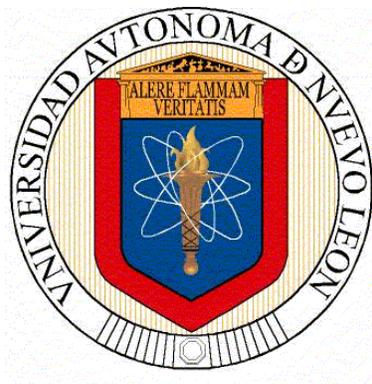


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**FENOTIPIFICACION Y GENOTIPIFICACION DE AISLAMIENTOS  
CLINICOS DE UN AREA ENDEMICA DE CROMOBLASTOMICOSIS  
EN VENEZUELA Y SU CORRELACION CLINICO  
EPIDEMIOLOGICA**

**Por**

**OLGA CAROLINA ROJAS GARCIA**

**Como requisito para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS  
con orientación en Microbiología Médica**

**JULIO DE 2011**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS  
DE UN ÁREA ENDÉMICA DE CROMOBLASTOMICOSIS EN VENEZUELA Y SU  
CORRELACIÓN CLINICO EPIDEMIOLÓGICA**

**Por**

**OLGA CAROLINA ROJAS GARCÍA**

**Como requisito para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS**

**con orientación en Microbiología Médica**

**JULIO DE 2011**

**"FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS  
DE UN ÁREA ENDÉMICA DE CROMOBLASTOMICOSIS EN VENEZUELA Y  
SU CORRELACIÓN CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA"**

*M. C. Olga Carolina Rojas García*

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ**  
Director de Tesis



---

**DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. VIRGILIO BOCANEGRA GARCÍA**  
Comisión de Tesis



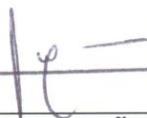
---

**DRA. LYDIA RIVERA MORALES**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. ELVA ARÉCHIGA CARVAJAL**  
Comisión de Tesis



---

**DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

---

**FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS  
DE UN ÁREA ENDÉMICA DE CROMOBLASTOMICOSIS EN VENEZUELA Y SU  
CORRELACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA**

**Presentado por: M. C. Olga Carolina Rojas García**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Gloria Ma. González González en colaboración con la sección de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva y Social del Decanato de Ciencias de la Salud, de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto. Venezuela.**



---

**Dra. Gloria Ma. González González**

## **AGRADECIMIENTO**

**A la Dra. Gloria Ma. González González**

**A la Dra. Elvira Garza González**

**Al Dr. Virgilio Bocanegra García**

**A los miembros de la comisión de tesis**

**A la Dra. Raquel Ballesteros Elizondo**

**A las Químicas Lydia y Diana**

**A las compañeras de laboratorio Lucy y Alma**

**A los excelentes técnicos Angelitos y el Sr. Carlos**

**A mis compañeros y amigos de Micro**

**A mis amigos de la Facultad de Medicina UANL**

**A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”**

**A mis pacientes.**

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	Página
1. INTRODUCCIÓN. . . . .	1
1.1    Generalidades de la cromoblastomycosis. . . . .	1
1.2    Epidemiología. . . . .	2
1.3    Agentes etiológicos. . . . .	3
1.3.1    Género <i>Fonsecaea</i> . . . . .	3
1.3.2    Género <i>Cladophialophora</i> . . . . .	4
1.3.3    Género <i>Phialophora</i> . . . . .	5
1.3.4    Género <i>Rhinocladiella</i> . . . . .	6
1.3.5    Género <i>Exophiala</i> . . . . .	6
1.4    Características clínicas. . . . .	6
1.5    Diagnóstico microbiológico. . . . .	8
1.5.1    Examen directo. . . . .	8
1.5.2    Cultivo. . . . .	9
1.5.3    Pruebas fisiológicas. . . . .	9
1.5.4    Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> . . . . .	10
1.5.5    Identificación molecular. . . . .	11
1.6    Estudios de variabilidad genética. . . . .	12
1.7    Tratamiento. . . . .	13

CAPITULO	Página
1.8	Justificación. . . . . 15
1.9	Objetivo general. . . . . 16
1.9.1	Objetivo general. . . . . 16
1.9.2	Objetivos específicos. . . . . 16
2.	MATERIALES Y MÉTODOS. . . . . 17
2.1	Estrategia general. . . . . 17
2.2	Recolección de datos clínicos y epidemiológicos. . . . . 19
2.2.1	Criterios de inclusión. . . . . 19
2.2.2	Criterios de exclusión. . . . . 19
2.2.3	Historia clínica. . . . . 20
2.3	Estudio microbiológico. . . . . 22
2.3.1	Examen directo. . . . . 22
2.3.2	Cultivo . . . . . 22
2.3.3	Activación de los aislamientos. . . . . 22
2.3.4	Estudio macroscópico. . . . . 23
2.3.5	Estudio microscópico. . . . . 23
2.3.6	Estudio fisiológico. . . . . 23
2.3.7	Pruebas adicionales. . . . . 24
2.4	Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> . . . . . 24
2.4.1	Método de macrodilución. . . . . 24

CAPITULO	Página
2.4.2	Agentes antifúngicos. . . . . 24
2.4.3	Preparación del inóculo. . . . . 25
2.4.4	Condiciones del macrométodo. . . . . 26
2.4.5	Análisis estadístico. . . . . 26
2.5	Identificación molecular. . . . . 27
2.5.1	Extracción de ADN. . . . . 26
2.5.2	Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr. . . 28
2.5.3	Purificación de los productos amplificados. . . . . 29
2.5.4	Secuenciación de los productos de la PCR. . . . . 29.
2.5.5	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas. . . . . 30
2.5.6	Depósito de secuencias en el GenBank. . . . . 30
2.6	Variabilidad genética. . . . . 30
2.6.1	ERIC-PCR. . . . . 30
2.6.2	Análisis de los polimorfismos. . . . . 31
2.7	Correlación de los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos. . . . . 31
3	RESULTADOS. . . . . 33
3.1	Características demográficas. . . . . 33
3.1.1	Grupos etarios . . . . . 34
3.1.2	Origen geográfico. . . . . 36

CAPITULO	Página
3.1.3 Ocupación. . . . .	36
3.1.4 Localización de las lesiones. . . . .	37
3.1.5 Características clínicas. . . . .	38
3.1.6 Tiempo de evolución de las lesiones. . . . .	40
3.2 Aislamientos clínicos. . . . .	41
3.2.1 Identificación macro y microscópica. . . . .	41
3.2.2 Pruebas fisiológicas. . . . .	45
3.2.3 Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> . . . . .	49
3.2.4 Identificación molecular. . . . .	50
3.3 Variabilidad genética. . . . .	52
3.4 Correlación de los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos. . . . .	54
3.4.1 Análisis de la asociación entre el género, tiempo de evolución y severidad de las lesiones. . . . .	54
3.4.2 Asociación de los polimorfismos de ADN, demografía y características clínicas. . . . .	55
3.4.3 Asociación entre los polimorfismos de ADN con las CMIs. . . . .	57
4 DISCUSION. . . . .	58

5	CONCLUSIONES. . . . .	61
6	PERSPECTIVAS. . . . .	62
7	REFERENCIAS. . . . .	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Antifúngicos utilizados y compañías farmacéuticas. . . . .	25
2. Iniciadores y secuencias utilizadas para la PCR y secuenciación. . . . .	28
3. Distribución de pacientes según grupos etarios. . . . .	34
4. Distribución de pacientes según localización de las lesiones. . . . .	37
5. Distribución de pacientes según tiempo de evolución de las lesiones. . . . .	40
6. Características fisiológicas de los aislamientos de <i>C. carrionii</i> . . . . .	47
7. Características fisiológicas de <i>F. pedrosoi</i> , <i>C. velox</i> y aislamiento no identificado. . . . .	48
8. Media geométrica, rango, CMI <sub>50</sub> y CMI <sub>90</sub> de <i>C. carrionii</i> , <i>F. Pedrosoi</i> y <i>C. velox</i> en µg/mL. . . . .	49
9. Número de referencia del laboratorio, número de acceso GenBank, especies y origen geográfico. . . . .	51
10. Asociación de género, tiempo de evolución y severidad de las lesiones. . . . .	54
11. Asociación entre los polimorfismos de ADN demografía y características clínicas. . . . .	56
12. Asociación entre los polimorfismos de ADN con las CMIs. . . . .	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de estrategia general seguida para la fenotipificación y genotipificación de aislamientos clínicos de un área endémica de cromoblastomycosis en Venezuela y su correlación clínico-epidemiológica. .	18
2. Historia clínica. . . . .	21
3. Distribución de pacientes según origen geográfico. . . . .	35
4. Clasificación de las lesiones según las formas clínicas. . . . .	39
5. Apariencia macroscópica de <i>C. carrionii</i> . . . . .	41
6. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de <i>C. carrionii</i> . . . . .	42
7. Apariencia macroscópica de <i>F. pedrosoi</i> . . . . .	42
8. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de <i>F. pedrosoi</i> . . . . .	43
9. Apariencia macroscópica de <i>C. velox</i> . . . . .	43
10. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de <i>C. velox</i> . . . . .	44
11. Apariencia macroscópica de aislamiento no identificado. . . . .	45
12. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de aislamiento no identificado. . . . .	45
13. Dendograma basado en ERIC-PCR. . . . .	53

## LISTA DE GRÁFICOS

Figura	Página
1. Distribución de pacientes según ocupación. . . . .	36

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEM	Agar extracto de malta
AHA	Agar harina de avena
ANS	Agar nutriente sintético
APD	Agar papa dextrosa
ATCC	American Type Culture Collection
AMB	Anfotericina B
°C	Grados centígrados
CLSI	Committee Clinical Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI <sub>50</sub>	La mínima concentración de antifúngico que inhibe el 50% de las cepas
CMI <sub>90</sub>	La mínima concentración de antifúngico que inhibe el 90% de las cepas
cm	Centímetros
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Concensus
h	Hora
ITS	Internal Transcriber Spacer
ITZ	Itraconazol
µg	Microgramos
ml	Mililitros

NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory
PCR	Polimerasa Chain Reaction
pH	Potencial de hidrógeno
PSZ	Posaconazol
VCZ	Voriconazol
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
%	Porcentaje
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBF	Terbinafina

## RESUMEN

Olga Carolina Rojas García

Fecha de obtención del Grado: Julio de 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título del Estudio: FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE UN ÁREA ENDÉMICA DE CROMOBLASTOMICOSIS EN VENEZUELA Y SU CORRELACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA**

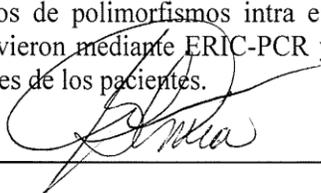
**Número de Páginas: 81**

Candidato al grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

**Área de Estudio: Microbiología.**

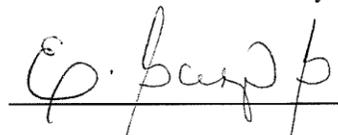
**Propósito y Método de estudio:** La cromoblastomycosis es una enfermedad granulomatosa crónica que afecta piel y tejido celular subcutáneo, es endémica en países tropicales y sub tropicales. En Venezuela el área endémica esta limita a los estados, Lara, Falcón y Zulia. Es la micosis profunda más frecuente en el país. El objetivo principal de este trabajo fue realizar la identificación fenotípica y molecular de aislamientos de pacientes con cromoblastomycosis procedentes de un área endémica de Venezuela, estudiar la variabilidad genética de los aislamientos clínicos y correlacionar los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos. Para realizar este estudio se diagnosticaron 35 pacientes en un lapso de seis años (2003-2009), los aislamientos se identificaron por métodos convencionales y herramientas moleculares. Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* en 35 cepas, siguiendo el método de referencia M38-A2 del Clinical Laboratory Standards Institute. Se realizaron estudios de variabilidad genética mediante ERIC-PCR. Se investigó la asociación de los polimorfismos de ADN con las características clínicas de los pacientes y con la epidemiología.

**Contribuciones y Conclusiones:** se confirma *Cladophialophora carrionii* como el principal agente etiológico de cromoblastomycosis en Venezuela. La enfermedad fue prevalente en pacientes masculinos de ocupación agricultores. Las lesiones se presentaron con mayor frecuencia en miembros superiores. Se describe por primera vez *Cladosporium velox* como agente etiológico de la cromoblastomycosis. Todos los aislamientos fueron susceptibles a los azoles evaluados y a la terbinafina, la droga menos efectiva fue anfotericina B. Se estudió la diversidad genética de los aislamientos, mostrando diferentes grados de polimorfismos intra e interespecies. Dos grandes clusters de *C. carrionii* se obtuvieron mediante ERIC-PCR y se evidenció asociación entre las formas clínicas y las edades de los pacientes.



**Dra. Gloria Ma. González González**

**Director de Tesis**



**Dra. Elvira Garza González**

**Co-Director de Tesis**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades sobre la cromoblastomicosis.

La cromoblastomicosis fue descubierta por Alexandrino Pedroso en Brasil en el año de 1911. Pedroso reportó la presencia de cuerpos esféricos marrones oscuros localizados en células gigantes, a partir de una biopsia de piel de lesiones nodulares y ulceradas en pierna y pie de un paciente diagnosticado con una dermatitis verrugosa.

La primera publicación que se reconoce sobre esta enfermedad fue en 1920 por Pedroso & Gómes, de 4 casos de dermatitis verrugosa en Brasil incluyendo el primer caso de Pedroso (4, 66). Brumpt en 1922 describe la etiología de los casos detectados en Brasil y les dio el nombre de *Hormodendrum pedrosoi* en honor a quien descubrió el primer caso, posteriormente renombrados por Negroni en 1936 como *Fonsecaea pedrosoi* (15, 60). Terra *et al* en 1922, definió el término de cromoblastomicosis, para señalar las patologías causadas por levaduras pigmentadas (81). En 1992 la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM) recomendó el término de cromoblastomicosis que ha sido mantenido oficialmente hasta el presente (63).

El primer caso de cromoblastomicosis en Venezuela se diagnosticó por histopatología por José Antonio O'Daly en 1938 (62), posteriormente publicaron 8 casos en el año 1943 (61). Trejos, investigador de Costa Rica en 1954 definió una nueva especie de cromoblastomicosis de cepas recuperadas en Venezuela enviadas por

el Dr. Humberto Campins (18), desde el Estado Lara como *Cladosporium carrionii*, reubicada en 1995 por de Hoog *et al*, en el género *Cladophialophora* (29, 84).

La cromoblastomycosis se define como infección subcutánea causada por hongos pigmentados, dematiáceos de pared gruesa, que forman estructuras multicelulares llamadas células muriformes o cuerpos escleróticos en los tejidos (3, 53). Es una micosis profunda granulomatosa localizada en piel y tejido celular subcutáneo, causada por hongos dimorfos cuyo hábitat es el suelo, fragmentos de madera, plantas, hojas y materia orgánica en descomposición. Los agentes etiológicos más aislados en el mundo son *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii*, con menor frecuencia se reporta *Fonsecaea monophora*, *Phialophora verrucosa* y en raros casos *Rhinochrysiella aquaspersa* y algunos reportes de *Exophiala jeanselmei* y *Exophiala spinifera* (9, 65). Recientemente *Exophiala bergeri* y *Fonsecaea nubica* han sido identificados como nuevos agentes de cromoblastomycosis (43, 58). Un caso raro de cromoblastomycosis se publicó en un paciente con trasplante renal causado por una especie no esporulada del género *Rhytidhysterium* (22).

