



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES CAUSALES DE CROMOBLASTOMICOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MIRIAM ESPINOZA RIVERA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Tsvetanka Dimitrova Dinkova**

VOCAL: **Profesor: Alfonso Rafael Salgado Aguayo**

SECRETARIO: **Profesor: Rigoberto Hernández Castro**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Hugo Antonio Hernández Pérez**

2° SUPLENTE: **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”

ASESOR DEL TEMA:

RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

SUSTENTANTE:

MIRIAM ESPINOZA RIVERA

Dedico este trabajo a:

Mis padres, Aurora y Arturo porque éste es uno
de los tantos resultados de su apoyo y esfuerzo.

Mis hermanos Oswaldo, Pamela y Diana Laura porque nadie
más que ustedes saben lo que significa cumplir esta meta.

A José Angel por formar parte de esta meta desde que se trazó.

Y a la memoria de mis abuelitos Luz, Concha y la Panchita.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química por formarme y forjarme profesionalmente, por brindarme a los mejores profesores, compañeros y amigos.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por la oportunidad de trabajar con él, por compartir sus conocimientos, por su apoyo, paciencia, disposición, dedicación y sobre todo por el tiempo brindado para realizar este trabajo a pesar de sus múltiples obligaciones.

A los profesores Tsvetanka Dimitrova Dinkova y Alfonso Rafael Salgado Aguayo por su apoyo y aportaciones para mejorar este trabajo.

A mis padres Aurora y Arturo por formarnos y proporcionarnos los recursos para recibir una educación superior, por su apoyo eterno e incondicional, por su paciencia, por los sacrificios que realizaron para que esto fuera posible, por cuidarme y siempre creer en mí.

A mis hermanos por toda una vida de experiencias, por el interés y apoyo mostrado en cada paso de esta etapa, porque este triunfo también es suyo y sin ustedes no hubiera sido posible.

A José Angel por todos los detalles que te hacen una persona maravillosa, por apoyarme, entenderme, levantarme, alentarme a seguir y nunca darte por vencido conmigo.

¡Gracias!

Índice

Abreviaturas

1. Resumen.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Cromoblastomycosis (CMB).....	3
Aspectos generales.....	3
Agentes etiológicos.....	4
Características de la enfermedad.....	4
Diagnóstico.....	6
Tratamiento.....	7
2.2 Genes ribosomales	8
3.1 Planteamiento del problema.....	11
3.2 Objetivos.....	12
Generales.....	12
Particulares.....	12
3.3 Hipótesis.....	12
4. Procedimiento.....	13
4.1 Muestras.....	13
4.2 Equipos.....	13
4.3 Reactivos.....	14
4.5 Metodología.....	16
Población estudiada.....	16
Desparafinación de tejido.....	18
Lisis y extracción de DNA.....	18

Amplificación de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S.....	19
Electroforesis en gel.....	20
Purificación del DNA amplificado en gel de agarosa	20
Cuantificación de DNA.....	21
Secuenciación de genes.....	21
Exclusión de muestras.....	22
5. Resultados.....	23
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	42
8. Bibliografía.....	43

Abreviaturas

CMB	Cromoblastomicosis
KOH	Hidróxido de potasio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RNAt	Ácido ribonucleico de transferencia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ITS	Internally Transcribed Spacer Regions
IGS	Intergenic spacer region
ETS	External Transcribed Spacer Regions
RNA pol I	RNA polimerasa I
RNA pol III	RNA polimerasa III
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ml	Mililitros
μl	Microlitros

mg	Miligramos
ng	Nano gramos
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
°C	Grados Celsius
SDA	Agar dextrosa Sabouraud
TAE	Tris-ácido Acético-EDTA
DNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
PHM	Feohifomicosis

1.0 RESUMEN

La Cromoblastomicosis (CMB) es una infección fúngica rara, subcutánea y cutánea crónica, ocasionada por inoculación traumática de hongos dematiáceos, su distribución es mundial con mayor prevalencia en climas tropicales y subtropicales, afecta piel y tejido celular subcutáneo principalmente de extremidades inferiores en adultos varones de cualquier grupo étnico que realizan trabajos rurales, es causada principalmente por los géneros: *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Rhinocladiella* y *Exophiala*, denominados hongos saprofitos que habitan el suelo, plantas, flores y madera en descomposición. Su diagnóstico se basa en observar células muriformes por examen directo con KOH o hematoxilina-eosina, y cultivo micológico. El tratamiento puede ser mediante el uso de itraconazol y/o terbinafina, más tratamiento físico y cirugía. Es una enfermedad crónica y por lo tanto difícil de tratar y erradicar por lo que se han buscado procedimientos más rápidos, sensibles y específicos para su diagnóstico. El objetivo de este trabajo es identificar los agentes causales de Cromoblastomicosis, de muestras de pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González mediante la amplificación y secuenciación de regiones ITS1-2 del DNAr, con el fin de conocer cuáles son las especies que afectan a la población mexicana.

Los resultados indican que *Fonsecaea pedrosoi* es el principal agente de CMB en México, de igual forma identificamos hongos dematiáceos nunca descritos en población mexicana como *Fonsecaea monophora*, *Cladosporium*

cladosporoides y *Cladosporium oxysporium* que son poco comunes o extremadamente raros de encontrar como causantes de esta patología.

Asimismo, se lograron identificar 5 casos con infección mixta de *F. pedrosoi* y *Candida parapsilosis*.

En conclusión, se identificó y diferenció el género y especies presentes en las muestras diagnosticadas con CMB, así como una infección mixta en 5 casos; por métodos moleculares basados en la alineación de secuencias DNAr e ITS usando los iniciadores universales ITS1 e ITS4.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 CROMOBLASTOMICOSIS (CMB)

ASPECTOS GENERALES

Esta enfermedad micótica es conocida como cromomicosis, micosis de Carrion, micosis de Lane-Pedroso, dermatitis verrucosa y blastomicosis negra (20). Es una infección fúngica, rara, cutánea y subcutánea crónica, ocasionada por inoculación traumática de hongos dematiáceos (hongos cuyas paredes contienen melanina que les imparten color negro) (40). Esta micosis fue descrita en 1911 por Pedroso y Gómez quienes la denominaron como una “dermatitis verrugosa de origen infeccioso” en la ciudad de Sao Pablo, Brasil; en 1915 Lane y Medlar reportaron el primer caso en EE. UU. De Norteamérica y en 1935 la enfermedad fue nombrada cromoblastomicosis por Moore y Almeida (20, 38). Su distribución es mundial, sin embargo, muestra mayor prevalencia en climas tropicales y subtropicales como México, Costa Rica, Puerto Rico, Cuba, Venezuela, Brasil, India, Australia, aunque también se han descrito casos en Europa y Estados Unidos (12, 25).

Afecta piel y tejido celular subcutáneo principalmente de extremidades inferiores y áreas de la piel que no están protegidas por la ropa (40), se presenta en cualquier grupo étnico, afecta a adultos entre 30 y 60 años, predominantemente a varones que realizan trabajos rurales, quienes adquieren la infección por inoculación traumática; así como a pacientes inmunosuprimidos que están bajo tratamiento con corticoesteroides, con Diabetes mellitus, receptores de trasplantes, y pacientes con enfermedades infecciosas crónicas entre otras. Es rara en mujeres y niños menores de 15 años (12).

AGENTES ETIOLOGICOS

Los agentes etiológicos productores de esta micosis subcutánea pertenecen principalmente a los géneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella* y *Exophiala*. Taxonómicamente este grupo de hongos se clasifican en la división *Ascomycota*, clase *Euascomycetes*, orden *Chaetothyrales* y familia *Herpotrichiellaceae* (40). De estos agentes, el agente más común es *Fonsecaea pedrosoi* seguido por *Phialophora verrucosa* y *Cladophialophora carrionii*, que es el hongo más importante como causal de esta enfermedad en desiertos (12). Estos son hongos de crecimiento lento, baja virulencia y una alta tolerancia al calor (40-42°C), habitan el suelo, plantas, flores y madera en descomposición, denominados hongos saprofitos de pigmento pardo (25, 38, 40,38).

CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad se origina por inoculación traumática; se desarrolla en forma lenta y tiene un curso crónico, por lo que el traumatismo puede haberse producido mucho tiempo antes de que la lesión aparezca, gracias a que las formas infectantes implantadas pueden persistir latentes durante largos periodos. La infección es limitada a piel y tejido celular cutáneo y subcutáneo, rara vez llega a diseminarse por vía linfática y comprometer estructuras óseas, siendo estas presentaciones más comunes en pacientes inmunosuprimidos y es de difícil tratamiento (12).

Clínicamente, inicia como una lesión pequeña, pápula o nódulo eritematoso, elevado, unilateral, pruriginoso, puede ser doloroso o asintomático, que se extiende lentamente en la piel adyacente (12). Se caracteriza por lesiones nodulares (su

presentación más común), seguida de la forma verrucosa. Con el tiempo las lesiones se tornan secas y costrosas con el borde elevado mostrando las formas tumorales y en placa (8, 38). Con frecuencia las grandes placas presentan cicatrización central mostrando lesiones cicatrízales. En ocasiones cuando la infección ha durado por mucho tiempo, las lesiones se tornan pedunculadas y adquieren un aspecto de coliflor (40). Generalmente la lesión es indolora, y en las etapas iniciales no produce molestias, lo que hace que los pacientes no se preocupen por atenderse.



Figura 1. Lesión de cromoblastomycosis en el brazo derecho con placas verrucosas, con un tiempo de evolución de 25 años (32).

La respuesta inmune está mediada por neutrófilos y macrófagos causando procesos granulomatosos. Los macrófagos no son capaces de destruir las células fúngicas fagocitadas y éstas se desarrollan en su interior (33, 40). Durante el proceso de infección se están produciendo constantemente anticuerpos anti-melanina, ya que la melanina es un factor de virulencia del hongo. Este pigmento interfiere con la activación del complemento, causando autoinmunidad lo que contribuye a la persistencia del hongo en el tejido y a la disminución de la susceptibilidad del hongo a los agentes antimicóticos; por otro lado, protege indirectamente al hongo de los

radicales libres y el subsecuente daño oxidativo. Este mecanismo no permite que los macrófagos u otras células fagocíticas eliminen los elementos del hongo explicando así el curso crónico (9, 12, 33).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se basa en el examen directo y cultivo. En el examen directo al microscopio óptico con KOH al 10 o 20 % se observan las formas parasitarias: células fumagoides, escleróticas o muriformes signo patognomónico de la enfermedad, son células de aproximadamente 6-12 μm de diámetro, de color marrón, paredes gruesas, con una doble membrana y un tabique central (similar a los granos de café) que pueden encontrarse solas o agrupadas. En algunos casos pueden encontrarse hifas pigmentadas. Estas células son fácilmente identificadas en tejidos teñidos con hematoxilina-eosina siendo innecesarias las tinciones especiales (Figura 2) (20, 33, 38).

