, de Ávila-Antunes T, Osório de Faria R, Brum-Cleff M, Gevehr-Fernandes C, Cunha-Muschner A, Araújo-Meireles MC, Ferreira L. 2005. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. Mycopathol. 160: 43-49.
  19. De Oliveira MM, de Almeida-Paes R, de Medeiros Muniz M, de Lima Barros MB, Gutierrez Galhardo MC, Zancoppe Oliveira RM. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: case report. Mycopathol. 169: 359-363.
  20. De Pinna M. 1991. Concepts and test of homology in the cladistics paradigm. Cladistics 7: 367-394.
  21. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, 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.
  22. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. 32(5):1792-1797.
  23. Espinosa-Texis A, Hernández-Hernández F, Lavalle P, Barba-Rubio J, López-Martínez R. 2001 Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. Gac. Méd. Méx. 137:111-117.
  24. Fincham J. 2001. Fungal Genetics. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd. 1-10.
  25. García VA, Mayorga J, Soto OH, Barba JF. 2008 Esporotricosis en niños: Estudio de 133 casos en el Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. Barba Rubio". Med Cutan Ibero Lat Am. 36:18-22.
  26. Gladfelter A, Berman J. 2009. Dancing genomes: fungal nuclear positioning. Nat Rev Microbiol. 12: 875-886.
  27. Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics. 24:774-786.
  28. Gonzáles-Ochoa. 1965. Contribuciones recientes al conocimiento de la esporotricosis. Gac. Med. Méx. 95:463-474.
  29. Hibbet D, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, Mclaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Roders JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schübler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell Leif, Untereiner W, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y-J, Zhang N. 2007 A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 111: 509-547.
  30. Hillis D. 1994. Homology in molecular biology. In: Hall BK. (Comp). Homology the hierarchichal basis of comparative biology. Academic Press, Inc. San Diego, California USA. 339-361.

31. Hiruma M, Kawada A, Ishibashi A. 1991. Ultraestructure of asteroid bodies in sporotrichosis. *Mycoses*. 34: 103-107.
32. Howard DH, Orr G. 1963. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. *J Bacteriol*. 85: 816-821.
33. Ishizaki H, Nakamura Y, Kariya H, Iwatsu T, Wheat R. 1976. Delayed hypersensitivity cross-reactions between *Sporothrix schenckii* and *Ceratomyces* species in sporotrichotic patients. *J Clin Microbiol*. 3: 546-547.
34. Ishizaki H, Wheat RW, Kiel DP, Conant NF. 1978. Serological cross-reactivity among *Sporothrix schenckii*, *Ceratomyces*, *Europhium* and *Graphium* species. *Infect Immun*. 21: 585-593.
35. Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. 2001. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses*. 44: 261-265.
36. Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. 2006. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection *Clin Microbiol Infect*. 12: 1076-1081.
37. Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 299-306.
38. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. *Medical mycology*. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. 707-729.
39. Lavalle-Aguilar P. 1968. Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis. *Mem. IV Cong. Mex. Derm. Tampico, Tamps., México*. pp 5-18
40. Lavalle-Aguilar P, Padilla Desgarenes MC. 2000. Programa de actualización para el dermatólogo. Libro 2 dermatomycología. Esporotricosis. [http://www.galderma.com.mx/pac/Pac2/d2\\_p38.htm](http://www.galderma.com.mx/pac/Pac2/d2_p38.htm) consultado 13/5/2012.
41. Lopes-Bezerra LM. 2011. *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans. *Front Microbiol*. 2:243.
42. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares LR. 2004. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Segunda Edición. México D.F. Editorial Trillas S.A. de C.V. 67-70.
43. López-Romero E, Reyes-Montes MR, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Billagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Toriello C. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol*. 6(1):85-102.
44. Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. 2009. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol*. 26: 218-222.
45. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* Species of Clinical interest. *J Clin Microbiol*. 45: 3198-3206.
46. Marimon R, Gené J, Cano J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 44:3251-6.
47. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol*. 46: 621-625.

48. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. 2008. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:732-734.
49. Marques-Dias N, Evangelista-Oliveria MM, Azevedo-Portela M, Santos C, Zancoppe-Oliveria RM, Lima N. 2011. Sporotrichosis caused by *Sporothrix Mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 17(10):1975-1976.
50. Mayorga-Rodríguez JA, Barba-Rubio J, Muñoz-Estrada VF, Rangel-Cortés A, Garcia-Vargas A, Magaña-Camarena I. 1997. Esporotricosis en el estado de Jalisco, estudio clinico-epidemiológico (1960-1996). *Dermatol Rev Mex.* 41: 105-108.
51. Michel da Rosa A, Scrofernerker M, Vettorato R, Lopes R, Vettorato G, Weber A. 2005. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 52: 451-459.
52. Munguía-Pérez R, Romo-Lozano Y, Castañeda-Roldan E, Velázquez-Escobar MC, Espinosa-Texis A. 2007. Epidemiología de la esporotricosis en el municipio de Huauchinango, Puebla. *Enf inf microbiol.* 27:38-43.
53. Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. 2005. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. *Clin Chem.* 51:35-39.
54. Nixon K, Ochoterena H. 2001. Taxonomía tradicional, cladística y construcción de hipótesis filogenéticas. En: Hernández HM, García Aldrete AN, Álvarez F, Ulloa M (Comps). *Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad.* México. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 15-39.
55. Novales J, Navarrete G, Ramos A. 1995. Esporotricosis. Aspectos histológicos, análisis de 50 casos. *Rev Centro Dermatol Pascua.* 4:149-152.
56. O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience.* 41:61-78.
57. O' Reilly LC, Altman SA. 2006. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 44 :2547-2552.
58. Oliveira DC, Markus-Lopes PG, Spader TB, Mahl CD, Tronco-Alves GR, Lara VM, Santurio JM, Hartz-Alves S. 2011. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol.* 49 (8):3047-3049.
59. Padilla Desgarenes MC, Zuloeta Espinosa de los Monteros E, Novales Santa CJ. 2002. Esporotricosis linfangítica. Presentación de un caso. *Rev Centro Dermatol Pascua.* 11: 130-134.
60. Padilla-Desgarenes MC, Medina-Castillo DE, Cortés-Lozano N. 2004. Esporotricosis en edad pediátrica: experiencia del centro Dermatológico Pascua. *Piel.* 19:350-363.
61. Ramírez-Gaona AY. 2005 Identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Sporothrix schenckii* obtenidos de la naturaleza en el Estado de Puebla. Tesis profesional de Maestría en Ciencias Microbiológicas con orientación en Microbiología Médica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 78
62. Ramos -e- Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. 2007. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 25: 181-187.

63. Rippon JW. 1990. *Micología Médica: Hongos y Actinomicetos Patógenos*. Tercera edición Tr. Castañeda L. Interamericana McGraw Hill. México.
64. Romeo O, Scordino F, Criseo G. 2011. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathol.* 172:179-186.
65. Saúl A, Bonifaz A. 2011. Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. *Dermatología Rev Mex.* 55(4): 200-208.
66. Shadomy H.J, Wang H. 1988. Unusual structures of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathol.* 102: 143-147.
67. Schell WA. 1998. Agents of Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. En: Ajello L, Hay RJ (eds.) *Medical Mycology*. Arnold. Londres. 315-336pp.
68. Schubach A, Barros MB, Wanke B. 2008. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 21: 129-133.
69. Talavera G, Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 4: 564-577.
70. Torres-Mendoza BM, Vázquez-Valls E, González-Mendoza A. 1997. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol.* 14:98-100.
71. Travassos LR, Lloyd KO. 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol Rev.* 44: 683-721.
72. Ulloa M, Hanlin RT. 2006. Nuevo diccionario ilustrado de micología. The American Phytopathological Society. Minnesota. 510-511.
73. Vandamme AM. 2009. Basic concepts of molecular evolution. In: *The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme (eds.). Cambridge University Press. United Kingdom. 3-29.
74. Vélez H, Santamaría L, Vargas ME, Montoya F. 1996. Polimorfismo fenotípico de cepas autóctonas de *Sporothrix schenckii*. *IATREIA.* 9: 71-75.
75. Venadero-Albarrán F, Orellana-Arauco AR, Castrillón-Alcaraz SJ, Bonifaz A, Padilla-Desgarenes MC. 2010. Esporotricosis linfangítica. A propósito de diferentes alternativas de tratamiento. *Dermatología Rev Mex.* 54(3): 145-149.
76. Wägele JW. 2004. Hennig's phylogenetic systematics brought up to date. In: Williams D, Forey P. (Eds). *Milestones in systematic*. CRC Press. Boca Raton, FL. USA.
77. Wägele JW. 2005. *Foundations of phylogenetic systematics: Distance methods*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil. München. 315-317.
78. Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. 2004. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jpn J Med Mycol.* 45: 165-175.
79. Winn RE. 1995. A contemporary view of sporotrichosis. *Curr Top Med Mycol.* 6: 73-94.
80. Zipfel RD, Wilelm de Beer Z, Jacobs K, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in mycology.* 55:75-97.