## 1.2 Epidemiología.

La cromoblastomycosis es una enfermedad cosmopolita, endémica, no contagiosa, de distribución mundial que se presenta con mayor frecuencia en los países tropicales y subtropicales, con alta incidencia de casos entre 30° N y 30° S (4). Las áreas de alta endemidad para la enfermedad son África (Madagascar y Sudáfrica), en Latinoamérica (Brasil, Venezuela, México, Cuba y República Dominicana). También se reporta con una alta frecuencia en otros continentes, como Asia (India, China, Japón

y Malasia) y Australia. Casos raros se han reportado en Canadá, norte de Europa y Estados Unidos (71). La mayoría de los agentes etiológicos pertenecen a la familia *Herpotrichillaceae*, (23-24), cuyo hábitat es el medio ambiente. El mecanismo de infección es exógeno (4), la enfermedad afecta a individuos inmunocompetentes que están en contacto con el hongo, no tiene predilección por raza, género o edad. Es una enfermedad ocupacional, que generalmente se reporta en trabajadores rurales, agricultores, mineros, quienes trabajan sin protección y están predispuestos a adquirir la infección a través de heridas punzantes. La localización de las lesiones se describe principalmente en miembros inferiores. La mayoría de los casos ocurren en pacientes masculinos en edades productivas de la vida entre los 20 y 60 años. Sin embargo el número limitado de casos entre los agricultores y granjeros pueden suponer otros factores involucrados para el desarrollo de la enfermedad (4).

### **1.3 Agentes etiológicos de la cromoblastomycosis.**

El hábitat de los agentes etiológicos de la cromoblastomycosis se supone que es el medio ambiente, pero el aislamiento de la naturaleza de estos microorganismos ha sido difícil (89).

#### **1.3.1 Género *Fonsecaea*.**

Las especies del género *Fonsecaea* son anamorfos. *F. pedrosoi* es el principal agente etiológico de cromoblastomycosis en el mundo, es un hongo saprófito, filamentoso (40, 76). Sin embargo Vicente *et al* (89) demostraron que los aislamientos

del medio ambiente son diferentes de los aislamientos clínicos. El nicho ecológico de estos microorganismos del género *Fonsecaea* es desconocido, es probable que se requiera parámetros especiales para su aislamiento como el pasaje en animales (58). *F. pedrosoi* se reporta en estricta asociación con esta enfermedad. Por otro lado, *F. monophora* se considera menos asociada a cromoblastomycosis, también afecta a otros órganos como cerebro, nódulos linfáticos, ganglios cervicales y vías biliares. *F. monophora* puede aislarse del medio ambiente (57). Recientemente se describió una nueva especie *F. nubica* que al igual que *F. pedrosoi* está asociada a cromoblastomycosis, *sensu stricto*. La distinción morfológica entre las tres especies es difícil, clínicamente esa distinción es relevante, porque las especies difieren en patología y virulencia. *F. monophora* se considera la especie más virulenta por su capacidad para afectar otros órganos. Un 81.4% se aísla de pacientes con cromoblastomycosis, en un 9.3% de infecciones cerebrales y un 9.3% del medio ambiente. La distribución geográfica difiere entre las especies, pero *F. pedrosoi* es procedente de América Central y de Sudamérica, con pocos casos reportados en otros países y nunca ha sido descrito como agente etiológico de cromoblastomycosis en China. Un pequeño porcentaje de los aislamientos de *F. monophora*, proceden de Sudamérica, un porcentaje importante de China y pocos casos reportados en otros países y similar distribución presenta *F. nubica* (58).

### **1.3.2 Género *Cladophialophora*.**

Las especies del género *Cladophialophora* son anamorfos, frecuentemente encontradas en infecciones humanas. El género se ubicó entre los hongos que exhiben

conidiogénesis tipo *Phialophora* pero esta característica limita la especie *C. carrionii*. Su estado teleomorfo no se ha encontrado. *C. carrionii* es el principal agente causal de cromoblastomicosis en regiones tropicales y subtropicales, semiáridas (71). Se reporta con frecuencia en Madagascar, Sudáfrica, Venezuela, Sur de China y Australia (13, 36). Dentro del género se han encontrado otras especies clínicamente importantes como: *Cladophialophora bantiana* y *Cladophialophora modesta* que causan infecciones cerebrales. *Cladophialophora devriesii* y *Cladophialophora arxii* causan infección diseminada. *Cladophialophora boppi* y *Cladophialophora saturnica* causan infecciones cutáneas (8). Algunas especies de *Cladophialophora* se encuentran en asociación y viviendo en plantas (28). Se cree que en las espinas de los cactus en las que este hongo crece podrían funcionar como vehículo de introducción al cuerpo humano (21).

### **1.3.3 Género *Phialophora*.**

El género *Phialophora* tiene más de 40 especies, la mayoría saprófitas del medio ambiente. De importancia clínica se describen *Phialophora verrucosa* y *Phialophora richardsiae* como agentes de cromoblastomicosis y feohifomicosis (50). *P. verrucosa* se ha aislado de madera en descomposición, troncos, corteza de pinos y suelos en el Japón (44). Se han reportado casos de cromoblastomicosis por *P. verrucosa* en países tropicales y subtropicales principalmente en Sudamérica y Japón. Recientemente se reportó un caso de cromoblastomicosis en Corea causado por *Phialophora richardsiae* (79).

#### **1.3.4 Género *Rhinocladiella*.**

El género *Rhinocladiella* comprende un grupo de especies saprófitas, aisladas del suelo, piedras, líquenes, oportunistas, productoras de feohifomicosis, lesiones cutáneas así como infecciones del sistema nervioso central. Recientemente en el género *Rhamicloridium* se incluyen especies anteriormente del género *Rhinocladiella* (5). La única especie relacionada hasta el momento con cromoblastomicosis es *R. aquaspersa*. Descrita por Borelli en 1942 como *Acrotheca aquaspersa* y redefinida como *R. aquaspersa* en 1972 (12). Se han reportado pocos los casos de cromoblastomicosis por este agente causal (7, 64, 67, 78). Su incidencia está limitada al continente americano.

#### **1.3.5 Género *Exophiala*.**

Las especies del género *Exophiala* comprende un gran grupo de levaduras negras, son anamorfos, implicadas en un sin número de infecciones humanas entre las que se destacan feohifomicosis, cromoblastomicosis y micetomas. Como agentes de cromoblastomicosis se han reportado a *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala spinifera* y recientemente *Exophiala bergeri* (9, 65, 72).

### **1.4 Características clínicas.**

La cromoblastomicosis es una enfermedad crónica en ocasiones debilitante y supurativa. Es una micosis granulomatosa subcutánea que se adquiere por inoculación traumática del hongo en la piel. Las lesiones progresan lentamente, no responden

usualmente al tratamiento y a veces reaparecen. Histopatológicamente hay evidencia que estos hongos sobreviven en los tejidos subcutáneos por largos períodos produciendo enzimas proteolíticas y manteniendo condiciones microaerofílicas facultativas. Su patogenia no se ha investigado extensamente, algunos estudios demuestran que en la interacción hospedero parásito hay una predominante respuesta inmune celular, con la activación de macrófagos que envuelven a los hongos para su fagocitosis, sin embargo, ésta no ocurre y la muerte celular se observa raramente. En estudios *in vitro* realizados con *F. pedrosoi* se puso en evidencia la protección de la secreción de la pared celular asociada con componentes de la melanina y la capacidad de protegerlo contra la destrucción celular. En pacientes con lesiones severas hay predominio de la citocina IL-10, bajos niveles de IFN-gamma y una ineficiente proliferación de células T, lo contrario ocurre en pacientes con lesiones leves (35, 38, 52). Los pacientes desarrollan una hiperplasia pseudoepiteliomatosa, acompañada de una eliminación transepitelial del hongo y una acantosis grave. Como en toda reacción granulomatosa, la lesión evoluciona hacia la fibrosis y la relación parásito-hospedero termina con una cicatrización en el sitio de formación del granuloma. Durante este proceso el agente patógeno desaparece del sitio de cicatrización, se forman nuevos focos de infección y el agente etiológico persiste con la formación de un nuevo granuloma en los tejidos (75, 85). Las lesiones generalmente ocurren en miembros inferiores cuando el agente etiológico es *F. pedrosoi*, especialmente en aquellos individuos que están mal calzados o simplemente no usan zapatos rutinariamente en sus labores del campo. Sin embargo cuando el agente etiológico es *C. carrionii* las lesiones usualmente se presentan en miembros superiores (68, 71-72). Las lesiones iniciales son generalmente solitarias y unilaterales, presentándose una lesión pequeña, eritematosa

violácea tipo pápula. Las pápulas incrementan su tamaño en semanas y con el tiempo se desarrollan diferentes tipos de lesiones de apariencia polimórfica. El prurito es un síntoma importante de la enfermedad (71). Existen varias clasificaciones de la enfermedad (19, 51). Carrión en 1950 caracteriza la enfermedad en 5 variedades: nodular, tumoral, verrugosa, cicatrizal y tipo placa (19). Queiroz-Tellez *et al* en una revisión sobre las manifestaciones clínicas adapta la clasificación a la descrita por Carrión (71).

La cromoblastomicosis está asociada a bajas tasas de curación, particularmente cuando la enfermedad es extensa y crónica. En 1999 y en el 2010, se reportaron casos de pacientes con lesiones asociadas a degeneración a carcinoma epidermoide (37, 46, 83).

## **1.5 Diagnóstico microbiológico.**

El diagnóstico de la enfermedad se basa en pruebas convencionales de laboratorio como el examen directo y el cultivo.

### **1.5.1 Examen directo.**

Se basa en la toma de muestra de la lesión activa del paciente. La muestra ideal puede ser escamas, pus o tejido. El examen directo se realiza con KOH sobre la muestra. La forma parasitaria del hongo son los cuerpos escleróticos de Medlar, estructuras redondeadas melanizadas de 4 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, son de pared gruesa y puede observarse un tabique o plano de división (75).

### **1.5.2 Cultivo.**

El cultivo o aislamiento del hongo se puede realizar en medio selectivo como el micosel, no selectivos como el agar de Sabouraud y agar papa dextrosa (APD).

La temperatura óptima para el crecimiento de estos hongos es de 25 a 30°C, son de crecimiento lento y desarrollan un micelio dematiáceo (75). Hasta hace poco tiempo las características microscópicas y macroscópicas de los cultivos, prevalecían para hacer el diagnóstico etiológico de la enfermedad, pero la laboriosidad requerida para la identificación de estos agentes causales, la necesidad de micólogos expertos y la dificultad de separar especies estrechamente relacionadas creó controversia en la identificación precisa de los agentes etiológicos.

### **1.5.3 Pruebas fisiológicas.**

No existe un patrón bioquímico o fisiológico de identificación (8, 25, 33). Los estudios fisiológicos no permiten diferenciar los agentes etiológicos de la cromoblastomycosis. La asimilación de azúcares, la hidrólisis de la urea, la prueba de licuefacción de la gelatina, el crecimiento en diferentes concentraciones de sal (NaCl), crecimiento en agar de micosel, son pruebas que resultan ambiguas para poder distinguir estas especies. Todos los aislamientos crecen a 37°C pero no a 40°C. Estas características son compartidas por otros hongos melanizados pertenecientes al orden *Chaetothyriales* (26).

#### **1.5.4 Estudios de susceptibilidad *in vitro*.**

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos nos permiten valorar la respuesta de un hongo a uno o más antifúngicos evaluados y correlacionar la actividad de las drogas con estudios *in vivo*. Son útiles también para detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (31). Es por ello sumamente importante su estudio en todas aquellas especies fúngicas que sean patógenas. Los métodos y técnicas de estudio de susceptibilidad *in vitro* de los hongos a los agentes antifúngicos son similares a los de los antibacterianos, y su diseño sigue las mismas directrices (34, 77). En el caso de los hongos filamentosos las dificultades son mayores ya que determinados factores hacen difícil la evaluación de las pruebas *in vitro*. Entre ellos podemos citar su lento crecimiento que se traduce en períodos de incubación más largos provocando la pérdida de actividad de los antifúngicos y la baja incidencia que presentan estas infecciones fúngicas hace que la definición de los puntos de corte sea difícil de establecer. En 1982, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), ahora Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), creó un subcomité con el objeto de establecer una normativa para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos. Para 1998 se publicó el primer documento que describe un método de referencia para determinar la susceptibilidad *in vitro* para hongos filamentosos M38-P (59). Tras varias publicaciones, en el 2002 se publicó el documento M38-A para los hongos filamentosos. El documento propone un método de dilución en medio líquido y establecen las variables experimentales críticas para los ensayos *in vitro*, variables como la preparación del inóculo, el medio de cultivo, las temperaturas y tiempos de incubación adecuados para el crecimiento de los hongos, así como los criterios de lectura de las CMIs. Desde su aparición, los protocolos

establecidos por el CLSI han sido aceptados universalmente como los métodos de referencia para los ensayos de la actividad *in vitro* de los compuestos antifúngicos. Actualmente se dispone del documento M38-A2, del CLSI (20), para trabajar en condiciones estandarizadas con hongos filamentosos. El documento M38-A2 es un método de referencia, para facilitar un acuerdo entre los laboratorios en la medición de susceptibilidad de hongos filamentosos contra agentes antifúngicos.

#### **1.5.5 Identificación molecular.**

Las distintas especies de hongos filamentosos dematiáceos parecen estar en relación íntima y son muy difíciles de distinguir entre sí. Parece ser que ningún aspecto taxonómico dentro de la micología médica ha provocado tanto debate y controversia como los agentes etiológicos de esta enfermedad (74). Los taxónomos han recurrido a la biología molecular para solucionar el problema en la separación de especies estrechamente relacionadas. Sólo un número limitado de especies pueden ser reconocidas por morfología. Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado hasta la fecha para resolver estos problemas. Los primeros estudios fueron realizados por Kawasaki *et al* (48), partiendo del ADN mitocondrial de especies identificadas morfológicamente y utilizaron la técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), para dilucidar la diversidad de éstas especies según su origen geográfico. Otros estudios realizados por Caligiorne *et al*, con hongos dematiáceos patógenos, utilizaron el ADN genómico y amplificaron las regiones ITS, para obtener separación de grupos de hongos productores de cromoblastomicosis y feohifomicosis mediante RFLP, y amplificación al azar de ADN (RAPD) (16-17). Ablitz *et al* diseñaron iniciadores con secuencias conservadas, para una

rápida identificación de *C. carrionii* y *F. pedrosoi* (1-2, 16-17, 47-48). Hasta este momento la región del genoma fúngico más utilizada para los estudios de identificación a nivel de especie es el ADN ribosomal. Las regiones más comúnmente estudiadas son tres genes codificantes 18S, 5.8S y 28S así como los espaciadores internos ITS1 e ITS2, también están asociados a estos genes la región espaciadora intergénica IGS con dos regiones no codificantes ETS1 y ETS2 (45). Todas estas regiones de ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos. *F. pedrosoi* es una de las especies más estudiadas a nivel molecular. Estudios recientes mediante secuenciación del locus ITS demuestran clara separación de las especies del género *Fonsecaea* (25, 58). Otros genes también han sido utilizados recientemente incorporando principalmente el análisis de genes codificantes de proteínas (58).