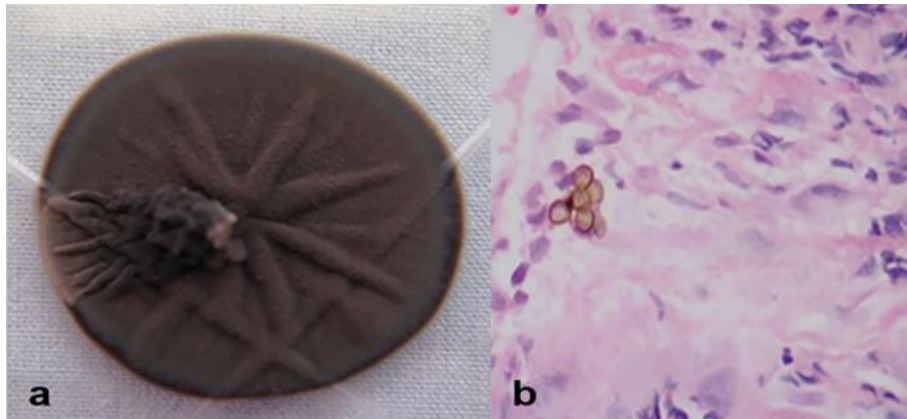


Figura 2. [a] Colonia de hongos dematiáceos en SDA de la muestra 144a con 4 semanas de crecimiento. [b] Células fumagoides (32).

Todas las especies tienen las mismas características en los cultivos, son colonias de crecimiento lento (25 a 30 días), sobre elevadas, con algunos pliegues, radiadas, aterciopeladas o vellosas, con tonalidades oscuras (color negro-ocre, negro-verdosas, negro-negro, marrón-oscuro o verde olivo) (Figura 2) (11). Los agentes productores de CMB crecen en medio de agar dextrosa Sabouraud (SDA) no son inhibidos por la cicloheximida ni por el cloranfenicol y se incuban durante 4-6 semanas a 28°C, manifestándose el crecimiento a los 10 días y alcanzando todas sus características a los 30 o 40 días. En contraste, las especies dematiáceas saprófitas del suelo tienen un desarrollo no tan lento (12, 38).

TRATAMIENTO

Es una enfermedad crónica y por lo tanto difícil de tratar y erradicar. La tasa de éxito de la terapia depende del agente etiológico, la severidad de la enfermedad y del medicamento antifúngico (12). En consecuencia, no hay un tratamiento de elección para esta micosis, sino más bien una serie de opciones terapéuticas. El tratamiento se puede dividir en tres tipos; tratamiento físico que incluye cirugía, terapia con calor y criocirugía, tratamiento farmacológico y terapia combinada. En las primeras etapas de la enfermedad, las lesiones responden a la extirpación quirúrgica, pero a medida que aumenta la gravedad, se obtienen mejores resultados con terapia combinada (8, 33).

El tratamiento farmacológico actualmente incluye el uso de itraconazol y/o terbinafina debido a que son los antifúngicos más efectivos y seguros contra los agentes causales de CMB, con los que se ha observado una disminución de las

lesiones (20, 33). Pero los tratamientos farmacológicos son costosos, e incluyen altas dosis de itraconazol y/o terbinafina (200 a 400 mg y 250 a 500 mg, respectivamente) diariamente durante más de un año. Incluso con tratamiento, las recaídas son comunes, por lo que se recomienda terapia combinada (27).

2.2 GENES RIBOSOMALES

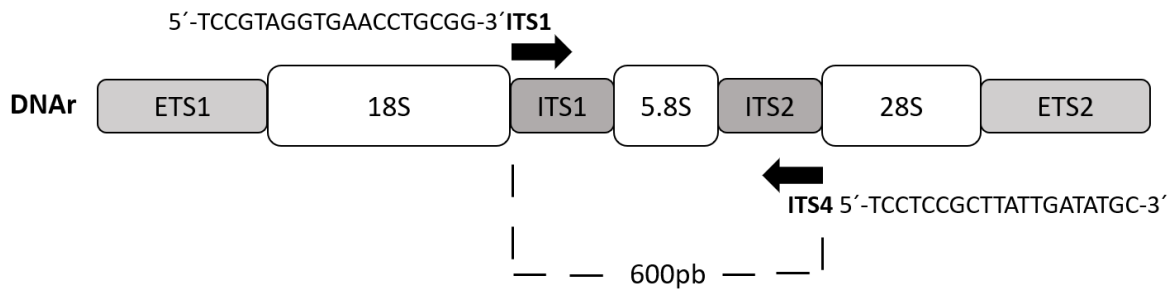


Figura 3. Región del DNA ribosomal codificante para RNA ribosomal. (- - -) Región amplificada, el DNAr 18S y 28S no se amplifican en su totalidad ya que tienen la función de anclar los primers ITS1 e ITS 4 respectivamente.

Normalmente las micosis son diagnosticadas en el laboratorio a través de diferentes procedimientos (examen directo, cultivo, histopatología, etc.), sin embargo, es necesaria una experiencia considerable para la correcta identificación fenotípica de la amplia gama de hongos. Son procedimientos que requieren de un tiempo prolongado para dar un resultado preciso. Esto ha sido motivo para la búsqueda de procedimientos más rápidos, sensibles y específicos, como los métodos moleculares. Este grupo de técnicas se basa principalmente en la amplificación de DNA correspondiente a fragmentos de genes o de genes completos, desarrollada y dada a conocer como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por Kary Mullis en 1983. La PCR de DNA genómico, amplificando regiones ITS (Internally Transcribed Spacer Regions) del DNA ribosomal (DNAr) se utiliza para la detección rápida de hongos dematiáceos (Figura 3) (14, 19, 34).

El complejo genético de DNAr incluye en la orientación de 5' a 3' la región espaciadora intergénica IGS (intergenic spacer region), que contiene la región espaciadora transcrita externa ETS 1 (external transcribed spacer) en el extremo 5' y la región ETS2 en el extremo 3', el gen 18S DNAr, la región ITS1, el gen 5.8S DNAr, la región ITS2 y el gen 28S DNAr. Esta unidad genómica (5'-ETS1-18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S-ETS2-3') (Figura 3), contiene los genes necesarios para la formación de RNA ribosomal (RNAr) y se denomina complejo de genes de DNAr del genoma (15, 16).

Durante la transcripción en el nucléolo, se produce el precursor de RNAr, el DNAr se transcribe a RNA 45S por la RNA polimerasa I (RNA pol I). Este precursor contiene los RNAr 18S, 5.8S y 28S. Estos tres se separan por metilación y eliminación enzimática sucesiva de las cuatro secuencias espaciadoras (ETS1, ETS2, ITS1 e ITS2) y son procesados para formar los RNAr maduros 18S, 5.8S y 28S, que finalmente se combinan con las proteínas ribosómicas producidas en el citoplasma y exportadas al nucléolo, para convertirse en subunidades ribosomales. Formando la subunidad pequeña 40S con el RNAr 18S más las proteínas tipo S (small), mientras que la subunidad grande 60S está conformada por el RNAr 5.8S, 28S, el RNAr 5S (el cual se transcribe en el núcleo por la RNA pol III) y las proteínas tipo L (large) (Figura 4); posteriormente las subunidades ribosomales son exportadas al citoplasma donde terminan su maduración y se unen al RNAt y al RNAm, lo que conduce a la unión de aminoácidos y síntesis de proteínas durante la traducción. Musters, Sande y Good demostraron que la eliminación de una o

ambas regiones ITS antes del inicio de la transcripción tiene un efecto perjudicial sobre la formación de RNAr maduro y por lo tanto en la traducción de proteínas (16).

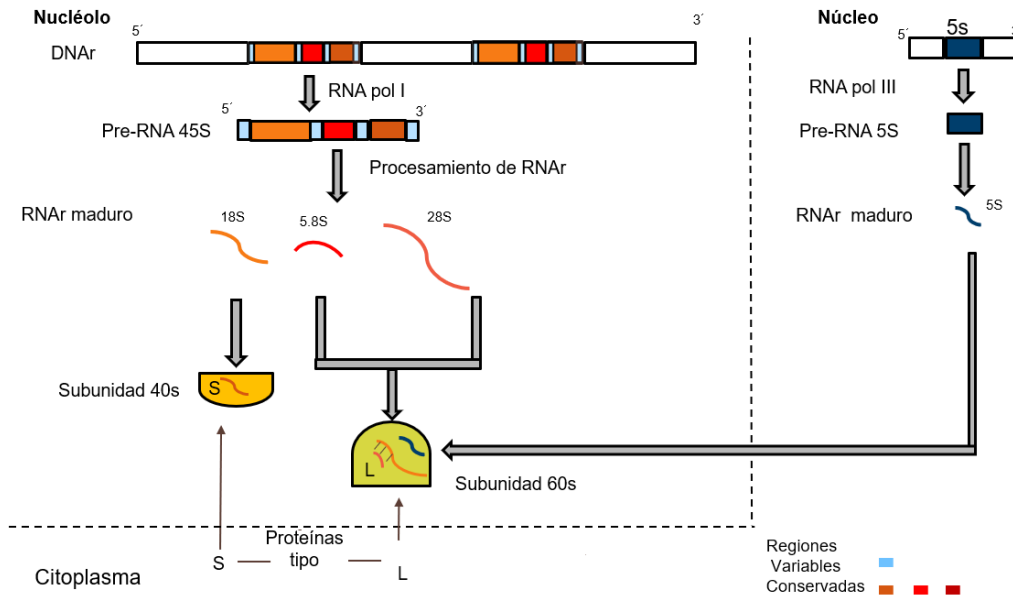


Figura 4. Diagrama de la maduración del RNAr en células eucariontes. En el nucléolo la RNA pol I transcribe el DNAr a pre-RNA 45S, el cual contiene cuatro regiones espaciadoras transcritas, dos externas (ETS1, ETS2), dos internas (ITS1, ITS2) y los genes que codifican para RNAr 18S, 5.8S, 28S. El pre-RNA 45S es procesado por la acción de exonucleasas y endonucleasas; para formar el RNAr maduro 18S, 5.8S y 28S. Fuera de nucléolo la RNA pol III transcribe el DNAr 5s a RNAr 5S y en el citoplasma se forman las proteínas tipo S y L, para dar paso a la formación de las subunidades ribosomales 40S y 60S.

