BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

TESIS PROFESIONAL

EFECTO DE LOS SIDERÓFOROS DEL GÉNERO *Sporothrix:* SOBRE SU CRECIMIENTO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA: FATIMA DEL CARMEN CRUZ CRUZ

ASESOR: M.C. ALEJANDRA PAULA ESPINOS ATEXIS

PUEBLA, FEBRERO, 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá **Gudelia Cruz Hernández**, eres mi ejemplo de vida, gracias por todo el apoyo, los regaños y el esfuerzo que me has brindado, por no dejar que pierda mi camino, creo que nunca encontraré las palabras para logra agradecerlo mami. Te quiero mucho.

A mi papá **Francisco Cruz Martínez**, gracias por darme la oportunidad y herramientas para irme a estudiar la que carrera que elegí y que me apasiona, gracias por el ejemplo de que, aunque estemos lejos físicamente nunca lo estaremos de corazón.

A mis hermanos **Jonathan Francisco** y **Monserrat del Carmen**, siempre he querido ser como ustedes, me gusta seguir sus pasos y me encantaría algún día alcanzarlos.

En fin, mi familia, los amo y lograr mi titulación es un regalo para mí y para ustedes.

A **Roberto,** gracias por todos los momentos que pasamos juntos durante la licenciatura, tomar clases, estudiar, jugar videojuegos, enamorarnos, etc. Solo nosotros sabemos lo mucho que significaron esos momentos, te extraño y espero muy pronto volver a vivir experiencias juntos que alimenten a nuestros corazones.

A mis amigos Citlali, Ximena, Omar y Kate, por hacer más amenas las clases, estudiar juntos, ir a comer y conocer un poco la ciudad. A mis compañeros del eje de microbiología, Brenda, Diana, Kate, Christian, Roberto Enrique y Gilberto, los momentos con ustedes fueron de los mejores en la licenciatura. A mis queridos amigos Aranza y David, que a pesar de la distancia nunca hemos dejado de querernos y apoyarnos.

Gracias Maestra Alejandra por los conocimientos, el apoyo que me ha brindado y la oportunidad no de sólo ser parte del laboratorio de micología, si no, por dejarme ser parte de su vida para que se logrará terminar este trabajo.

A la D.C. Claudia Martínez y a la D. C. Lucía Soto, por no dejarme sola durante el proceso de titulación, aconsejarme y resolverme dudas, me encuentro infinitamente agradecida.

Índice

1. Índice de abreviaturas 5

2. Resumen 6

3. Introducción 7

4. Antecedentes 8

4.1 Antecedentes generales 8

4.1.1 Esporotricosis 8

4.1.1.1 Historia 8

4.1.1.2 Morfología 9

4.1.1.3 Patogenia 10

4.1.1.4 Factores de virulencia 12

4.1.1.5 Diagnóstico 13

4.1.1.6 Tratamiento 13

4.1.1.7 Epidemiología 13

4.1.2 *Sporothrix schenckii* y *Sporothrix mexicana* 14

4.1.3 Sideróforos 14

4.1.3.1 Sideróforos en la virulencia de los hongos 16

4.1.3.2 Mecanismos de liberación y adquisición de sideróforos fúngicos 16

4.1.3.3 Biosíntesis de sideróforos fúngicos 17

4.2 Antecedentes específicos 18

5. Planteamiento del problema 20

6. Objetivos 21

6.1 General 21

6.2 Específicos 21

7. Material y métodos 22

7.1* Cultivo de cepas de *S. schenkii* y *S. mexicana 22

7.2 Obtención de la suspensión celular 22

7.3 Obtención de sideróforos 22

7.4 Efecto de los sideróforos sobre el crecimiento de cepas de *Sporothrix schenckii* y *Sporothrix mexicana* 22

8. Resultados 24

8.1 *S. mexicana* cepa 551 aislada del ambiente 25

8.2 *S. mexicana* cepa 542 aislada del ambiente 27

8.3 *S. schenckii* cepa 553 aislada del ambiente 29

8.4 *S. schenckii* cepa 540 aislada del ambiente 31

8.5 *S. schenckii* cepa 185 aislada de paciente (humano) 34

8.6 *S. schenckii* cepa R-03-8-M aislada de paciente (mascota) 36

9. Discusión 38

10. Conclusiones 41

11. Perspectivas 42
12. Bibliografía 43

1. Índice de abreviaturas

%	Porciento
µL	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BHI	Agar Infusión Cerebro Corazón
C	Citocina
cm	Centímetros
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
Fe^{3+}	Ion férrico
G	Guanina
KI	Yoduro de potasio
mm	Milímetros
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
spp.	Especies