### **1.6 Estudios de variabilidad genética.**

Son pocos los estudios que se han realizado acerca de la variabilidad genética en agentes causales de cromoblastomycosis. Attili *et al* en 1998 y Tanabe *et al* en el 2004 utilizaron RFLP e ITS para estudios de epidemiología molecular en aislamientos identificados morfológicamente como *F. pedrosoi* y *F. compacta* (6, 80). No obstante no aportaron datos concluyentes, ya que no fue posible distinguir entre especies, sugiriendo estos estudios una mejor revisión del género *Fonsecaea*. Recientemente estudios utilizando la técnica de RAPD han demostrado un alto grado de diversidad genética entre las especies del género *Fonsecaea* identificadas con herramientas moleculares (25, 92).

## 1.7 Tratamiento.

El tratamiento y el pronóstico de la cromoblastomicosis depende del agente etiológico, del tamaño y la extensión de la lesión, las características clínicas y la presencia de complicaciones como: la fibrosis de los tejidos o el grado de compromiso linfático y edema que reduce la llegada de óptimos niveles de antifúngicos en los tejidos. El éxito terapéutico puede ser relacionado con el agente etiológico y *C. carrionii* es más sensible que *F. pedrosoi* (72). En pacientes con lesiones pequeñas, el tratamiento oportuno puede resolver la infección.

En el tratamiento específico de la cromoblastomicosis están involucrados procedimientos como la extirpación quirúrgica, termoterapia, electrocoagulación y la crioterapia (14, 30, 42, 49, 73), cuyo mecanismo de acción es físico, actuando a través de la eliminación del hongo y causando cicatrices indeseables. En el abordaje racional, se utilizaron fármacos tales como 5-fluorocitosina el cual actúa como un inhibidor de la síntesis de macromoléculas (69-70). La anfotericina B (56, 82) es un antibiótico poliénico, también utilizado durante la época de los años 50 en el tratamiento de la cromoblastomicosis (con efecto fungicida inmediato) (56). Este compuesto es un potente antifúngico en un gran número de afecciones micóticas, incluyendo las sistémicas. Sin embargo su insolubilidad genera un efecto secundario indeseable, con severos efectos nefrotóxicos. Por ende su uso requiere de un monitoreo permanente del paciente y sólo se administra en micosis severas, donde otras alternativas fracasan (82). Desde la década de los 80, se han utilizado los azoles en tratamientos orales como, ketoconazol, el primero de esta generación y posteriormente en los 90 el itraconazol y saperconazol (39, 87), compuestos azólicos inhibidores de la síntesis endógena de

esteroles (86). También en la ruta biosintética del ergosterol podemos destacar dos puntos claves la epoxidación del escualeno a partir del escualeno, paso inhibido por las alimaminas como la terbinafina (71, 95), que actúan bloqueando la síntesis del lanosterol. Presentándose en algunos casos, efectos adversos e intolerancia oral (69). Otros azoles más recientemente introducidos en el mercado son posaconazol y voriconazol los cuales son derivados triazólicos fluorados llamados azoles de segunda generación (71).

### **1.8 Justificación.**

La identificación de los agentes causales de la cromblastomicosis, por métodos fenotípicos no siempre es posible, debido a la variedad de las formas de reproducción asexual de estos hongos. El análisis molecular de los aislamientos clínicos es una excelente herramienta para conocer la etiología de manera precisa.

El estudio del fenotipo y la diversidad genética de los agentes etiológicos de la cromblastomicosis y su correlación con los datos clínico-epidemiológicos, contribuirán a un mejor entendimiento de esta patología.

## **1.9 Objetivos.**

### **1.9.1 Objetivo general.**

Determinar la correlación entre los datos clínico-epidemiológicos de pacientes con cromoblastomycosis procedentes de un área endémica de Venezuela, con el fenotipo y el genotipo de los aislamientos clínicos.

### **1.9.2 Objetivos específicos.**

1. Recolectar los datos clínicos y epidemiológicos de pacientes cromoblastomycosis.
2. Realizar la identificación fenotípica y molecular de los aislamientos clínicos.
3. Determinar la susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicos a diferentes antifúngicos.
4. Determinar la variabilidad genética de los aislamientos clínicos.
5. Correlacionar los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos.

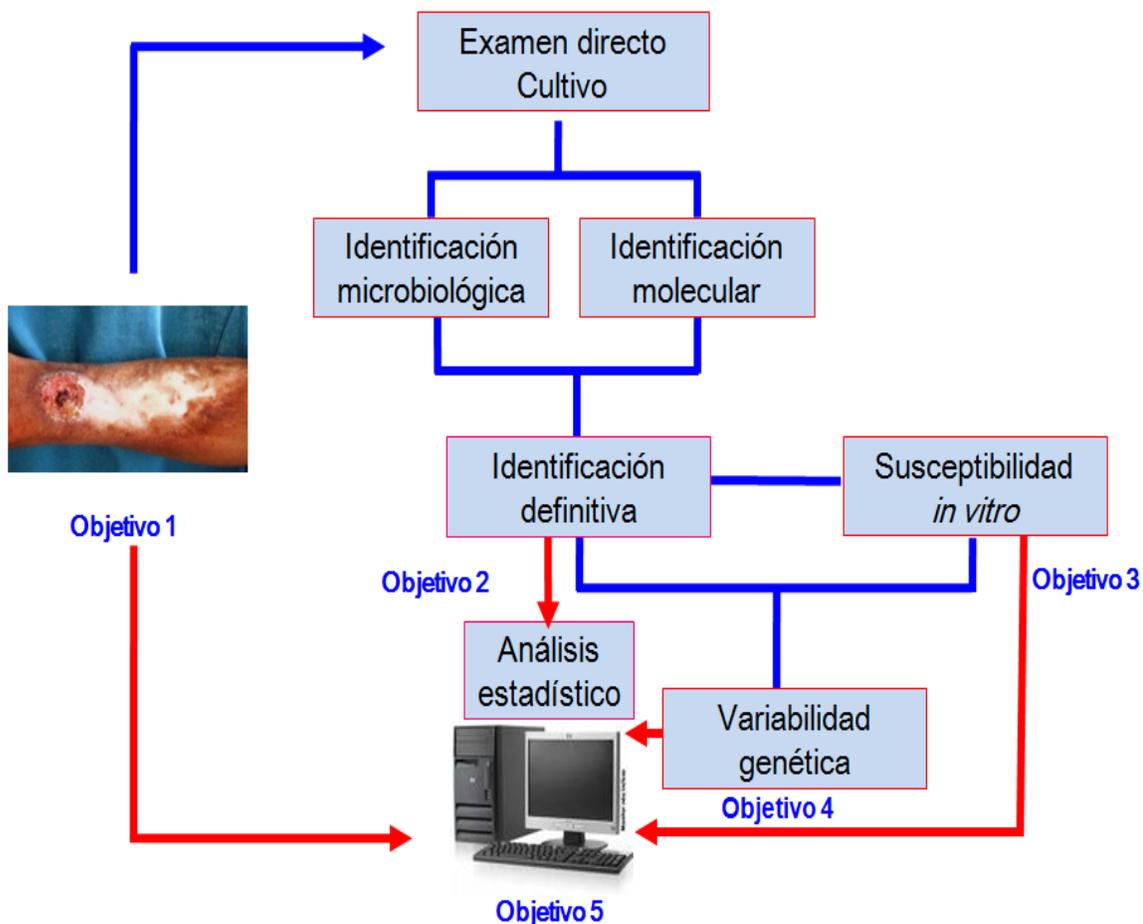
## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Estrategia general.

En la figura 1 se muestra la estrategia general que se siguió para cumplir con los 5 objetivos específicos planteados para llevar a cabo este estudio. Se recolectaron los datos clínicos y epidemiológicos de pacientes con cromoblastomicosis procedentes de un área endémica de Venezuela, diagnosticados mediante examen directo y cultivo. A todos los aislamientos clínicos se les realizó identificación microbiológica mediante la observación macroscópica y microscópica, pruebas fisiológicas, e identificación molecular para obtener la identificación definitiva. Posteriormente se llevó a cabo el estudio de susceptibilidad *in vitro* a diferentes antifúngicos. Por otro lado partiendo del ADN genómico obtenido para la identificación molecular se realizó el estudio de variabilidad genética. Por último se siguió con el análisis estadístico para buscar posibles correlaciones entre los hallazgos fenotípicos y genotípicos con las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes.

Figura 1. Esquema de la estrategia general seguida para la fenotipificación y genotipificación de aislamientos clínicos de un área endémica de cromoblastomycosis en Venezuela y su correlación clínico-epidemiológica.



## **2.2 Recolección de datos clínicos y epidemiológicos.**

Se evaluaron pacientes con lesiones sugestivas de cromoblastomycosis en un área endémica en Venezuela.

### **2.2.1 Criterios de inclusión.**

- Pacientes que acudieron a la consulta de micología en el Hospital “Dr. Luis Ignacio Montero” de Siquisique, Municipio Urdaneta, Estado Lara, Venezuela.
- Pacientes que acudieron a la consulta de micología de la Escuela de Medicina “Dr. Pablo Acosta Ortiz” de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela.
- Pacientes con examen directo positivo.
- Pacientes con cultivo positivo.
- Firma de consentimiento informado.

### **2.2.2 Criterios de exclusión.**

- Pacientes que habían recibido tratamiento antimicótico.
- Examen directo y/o cultivo negativo.
- Pacientes que se negaran a firmar el consentimiento informado.

### **2.2.3 Historia clínica.**

A todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se les aplicó un instrumento semi-estructurado (historia clínica) basado en:

- a) Datos de identificación
- b) Interrogatorio
- c) Antecedentes personales y epidemiológicos
- d) Examen físico
- e) Toma de muestra de la lesión para estudio micológico.

Se solicitaron exámenes de laboratorio tales como: biometría hemática, velocidad de sedimentación globular, pruebas de funcionamiento hepático. Los datos se registraron en el documento (Historia clínica) con una autorización de la institución que la respalda. (Ver figura 2).

Figura 2. Historia Clínica.

	<b>HOSPITAL</b> <b>“DR. LUIS IGNACIO MONTERO”</b> <b>SIQUISIQUE- MUNICIPIO URDANETA</b> <b>ESTADO LARA</b> <b>U.C.L.A.-MPPS</b>	 / /
	<b>HISTORIA CLINICA</b>	
<b>I IDENTIFICACION</b>		NH: _____
Nombres: _____ Apellidos: _____		
Edad: _____ Sexo: _____ Ocupación: _____		
Dirección: _____		
<b>II ANTECEDENTES</b>		
Antecedentes Familiares: _____		
Antecedentes Epidemiológicos: _____		
<b>III ENFERMEDAD ACTUAL</b>		
_____		
_____		
<b>IV EXAMEN FISICO</b>		
_____		
_____		
<b>V ESTUDIO MICOLÓGICO</b>		
Examen Directo: _____ Cultivo: _____		
Agente etiológico: _____ Foto: _____ Fecha: _____		
<b>VI TRATAMIENTO</b>		
_____		Fecha de inicio: _____
Exámenes de Laboratorio: _____		Fecha: _____
Hematología Completa: _____		
VSG: _____ Transaminasas: _____		Otros: _____
<b>AUTORIZACIÓN:</b>		
Yo _____ CI: _____ recibo de la Dra. Olga Carolina Rojas, médico en ejercicio, el suministro de itraconazol como farmacoterapia de mi enfermedad y la autorizo como mi médico tratante. CI: 7.566.685 CM: 3.061 MPPS: 37.777		

## **2.3 Estudio microbiológico.**

### **2.3.1 Examen directo.**

Para realizar el examen directo a cada paciente, se procedió a la toma de muestra de las lesiones activas. Para este procedimiento se limpió el área afectada con alcohol absoluto, se utilizó un bisturí para la toma de escamas, pus o tejido. El material biológico se colocó en un portaobjetos al que se le adicionó hidróxido de potasio al 10% y se cubrió con un cubreobjetos. Posteriormente se esperó unos 10 a 15 minutos y se hizo la observación al microscopio con los objetivos de 10 y 40 x.

### **2.3.2 Cultivo.**

Las escamas, pus o tejidos obtenidos de la toma de muestra del paciente, se inocularon en medio de agar dextrosa de Sabouraud adicionado de cloranfenicol (Ver Apéndice I). Los cultivos se mantuvieron a 25°C, durante 4 a 6 semanas, aquellos que resultaron positivos se resembraron cada 4 semanas hasta el momento de su estudio.

### **2.3.3 Activación de los aislamientos.**

La activación de los cultivos, se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se reactivaron todos los aislamientos en placas de (APD), se incubados a 30°C y después se realizó la resiembra cada 4 semanas, para su posterior estudio.

#### **2.3.4 Estudio macroscópico.**

Se caracterizaron macroscópicamente todos los aislamientos clínicos. Se realizó la observación de las colonias las cuales se midieron en sus diámetros semanalmente durante 4 semanas. Para la descripción de las características macroscópicas se tomó en cuenta la textura, la topografía, márgenes y el color de las colonias, la descripción definitiva de las colonias se hizo hasta la cuarta semana.

#### **2.3.5 Estudio microscópico.**

Se utilizó un microscopio Nikon eclipse 50i, con cámara digital DS-2Mv. Para el estudio de la morfología microscópica se realizaron microcultivos en (APD) a 30°C durante 4 semanas, de todos los aislamientos clínicos estudiados. Se estudiaron cada una de las estructuras fúngicas: hifas, conidióforos, células conidiógenas, conidias, cicatrices y pigmento. Se hizo el análisis morfométrico obteniendo la medida de cada una de las estructuras. Para la documentación gráfica se utilizó la cámara digital del microscopio y se hicieron tomas con los objetivos de 20 x, 40 x y 100 x de cada una de las estructuras.

#### **2.3.6 Estudio fisiológico.**

Para evaluar las características fisiológicas se utilizó el sistema API 20C AUX de Biormerieux para levaduras, adaptado a hongos filamentosos (32). Se realizó la prueba de hidrólisis de la urea, licuefacción de la gelatina y crecimiento en agar de micosel. Así como también estudios de crecimiento a diferentes temperaturas: 30, 37 y 40°C.

### **2.3.7 Pruebas adicionales.**

En los cultivos donde no pudo realizarse una identificación precisa se llevaron a cabo pruebas adicionales como: agar harina de avena y agar extracto de malta, medios utilizados para promover la esporulación. Se realizaron microcultivos en agar nutriente sintético (Ver Apéndice I) a 25°C, se sometieron los aislamientos a diferentes concentraciones de NaCl, al 5, 10, 17 y 20% y a temperaturas de 10, 25 y 35°C. Siguiendo los lineamientos de de Hoog para la identificación de hongos patógenos (27).

## **2.4 Estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos.**

### **2.4.1 Método de macrodilución.**

Se realizaron los estudios de susceptibilidad *in vitro* siguiendo el método de referencia M38-A2 del CLSI (20).