Los genes del DNAr se encuentran en todos los organismos y se sabe que acumulan mutaciones a un ritmo constante y lento a lo largo del tiempo. Son genes altamente conservados con regiones variables a lo largo de cada gen (16, 19).

La región de DNAr es la más conservada en el genoma fúngico, es adecuada para el análisis de diferencias filogenéticas y, por lo tanto, estos marcadores moleculares son potencialmente útiles para la identificación más precisa de una amplia gama de hongos (2, 15, 16, 30, 32). La amplia diversidad de las secuencias dentro de las regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2) entre los principales grupos de

microorganismos eucariontes e incluso dentro de especies del mismo grupo de organismos, son la base genética para la organización de los hongos en grupos taxonómicos (16). La conservación de los genes que codifican para el rRNA permite el fácil acceso a las regiones ITS con iniciadores para realizar la PCR (2, 15, 32). Los tamaños de secuencia para cada región ITS varían desde alrededor de 1000 pb en células humanas, mientras que para hongos es una región aproximadamente de 600 pb. White en 1990 propuso el uso de iniciadores fúngicos universales basados en regiones altamente conservadas del rDNA para la amplificación por PCR de la región de rDNA 18S-ITS1-5.8-ITS2-28S (donde el rDNA 18S y 28S funcionan como ancla de los primers ITS1 e ITS2, respectivamente) (Figura 3), seguido de una comparación de secuencias. Este método es prometedor para dar un diagnóstico más temprano y ayudar a seleccionar los agentes antimicóticos más eficaces para tratar a los pacientes (2, 16, 30, 32, 43).

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Cromoblastomycosis es una micosis subcutánea, crónica y poco atendida alrededor del mundo. Los hongos patógenos que la provocan son difíciles de diferenciar a nivel de especie con los métodos convencionales, debido a que morfológicamente son muy similares y se requiere de cierta experiencia para diferenciar fenotípicamente las características de cada hongo. Por lo que en este trabajo se sugiere el uso de la región rDNA ITS1-5.8S-ITS2 como marcador genético, para fortalecer el diagnóstico y conocer datos epidemiológicos en México.

3.2 OBJETIVOS

GENERAL

Identificar los agentes causales de Cromoblastomycosis en muestras de piel embebidas en parafina o de cultivo, de pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González; mediante la amplificación y secuenciación del DNAr y las secuencias ITS.

PARTICULARES

Diferenciar a nivel de especie, los agentes causales de Cromoblastomycosis que afectan a la población mexicana atendida en el Hospital general Dr. Manuel GEA González.

Confirmar el diagnóstico microbiológico e histopatológico de Cromoblastomycosis emitido por el Hospital general Dr. Manuel Gea González, con métodos más sensibles y precisos.

Proporcionar datos precisos sobre la Cromoblastomycosis en México.

3.3 HIPÓTESIS

Las muestras de piel embebidas en parafina y cultivo con diagnóstico microbiológico e histopatológico (diagnóstico clásico) con sospecha de Cromoblastomycosis al ser analizadas por la secuenciación de la región ribosomal DNAr ITS1-5.8S-ITS2 presentaran diferentes especies asociadas a esta patología clínica.

4. PROCEDIMIENTO

4.1 MUESTRAS

Del banco de muestras del servicio de dermatopatología del Hospital general Dr. Manuel Gea Gonzáles se seleccionaron 27 muestras, todas con sospecha de Cromoblastomycosis por observar características de hongos dematiáceos al microscopio.

Todas son muestras clínicas de piel de pacientes mexicanos que acudieron a consulta al Hospital General Dr. Manuel GEA González entre 1997-2016.

Muestras embebidas en parafina, cada muestra contenía 5 cortes de 5 micras de grosor (25 μ g) de piel de pacientes con diagnóstico de cromoblastomycosis recolectadas durante un periodo de 19 años.

De manera extraordinaria durante el procesamiento de las muestras se recibieron dos muestras más de cultivos frescos, de un paciente con cromoblastomycosis (muestra 144a y 144b). Todas las muestras analizadas fueron previamente diagnosticadas con examen directo o histopatología, más cultivo en agar SDA.

4.2 EQUIPOS

Termocicladores: TECHNE TC-300 y AXIGEN MAXIGENE empleados para la amplificación de la región DNAr ITS1-5.8S-ITS2, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Varios: Centrifuga (Legend Micro 17R), vortex (VELT científica), incubadora, baño maría (Boekel Grant), campana de flujo laminar (The Baker company),

transiluminador (Dual intensity ultraviolet), empleados para la extracción y purificación de DNA. Balanza analítica (OHAUS), cámara de electroforesis horizontal (APOLLO), fuente de poder (500-2 Power supply), foto-documentador (UVP Epi Chemi II Dakoromm), empleados para la visualización los productos de amplificación y purificación.

Espectrofotómetro (Nano drop-ONE), empleado para la cuantificación de DNA.

4.3 REACTIVOS

Para desparafinar el tejido:

- Xilol al 100%
- Etanol al 100%

Para lisis del tejido y la extracción de DNA:

- Sistema comercial DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Qiagen).

Para la reacción en cadena de la polimerasa:

- Máster mix (DNTP's, MgCl₂, buffer de PCR 1X), iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') White et al 1990 (43), agua estéril y enzima Taq DNA polimerasa.

Para la purificación de DNA en gel de agarosa:

- El sistema de purificación QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

Para el gel de agarosa:

- Agarosa, buffer para electroforesis Tris-ácido Acético-EDTA (TAE) 1X, bromuro de etidio y marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen).

4.5 METODOLOGÍA

POBLACIÓN ESTUDIADA

Las características de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras para realizar el diagnóstico se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de las muestras donde se tenía sospecha de la presencia de hongos dematiáceos.

Muestra	Año	Origen	Sexo	Edad (años)	Ocupación	Tiempo de evolución	Área afectada
171-97*	1997	Tamaulipas	masculino	68	campesino	27 años	Cara
294-97	1997	-	masculino	72	-	6 años	Extremidades superiores
412-97*	1997	Tamaulipas	masculino	68	campesino	27 años	Cara
23-99	199	-	masculino	60	-	4 años	Extremidades superiores
88-99*	1999	Veracruz	masculino	60	campesino	3 años	Extremidades superiores
158-A-00	2000	-	masculino	-	-	30 años	Extremidades superiores
158-B-00	2000	-	masculino	-	-	30 años	Extremidades superiores
158-C-00	2000	-	masculino	-	-	30 años	Extremidades superiores
253-05*	2005	Mérida	masculino	60	campesino	15 años	Extremidades superiores
471-07*	2007	Puebla	masculino	71	campesino	31 años	Glúteos

547-07	2007	-	masculino	60	-	15 años	Tronco
678-09	2009	-	-	-	-	-	-
535-11*	2011	Nayarit	masculino	63	campesino	10 años	Tronco
156-A-13	2013	-	masculino	57	-	2 años	
156-B-13*	2013	CDMX	femenino	20	estudiante	-	Pie
40-13*	2013	Nayarit	masculino	66	campesino	10 años	Espalda
158-13	2013	-	masculino	-	-	20 años	Extremidades inferiores
429-13	2013	-	femenino	64	-	18 años	Extremidades inferiores
838-15	2015	-	masculino	38	-	20 años	Extremidades inferiores
1727-15	2015	-	masculino	33	-	7 años	Extremidades superiores
1425-15	2015	-	masculino	12	-	-	Extremidades inferiores
1625-16	2016	-	femenino	45	-	4 años	Extremidades superiores
335-16	2016	-	masculino	30	-	10 años	Extremidades inferiores
583-16	2016	-	masculino	15	-	12 años	Extremidades superiores
616-16*	2016	Chiapas	masculino	42	campesino	16 años	Pierna
617-16*	2016	Chiapas	masculino	76	campesino	25 años	Abdomen
550-16*	2016	Guerrero	masculino	65	campesino	-	Antebrazo
144-a*	2017	Oaxaca	masculino	63	campesino	25 años	Antebrazo
144-b*	2017	Oaxaca	masculino	63	campesino	25 años	Antebrazo

*Muestras positivas a CMB

- Sin datos

DESPARAFINACIÓN DE TEJIDO

Las muestras se desparafinaron por el método Xilol/Etanol: Brevemente, las muestras se colocaron en tubos de 1.5 ml, cada muestra contenía 5 cortes de 5 micras de grosor de cultivo puro (25 μ g), se añadieron 1200 μ l de xilol absoluto, se mezcló y centrifugo a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante, y se lavó el pellet dos veces con 1000 μ l de etanol absoluto, se re-suspendió y centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, después del segundo lavado se retiró el sobrenadante por decantación, y dejó evaporando a 37°C por 20 min en la incubadora hasta observar que el tejido estaba completamente seco.

LISIS Y EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción de DNA total, las muestras se digirieron por el método enzimático con proteinasa K; se utilizó el sistema comercial DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Qiagen). Al pellet de tejido libre de etanol se le añadieron 180 μ l de solución ATL, 80 μ l de proteinasa K a 20 mg/ml concentración final, se mezcló y dejó incubando a 56°C en baño María por 18 h o toda la noche.

Posteriormente, se le adicionaron 200 μ l de la solución AL y 200 μ l de etanol al 96%, se mezcló suavemente, y colocó en una columna de afinidad, se centrifugo a 8000 rpm durante 1 min. La columna se lavó con 500 μ l de la solución AW1 y centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; se realizó otro lavado con 500 μ l de solución AW2 y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante; para remover el remanente de la solución AW2 se centrifugó en seco a 13000 rpm durante 1 min. El DNA se obtuvo colocando 50 μ l de agua estéril en la columna, posteriormente se

centrifugó a 13000 rpm por 1 min. Finalmente, el DNA de cada muestra se almacenó a 4°C hasta su uso.