2. Resumen

La esporotricosis es una enfermedad causada por hongos dimórficos que pertenecen al género *Sporothrix,* estos hongos son capaces de producir sideróforos. Los sideróforos son moléculas con gran afinidad al hierro, los cuales facilitan el crecimiento de los microorganismos en condiciones limitadas de hierro.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto que tienen los sideróforos de *Sporothrix schenckii* en el crecimiento de *Sporothrix schenckii y Sporothrix mexicana.* Se estudiaron 6 cepas, 2 de *Sporothrix mexicana* (551 y 542) y 4 de *Sporothrix schenckii* (553, 540, 185 y R-03-8-M) en fase micelial. Se sembraron inicialmente en Agar Mycosel a 28°C, para transcurridos 7 días, realizar la obtención de una suspensión celular por cada cepa manteniéndolas en Caldo dextrosa Sabouraud, por 3 días a 28°C y 150rpm.

Posteriormente cada cepa se sembró en cajas Petri sin y con 5,10,15,20 y 200µL de sideróforos de la cepa 553 de *Sporothrix schenckii*, los cuales se encontraban almacenados en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencia Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Finalmente se monitoreó el diámetro de crecimiento colonial de las cepas cada 24 horas por 96 horas.

Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas tienden a aumentar su diámetro de crecimiento micelial cuando se les adiciona sideróforos, así como, diferencias en la morfología macroscópica y microscópica, los cuales fueron notables en las cepas que crecieron en medios con sideróforos.

3. Introducción

La esporotricosis se trata de una micosis subcutánea causada por hongos pertenecientes al género *Sporothrix* (1), es frecuente en el mundo y se reporta una alta incidencia en países latinoamericanos (2). Dentro de las micosis subcutáneas la esporotricosis ocupa el primer lugar en México (3), se reportan casos en todos los estados y se han aislado cepas *de S. schenckii, S. globosa, S. brasiliensis* y *S. mexicana*. En el estado de Puebla se ha identificado la presencia de las especies de *S. schenckii* y *S. mexicana* (4), *S. schenckii* es la principal especie causante de esporotricosis en humanos, por otro lado, *S. mexicana* se considera una especie endémica de Puebla, debido a que se ha aislado en diferentes municipios (3), por lo que es de interés conocer sus características como: crecimiento, morfología, reproducción, factores de virulencia, entre otros.

Los sideróforos son producidos por diferentes microorganismos, entre ellos los hongos del género *Sporothrix* spp. (5), estos se consideran uno de los factores de virulencia de mayor importancia en los hongos (6), ya que les podrían conferir la capacidad de evadir la respuesta del sistema inmunológico o transitar a través del torrente sanguíneo y con ello ser responsables de enfermedades sistémicas (7). Con este trabajo se podrá esclarecer el papel de estos agentes quelantes de hierro en el crecimiento de cepas de *Sporothrix schenckii* y *Sporothrix mexicana.* Los resultados que se obtengan podrían dar pie a estudios posteriores para poder analizar su función en la virulencia con detalle y en qué grado de importancia podrían estar participando durante la infección a un hospedero.

4. Antecedentes

4.1 Antecedentes generales

4.1.1 Esporotricosis

La esporotricosis es una micosis granulomatosa crónica cosmopolita, adquirida por inoculación traumática (1) y causada por el clado patógeno *Sporothrix schenckii* (8) Se trata de la micosis subcutánea más común en Latinoamérica y se considera una enfermedad ocupacional ya que se presenta con mayor frecuencia en campesinos, agricultores y jardineros (9), esto debido a que la infección ocurre por inoculación con el suelo, plantas y materia orgánica contaminada (10).

Dicho clado patógeno o clínico está conformado por las especies *S. brasiliensis, S. schenckii, S. globosa* y *S. luriei*, que se aíslan de casos humanos y animales; el denominado clado ambiental incluye al complejo *S. pallida* (*S. chilensis, S. mexicana, S. humicola* y S*. pallida*) y al complejo *S. stenoceras* (8).