### **2.4.2 Agentes antifúngicos.**

Los agentes antifúngicos utilizados fueron proporcionados por sus respectivas compañías farmacéuticas. Se muestran en la tabla 1.

Todos los antifúngicos empleados se obtuvieron como sustancias puras y fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%, excepto anfotericina B la cual se disolvió en agua. Se prepararon diluciones seriadas de cada agente antifúngico, en un rango de concentración de

0.015 a 8 µg/ml y se dispensó 0.1ml de cada dilución en tubos de tapón de rosca (12 x12).

Los tubos con la droga se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Tabla 1. Antifúngicos utilizados y compañías farmacéuticas

Antifúngico	Compañía farmacéutica
Anfotericina B (AMB)	Bristol Myers Squibb. (Princeton, NJ, USA)
Itraconazol (ITC)	Janssen Pharmaceutica. (Beerse Belgium)
Posaconazol (POS)	Shering-Plough. (Kenilworth, NJ, USA)
Voriconazol (VRC)	Pfizer, Inc. (New York, NY, USA)
Terbinafina (TER)	Novartis. ( Mexico DF, México)

#### 2.4.3 Preparación del inóculo.

Se preparó el inóculo según recomendaciones del documento M38-A2. Se partió de una placa de APD de un cultivo con el crecimiento de 4 semanas a 30°C. Se adicionaron 2ml de solución salina estéril a cada placa, se rasparon las colonias con un aplicador de madera estéril, para obtener una suspensión homogénea, la cual se llevó a vortex para separar las conidias de las hifas, luego se filtró en gasa estéril hasta obtener un 95% de conidias. Se ajustó el inóculo a una concentración final de  $0.4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  CFU/ml. Se verificó la concentración del inóculo mediante cuenta seriada en placa. El medio de

cultivo utilizado fue el RPMI 1640 y cada suspensión fue diluida en 1:100. Los tubos con 0.1 de fármacos fueron inoculados con 0.9 mL de la suspensión de inóculo.

#### **2.4.4 Condiciones del macrométodo.**

Los tubos fueron incubados durante 7 días a 35°C, las lecturas se hicieron visuales cada 24 horas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió para la anfotericina B como la más baja concentración de droga que mostró el 100% de inhibición en el crecimiento y para los azoles y alilamina la CMI se definió como la más baja concentración de droga que mostró el 80% de inhibición del crecimiento, al compararla con el tubo control libre de droga. Se utilizaron como cepas control, *Paecilomyces variotii* MYA-3630 y *Candida krusei* ATCC 6258.

#### **2.4.5 Análisis estadístico.**

Se determinó la media geométrica (MG), la concentración mínima inhibitoria necesaria para inhibir el 50 y 90% de las cepas (CMI<sub>50</sub>) y (CMI<sub>90</sub>), el rango de susceptibilidad de cada droga y fueron calculados usando Microsoft® Office Excel 2007.

## 2.5 Identificación molecular.

### 2.5.1 Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN genómico, partiendo del micelio del hongo, crecido en APD durante 4 semanas a 30°C, se transfirió aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de micelio a un Eppendorf de 2 ml se agregó 200µl de buffer de lisis (Tris-HCl pH 8 20mM, EDTA 2mM, 1.2% triton x-100, lisozima 2mg/ml), se mezcló e incubó por 2 horas a 37° C. Se agregó 390 µl de TE 1X con SDS al 1% más 4µl de proteinasa K (2mg/ml) y se incubó por 1 hora a 55° C. Se agregó 100µl de Na Cl 5M y se mezcló, luego se agregaron 80µl de cetyl trimethyl ammonium bromide adicionado de cloruro de sodio, se mezcló e incubó por 10 min a 65°C. Posteriormente se agregaron un volumen igual de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1) y fenol saturado (250 µl) y 100 µl TE1X. Se mezcló, se centrifugó a 14.000 rpm por 8 min y se separó la fase acuosa. Se repitió el volumen igual de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1) y 250 µl de fenol saturado y 100 µl de TE1X (mezclar y centrifugar, separar la fase acuosa). A la fase acuosa final se agregaron 0.6 volumen de alcohol-isopropílico y del volumen total el 10% de acetato de sodio 3M pH 5.2 ± 2, luego se incubó a -20°C por 15 min. Se centrifugó a 14.000 rpm por 8 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla que quedó, se lavó 1ml de etanol 70%. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 8 min. Se desechó el sobrenadante, se lavó 2 veces. Se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 50 µl de TE 1X y se calentó a 65° C por 15 min. Para finalizar el ADN se cuantificó por espectrofotometría (Coulter DU 800 Beckman). Se refrigeró a -20°C hasta su utilización.

### 2.5.2 Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr.

Para la amplificación de la región ITS completa (ITS1-5.8S-ITS2), se utilizaron los iniciadores ITS5 e ITS4 (Ver tabla 2) (91). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 100 ng de ADN genómico, 10 mM Tris HCl , 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTP's, 0.2 pmol de cada primer y 1 U *Taq* polimerasa (Bioline, MA, USA). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 1 ciclo de 95°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 s, alineamiento a 55°C por 90 s y extensión a 72°C por 90 s. Por último una extensión final de 1 ciclo de 72°C por 5 min. Utilizando el termociclador Px2 Thermal cycler (Termo Electro Corporation Milford, MA, EU). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y revelados con luz UV ( UVP Biolmaging System. EpiChemi 3 Darkroom). Para comprobar el tamaño de las amplificaciones se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb HyperLadder IV (Bioline, MA, USA).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la PCR y secuenciación

<b>Iniciador</b>	<b>Locus</b>	<b>Secuencia 5' a3'</b>	<b>Referencia</b>
ITS5	ITS ADNr	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White y col. (1990)
ITS4	ITS ADNr	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White y col. (1990)

### **2.5.3 Purificación de los productos amplificados.**

Los productos de la PCR se purificaron con un kit comercial (Wizar® Genomic DNA Purification System) Promega. Madison, WI. USA.

El producto de PCR se pasó a un tubo eppendorf de 2ml, se adicionó al producto 2ml de buffer de purificación (se mezcló por inversión). A la mezcla se adicionaron 1ml de resina, se agitó en vortex 3 veces en 1 min. La suspensión obtenida se pasó por la minicolumna, se descartó la solución. La mini columna se lavó con 2 ml de isopropanol al 80%. Posteriormente se centrifugó la minicolumna, suspendida en un eppendorf a 10.000 rpm por 2 min para secar. A la minicolumna se le agregó 50µl de agua para PCR y se esperó 1 minuto. Se centrifugó la minicolumna suspendida en un eppendorf a 10.000 rpm por 20 segundos, para obtener el ADN purificado. Las muestras purificadas se almacenaron a -20 hasta el momento de su utilización.

### **2.5.4 Secuenciación de los productos de la PCR.**

Los iniciadores que se utilizaron para la secuenciación son los mismos que se utilizaron para la amplificación, ITS5 e ITS4 (Ver tabla 2).

La secuenciación se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.

### **2.5.5 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas.**

Para la obtención de secuencias consenso a partir de dos secuencias complementarias, se empleó el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor (1997-2000). Una vez obtenidas las secuencias consenso se alinearon utilizando el sistema informático BLASTn <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Las secuencias alineadas fueron comparadas con base a similitud con los datos disponibles en el GenBank.

### **2.5.6 Depósito de secuencias en el GenBank.**

Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank a través de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

## **2.6 Estudios de variabilidad genética.**

El método utilizado para generar amplificaciones genómicas de los hongos fue mediante amplificación de secuencias intergénicas repetitivas ERIC-PCR, desarrollado como fue descrito inicialmente por Versalovic *et al*, utilizando el iniciador ERIC2 (88).

### **2.6.1 ERIC-PCR.**

Partiendo del ADN genómico obtenido en el apartado 2.5.1 se realizó la reacción para ERIC-PCR en un volumen de 25µl conteniendo 200ng de ADN, buffer 10 mM Tris

HCl, pH 8.3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM dNTP's, 0.5 pmol de ERIC2 y 2 U *Taq* polimerasa (Bioline, MA, USA). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 1 ciclo de 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, alineamiento a 35°C por 20 s y extensión a 72°C por 60 s. Por último una extensión final de 1 ciclo de 72°C por 7 min. La amplificación de los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y revelados con luz UV (UVP Biolumaging System. EpiChemi 3 Darkroom California, USA). Para comprobar el tamaño de las amplificaciones se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb HyperLadder IV (Bioline). Las reacciones se repitieron 3 veces para comprobar reproducibilidad.

### **2.6.2 Análisis de los polimorfismos.**

Para este análisis se tomó en cuenta la ausencia o presencia de banda, basado en algoritmos jerárquicos acumulativos formando grupos por el método de distancias mínimas, representado por un dendograma, para este análisis se utilizó el SPSS18.

## **2.7 Correlación de los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos.**

La asociación entre los polimorfismos de ADN, datos demográficos de la enfermedad, se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher. La asociación entre las características genotípicas y origen geográfico de los aislamientos se evaluó mediante la prueba de Chi cuadrada. La correlación entre la edad, CMI's de los antifúngicos se evaluó

mediante la prueba de Mann-Whitney. La correlación de los polimorfismos de ADN con la localización de las lesiones, características clínicas y ocupación se evaluó con la prueba de Chi cuadrada.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Características demográficas.**

##### **3.1.1 Grupos etarios.**

En la tabla 3 se muestra la distribución de los pacientes por edades. Se diagnosticaron 35 pacientes con cromoblastomycosis, 24 hombres (68.5%) y 11 mujeres (31.4%), en edades comprendidas entre 9 y 80 años con una media de 51 años. Las edades más afectadas fueron la tercera y sexta décadas de la vida.

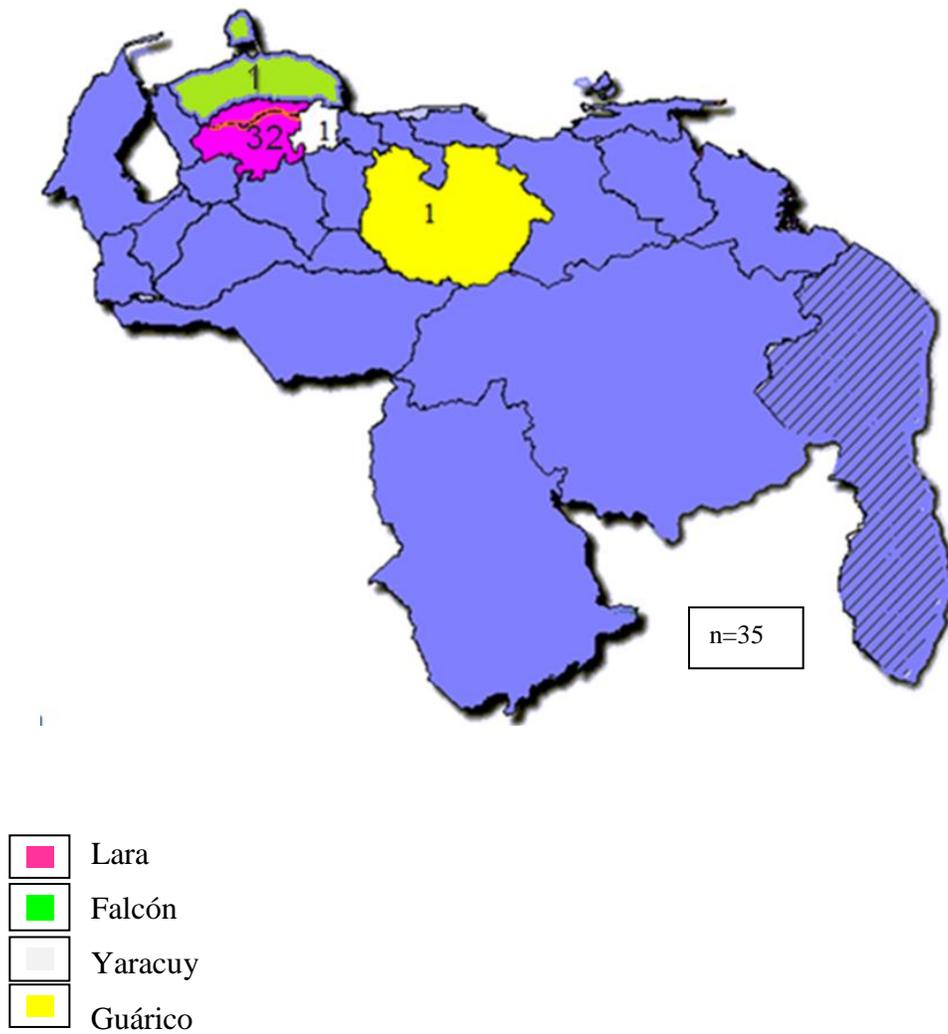
Tabla 3. Distribución de pacientes según grupos etarios.

<b>Edad</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1-10	1	2.8
11-20	1	2.8
21-30	3	8.5
31-40	7	20
41-50	5	14.2
51-60	8	2.2
61-70	7	20
71-80	3	8.5

### **3.1.2 Origen geográfico.**

La procedencia de los pacientes según origen geográfico, se muestra en la figura 3. La mayor parte de los pacientes fueron procedentes del Estado Lara lo que representó 32 pacientes para un 91.4%, un paciente procedente del estado Guárico, un paciente procedente del estado Falcón y un paciente procedente del estado Yaracuy lo que correspondió a un 2.8% cada uno.

Figura 3. Pacientes según origen geográfico.

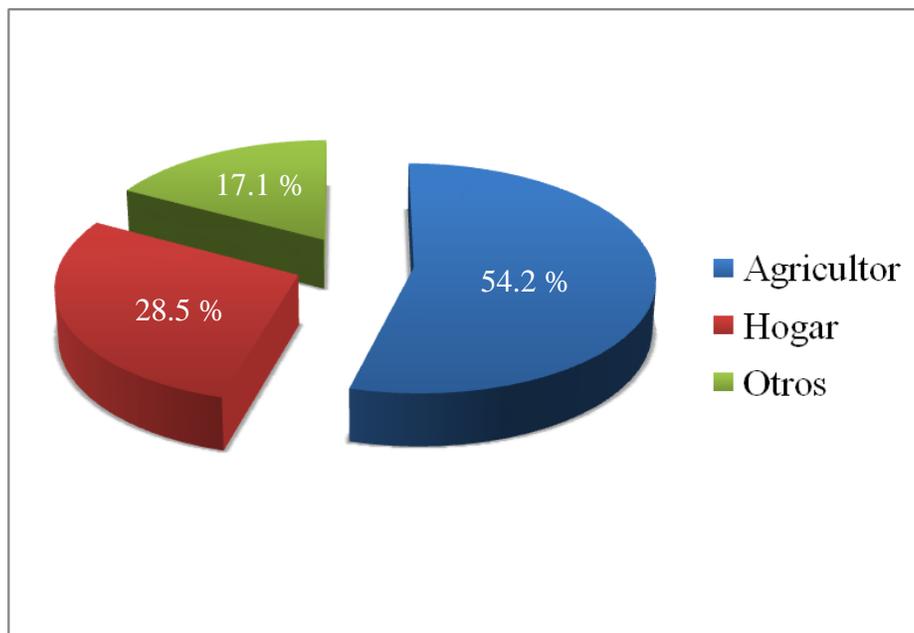


Leyenda: estados de Venezuela.