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN RIBOSOMAL ITS1-5.8S-ITS2

Para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 se utilizaron los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 100ng de DNA de la muestra. En un tubo estéril para PCR se colocaron los reactivos en el siguiente orden 12.5 µl de master mix (10 µmol de DNTP's, 1.5mmol de MgCl₂ y 1x de buffer de PCR), 1.5 µl de ITS1 al 0.5 µmol/L, 1.5 µl de ITS2 al 0.5 µmol/L, 2 unidades de enzima Taq DNA polimerasa y 10 µl de DNA de la muestra o 10 µl de agua estéril para el control negativo, para obtener un volumen final de 26 µl. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador de punto final, las condiciones a las cuales se llevó acabo la reacción son las siguientes: Desnaturalización inicial de 95°C por 5 min; seguida de 33 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 30 s, una alineación de 58°C por 35 s, y una extensión a 72°C por 45 s; finalmente una extensión final de 72°C por 7 min (Figura 5).

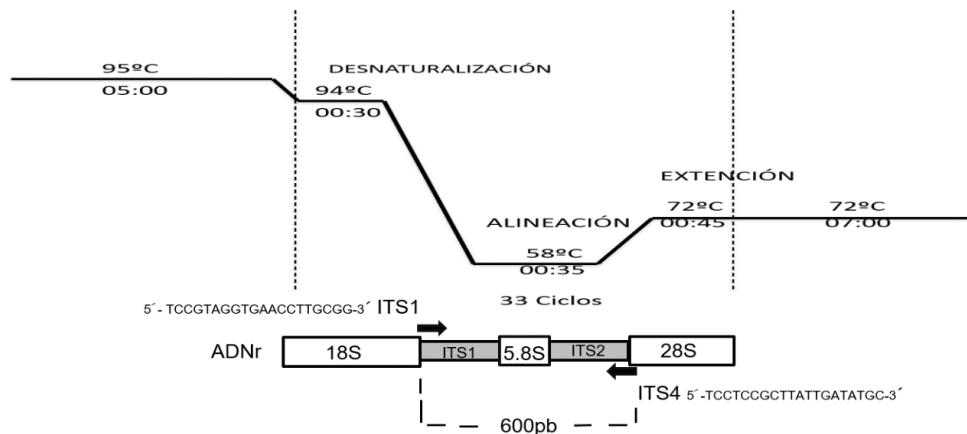


Figura 5. Esquema del programa de amplificación de la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2

ELECTROFORESIS EN GEL

Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis horizontal a 100V durante 30 min, los productos se detectaron con un foto-documentador de UV, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

PURIFICACIÓN DEL DNA AMPLIFICADO EN GEL DE AGAROSA

Los productos de amplificación obtenidos de la PCR se purificaron utilizando el sistema comercial de purificación QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Los productos de amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, el cual se resolvió (separó) a 70 V durante 30 min. Se cortó el producto del gel positivo para hongos, con ayuda del transiluminador-UV (tomando como positivo el producto amplificado aproximadamente en 600 pb); se colocó en un tubo de 1.5 ml estéril, se añadieron 500 µl de solución QC, e incubó en baño

María a 56°C durante 10 min, posteriormente se mezcló y se añadieron 300 µl de isopropanol absoluto, se agitó suavemente y se vertió el contenido en una columna de afinidad, se centrifugo a 13000 rpm durante 1 min, se le añadieron 500 µl de solución QG y centrifugo nuevamente a 13000 rpm durante 1 min, después se le añadieron 750 µl de solución PE y se centrifugo a 13000 rpm durante 1 min. Para eliminar el remanente de la solución PE de la columna, se centrifugo en seco a 13000 rpm durante 2 min. Para finalizar, el DNA se recuperó de la columna agregando 50 µl de agua estéril y se centrifugo a 13000rpm durante 1 min. El DNA purificado de cada una de las muestras se resguardo a -20°C hasta su uso.

CUANTIFICACIÓN DE DNA

La concentración del DNA se determinó a través de un espectrofotómetro (Nano-drop ONE) a una OD 260/280, utilizando como blanco agua estéril y se empleó 1µl de DNA de la muestra. El DNA fue almacenado en 4°C hasta su uso.

SECUENCIACIÓN DE GENES

La secuencia de nucleótidos se determinó en ambos sentidos mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Flourescence-Based Sequencing, utilizando el equipo Applied Biosystems Modelo 3730 en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se obtuvo la secuencia consenso, y la secuencia completa de nucleótidos se sometió a la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para buscar homologías mediante el sistema Blast nucleotide. Los porcentajes de identidad entre las secuencias permitieron la

identificación de género y especie. Para realizar la secuenciación de los genes se utilizaron 100 ng de DNA purificado, y los iniciadores se utilizaron a una concentración final de 10 pmol, uno para cada reacción de secuenciación.

EXCLUSIÓN DE MUESTRAS

De las 29 muestra iniciales únicamente se seleccionaron trece (Tabla 1), donde se confirmó el diagnóstico de CMB por biología molecular (Tabla 5); de las 16 muestras restantes, 8 no amplificaron, ya que al ser muestras extraídas de bloques de parafina, el material genético obtenido pudo sufrir fraccionamiento o degradación durante los procesos de parafinación o desparafinación dando como resultado una concentración de DNA baja o de poca calidad complicando la realización de las técnicas moleculares. 8 muestras, después de compararlas con la base de datos de GenBank, mostraron organismos como *Brevibacterium linens* (bacteria) por lo tanto es un error de secuenciación, tres resultaron *Fraxinus uhdei* (árbol), *Usnea rubrotincta* (fruto), *Gyrodactylus sp* (parasito), *Fungal sp.* (hongo) y en una muestra no se encontró similitud. Dado que ninguno de estos organismos son hongos dematiáceos o muestran relación alguna con la CMB son consideradas como negativas para CMB por contaminación. Esto se debe a que al ser pacientes de zonas rurales primero acuden a curanderos o buscan remedios antes de ir al médico. Debido a que el objetivo principal de este trabajo es identificar a nivel molecular los agentes causales de CMB únicamente analizaremos el resultado de las muestras donde se comprobó el diagnóstico fenotípico (clásico).

5. RESULTADOS

Tabla 2. Datos demográficos de las muestras de pacientes diagnosticados con Cromoblastomycosis.

$n_{total} = 29$ $n_{negativas\ CMB} = 16$ $n_{positivas\ CMB} = 13$						
Sexo		Ocupación		Edad		
Hombres	Mujer	Campesino	Otra	Menos de 40 años	Más de 40 años	Promedio
12(92%)	1(8%)	12(92%)	1(8%)	2(16%)	11(84%)	60años

Tabla 3. Topografía de la lesión y tiempo de evolución de la enfermedad al momento de tomar la muestra.

Topografía de las lesiones			
Miembros inferiores	Miembros superiores	Tórax (abdomen, glúteo)	Cara
2(16%)	5(38%)	4(30%)	2(16%)

Tiempo de evolución			
1 a 10 años	11 a 20 años	más de 20 años	sin dato
3(23%)	2(15.5%)	6(46%)	2(15.5%)

Del total de muestras en 8 no se puede comprobar a nivel molecular el diagnóstico de CMB, 8 son negativas para CMB por lo que no se incluyeron en el análisis epidemiológico de este trabajo; mientras que en las 13 muestras positivas a CMB se encontró en la información compartida por el área dermatopatología del hospital (Tabla 1) que 92% de los pacientes son hombres, campesinos, el 8% (1 paciente) son mujeres; el rango de edad va de los 20 a los 76 años, donde el mayor número de casos se presentó en pacientes de 60 años o más (Tabla 2). De acuerdo con la topografía de las lesiones, se observó que las extremidades superiores son el área

más afectada con un 38%, el tiempo de evolución vario de 4 a más de 20 años (Tabla 3).

PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Después de realizar la PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las muestras se obtuvieron productos de amplificación de 550 y 600 pb, aproximadamente (Figura 6). Para las muestras donde se obtuvo más de un producto de amplificación de aproximadamente 550 pb y 600 pb, de la misma intensidad, se purificaron los productos para comparar las secuencias obtenidas; como fue el caso de las muestras 412-97, 88-99, 471-07, 535-11, 156-B-13 (Figura 6).

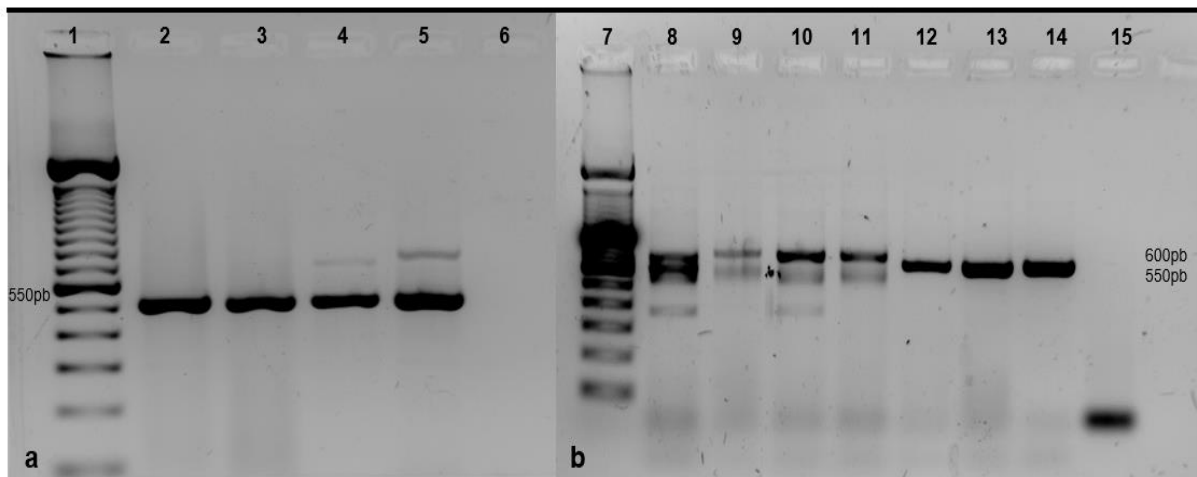


Figura 6. PCR de amplificación de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de muestras de pacientes diagnosticados con Cromoblastomycosis. Carril 1 y 7: marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder; Carril 6 y 15: control negativo; [a] Carril 2: muestra 171-97; Carril 3: muestra 253-05; Carril 4: muestra 40-13; Carril 5: muestra 471-07 ; [b] Carril 8: muestra 412-97; Carril 9: muestra 535-11; Carril 10: muestra 156-B-13; Carril 11: muestra 88-99; Carril 12: muestra 616-16; Carril 13: muestra 617-16 y Carril 14: muestra 550-16.