### 3.1.3 Ocupación.

Los resultados de la distribución de los pacientes según su ocupación se muestran en la gráfica 1. La mayoría de los pacientes se dedicaban a las labores agrícolas.

Gráfica 1. Distribución de pacientes según ocupación.



### 3.1.4 Localización de las lesiones.

Las lesiones de los pacientes en su mayoría se encontraban en miembros superiores, estos resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Distribución de pacientes según localización de las lesiones.

<b>Área anatómica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Miembros superiores	28	80
Miembros inferiores	1	2.8
Tórax	2	5.7
Abdomen	2	5.7
Glúteos	2	5.7

### 3.1.5 Características clínicas.

De acuerdo a la clasificación de Queiroz-Tellez *et al* y a las formas clínicas encontradas en este estudio, clasificamos las lesiones en seis tipos, los resultados se muestran en la figura 4.

- a) Tipo pápula: lesión cutánea elevada, circunscrita de menos de 0.5 centímetros de diámetro.
- b) Tipo placa: lesión cutánea ligeramente elevada, en meseta que se forma de la confluencia de pápulas, generalmente extensa eritematosa, violácea.
- c) Tipo escamocostra: lesión cutánea formada por acumulación excesiva del estrato corneo formando depósito indurado por acumulación de exudados.
- d) Tipo úlcera: lesión deprimida por pérdida de la epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo.
- e) Tipo verruga: lesión elevada de aspecto irregular hiperqueratósica.
- f) Lesión mixta: cuando se presentan al menos dos tipos de lesiones.

Figura 4. Clasificación de las lesiones según formas clínicas.



A. Lesión tipo pápula.



B. Lesión tipo placa.



C. Lesión tipo costra.



D. Lesión tipo úlcera.



E. Lesión tipo verruga.



F. Lesión mixta.

De los 35 pacientes diagnosticados, 13 pacientes presentaron lesiones tipo costra lo que representa un 37.1%, seguido de 12 pacientes con lesiones tipo placa lo que corresponde a un 34.2%, 3 pacientes presentaron lesiones tipo verruga y otros 3 lesiones mixtas lo que corresponde a un 8.3% cada una y 2 pacientes presentaron lesiones tipo pápula, igualmente 2 pacientes lesiones tipo úlcera para un 5.7% respectivamente.

### 3.1.6 Tiempo de evolución de las lesiones.

La mayoría de los pacientes presentaron lesiones con un tiempo de evolución de hasta 2 años, estos resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Distribución del tiempo de evolución de las lesiones de los pacientes.

<b>Tiempo en meses</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1-24	18	51.4
25-60	7	20
> 61	10	28.5

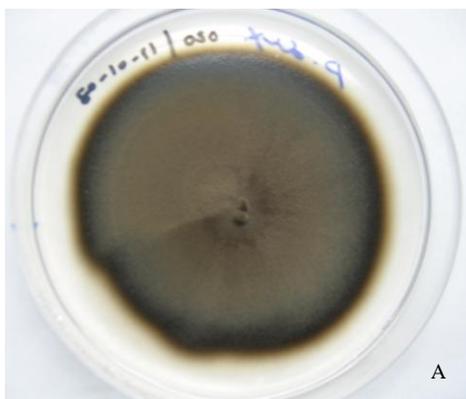
## 3.2 Aislamientos clínicos.

### 3.2.1 Identificación macro y microscópica.

Se identificaron morfológicamente 29 aislamientos como *C. carrionii*, 4 aislamientos como *F. pedrosoi*, 1 aislamiento como *C. velox* y 1 aislamiento no pudo ser identificado mediante los parámetros convencionales de identificación. Se verificaron características descritas para cada una de las especies.

***C. carrionii*.** Características de cultivo: en APD a 30°C, crece lentamente, colonias pulverulentas o aterciopeladas, verde olivácea, pardo negruzca. Reverso negruzca (Ver figura 5). Observación microscópica: Hifas que ascienden en forma erecta, ápice ramificado y cadenas de conidias ramificadas. Conidióforos primarios y secundarios de 5.5-8  $\mu\text{m}$  de longitud. Las conidias son pálidas oliváceas, en ocasiones marrones claras, pared lisa o levemente rugosa, limoniformes a fusiformes, de 4.5-8.5  $\mu\text{m}$  de longitud x 2.2-2.6  $\mu\text{m}$  de ancho; cicatrices (2-4  $\mu\text{m}$  por conidia) algunas veces pigmentadas (Ver figura 6).

Figura 5. Apariencia macroscópica de *C. carrionii*.

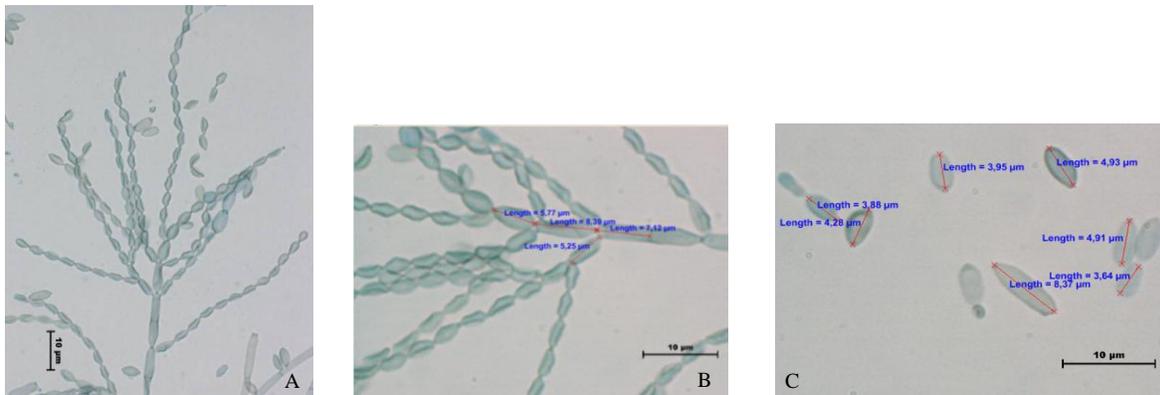


A) Anverso.



B) Reverso.

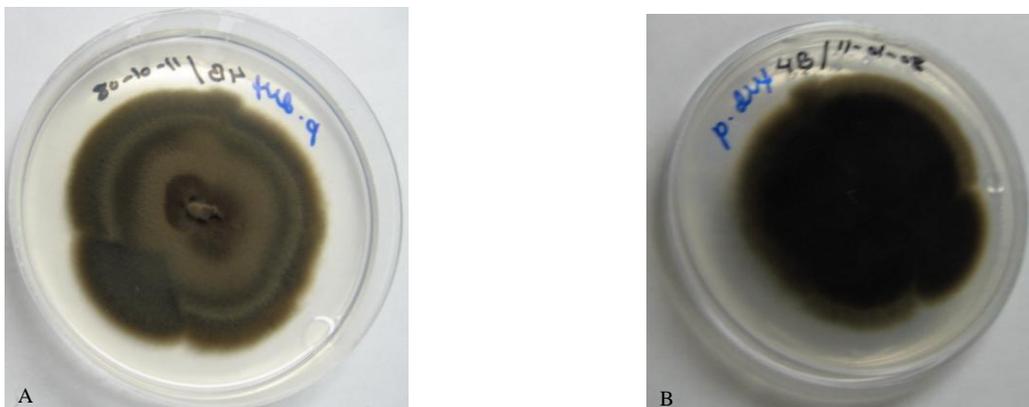
Figura 6. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de *C. carrionii*.



A) Conidióforos erectos, cadenas de conidias. B) Conidióforos. C) Conidias aisladas.

***F. pedrosoi***. Características de cultivo: en APD a 30°C, crece lentamente, colonia verde oliva, pardo negruzca, negro o grisácea, aterciopelada, pulverulenta. Reverso de la placa, negruzca. (Ver figura 7). Observación microscópica: conidióforos no bien diferenciados, melanizados de 6.5- 8.5 μm de ancho x 1.4-2.5 μm con conidias individuales o cadenas de un máximo de tres conidias cada una, de 4.5-8 μm de longitud x 0.9-4.7 μm de ancho. Pueden ser alargadas, cilíndricas u ovoides. (Ver figura 8)

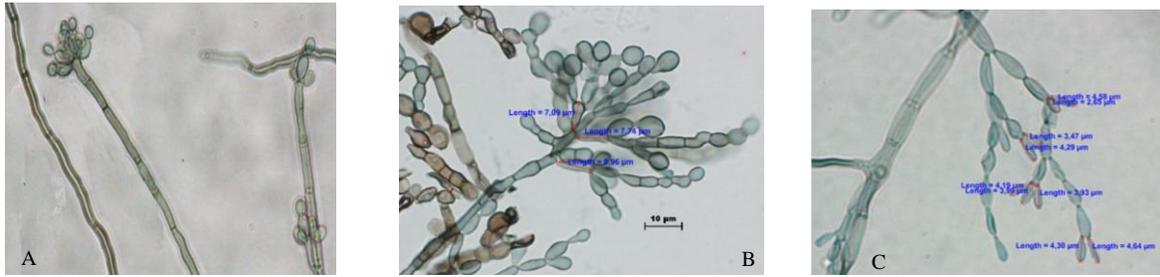
Figura. 7 Apariencia macroscópica de *F. pedrosoi*.



A) Anverso

Fig. 7 B) Reverso

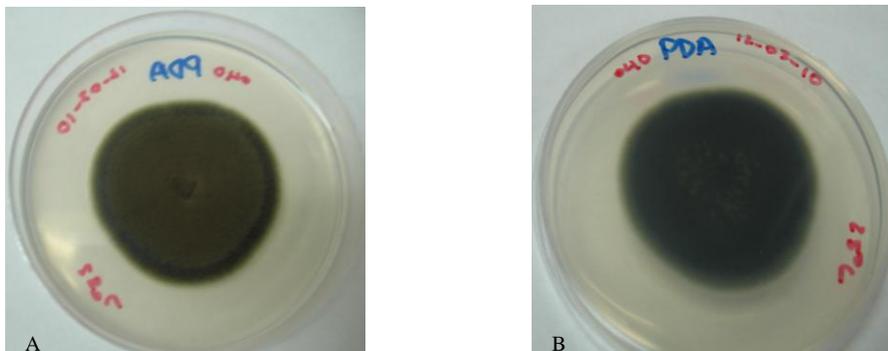
Fig. 8 Apariencia microscópica y estudio morfométrico de *F. pedrosoi*.



A) Conidióforos. B) Conidióforos y conidias alargadas y ovoides. C) Conidias alargadas.

*C. velox*. Características de cultivo: en APD a 30°C, crece rápidamente, colonia que se propaga, pulverulenta a lanuda, verde grisácea a verde oliva. Reverso de la placa negruzca. (Ver figura 9) Microscopía: hifas de 15.5 µm de longitud, conidióforos usualmente presentes y erectos de 18 µm de longitud x 3.14 µm ancho, marrones con cicatrices de ramoconidias primarias, negruzcas, marrones, pared lisa a verrugosa de 18.78 µm de longitud x 2.19 µm de ancho, ramoconidias secundarias más cortas de 6.09 µm de longitud x 2.5 µm de ancho de paredes lisas, con al menos 3 cicatrices que van de 0.61 a 0.90 µm con un septo, emergen cadenas de conidias ramificadas, intercalares de 4 µm longitud y 2.2 µm ancho y conidias terminales de 3.28 µm de la longitud y 1.91 µm de ancho fácilmente desprendibles, pequeños conidios frecuentemente ramoconidios septados. (Ver figura 10).

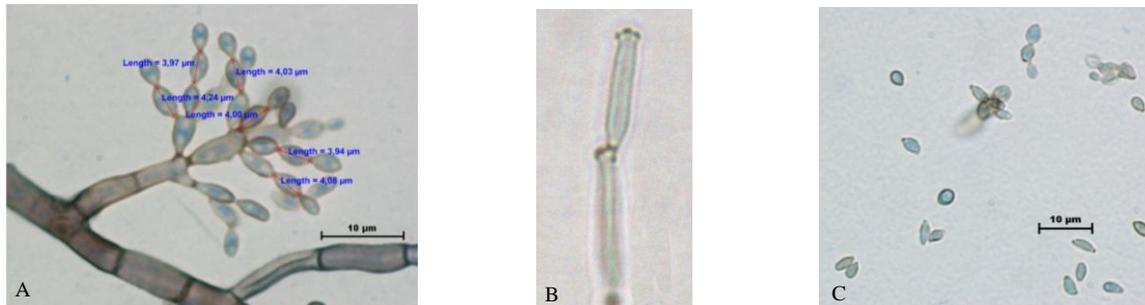
Figura. 9 Apariencia macroscópica de *C. velox*.



A) Anverso.

B) Reverso.

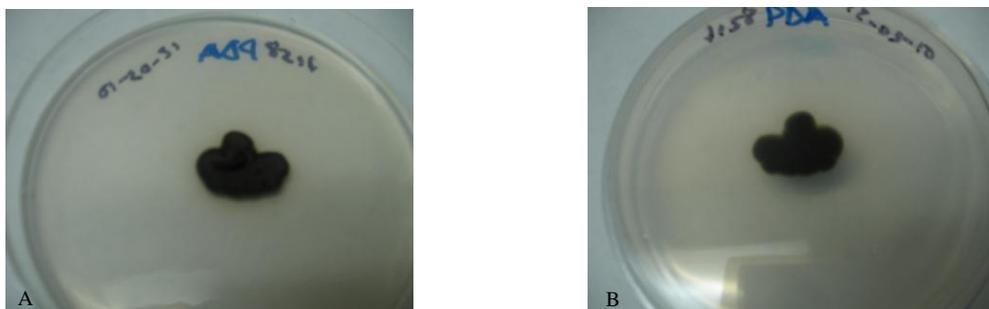
Figura 10. Apariencia microscópica y estudio morfométrico de *C. velox*.



A) Conidias intercalares. B) Conidióforo con cicatrices de ramoconidia. C) Conidias aisladas.

**Aislamiento no identificado.** Características de cultivo: en APD a 30°C, crece muy lentamente, colonia negruzca, aterciopelada. Reverso de la placa negruzca. (Ver figura 11)  
Observación microscópica: hifas septadas de 3.5- 12.9 μm de longitud x 0.0-2.0 μm de ancho. Conidióforos alargados de 4-11.2 μm y conidias escasa alargadas de 4-6. μm de longitud (Ver figura 12).

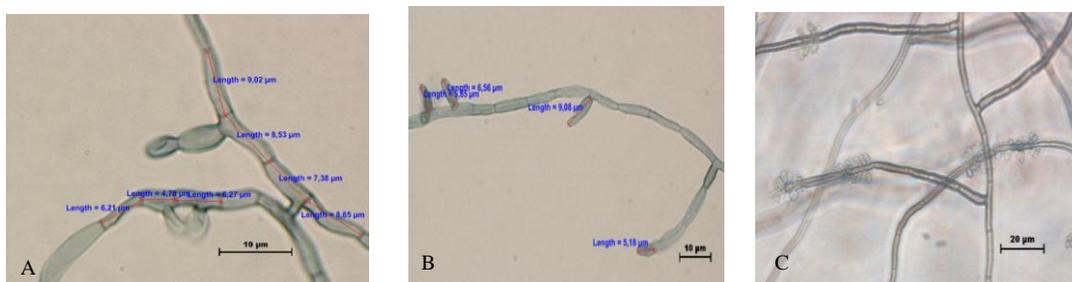
Figura 11. Apariencia macroscópica.