En el caso de las muestras extraordinarias de cultivo fresco se observaron dos colonias elevadas, radiadas, aterciopeladas, una de color gris-marrón y la otra de color negro de las muestras 144a y 144b respectivamente. De ambas se tomó la punta de una espátula como muestra y se trataron del mismo modo que todas las anteriores a excepción del proceso de desparafinación. De estas dos muestras se obtuvieron los productos de amplificación en 600pb para la muestra 144a y 550 pb para la muestra 144b (Figura 7).

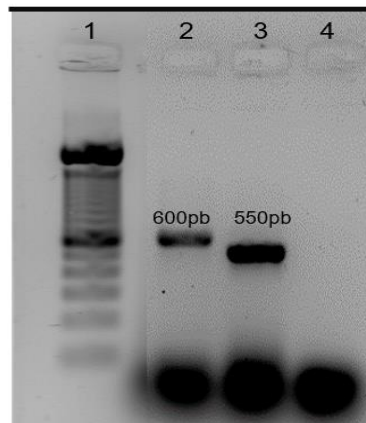


Figura 7. PCR de amplificación de la región ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de muestras de cultivo fresco. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder; Carril 2: muestra 144a; Carril 3: Muestra 144b; Carril 4: control negativo.

DNA PURIFICADO EN GEL DE AGAROSA

Se realizaron 3 PCR para cada muestra, después de corroborar que se obtuvieron los mismos productos de amplificación para cada una; se juntaron los volúmenes restantes de las reacciones (60 μ l aproximadamente) y se purificó el DNA en un gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos en cada muestra. Para conocer la cantidad y calidad del DNA obtenido de las muestras, se cuantificó 1 μ l de DNA de cada producto de amplificación purificado, por espectrofotometría en el

rango de luz ultravioleta (UV) a 260 nm, con ayuda del espectrofotómetro Nanodrop ONE (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración y pureza del DNAr de muestras de pacientes con sospecha de Cromoblastomycosis.

Muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280
171-97*	7.2	2.1
294-97	7.3	1.9
412-97₁*	16.1	1.9
412-97₂	10.03	1.8
88-99₁*	15.06	1.7
88-99₂	8.7	1.9
158-A-00	23.0	1.8
158-B-00	21.0	1.8
158-C-00	15.6	2.4
253-05*	8.0	2.0
471-07₁*	34.7	1.8
471-07₂	10.6	1.7
547-07	5.6	2.0
678-09	8.8	1.8
535-11₁*	8.2	1.7
535-11₂	7.0	1.8
156-A-13	6.8	1.9
156-B-13₁*	21.4	1.8
156-B-13₂	6.4	1.8
40-13*	19.7	1.8
158-13	9.5	1.9
616-16*	15.7	1.9
617-16*	60.2	1.8
550-16*	72.9	1.8
144-a*	7.8	2.4
144-b*	21.7	1.9
₁ y ₂ productos de amplificación diferentes en la misma muestra. *Muestras positivas a CMB		

Además de conocer la concentración y pureza del DNA, era importante conocer la integridad del DNAr purificado de cada muestra, por lo que se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, esperando obtener una sola banda bien

definida y estrecha, de 550 pb o 600 pb de acuerdo con el tamaño del producto de amplificación cortado y purificado para cada muestra (Figura 8).

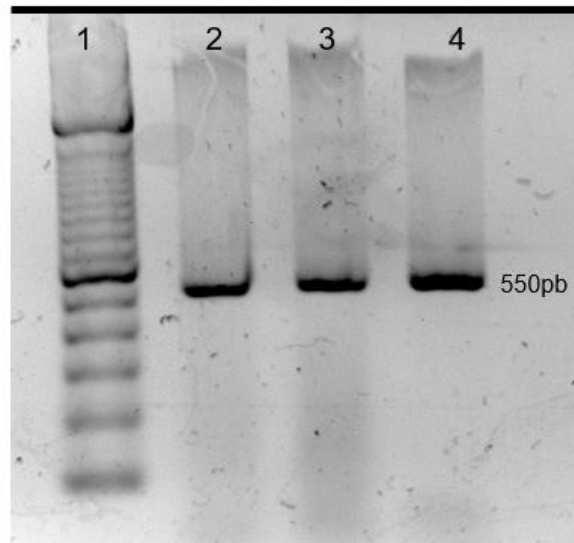


Figura 8. Productos de amplificación purificados de DNAr de hongos obtenidos de pacientes diagnosticados con CMB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder; Carril 2: muestra 616-16; Carril 3: muestra 617-16 y Carril 4: muestra 550-16.

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES CAUSALES DE CROMOBLASTOMICOSIS

Se enviaron a secuenciar 100 ng de DNA de cada una de las muestras, en ambas direcciones con los primers ITS1 e ITS4. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para buscar homologías mediante el sistema Blast nucleotide. Los agentes causales de CMB identificados en las muestras estudiadas se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Agentes causales de Cromoblastomicosis identificados a nivel de género y especie, de muestras de pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Muestra	Agente causal de Cromoblastomicosis	% de identidad.
171-97*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	100
294-97	<i>Brevibacterium linens</i>	96
412-97₁*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	100
412-97₂	<i>Candida parapsilosis</i>	100
88-99₁*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	99
88-99₂	<i>Candida parapsilosis</i>	100
158-A-00	<i>Fraxinus uhdei</i>	99
158-B-00	<i>Fraxinus uhdei</i>	99
158-C-00	<i>Fraxinus uhdei</i>	99
253-05	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	100
471-07₁*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	99
471-07₂	<i>Candida parapsilosis</i>	100
547-07	<i>Fungal sp</i>	98
678-09	<i>Usnea rubroctincta</i>	90
535-11₁*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	99
535-11₂	<i>Candida parapsilosis</i>	100
156-A-13	<i>Gyrodactylus sp</i>	99
156-B-13₁*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	99
156-B-13₂	<i>Candida parapsilosis</i>	100
40-13*	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
158-13	-	-
616-16*	<i>Fonsecaea monophora</i>	100
617-16*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	100
550-16*	<i>Fonsecaea monophora</i>	100
144-a*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	100
144-b*	<i>Cladosporium oxysporum</i>	99
₁ y ₂ productos de amplificación diferentes en la misma muestra. *Agentes causales de CMB		

Así mismo se realizó la alineación y construcción de árboles filogenéticos con los programas VECTOR Advance 11.5 y MEGA de las secuencias obtenidas de las muestras contra las secuencias de la base de datos del GenBank con las que se obtuvo un mayor porcentaje de identidad al realizar el BLASTn (Figura 9-13).

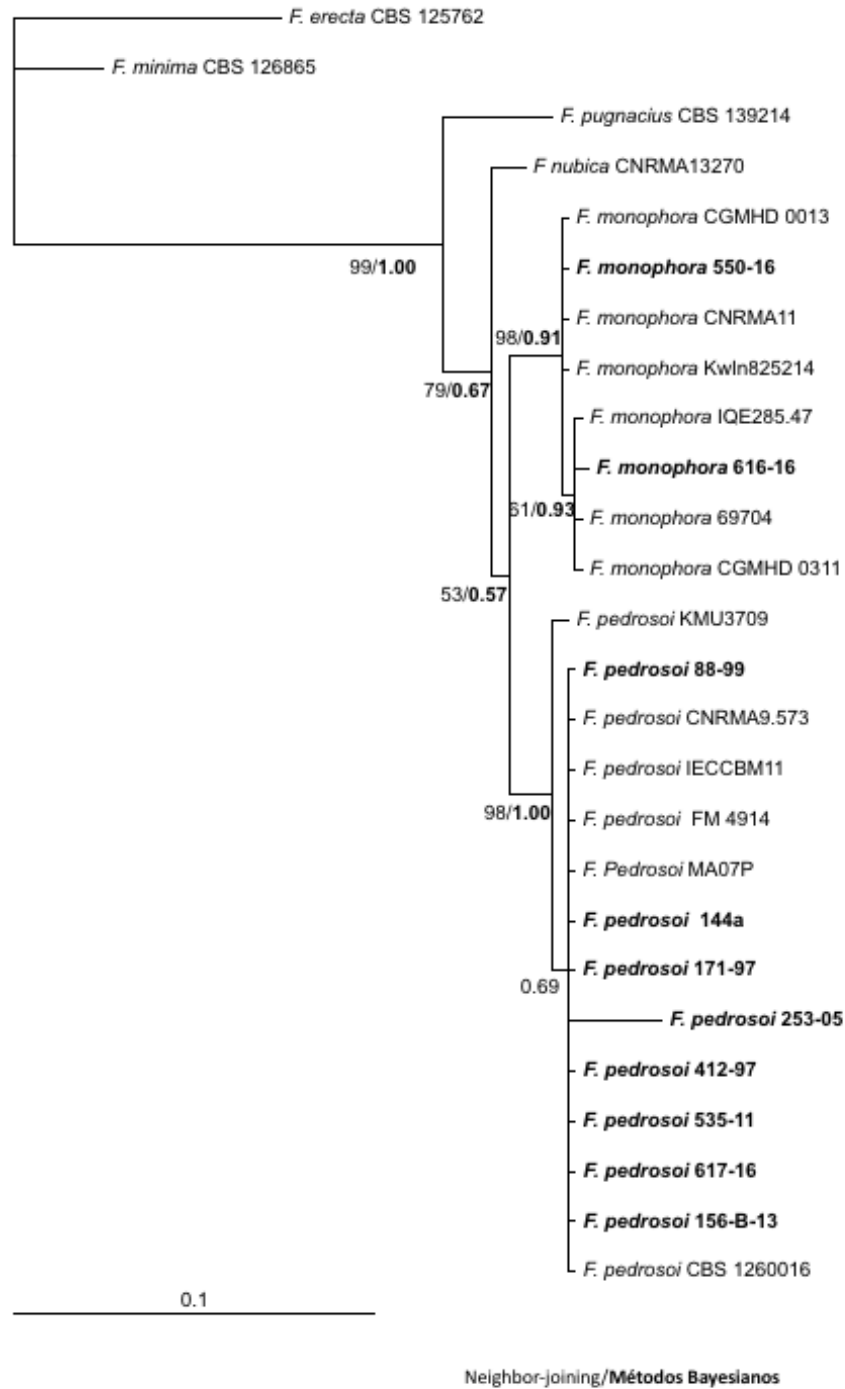


Figura 9. Árbol filogenético del género *Fonsecaea* basados en la alineación de secuencias DNAr e ITS. 171-97, 412-97, 88-99, 253-05, 535-11, 550-16, 616 y 617-16 secuencias obtenidas de la amplificación y secuenciación del DNAr de las muestras de pacientes diagnosticados con CMB y secuencias de la base de datos del GenBank.

	380	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	5
171-97	12	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
412-97	9	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
88-99	12	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
253-05	23	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
535-11	12	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
156-B-13	9	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
617-16	9	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
144a	12	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. pedrosoi</i> CBS 126016	380	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. pedrosoi</i> CNRMA9.573	41	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. pedrosoi</i> IEC-CBM11	31	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
550-16	7	GTCTTCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
616-16	7	GTCTTCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. monophora</i> IQE285.47	16	GTCTTCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. monophora</i> CNRMA11	41	GTCTTCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
<i>F. monophora</i> CGMHD 0013	41	GTCTTCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															
Consensus	380	GTCTCCTAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGCTTACTGACCTCAGTTGCTTCGGCAGGCCCGTCTTAATCTGACCCTGGAGGACCGCTAATGCGGGTGTACCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA															

Figura 10. Alineación de las secuencias del género *Fonsecaea*. 171-97, 412-97, 88-99, 253-05, 535-11, 617-16, 144a muestras 100% homologas con *Fonsecaea pedrosoi* cepa CBS 1260016, CNRMA9.573, IEC-CBM11; muestras 550-16, 616-16 100% homologas con *Fonsecaea monophora* cepa IQE285.47, CNRMA11, CGMHD 0013. La región que va de 380 a 530 pb es donde se observó el mayor número de diferencias entre ambas especies. Amarillo idéntico a la secuencia consenso, azul y blanco diferencias entre las especies *F. pedrosoi* y *F. monophora*.

El mayor número de diferencias genotípicas obtenidas después de la comparación de las secuencias se encuentran en la región que va de 380 a 530 pb de la secuencia consenso, donde en la posición 385, 411 y 469 *F. monophora* cambia una citosina por una timina, en 417 hay un cambio de adenina a timina, en 470 y 479 de timina a citosina, en 483 de adenina a guanina con respecto a *F. pedrosoi*. Mientras que en la posición 448 se observa un cambio de timina a guanina, mostrando

que tanto la muestra 616-16 y *F. monophora* cepa IQE285.47 son idénticas entre sí, pero diferentes al resto de las *Fonsecaas*.

	106	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250					
412-97 Cp	52	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
88-99 Cp	51	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
471-07 Cp	51	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
535-11 Cp	53	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
156-B-13 Cp	51	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
<i>C. parapsilosis</i> BKR1	55	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
<i>C. parapsilosis</i> d73a	54	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
<i>parapsilosis</i> isolate R97313	106	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
<i>C.parapsilopsis</i> SHIOYL56	47	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
<i>C. parapsilosis</i> H142B	52	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA
Consensus	106	TTTTGAAA	ACTTTGCT	TTGGTAGG	CCTTCTAT	ATGGGGCCT	GCCAGAGAT	TAAACTCA	ACC	AAATTTT	ATTTAATG	TC	AACCGATT	ATTTAATAG	TCAAAA	ACTTTCAACA	ACGGATCT	CTTGGTTCT	CGCATCGAT	GAAGA	ACGCAGCGA

Figura 11. Alineación de secuencias 100% homologas con *Candida parapsilopsis*, muestras 412-97, 88-99, 471-99, 535-11 y156-B-13 en donde se obtuvieron dos productos de amplificación similares en tamaño e intensidad. Amarillo idéntico a la secuencia consenso.

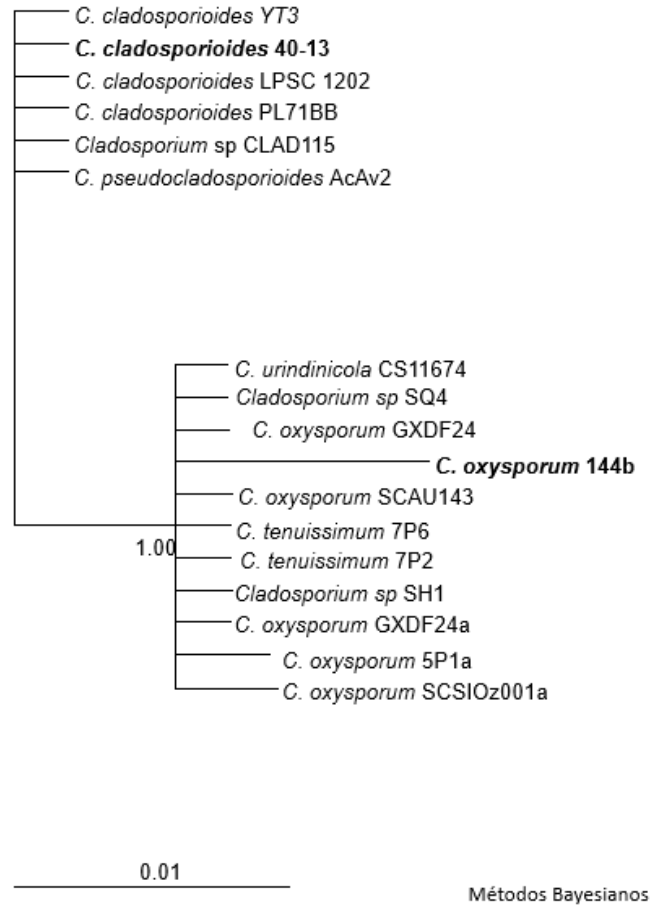


Figura 12. Árbol filogenético del género *Cladosporium* basados en la alineación de secuencias DNAr e ITS. 40-13 y 144b secuencias obtenidas de la amplificación y secuenciación del DNAr de las muestras de pacientes diagnosticados con CMB y secuencias de la base de datos del GenBank.

	486	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630
144b	315	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. oxysporum</i> isolate GXDF24	316	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. oxysporum</i> 5P1	317	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. oxysporum</i> SCSIO z001	319	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. oxysporum</i> SCAU143	318	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. uredinicola</i> CS11674	319	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
40-13	346	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. cladosporioides</i> YT3	486	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. cladosporioides</i> PL7-1BB	370	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
<i>C. cladosporioides</i> LPSC 1202	378	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											
Consensus	486	CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGC	TCGGGAGGCTACGCCGTA	AAAAACA	ACCGTTTCTAAGGTI											

Figura 13. Alineación de las secuencias del género *Cladosporium*. Muestra 40-13 100% homologa con *Cladosporium cladosporioides* cepa YT13, PL7-1BB y LPSC 1202; muestra 144b 100% homologa con *Cladosporium oxysporum* cepa GXDF24, 5P1, SCSIO z001 y SCAU143. La región de 590 a 630 pb es donde se observaron las diferencias entre ambas especies. Amarillo idéntico a la secuencia consenso, verde y blanco diferencias entre especies, azul y blanco diferencias entre la muestra 144b y las especies de *Cladosporium*.

6. DISCUSIÓN

La cromoblastomicosis es la más frecuente de las micosis subcutáneas causadas por hongos dematiáceos y constituye la tercera micosis subcutánea más frecuente en México. Es considerada una enfermedad desatendida por la Organización Mundial de la Salud (1) debido a que la notificación de esta enfermedad no es obligatoria, por lo que no existen datos epidemiológicos. Su incidencia y prevalencia en México se mide por los reportes de casos clínicos en la literatura (1, 7, 25, 29).

El diagnóstico de CMB en México se basa en el examen micológico e histológico de las muestras de tejido del área afectada. Por alrededor de 19 años (1997 a 2016) el Hospital General Dr. Manuel Gea González conservó muestras embebidas en bloques de parafina, donde se observaron células muriformes (signo patognomónico de la enfermedad) o características de hongos dematiáceos, por esta razón se analizaron las muestras con la finalidad de identificar los agentes causales que afectan a la población mexicana y comprobar a nivel molecular el diagnóstico. En 16 muestras no se pudo corroborar el diagnóstico debido a que la calidad del DNAr no permitió el análisis molecular (8 muestras) o bien se encontraron organismos que no muestran ninguna relación con la CMB (8 muestras, Tabla 5) por lo que se consideraron como negativas, mostrándonos la importancia de una correcta toma de muestra y la implementación de métodos de diagnóstico más específicos para este tipo de enfermedades para emitir un diagnóstico correcto y un tratamiento oportuno, adecuado y eficaz.

Los datos demográficos proporcionados para las muestras positivas (Tabla 1) coinciden con trabajos realizados en población mexicana con CMB ya que

observamos que los individuos más afectados por esta micosis subcutánea son del sexo masculino, que se dedica a trabajos rurales (Tabla 2) por lo tanto son más propensos a adquirir la infección por inoculación traumática durante su trabajo, similar a lo que reportan distintos autores donde la frecuencia en hombres va del 63% al 71%, mientras que para campesinos es del 70% (1, 7, 25, 29). La edad promedio fue de 60 años, por lo tanto la mayoría de las muestras son de pacientes de la tercera edad (84%) que debieron adquirir la enfermedad entre los 40 y 50 años. A pesar de que esta patología es más frecuente en adultos, consideramos importante mencionar que no es propia de la edad ya que todas las edades pueden verse afectadas, inclusive existen reportes de casos en niños, 3 en México hasta el 2013 (25, 75, 21) y 22 casos de niños y adolescentes en Venezuela de 1992 al 2004, una constante de estos casos son las actividades rurales (4).

Con relación a la evolución de la enfermedad el 46% de los pacientes acudieron a consulta después de 20 años de evolución y ninguno antes de un año; por lo tanto, el 84.5% de la población analizada acudió a consulta mucho tiempo después de adquirir la infección (11 muestras), similar a lo reportado en la literatura donde del 68% al 88% de la población acude a consulta después de 1 año o más de padecer la infección (1, 25, 29). Esto nos indica que la infección no tiene un período de incubación definido, en la mayoría de los casos tiene un curso lento y crónico.

El área más afectada son los miembros superiores (38%), seguido de tórax (30%) (Tabla 3), similar a lo reportado por Atoche et al 2016, donde mencionan que los miembros superiores son los más afectados, pero estos datos contrastan con lo reportado por Bonifaz et al 2001 y Navarrete et al 2017 donde observaron que el

mayor número de casos en México se presentan en las extremidades inferiores (entre un 50% o 55%). Estas diferencias puede deberse al número de muestras analizadas ya que en los trabajos citados anteriormente manejan una n de 51 y 60; todos coinciden en que los glúteos, la cara, el pabellón auricular e incluso la nariz pueden verse afectados por la infección pero en menor frecuencia (1, 25, 29, 33).