A) Anverso.

B) Reverso.

Figura 12. Apariencia microscópica y análisis morfométrico.



A) Hifas septadas. B) Conidias alargadas escasas. C) Hifas con conidias a las 7 semanas.

### 3.2.2 Pruebas fisiológicas.

Se realizaron las pruebas de asimilación de azúcares con el sistema API 20C AUX de Biomerieux (32), modificado para hongos filamentosos. Mediante estas pruebas, las especies no pueden ser diferenciadas, no existe un criterio que permita identificar los agentes de cromoblastomycosis, sin embargo de las 29 aislamientos identificados como *C. carrionii* presentaron las pruebas de asimilación de 6 carbohidratos con un patrón homogéneo y la asimilación de 13 carbohidratos fue variable. Se realizó la prueba de hidrólisis de la urea, resultando un 89.6% positivos y un 10.3% negativos, se observó crecimiento en micosel en todos los aislamientos de *C. carrionii* y su máxima temperatura de crecimiento fue 37°C. Presentando un crecimiento óptimo entre 25 y 30°C (Ver tabla 6). Para los 4 aislamientos de *F. pedrosoi* las pruebas de asimilación de azúcares fueron diferentes en los cuatro aislamientos, la prueba de la urea resultó positiva para todos los aislamientos, todos crecieron en agar de micosel, la temperatura máxima de crecimiento para los aislamientos de *F. pedrosoi* fue 37°C excepto uno de los aislamientos en los que

se observó crecimiento a 40°C. Siendo la temperatura óptima para todos entre 25 y 30°C (Ver tabla 7).

El aislamiento identificado morfológicamente como *C. velox*, presentó crecimiento a temperaturas de 10, 25 y 30°C no se obtuvo crecimiento a 35°C, su temperatura óptima fue 25°C. La prueba de hidrólisis de la urea resultó positiva, no creció en agar de micosel y la licuefacción de la gelatina fue positiva. Adicionalmente se hicieron pruebas como la tolerancia al cloruro de sodio a diferentes concentraciones (Ver tabla 7).

En el caso del aislamiento no identificado, el hongo fue de crecimiento muy lento, con una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 30°C, no se observó crecimiento después de los 30°C, presentó crecimiento en agar de micosel, la prueba de la hidrólisis de la urea resultó positiva y la licuefacción de la gelatina fue negativa, para la asimilación de carbohidratos (Ver tabla 7). Igualmente en este aislamiento se hicieron pruebas adicionales, pruebas como la tolerancia al cloruro de sodio a diferentes concentraciones. Las pruebas que se realizaron para lograr una mejor esporulación fueron: crecimiento en agar harina de avena, agar extracto de malta.

Tabla 6. Características fisiológicas de los aislamientos de *C. carrionii*

	HO011503	HM803225	HO011502	HM803229	HO011504	HM989979	HM803230	HM071061	HM803231	HM071057	HM803232	HM071063	HM071056	HM089980	HM071059	HO011505	HM803228	HM803227	HM071060	HM071064	HM803226	HM989981	HM803233	HM989982	HM071062	HM803234	HO011506	HM071058	HO011507	
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-k-D- Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Xilitol	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactosa	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Metil-D-Glucopiranoside	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
N-Acetil-Glucosamina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Maltosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melecitosa	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Urea	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micosel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 17%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Características fisiológicas de *F. pedrosoi* (izquierda), *C. velox* (centro), No identificado (derecha).

	HM748580	HM748581	HM748582	HM748583	HM474870	GU117853
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	-	+
2-k-D- Gluconato	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	+	+
Xilitol	-	-	-	-	-	-
D-Galactosa	+	+	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	-	-	+	+
Metil-D-Glucopiranoside	-	-	-	+	-	+
N-Acetil-Glucosamina	+	+	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+
D-Lactosa	-	+	+	+	+	-
D-Maltosa	+	+	+	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+
D-Melecitosa	+	+	+	+	+	+
D-Rafinosa	-	-	+	-	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	+	-
Micosel	+	+	+	+	-	+
30°C	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	-	+	-	-
40°C	-	+	-	+	-	-
NaCl 5%	+	+	+	+	+	-
NaCl 10%	-	-	-	-	+	-
NaCl 17%	-	-	-	-	+	-
NaCl 20%	-	-	-	-	+	-

### 3.2.3 Estudios de susceptibilidad *in vitro*.

Se siguieron las normas del CLSI M38-A2, método de dilución en caldo para hongos filamentosos, mediante el macrométodo (20). Se realizaron modificaciones propias, se adicionó 2% de glucosa al RPMI, observándose un mayor crecimiento del hongo. Diariamente se aplicó vortex a todos los tubos para evitar que las conidias se pegaran a las paredes. Se siguieron las recomendaciones para la preparación del inóculo, el cual se obtuvo en un rango de 2.9- 4.6 x 10<sup>4</sup> UFC/mL, al medio de cultivo utilizado (RPMI 1640) La lectura de la concentración mínima inhibitoria se realizó el día 6. Los resultados se muestran en la tabla 8, pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los 34 aislamientos clínicos a 5 antifúngicos.

Tabla 8. Media geométrica, rango, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de *C. carrionii*, *F. pedrosoi* y *C. velox* en µg/mL

	<i>C. carrionii</i> (29)				<i>F. pedrosoi</i> (4)	<i>C. velox</i> (1)
	MG	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	CMI
Anfotericina B	4.195	1 >8	4	8	1- 4	4
Terbinafina	0.069	0.015-2	0.03	0.5	0.015-0.5	2
Itraconazol	0.119	0.015-0.5	0.125	0.5	0.015-0.5	>8
Voriconazol	0.348	0.03-1	0.5	1	0.125-0.25	>8
Posaconazol	0.097	0.03-0.25	0.125	0.25	0.06-0.125	2

Para los 29 aislamientos de *C. carrionii* los rangos de efectividad de las drogas, fueron de 0.03 – 1 µg/ml para los triazoles y para la alilamina de 0.015-2 µg/ml, fueron los fármacos más efectivos. La anfotericina B fue la droga menos efectiva con un rango de 1-4 µg/ml. En los aislamientos de *F. pedrosoi* sólo se muestran los rangos presentándose un comportamiento similar a *C. carrionii*. En el caso de *C. velox*, para anfotericina B presentó una CMI de 4 µg/ml, terbinafina 2 µg/ml, itraconazol y voriconazol la CMI fue mayor de 8 µg/mL y posaconazol una CMI de 2 µg/ml. Para este aislamiento no se tiene datos de referencia, así como para muchos hongos filamentosos.

### **3.2. 4 Identificación molecular.**

La tabla 8 muestra los resultados de las identificaciones de los 35 aislamientos clínicos, realizadas por secuenciación del locus ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Se muestra el número de referencia del laboratorio de Micología del Decanato de Ciencias de la Salud de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Venezuela. El número de acceso del GenBank y el origen geográfico de los aislamientos.

Loa aislamientos clínicos identificados fueron 34, los cuales presentaron una homología  $\geq$  que el 98% comparado con lo reportado en el GenBank para la identificación definitiva, cada uno de los aislamientos posee respaldo fenotípico. Uno de los aislamientos clínicos, no pudo ser identificado, la homología encontrada no fue aceptable (94%) para su identificación. Se depositó como una especie del orden *Chaetothyriales* considerando el estudio fenotípico y las homologías encontradas en la base de datos revisada.

Tabla 9. Número de referencia del laboratorio, número acceso GenBank, especie y origen geográfico.

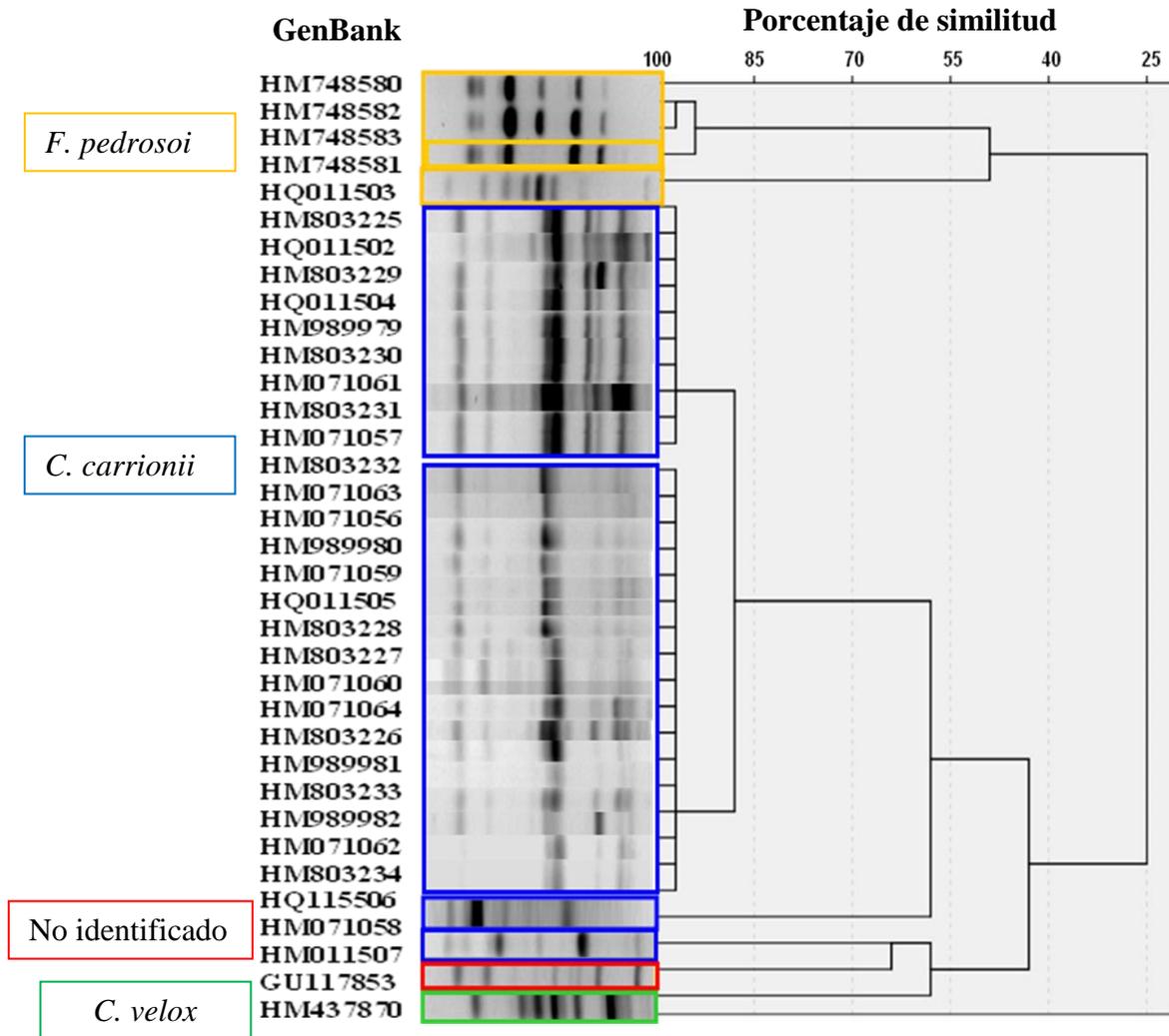
Nº de referencia	GenBank	Especie	Origen geográfico
19	HM071056	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
21	HM071057	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
36	HM071058	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
55	HM071059	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7053	HM071060	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7029	HM071061	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7166	HM071062	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7186	HM071063	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7199	HM071064	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
18	HM803225	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
20	HM803226	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
22	HM803227	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
23	HM803228	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
27	HM803229	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
24	HM989979	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
64	HM989980	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
72	HM989981	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
67	HM989982	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
58	HM803230	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
77	HM803231	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
60	HM803232	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7185	HM803233	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
54	HM803234	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
71	HQ011502	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
78	HQ011503	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
63	HQ011504	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
34	HQ011505	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
62	HQ011506	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
50	HQ011507	<i>C. carrionii</i>	Edo Lara. Venezuela
7165	HM748580	<i>F. pedrosoi</i>	Edo Lara. Venezuela
7013	HM748581	<i>F. pedrosoi</i>	Edo. Falcón. Venezuela
2288	HM748582	<i>F. pedrosoi</i>	Edo Guárico. Venezuela
7002	HM748583	<i>F. pedrosoi</i>	Edo Yaracuy. Venezuela
40	HM437870	<i>C. velox</i>	Edo Lara. Venezuela
7158	GU117853	No identificado	Edo Lara. Venezuela

### 3.3 Variabilidad genética.

Se llevó a cabo mediante ERIC-PCR, utilizando el iniciador ERIC2 (88). Se generaron perfiles electroforéticos que mostraron claras diferencias entre las especies identificadas en este estudio. Se amplificaron de 1 a 9 bandas con un rango de 0.2 a 1 kb. Se tomó en cuenta para el análisis la presencia o ausencia de bandas, obteniéndose 4 patrones electroforéticos para *C. carrionii*, el cual quedó dividido en 2 grandes grupos, o clusters, cluster I y II, con 10 y 17 aislamientos respectivamente. El cluster III con sólo un aislamiento al igual que el cluster IV. El cluster I y II tuvieron un porcentaje de similitud relativo del 90%. El cluster III tuvo un porcentaje de similitud relativo de un 60% respecto a ambos clusters I y II y el cluster IV con un porcentaje de similitud del 50% respecto a los anteriores. Lo que demostró un limitado polimorfismo intraespecie. En el estudio de los aislamientos identificados como *F. pedrosoi* se encontraron 3 perfiles electroforéticos, correspondiendo a tres clusters, cluster I con 2 aislamientos 100% similares, cluster II con un solo aislamiento relacionado con un 95% con el cluster I y el cluster III con un 48% de similitud relativa con respecto al cluster I y II. Las especies *C. carrionii* y *F. pedrosoi* tuvieron un relativo porcentaje de similitud de un 25%. La especie identificada como *C. velox* y el aislamiento no identificado se encontró más relacionadas a las especies de *C. carrionii* con un porcentaje de similitud de 43% y con *F. pedrosoi* el porcentaje es de 25%. Los resultados se muestran en la figura 13.

Los resultados demostraron una clara diversidad genética entre las especies identificadas en este estudio.

Figura 13. Dendograma basado en ERIC-PCR.



### 3.4 Correlación de los datos clínico-epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y genotípicos.

#### 3.4.1 Análisis de la asociación entre género, tiempo de evolución y severidad de las lesiones.

Los resultados son mostrados en la tabla 10. Para este análisis sólo se tomó en cuenta 29 aislamientos de *C. carrionii*. El tiempo de evolución se clasificó en 2 variables de 1-24 meses y de 25 meses o más, así mismo la severidad de las lesiones se clasificaron en lesiones leves y no leves, las no leves incluyen las moderadas y las severas. Se aplicó la prueba exacta de Fisher. No se observa asociación en este análisis.