La enfermedad ocurre con mayor frecuencia en hombres con respecto a mujeres. Esto varía dependiendo del país; por ejemplo, en México va de 2:1 a 4:1, en Corea y Japón es 1:1; mientras que en Brasil puede llegar a ser de 12:1 coincidiendo más con nuestros datos (1, 7, 17,21, 25) debido a que en dichos países es más común que los hombres realicen trabajos de campo.

El diagnóstico por identificación fenotípica de las especies de hongos patógenos con pigmentación oscura del orden *Chaetothyriales* (clase *Eurotiomycetes*) de los géneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Rhinocladiella* y *Exophiala* es difícil y en ocasiones puede ser errónea, ya que es necesario contar con una experiencia considerable para su correcta identificación, así mismo se requiere de un tiempo prolongado para dar un resultado preciso (14, 35). Por esto decidimos hacer uso de técnicas moleculares como la extracción, amplificación y secuenciación del DNAr para identificar a nivel de especie los agentes causales de CMB utilizando los marcadores moleculares ITS, que se han convertido en la región del DNA utilizada con mayor frecuencia, y ha demostrado ser un método potencialmente útil para la detección e identificación rápida de hongos con fines médicos y científicos, debido a que estas secuencias contienen regiones variables y conservadas, lo que permite la comparación y la discriminación de organismos de

diferentes niveles taxonómicos y filogenéticos entre especies del mismo género. Así mismo se utilizan las secuencias fúngicas de ITS para la identificación de cultivos, la investigación filogenética, la detección directa a partir de muestras clínicas o el medio ambiente y la tipificación molecular para investigaciones epidemiológicas (2, 15, 16, 30, 32).

Se obtuvieron once secuencias para el género *Fonsecaea* del cual actualmente se distinguen principalmente cuatro especies que afectan humanos: *F. pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* y *F. pugnacius*, las primeras dos se relacionan estrictamente con la formación de células muriformes y CMB en el mundo (23, 35, 44) mientras que *F. monophora* y *F. pugnacius* muestran un neurotropismo, que eventualmente lleva a la diseminación al cerebro y otros órganos (44). *F. pedrosoi* es el principal agente etiológico de CMB en México de acuerdo con Bonifaz et al., 2001 en el 90% de los casos, Rojas et al., 2015 con 100% de los casos analizados, Navarrete et al., 2017 con 98% casos confirmados y en el 87% de los casos estudiados por Atoche et al 2018 (1, 7, 25, 29) coincidiendo con nuestros resultados debido a que 9 de las 13 muestras positivas comparten homología en un 99% o 100 % con las cepas de *F. pedrosoi* CBS 126016, IEC-CBM11, MA07P, CNRMA9.573 e IFM4914 entre otras (Figura 10).

Las secuencias obtenidas de las muestras 550-16 y 616-16 comparten el 100 % de homología con las cepas de *F. monophora* CNRMA11, kw-In-8252-14, IQE285.47 y CGMHD 0013 (Figura 10), considerada más como un oportunista ya que ocasiona infecciones diseminadas en cerebro y otros órganos (3, 10). De igual manera es un agente etiológico de CMB, principalmente al sur de China donde se tienen

reportados el mayor número de casos por este patógeno; también se han confirmado casos en Argentina, Brasil y África (18, 22, 44); en México no se tiene descrito ningún caso de CMB por dicho hongo (4, 7, 8, 29), por lo que estos dos pacientes son los primeros casos confirmados por *F. monophora*.

Las diferencias morfológicas y fisiológicas entre *F. pedrosoi* y *F. monophora* son pocas, por lo que es difícil distinguirlas fenotípicamente ya que ambas tienen el aspecto microscópico típico del género *Fonsecaea* (colonias negras de crecimiento lento y seco con textura aterciopelada), con una temperatura de crecimiento máxima de 37°C, tolerantes a cicloheximida (23, 41). Una de las principales diferencias es *F. pedrosoi* afecta piel y tejido subcutáneo provocando CMB mientras que *F. monophora* además causar CMB también afecta otros órganos como el cerebro, los ganglios linfáticos cervicales, y puede aislarse directamente del medio ambiente por lo que es considerada un oportunista en general (21, 22, 41). Los dominios ITS ribosómicos se han empleado ampliamente para evaluar la historia evolutiva del género *Fonsecaea* (Figura 9) y diferenciar genotípicamente entre las especies de este género, y confirmar que tanto *F. pedrosoi* como *F. monophora* son agentes causales de CBM en México (Figura 10), al observar el 100% de similitud entre las secuencias obtenidas de la amplificación del DNAr y las secuencias ITS de pacientes diagnosticados con CMB contra las secuencias de la base de datos del GenBank.

Cinco muestras con presencia de *F. pedrosoi*, también presentaron *Candida parapsilosis* (Tabla 5, Figura 11), En este grupo se identificaron dos productos de amplificación, debido a la diferencia en el tamaño de las ITS's. *C. parapsilosis* es

una levadura oportunista que se aísla fácilmente de suelo, agua y plantas, así como de mucosas, piel y uñas de los seres humanos y animales. Puede causar infecciones orales, vaginales, pulmonares y en ocasiones infecciones sistémicas como candidemia (presencia de especies de *Candida* en sangre) en pacientes inmunodeprimidos, posquirúrgicos, neutropénicos y neonatos prematuros. Su aparición está relacionada con su capacidad de colonizar la piel, proliferar en soluciones que contienen glucosa y adherirse al plástico. Es la especie más común en el ambiente hospitalario entre las especies de *Candida* no *albicans* y se encuentra frecuentemente en las superficies físicas, material quirúrgico, uñas y manos de enfermeras o médicos (39). No se ha descrito la asociación de *C. parapsilosis* con CMB, por lo que se ignora si esta asociación favorece el efecto del hongo negro en cuanto a la rapidez y tipo de presentación, la extensión de la lesión, así como si se ve afectada la respuesta al tratamiento. Queda claro que la identificación de esta levadura no es rara, ya que es parte de la microbiota de la piel, sin embargo, no había sido identificada en estudios previos debido a que tal vez el hongo negro inhibía su crecimiento o la toma de las muestras era superficial o solo se sembraban las escamas de la lesión. El hecho de identificarla se debe a la metodología utilizada, donde se emplearon biopsias de piel y al extraer el DNA total de la muestra, se amplificó el DNAr y las regiones ITS de *C. parapsilosis* y del hongo negro, solo que el tamaño del producto de amplificación fue diferente entre ellos (Figura 6), y a que su prevalencia clínica ha ido en aumento debido a que es la principal especie no-*albicans* responsable de candidiasis diseminada con un 20% de los casos en México de acuerdo con Treviño et al 2012 (6).

Las muestras 40-13 y 144b son homologas para *Cladosporium cladosporoides* cepa YT13, PL7-1BB y LPSC 1202 (Figura 12, 13) y *Cladosporium oxysporum* cepa GXDF24, 5P1, SCSIO z001 y SCAU143. (Figura 12, 13) respectivamente; de igual forma son hongos dematiáceos que forman colonias oliváceas a negras, aterciopeladas; este género morfológicamente es muy similar a las especies de *Cladophialophora* pero se distinguen de esta por encontrarse en la clase: *Dothideomycetes* y orden: *Capnodiales* y muestran incapacidad para crecer en medios que contienen cicloheximida (28). *C. cladosporoides* y *C. oxysporum* son las especies más comunes en infecciones cutáneas o subcutáneas como Feohifomicosis (PHM), término generalmente reservado para el resto de los síndromes clínicos causados por hongos melanizados, donde no se observan células muriformes (13, 26, 31, 42). La gran variedad de manifestaciones clínicas entre PHM cutánea y CMB y la similitud morfológica de sus agentes causales basados solo en los hallazgos patológicos hacen difícil la diferenciación y diagnóstico entre ellas (2). Tomando en cuenta que en ambas muestras se tiene la certeza de haber observado células muriformes en el examen directo e histopatológico nos confirma que *C. cladosporoides* es un agente causal de CMB poco común ya que solo se encontraron reportados 4 casos en la India en 2015 (5, 24); en los primeros 3 casos los pacientes eran hombres de entre 20 y 50 años, inmunocompetentes, con una duración de la infección de 1 a 13 años en las extremidades inferiores. En los 3 casos se confirmó CMB por la presencia de células fumagoides y la especie *C. cladosporoides* por cultivo (5), mientras que el caso 4 era un agricultor varón de 55 años con una lesión en la pierna izquierda con una evolución de aproximadamente 32 años, y se diagnosticó igual que los 3 casos

anteriores, más métodos de biología molecular, donde amplificaron el fragmento de la región D1/D2 del gen LSU (28S DNAr, segunda región variable del DNAr más utilizada para su amplificación), utilizando el par de iniciadores universales NL1 e NL4 (este es otro método que sirve para la diferenciación de especies a nivel molecular de hongos) (27), la secuencia obtenida se comparó con la base de datos de NCBI GenBank; donde al igual que nosotros obtuvieron *C. cladosporioides* (24), a diferencia de *C. oxisporium* donde no se encontró ningún caso reportado de CMB ya que es muy raro encontrarlo en infecciones cutáneas y de estas la más común es PHM. Similar al reportado por Torres et al., 2018 en México (37) y Nath et al., 2015 en la India, donde después de llevar a cabo la PCR para la amplificación y secuenciación de los espaciadores internos transcritos (ITS) y el DNAr utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 (43), obtuvieron una homología del 100% con *Cladosporium langeronii* y 99% con *Bipolaris cynodontis* respectivamente (24, 37), confirmando así que agentes poco comunes como *C. cladosporioides* o extremadamente raros como *C. oxisporium*, *C. langeronii* y *Bipolaris cynodontis* son capaces de producir células fumagoides y por lo tanto ocasionar cromoblastomicosis.

La CMB en México se diagnostica por métodos convencionales, lo que podría llevar a una identificación errónea del patógeno como lo describe Torres et al., 2018, por lo tanto, el análisis de las secuencias ribosomales e ITS permiten una identificación precisa de las especies y contribuye con datos exactos de esta enfermedad humana endémica de México.

7. CONCLUSIONES

Se comprobó a nivel molecular el diagnóstico fenotípico de CMB e identifico el género y especie del agente causal a través del análisis de secuencias DNAr e ITS utilizando los iniciadores universales ITS1 e ITS4.

Se identificó a *F. pedrosoi*, como principal agente causal de CMB en México.