**Tabla 10.** Asociación de género, tiempo de evolución y severidad de las lesiones

	Lesiones leves	Lesiones no leves	Valor $p$
Género hombre/mujer	14/8	7/0	NS (0.14)
Tiempo evolución			
1-24 / >25 meses	12/10	4/3	NS (1)

NS: no significativo cuando  $p > 0.05$

El valor de  $P$  fue obtenido por la prueba exacta de Fisher

### **3.4.2 Asociación entre los polimorfismos de ADN, demografía y características clínicas.**

Se muestran los resultados en la tabla 11. Para este análisis se evaluaron 27 aislamientos clínicos que comprende los 2 grandes clusters de *C. carrionii*.

Se observó asociación entre los clusters con las edades de los pacientes en el cluster I las edades estuvieron comprendidas entre 9-59 años y en el cluster II las edades oscilaron entre 17- 80 años. Esto dio como resultado un valor de  $p = 0.04$ . Se observó una tendencia significativa entre los clusters y las formas clínicas de los pacientes. Los pacientes del cluster I, predominó la forma clínica tipo costra, mientras que los pacientes pertenecientes al cluster II predominó la lesión tipo placa. El resultado fue una  $p= 0.08$ , lo cual representa un resultado con una con una tendencia a la significación estadística.

Para el resto de las variables no hubo asociación.

**Tabla 11.** Asociación entre los polimorfismos de ADN, demografía y características clínicas.

	Cluster I	Cluster II	Valor <i>p</i>	Prueba
Género: Hombre / mujer	9/1	10/7	0.19	1
Edad	37.5 (9-59)	55 (17-80)	0.04	2
Localización: MsSs/tórax/abdomen/glúteos	8/1/0/1	15/1/1/0	0.47	3
Forma clínica: Costra/placa/pápula/verruca/úlceras/mixta	6/1/1/0/1/1	2/9/2/2/1/1	0.08	3
Ocupación: Campesino/otra	8/2	8/9	0.20	3
Origen geográfico: Siquisique/Xaguas/Carora	8/2/0	13/3/1	0.73	3

(1) Prueba exacta de Fisher

(2) Prueba de Mann-Whitney

(3) Prueba de Chi cuadrado

### 3.4.3 Asociación entre los polimorfismos de ADN con las CMI.

En el análisis de los clusters con las CMI de los diferentes antifúngicos contra *C. carrionii* no se observó ninguna asociación. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Asociación entre los polimorfismos de ADN con las CMI.

	Cluster I	Cluster II	Valor <i>p</i>
Antifúngicos	CMI	CMI	
Anfotericina B	4	4	NS (0.82)
Terbinafina	0.015	0.06	NS (0.53)
Itraconazol	0.125	0.125	NS (0.75)
Voriconazol	0.125	0.5	NS (0.89)
Posaconazol	0.125	0.125	NS (0.60)

NS: no significativo cuando  $p > 0.05$

El valor de  $p$  fue obtenido mediante la prueba de Mann-Whitney

Concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN.

Los resultados de este estudio confirman que la cromoblastomicosis es una enfermedad granulomatosa, subcutánea, crónica, ocupacional, endémica de Venezuela, que afecta a campesinos, con lesiones que se presentaron en miembros superiores, en edades comprendidas entre la tercera y sexta década de la vida. El agente etiológico más aislado fue *C. carrionii*, el cual fue detectado en el 82% de los aislamientos clínicos, este estudio concuerda con lo antes reportado por otros autores (10, 18, 75, 93).

Para una mejor descripción de la cromoblastomicosis, varias clasificaciones de las lesiones han sido propuestas en el siglo pasado (11, 19, 51, 72). Sin embargo nuevas presentaciones clínicas se han demostrado (7, 83). En este estudio, las lesiones se clasificaron en 6 tipos, no coincidiendo nuestra clasificación con lo anterior reportado(19).

El tipo predominante fue costra (37.1%) seguido de lesión tipo placa (34.2%). Bonifaz en el 2001, reporta en un estudio realizado en México donde evaluó 51 pacientes, un predominio de lesiones nodulares (41%), seguido de lesiones verrugosas ( 26%) (11).

Con respecto a la severidad y tiempo de evolución de las lesiones, encontramos que la mayoría de los pacientes presentaron lesiones leves (71.4%) y el tiempo de evolución de las mismas fue hasta 2 años (51.4%), en el momento del diagnóstico. Nuestro estudio no coincide con el tiempo de evolución reportado por otros autores el cual es de larga data, así lo refieren estudios de Barroeta *et al* en 1988 en Venezuela (10) y por Esterre *et al* en Madagascar en 1997 (36).

Los resultados obtenidos de susceptibilidad *in vitro* de *C. carrionii* contra los 5 antifúngicos evaluados, anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol y terbinafina fueron similares a los reportado por González G. M *et al* en 2005 y Vitale R. G *et al* en 2009 (41, 90). Por lo general los agentes etiológicos de cromoblastomicosis son susceptibles a la mayoría de los antifúngicos *in vitro* (54-55, 90), aunque el tratamiento de los pacientes resulte difícil y en ocasiones tengan recidivas.

Este es el primer estudio donde se reporta una especie de la familia Davidiellaceae del orden Capnodiales, como agente causal de cromoblastomicosis. Las especies pertenecientes a esta familia son consideradas contaminantes del medio ambiente. Se identifica *Cladosporium velox*, especie que hasta el momento no había sido reportado como patógeno para el hombre (94).

Una gran cantidad de herramientas moleculares han sido aplicadas para resolver los problemas taxonómicos en la clasificación de estos hongos dematiáceos y entender patrones epidemiológicos y la relación con los diferentes orígenes geográficos de aislamientos clínicos (8, 16-17, 25, 28). Se han realizado estudios de genotipificación para investigar las variaciones entre la misma especie, así como variaciones interespecies. Pocos son los estudios que ponen en evidencia la diversidad genética de agentes causales de cromoblastomicosis. Investigadores han demostrado grados de polimorfismos entre las especies del género *Fonsecaea*, indicando bajo o alto grado de variabilidad genética (25, 58, 92). Se evidenció mediante ERIC-PCR diferentes patrones electroforéticos entre las especies identificadas de *C. carrionii* en las cuales se detectó un limitado grado de polimorfismo entre las especies.

Mediante ERIC-PCR se demostró un alto grado de variabilidad genética entre las 4 especies de *F. pedrosoi*, no existen antecedentes similares a este estudio, es evidente que

las especies son diferentes genéticamente, lo que puede explicarse por sus diferentes orígenes geográficos.

En este estudio se detectaron diferentes patrones electroforéticos entre las especies de *Cladophialophora*, *Fonsecaea* y *Cladosporium* observándose una clara variación genética entre géneros. No existen estudios similares en la literatura con esta técnica para el estudio de este grupo de hongos dematiáceos lo que representa un aporte en los estudios de cromoblastomycosis.

En este trabajo se estudió la asociación de los hallazgos genotípicos con los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes, es el primer estudio realizado de este tipo. Se demostró asociación en los clusters de *C. carrionii* y las edades de los pacientes. También se demostró asociación entre los clusters y las formas clínicas de las lesiones, lo que podría ser útil para el estudio de la enfermedad, sin embargo es necesario el estudio de un mayor número de casos, debido a que no existen estudios similares.

Uno de los aislamientos clínicos no pudo ser identificado con herramientas fenotípicas ni moleculares, es posible que se trate de un nuevo agente etiológico de cromoblastomycosis por lo que se hace necesario generar nuevos conocimiento de estudios y conocer más sobre esta enfermedad.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES.

1. Se confirmó a *C. carrionii* como el principal agente etiológico de cromoblastomicosis en un foco endémico en el Estado Lara, Venezuela por estudios fenotípicos y moleculares.
2. En esta investigación se describe por primera vez a *C. velox* como agente etiológico de cromoblastomicosis.
3. Por métodos moleculares no fue posible identificar uno de los aislamientos clínicos estudiados.
4. Se demostró variabilidad genética entre las especies de *C. carrionii* y *F. pedrosoi*.
5. ERIC-PCR es una herramienta útil para estudiar polimorfismos genéticos entre especies estrechamente relacionadas de cromoblastomicosis.

## **CAPÍTULO 6**

### **PERSPECTIVAS.**

Realizar el estudio filogenético de los agentes de cromoblastomycosis con los datos obtenidos para *C. carrionii*.

Evaluar otros genes que pudieran generar mayor información sobre patogenicidad de estas especies.

Estudiar otras áreas endémicas con un mayor número de pacientes y correlacionar nuestros resultados con nuevos estudios.

Desarrollar un modelo murino para un mayor entendimiento de la historia natural de la enfermedad.

## CAPITULO 7

### REFERENCIAS.

1. **Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa, N. Nieda, M. Miyaji, and K. Nishimura.** 2003. Rapid identification of the genus *fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. *J. Clin. Microbiol.* **41**:873-876.
2. **Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa, and K. Nishimura.** 2004. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**:404-407.
3. **Ajello, L.** 1975. Phaeophycomycosis: Definition and etiology. En: *Mycoses. Sci Publ* N° 304. Washington D.C. 20037:126-120.
4. **Al- Doory, Y. (ed.).** 1972. *Chomomycosis.* Press Publishing Company Missoula, Montana.
5. **Arzanlou, M., J. Z. Groenewald, W. Gams, U. Braun, H. D. Shin, and P. W. Crous.** 2007. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Stud Mycol* **58**:57-93.
6. **Attili, D. S., G. S. De Hoog, and A. A. Pizzirani-Kleiner.** 1998. rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. *Med Mycol* **36**:219-225.
7. **Badali, H., A. Bonifaz, T. Barron-Tapia, D. Vazquez-Gonzalez, L. Estrada-Aguilar, N. M. Cavalcante Oliveira, J. F. Sobral Filho, J. Guarro, J. F. Meis, and G. S. De Hoog.** 2010. *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. *Med Mycol.*

8. **Badali, H., C. Gueidan, M. J. Najafzadeh, A. Bonifaz, A. H. van den Ende, and G. S. de Hoog.** 2008. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Stud Mycol* **61**:175-191.
9. **Barba-Gomez, J. F., J. Mayorga, M. R. McGinnis, and A. Gonzalez-Mendoza.** 1992. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J Am Acad Dermatol* **26**:367-370.
10. **Barroeta, S., A. Mejía de Alejos, C. Franco de Arias, A. Prado, and R. Zamora.** 1988. Cromomicosis en el Estado Lara. *Derm Venez* **24**:134-137.
11. **Bonifaz, A., E. Carrasco-Gerard, and A. Saul.** 2001. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* **44**:1-7.
12. **Borelli, D.** 1972. *Acrotheca aquaspersa* Nova Species Agente de Cromomicosis. *Acta Cient Venezuelana* **23**:193-196.
13. **Borelli, D.** 1980. Causal agents of chromoblastomycosis. En superficial cutaneous and subcutaneous infection PAHO Scientific Publication **396**:334-335.
14. **Borelli, D.** 1972. Diagnosis and treatment of chromomycosis. *Arch Dermatol* **106**:419.
15. **Brumpt, E. (ed.).** 1922. *Prés de Parasitologie*. 3rd ed. Paris, France: Masson; Paris, France.
16. **Caligorne, R. B., M. A. de Resende, E. Dias-Neto, S. C. Oliveira, and V. Azevedo.** 1999. Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mycoses* **42**:609-614.

- 17. Caligorne, R. B., M. A. Resende, E. Paiva, and V. Azevedo.** 1999. Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. *Can J Microbiol* **45**:408-412.
- 18. Campins, H., and M. Scharyj.** 1953. Cromoblastomycosis: Comentarios sobre 34 casos con estudio clínico histológico y micológico. *Gac. Med. Caracas.* **61**:127-151.
- 19. Carrion, A. L.** 1950. Chromoblastomycosis. *Ann N Y Acad Sci* **50**:1255-1282.
- 20. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standards Second Edition. Document M38A-2 National Committee for Laboratory Standards. Wayne, PA.
- 21. Crous, P. W., K. Schubert, U. Braun, G. S. de Hoog, A. D. Hocking, H. D. Shin, and J. Z. Groenewald.** 2007. Opportunistic, human-pathogenic species in the *Herpotrichiellaceae* are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the *Venturiaceae*. *Stud Mycol* **58**:185-217.
- 22. Chowdhary, A., J. Guarro, H. S. Randhawa, J. Gene, J. Cano, R. K. Jain, S. Kumar, and G. Khanna.** 2008. A rare case of chromoblastomycosis in a renal transplant recipient caused by a non-sporulating species of *Rhynchostyria*. *Med Mycol* **46**:163-166.
- 23. de Hoog, G. S.** 1993. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**:105-109.
- 24. de Hoog, G. S.** 1997. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses* **40 Suppl 2**:5-8.

- 25. de Hoog, G. S., D. Attili-Angelis, A. H. G. V. A. Vicente, Gerrits van den Ende, and F. Queiroz-Telles.** 2004. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Medical Mycology* **42**:405-416.
- 26. de Hoog, G. S., A. H. Gerrits van den Ende, J. M. Uijthof, and W. A. Untereiner.** 1995. Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phaeococcomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**:43-49.
- 27. de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueiras (ed.).** 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2da ed ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- 28. de Hoog, G. S., A. S. Nishikaku, G. Fernandez-Zeppenfeldt, C. Padin-Gonzalez, E. Burger, H. Badali, N. Richard-Yegres, and A. H. van den Ende.** 2007. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. *Stud Mycol* **58**:219-234.
- 29. de Hoog, G. S., F. Masclaux, A. H. G. Gerrits Van Den Ende, K. J. Kwon-Chung, M. R. McGinnis.** 1995. Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic *Cladosporium-Xylohypha* species. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* **33**:339-347.
- 30. de Souza Sittart, J. A., and N. Y. Valente.** 1986. [Treatment of chromomycosis with liquid nitrogen]. *Med Cutan Ibero Lat Am* **14**:227-232.
- 31. Espinel-Ingroff, A.** 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev. Esp. Quimioter* **7**:20-31.
- 32. Espinel-Ingroff, A., M. R. McGinnis, D. H. Pincus, P. R. Goldson, and T. M. Kerkering.** 1989. Evaluation of the API 20C yeast identification system for the differentiation of some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* **27**:2565-2569.

- 33. Espinel-Ingroff, A., P. R. Goldson, M. R. McGinnis, and T. M. Kerkering.** 1988. Evaluation of Proteolytic Activity to Differentiate Some Dematiaceous Fungi. *J. Clin. Microbiol.* **26**:301-307.
- 34. Espinel-Ingroff, A., and S. Shadomy.** 1989. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**:352-361.
- 35. Esterre, P., and A. Andriantsimahavandy.** 1993. [History of a cutaneous lesion: chromomycosis]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* **60**:21-25.
- 36. Esterre, P., A. Andriantsimahavandy, and C. Raharisolo.** 1997. [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean] *Bull Soc Pathol Exot* **90**:312-317.
- 37. Esterre, P., J. L. Pecarrere, C. Raharisolo, and M. Huerre.** 1999. [Squamous cell carcinoma arising from chromomycosis. Report of two cases]. *Ann Pathol* **19**:516-520.
- 38. Esterre, P., L. Risteli, and S. Ricard-Blum.** 1998. Immunohistochemical study of type I collagen turn-over and of matrix metalloproteinases in chromoblastomycosis before and after treatment by terbinafine. *Pathol Res Pract* **194**:847-853.
- 39. Franco, L., I. Gomez, and A. Restrepo.** 1992. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int J Dermatol* **31**:725-729.
- 40. Gezuele, E., J. E. Mackinnon, and I. A. Conti-Diaz.** 1972. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. *Sabouraudia* **10**:266-273.
- 41. Gonzalez, G. M., A. W. Fothergill, D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, and D. Loebenberg.** 2005. *In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med. Mycol.* **43**:281-284.