Se presentó una infección mixta con *C. parapsilosis*, levadura oportunista de la cual no se tienen reportes de su asociación con CMB.

Se identificó a *F. monophora*, *C. cladosporioides*, agente causal de CMB poco común en el mundo y *C. oxisporium* confirmado que este hongo dematiáceo es capaz de producir células muriformes y por lo tanto causar CMB, especies nunca reportadas en México como agentes etiológicos de CMB, por lo que consideramos importante este trabajo.

En 16 muestras de las 29 iniciales no se pudo corroborar el diagnóstico a nivel molecular, mostrando la importancia de realizar correctamente la toma de muestra y el tratamiento previo de esta antes de someterla a cualquier método de diagnóstico, ambos elementos esenciales para poder diagnosticar y tratar cualquier enfermedad.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Atoche, C. E., Torres, E., López, R., Arenas R. Panorama epidemiológico de la cromoblastomicosis en el Centro Dermatológico de Yucatán. *Dermatol Rev Mex*, 2016; 60(6):459-466.
2. Attili, S., Hoog, S., Pizzirani-Kleiner, A. rDNA-RFLP and ITS sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of Cromoblastomycosis, *Medical Mycology*, 1998; 36:219-225.
3. Bagla, P., Loeffelholz, M., & Blanton, L. S. Cerebral phaeohyphomycosis by *Fonsecaea monophora*: Report in a patient with AIDS and a ring enhancing lesion. *Medical mycology case reports*, 2016; 12: 4–7. doi: 10.1016/j.mmcr.2016.06.002
4. Blanco, M., Hernández, R., García, L., Yegres, F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela, *Medical Mycology*, 2006; 44(5):467-471, <https://doi.org/10.1080/13693780500543238>
5. Bordoloi, P., Nath, R., Borgohain, M., Huda, M. M., Barua, S., Dutta, D., Saikia, L. Subcutaneous mycoses: an aetiological study of 15 cases in a tertiary care hospital at Dibrugarh, Assam, northeast India. *Mycopathologia* 2015; 179(5–6): 425–435. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9861-x>
6. Borman, A. M., Linton, C. J., Oliver, D., Palmer, M. D., Szekely, A., Odds, F. C., & Johnson, E. M. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal

- transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *Journal of clinical microbiology*, 2009; 47(7): 2307–2310. doi:10.1128/JCM.00240-09
7. Bonifaz, A., Carrasco, E., Saúl, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*, 2001; 44:1–7.
 8. Bonifaz, A., Saúl, A., Paredes, V., Araiza, J., Fierro, L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: Experience with four, *Journal of Dermatological Treatment*, 2005; 16(1): 47-51, DOI: 10.1080 / 09546630410024538
 9. Cunha, M. M., Franzen, A. J., Seabra, S. H., Herbst, M. H., Vugman, N. V., Borba, L. P., Rozental, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC microbiology*, 2010; 16(80):1-9, doi:10.1186/1471-2180-10-80
 10. Doymaz, M. Z., Seyithanoglu, M. F., Hakyemez, İ., Gultepe, B. S., Cevik, S., & Aslan, T. A case of cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*, a neurotropic dematiaceous fungus, and a review of the literature. *Mycoses*, 2015; 58(3), 187–192. <https://doi.org/10.1111/myc.12290>
 11. Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial medica Panamericana, México, 12a Edición.
 12. Gaviria, CM., Cardona, N. Esporotricosis y cromoblastomicosis: revisión de la literatura. *CES Medicina*; 2017; 31(1): 77-91.
 13. Gugnani, H. C., Ramesh, V., Sood, N., Guarro, J., Moin-UI-Haq., Paliwal-Joshi, A., Singh, B. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium*

- oxysporum and its treatment with potassium iodide. *Med Mycol*, 2006; 44(3): 285-288.
14. Hernández, F. La biología molecular en el diagnóstico micológico en México, *Gac Méd Méx*, 2008; 144(2): 134-136.
 15. Iwen, P. Molecular detection and typing of fungal pathogens. *Clin Lab Med*, 2013; 23(4): 781–799. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(03\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(03)00082-9)
 16. Iwen, P., Hinrichs, S.H., Rupp, M.E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical mycology*, 2002; 40(1): 87-109.
 17. Kim, D. M., Hwang, S. M., Suh, M. K., Ha, G. Y., Choi, G. S., Shin, J., & Han, S. H. Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi*. *Annals of dermatology*, 2011; 23(3): 369–374. doi:10.5021/ad.2011.23.3.369
 18. Label, M., Karayan, L. C., De Hoog, S., Afeltra, J., Bustamante, T., Vitale R. G. Differential distribution patterns of *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis, exemplified by the first case due to *F. monophora* from Argentina. *Med Mycol Case Rep*. 2018; 20: 35–38. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.11.002
 19. Landlinger, C., Bašková, L., Preuner, S. Willingeret, B. Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region; *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28: 613-622. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s10096-008-0683-3>
 20. Lupi, O., Tying, S., McGinnis, R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*; 2005; 53: 931- 951.

21. Najafzadeh, M. J., Gueidan, C., Badali, H., Gerrits Van Den Ende, H. A. H. G., Xi, L., de Hoog, G. S. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Medical Mycology*, 2009; 47(1): 17–25, <https://doi.org/10.1080/13693780802527178>
22. Najafzadeh, M. J., Rezusta, A., Cameo, M.I., Zubiri, M. L., Yus, M. C., Badali, H., Revillo, M. J., De Hoog, G. S. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol*. 2010; 48(2):390-393. doi: 10.1080/13693780903008813
23. Najafzadeh, M. J., Sun, J., Vicente, V., Xi, L., Gerritsvan den Ende A. H., de Hoog, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med Mycol* 2010; 48(6):800–806. <https://doi.org/10.3109/13693780903503081>
24. Nath, R., Barua, S., Barman, J., Swargiary, P., Borgohain, M., Saikia, L. Subcutaneous Mycosis Due to *Cladosporium cladosporioides* and *Bipolaris cynodontis* from Assam, North-East India and Review of Published Literature. *Mycopathologia*; 2015; 180(5-6): 379-87. doi: 10.1007/s11046-015-9926-x.
25. Navarrete, M., Arenas, R., Muñoz, V. F., Atoche, C. E., Bonifaz, A. Cromoblastomycosis en México: revisión de 603 casos en siete décadas. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 2017; 12(2): 87-93
26. Pereiro, M.Jr., Jo-Chu, J., Toribio, J. Phaeohyphomycotic cyst due to *Cladosporium cladosporioides*. *Dermatology*, 1998;197(1): 90-92.

27. Queiroz, F., Esterre, P., Perez, M, Vitale, R. G., Salgado, C. G., Bonifaz, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Micology*. 2009;47(1): 3-15.
28. Revankar, S. G., Sutton, D. A. Melanized fungi in human disease. *Clinical microbiology reviews*, 2010; 23(4), 884–928. doi:10.1128/CMR.00019-10
29. Rojas, C., León R. B., Pérez, A. A., Aguirre, M., Moreno, M. G. Phenotypic and molecular identification of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. *Mycoses*, 2015; 58(5):267-272. <https://doi.org/10.1111/myc.12308>
30. Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera M. L., Wickes, B. L. DnaA universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses*, 2014; 57(10): 612-622 <https://doi.org/10.1111/myc.12208>
31. Romano, C., Bilenchi, R., Alessandrini, C., Miracco, C. Case report. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium oxysporum*. *Mycoses*, 1999; 42(1-2): 111-115.
32. Romero, M, Ruíz L.F., Castillo, A., Arenas, R., Vega, M. E., Xicohtencatl-Cortes J, Espinoza, M., Hernández, R. An impressive case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* in a patient with a long history of fungal infection. *J Medical mycology*, 2018; 28(4):663-665. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.07.008
33. Santos, A. L., Palmeira, V. F., Rozental, S., Kneipp, L. F., Nimrichter, L., Alviano, D. S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major

- etiologic agent of chromoblastomycosis, *FEMS Microbiology Reviews*, 2007; 31(5): 570-591: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00077.x>
34. Sueli, T., Cury, A., Martis, L., Hiroyuki, M., Dominguez, R. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007; 57: 267-272.
35. Telles, F., de Hoog, S., Santos, D. W. C. L., Salgado, G. C., Vicente, V. A., Bonifaz, A., Roilides, E., Xi, L., Azevedo, C. D. M. P. S., da Silva, M. B., Pana, Z. D., Colombo, A. L., Walsh, T. J. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev*, 2017; 30:233–276. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-16>
36. Thomas, E., Bertolotti, A., Barreau, A., Klisnick, J., Tournebize, P., Borgherini, G., Zemali, N., Jaubert, J., Jouvion, G., Bretagne, S., Picot, S. From phaeohyphomycosis to disseminated chromoblastomycosis: A retrospective study of infections caused by dematiaceous fungi. *Med Mal Infect*, 2018; 48(4): 278-285. doi:10.1016/j.medmal.2017.09.011
37. Torres, E., Arenas, R., Hernández, R. Chromoblastomycosis due to *Cladosporium langeronii*. Molecular diagnosis of an agent previously diagnosed as *Fonsecaea pedrosoi*. *An Bras Dermatol*, 2018; 93(3): 475–476. doi:10.1590/abd1806-4841.20187644
38. Torres, E., Isa, R., Isa, M., Arenas, R. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol*; 2012; 30: 403-408.
39. Treviño, R. D. J., González, J. G., Garza, E., González, G. M. Candida parapsilosis, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria*, 2012; 14(56):125-181.

40. Ventura, R., Failoc, V., Silva, H. (2017). Cromoblastomycosis: características clínicas y microbiológicas de una enfermedad desatendida, *Rev. Chil. Infectol*, 2017; 34(4): 404-407.
41. Vicente, V. A., Attili-Angelis, D., Pie, M. R., Queiroz-Telles, F., Cruz, L. M., Najafzadeh, M. J., Pizzirani-Kleiner, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in mycology*, 2008; 61, 137–144. doi:10.3114/sim.2008.61.14
42. Vieira, M. R., Milheiro, A., Pacheco, F.A. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Med Mycol*, 2001; 39(1):135-7.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc., 1999; 315-322.
- <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
44. Xi, L., Sun, J., Lu, C., Liu, H., Xie, Z., Fukushima, K., Takizawa, K., Najafzadeh, M. J., de Hoog, G. S., Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China, *Medical Mycology*, 2009; 47(1): 27–33. <https://doi.org/10.1080/13693780802468209>