- 42. Hiruma, M., A. Kawada, M. Yoshida, and M. Kouya.** 1993. Hyperthermic treatment of chromomycosis with disposable chemical pocket warmers. Report of a successfully treated case, with a review of the literature. *Mycopathologia* **122**:107-114.
- 43. Iwasawa, M., T. Miyakawa, Y. Takahashi, K. Inakufu, H. Matute, and K. Nishimura.** 2009. Chromoblastomycosis and subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala bergeri* and *E. xenobiotica* in immunocompromised patients. In J. D. S. (Amsterdam) (ed.), *The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology*, Tokyo.
- 44. Iwatsu, T., M. Miyaji, and S. Okamoto** 1981. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. *Mycopathologia* **75**.
- 45. Iwen, P. C., S. H. Hinrichs, and M. E. Rupp.** 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* **40**:87-109.
- 46. Jamil, A., Y. Y. Lee, and S. Thevarajah.** 2011. Invasive squamous cell carcinoma arising from chromoblastomycosis. *Med Mycol*.
- 47. Kawasaki, M., M. Aoki, H. Ishizaki, M. Miyaji, K. Nishimura, K. Nishimoto, T. Matsumoto, C. De Vroey, R. Negroni, M. Mendonca, A. Andriantsimahavandy, and P. Esterre.** 1999. Molecular epidemiology of *Fonsecaea pedrosoi* using mitochondrial DNA analysis. *Med Mycol* **37**:435-440.
- 48. Kawasaki, M., H. Ishizaki, M. Miyaji, K. Nishimura, T. Matsumoto, S. Hombo, and D. Muir.** 1993. Molecular epidemiology of *Cladosporium carrionii*. *Mycopathologia* **124**:149-152.

- 49. Kuttner, B. J., and R. J. Siegle.** 1986. Treatment of chromomycosis with a CO<sub>2</sub> laser. *J Dermatol Surg Oncol* **12**:965-968.
- 50. Kwon-Chung, K. J. a. J. E. B. (ed.).** 1992. *Chromoblastomycosis*, Philadelphia, USA.
- 51. Lavalle, P.** 1975. *Chromomycosis. Clinical Tropical Dermatology* London: Blackwell Scientific Publications; 36-41.
- 52. Mazo Favero, V., M. Da Gloria de Souza, K. S. Ferreira, S. G. Marques, A. G. Goncalves, D. Vagner de Castro Lima Santos, M. Pedroso e Silva Cde, and S. R. Almeida.** 2005. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect* **7**:708-713.
- 53. McGinnis, M. R.** 1983. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* **8**:1-16.
- 54. McGinnis, M. R., and L. Pasarell.** 1998. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med Mycol* **36**:243-246.
- 55. McGinnis, M. R., and L. Pasarell.** 1998. In vitro testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol* **36**:2353-2355.
- 56. Meyer, R. D.** 1992. Current role of therapy with amphotericin B. *Clin Infect Dis* **14** Suppl 1:S154-160.
- 57. Najafzadeh, M. J., A. Rezusta, M. I. Cameo, M. L. Zubiri, M. C. Yus, H. Badali, M. J. Revillo, and G. S. De Hoog.** 2010. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. *Med. Mycol.* **48**:390-393.

- 58. Najafzadeh, M. J., J. Sun, V. Vicente, L. Xi, A. H. van den Ende, and G. S. de Hoog.** 2010. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med. Mycol.* **48**:800-806.
- 59. National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- 60. Negroni, R.** 1936. Estudio del primer caso argentino de cromomicosis, *Fonsecaea* (Negroni) pedrosoi (Brumpt) 1921. *Rev. Inst. Bacteriol.* **7**:419-426.
- 61. O' Daly, J. A.** 1943. La cromoblastomycosis en Venezuela. Memoria de la Primera Jornada de Dermatología.:121-145.
- 62. O' Daly, J. A.** 1938. Las Cromoblastomycosis, nota preliminar. *Revista de la Policlínica Caracas.* **44**:2300.
- 63. Odds, F. C., T. Arai, A. F. Disalvo, E. G. Evans, R. J. Hay, H. S. Randhawa, M. G. Rinaldi, and T. J. Walsh.** 1992. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J. Med. Vet. Mycol* **30**:1-10.
- 64. Olivera L. G; R. M. Lopes, C.F. Cisalpino.** 1977. Identificacao de agentes de cromomicose. *An Brasil Dermatol* **52**:1-5.
- 65. Padhye, A. A. and L. Ajello.** 1987. A case of chromoblastomycosis with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* **30**:134.
- 66. Pedroso, A. and J. Gomes.** 1920. 4 casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *Ann Paulistas de Medicina e Cirurgia* **11**:53-61.

- 67. Pérez- Blanco, M., V. R. Hernández, G. Fernández-Zeppenfeldt, F. Yegres, and D. Borelli.** 1998. Cromomicosis por *Rhinocladiella aquaspersa*: descripción del primer caso en Venezuela. *Rev Iberoam Mycol* **15**:51-54.
- 68. Perez-Blanco, M., R. Hernandez Valles, L. Garcia-Humbria, and F. Yegres.** 2006. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. *Med Mycol* **44**:467-471.
- 69. Polak, A.** 1999. The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses* **42**:355-370.
- 70. Polak, A., and H. J. Scholer.** 1975. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* **21**:113-130.
- 71. Queiroz-Telles, F., P. Esterre, M. Perez-Blanco, R. G. Vitale, C. G. Salgado, and A. Bonifaz.** 2009. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* **47**:3-15.
- 72. Queiroz-Telles, F., M. R. McGinnis, I. Salkin, and J. R. Graybill.** 2003. Subcutaneous mycoses. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **17**:59-85, viii.
- 73. Ramirez, M. M.** 1973. Treatment of chromomycosis with liquid nitrogen. *Int J Dermatol* **12**:250-254.
- 74. Rippon, J. W. (ed.).** 1982. *Medical Mycology*. Saunders Company, Philadelphia.
- 75. Rippon, J. W. (ed.).** 1990. *Tratado de Micología Médica*, México.
- 76. Salfelder, K., J. Schwarz, A. Romero, d. L. TR, Z. Zambrano, and P. Díaz.** 1968. *Nocardia asteroide, Phialophora pedrosoi y Cryptococcus neoformans* en Venezuela. *Mycopathol Mycol Appl* **34**:144-154.

- 77. Shadomy, S., and H. J. Shadomy.** 1991. Comparative *in vitro* antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **14**:21-22.
- 78. Shell WA, M. M., Borelli D.** 1983. *Rhinocladiella aquaspersa*: a new combination for *Acrotheca aquaspersa*. *Micotaxon* **17**:341-348.
- 79. Son, Y. M., H. K. Kang, S. Y. Na, H. Y. Lee, J. O. Baek, J. R. Lee, J. Y. Roh, and Y. H. Seo.** 2010. Chromoblastomycosis Caused by *Phialophora richardsiae*. *Ann. Dermatol.* **22**:362-366.
- 80. Tanabe, H., M. Kawasaki, T. Mochizuki, and H. Ishizaki.** 2004. Species identification and strain typing of *Fonsecaea pedrosoi* using ribosomal RNA gene internal transcribed spacer regions. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **45**:105-112.
- 81. Terra, F., M. Torres, and F. O. Fonseca.** 1922. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associado de leishmaniose. *Brasil Médico.* **36**:363-368.
- 82. Tiraboschi, I. N.** 1994. Amfotericina B liposomal. *Rev. Argent. Micol* **17 (2)**:19-29.
- 83. Torres, E., J. G. Beristain, Z. Lievanos, and R. Arenas.** 2010. Chromoblastomycosis associated with a lethal squamous cell carcinoma. *An. Bras. Dermatol.* **85**:267-270.
- 84. Trejos, A.** 1954. *Cladosporium carrionii* n . Sp. and the problem of *Cladosporia* isolated from chromoblastomycosis. *Rev. Biol. Trop* **2**:75-112.
- 85. Uribe, F., A. I. Zuluaga, W. Leon, and A. Restrepo.** 1989. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* **105**:1-6.

- 86. Vanden Bossche, H., P. Marichal, J. Gorrens, D. Bellens, H. Moereels, and P. A. Janssen.** 1990. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 alpha-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:56-59.
- 87. Vanden Bossche, H., P. Marichal, G. Willemsens, D. Bellens, J. Gorrens, I. Roels, M. C. Coene, L. Le Jeune, and P. A. Janssen.** 1990. Saperconazole: a selective inhibitor of the cytochrome P-450-dependent ergosterol synthesis in *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses* **33**:335-352.
- 88. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**:6823-6831.
- 89. Vicente, V. A., D. Attili-Angelis, M. R. Pie, F. Queiroz-Telles, L. M. Cruz, M. J. Najafzadeh, G. S. de Hoog, J. Zhao, and A. Pizzirani-Kleiner.** 2008. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Stud. Mycol.* **61**:137-144.
- 90. Vitale, R. G., and G. S. de Hoog.** 2002. Molecular diversity, new species and antifungal susceptibilities in the *Exophiala spinifera* clade. *Med Mycol* **40**:545-556.
- 91. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. (ed.).** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, San Diego.
- 92. Xi, L., J. Sun, C. Lu, H. Liu, Z. Xie, K. Fukushima, K. Takizawa, M. J. Najafzadeh, and G. S. De Hoog.** 2009. Molecular diversity of *Fonsecaea* (*Chaetothyriales*) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med. Mycol.* **47**:27-33.

- 93. Yegres, F., and N. Richard-Yegres.** 2002. *Cladophialophora carrionii*: Aportes al conocimiento de la endemia en Venezuela durante el siglo XX. Rev. Soc. Microbiol **22**:2.
- 94. Zalar, P., G. S. de Hoog, H. J. Schroers, P. W. Crous, J. Z. Groenewald, and N. Gunde-Cimerman.** 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Stud Mycol **58**:157-183.
- 95. Zhang, J., L. Xi, C. Lu, X. Li, T. Xie, H. Zhang, Z. Xie, and S. De Hoog.** 2009. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. Mycoses **52**:176-181.

## APENDICE A

### MEDIOS DE CULTIVO

#### **Agar de Sabouraud. Difco®**

Peptona al 10 g

Glucosa al 20 g

Agar 15 g

Cloranfenicol 500g

Agua destilada 1000 ml.

#### **Agar papa dextrosa. Bioxon®**

Papa 200g

Glucosa 20g

Agar 20g

Agua destilada 1000 ml.

#### **Agar harina de avena. (Quaker® Avena en hojuelas)**

Harina de avena 30g

Agar 20g

Agua destilada 1000 ml.

#### **Agar extracto de malta. Difco®**

Extracto de malta 20 g

Glucosa 20 g

Peptona 1 g

Agar 20 g

Agua destilada 1000 mL

**Agar nutriente sintético.**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g

$\text{KNO}_3$  1g

$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  0.5 g

KCl 0.5 g

Glucosa 0.2 g

Sacarosa 0.2 g

NaOH (1M) 0.6ml

Agar 13.2 g

Agua destilada 1000 ml.

**Agar Christesen (Merck)**

Peptona 1g

Glucosa 1g

Cloruro de sodio 5g

Fosfato monopotásico 2g

Rojo de fenol 0.012g

Agar 12g

Urea 50ml al 40%

Agua destilada 1000 mL

**Mycosel (Bioxon)**

Peptona de soya 10g

Glucosa 10g

Agar 15.5g

Cicloheximida 0.4g

Cloranfenicol 0.05g

Agua destilada 1000 mL

**Gelatina Nutritiva (Bioxon)**

Gelatina 120g

Glucosa 5g

Nitrógeno base (Difco) 6.7g

Agua destilada 1000 mL

## APÉNDICE B

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### **Bromuro de etidio 0.5 mg/ml (solución stock)**

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 ml de agua ultrapura. Aforar a 50 ml y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

#### **Bromuro de etidio 2 µl/ml (solución de trabajo)**

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles de agarosa (1 ml de la solución stock más 249 ml de agua ultrapura).

#### **EDTA 500 mM pH 8.0 (ácido etilen diamino tetracético).**

Disolver 9.306 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O en 40 ml de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 ml.

#### **Etanol al 70%**

Mezclar 70 ml de etanol al 100% más 30 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

#### **Fenol saturado**

1. Destilación: Se funde el fenol a 68°C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180°C, es recomendable

no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

2. Saturación: Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.
3. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante).
4. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).
5. Agitar durante 48 h a temperatura de refrigeración, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación.
6. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0.
7. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración 0.2%.
8. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco obscuro a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las alícuotas de fenol en uso se almacenan a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Gel de agarosa al 2%**

Disolver 2 g de agarosa por cada 100 ml de TBE 0.5X, calentar en microondas o en plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10  $\mu$ L de bromuro de etidio 2 mg/ $\mu$ l por cada 100 ml de solución y vaciar en la cámara de electroforesis.

### **Gel de agarosa al 1.5%**

Disolver 1.5 g de agarosa por cada 100 ml de TBE 0.5X, calentar en microondas o en plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10  $\mu$ l de bromuro de etidio 2 mg/ $\mu$ l por cada 100 ml de solución y vaciar en la cámara de electroforesis.

### **Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)**

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 ml de glicerol en TE 1X pH 8.0 aforar a 10 ml.

### **SEVAG (24:1)**

Disolver 24 ml de cloroformo más 1 ml de alcohol isoamílico.

### **Proteinasa K 10 mg / ml**

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5

### **SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio)**

Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 ml de agua destilada.

### **SDS al 1% (Dodecil sulfato de sodio)**

Mezclar 5 ml de una solución de SDS al 10% en 50 ml de agua destilada.

#### **TBE 10X (Solución stock)**

Disolver 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico en 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y en agua ultrapura aforar a 500 ml.

#### **TBE 0.5X (Solución de trabajo)**

Disolver 50 ml de TBE 10X en 400 ml de agua ultrapura y aforar a 1000 ml.

#### **TE 1X**

Mezclar 500 ml de Tris- HCl 500 mM, pH 8.0 y 50 ml de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 ml.

#### **TE 1X con SDS al 1%**

Disolver 1 g de SDS en 100 ml de TE 1X.

#### **Tris-HCl 500 mM, pH 8 (Solución stock)**

Disolver 30.3 g de trizma base en 300 ml de agua ultrapura, ajustar el pH con ácido clorhídrico concentrado y aforar a 500 ml.

#### **Acetato de sodio 3M pH 5**

Disolver 12.3 gr de acetato de sodio en 25ml de agua destilada. Ajustar el pH con ácido acético glacial y aforar a 50 ml. Esterilizar en autoclave.