4.1.1.1 Historia

El agente causal de la esporotricosis, *Sporothrix schenkii* fue aislado por primera vez en 1896 por Benjamín Schenck, quién era un estudiante de medicina en el Hospital Johns Hopkins en Baltimore, Estados Unidos. El aislado se obtuvo a partir de un paciente de 36 años masculino, el cual presentaba lesiones en la mano y en el brazo derecho. Este aislado fue estudiado por Erwin Smith un micólogo que concluyó que se trataba de un hongo perteneciente al género *Sporotrichum* (11).

El actual nombre *Sporothrix schenckii,* lo dieron por primera vez Hektoen y Perkins en 1900, al haber descrito una lesión que sufrió un niño después de golpearse un dedo, en Colorado, Estados Unidos. Posteriormente, en 1903, Sabouraud sugirió el uso de yoduro de potasio para el tratamiento de la esporotricosis, debido a que era una enfermedad común en Francia a principios del siglo XX. Hasta ahora esta terapia aún sigue siendo usada (12).

En 1908, Splendore, en Brasil, describió cuerpos asteroides alrededor de las levaduras de *Sporothrix schenckii*, lo cual comenzó a ser una herramienta para el diagnóstico de esporotricosis (13).

A partir de los estudios de Marimon en 2007, se reordenó la etiología y se

propuso al complejo denominado *Sporothrix schenkii,* conformado por siete especies: *S. schenckii, S. brasiliensis, S. globosa, S. mexicana, S. lurei, S. pallida* y *S. chilensis* (14).

En 2020 Messias y colaboradores, con base a las definiciones propuestas por Hoog y colaboradores de 2015 (15), descartan llamar “complejo de especies” a los hongos incluidos dentro del género *Sporothrix,* debido a que se han relevado diferencias significativas entre las especies, como rasgos morfológicos, fisiológicos, genéticos, epidemiológicos, de virulencia y susceptibilidad variable a los antifúngicos. Proponen los términos “clado patógeno o clínico” y “clado ambiental” (8).

4.1.1.2 Morfología

Los hongos del género *Sporothrix* son hongos termodimórficos, que presentan la forma micelial o filamentosa (fase saprofítica) en la naturaleza o *in vitro* a 25 °C, y desarrollan células de tipo levadura (fase parasitaria) en el hospedador mamífero *o in vitro* a 35-37 °C (16). Esto se considera un factor de virulencia, ya que le confiere la capacidad de sobrevivir a diferentes entornos, esta transición, independientemente a la temperatura, también está controlada por cambios ambientales como la humedad, el pH, los nutrientes y la disponibilidad de oxígeno, entre otros (17).

En general, en la forma filamentosa o micelial se observan, colonias de crecimiento de color blanco y húmedas en aproximadamente de 3 a 5 días, conforme envejecen comienzan a ser duras y arrugadas, y en el caso de algunas especies aparecen conidios pigmentados, que van desde un tono marrón hasta negro (16). Microscópicamente se observan micelios delgados (1 a 2 micrómetros), tabicados y ramificados; así como microconidios hialinos sésiles y con simpodulosporas que semejan “flores de duraznos” (18).

Los hongos pertenecientes al género *Sporothrix,* se han sometido a numerosos estudios moleculares en los que se ha demostrado claramente la existencia de varios grupos que son genéticamente diferentes. Basándose en características macroscópicas, asimilación de sacarosa y rafinosa, capacidad de crecer a 37°C, y la secuencia del gen nuclear de la calmodulina, se describieron a diferentes especies que conforman al género *Sporothrix* (14).

Comparando características del crecimiento filamentoso en agar de dextrosa y papa (PDA) a las 6 especies tenemos que:

- *S. schenkii:* Sus conidios pueden estar pigmentados, logra crecer a 37°C y asimila sacarosa y rafinosa (16) (11).
- *S. brasiliensis:* Sus conidios pueden estar pigmentados, logra crecer a 37°C y no asimila sacarosa ni rafinosa (11).
- *S. globosa:* Sus conidios pueden estar pigmentados, no presenta crecimiento a 37°C y asimila sacarosa, pero no rafinosa (16) (11).
- *S. lurei:* Sus conidios no son pigmentados, presenta crecimiento a 37°C, asimila sacarosa y puede asimilar o no rafinosa (16) (11).
- *S. mexicana:* Sus conidios pueden estar pigmentados, logra crecer a 37°C y asimila sacarosa y rafinosa (16) (11).
- *S. chilensis:* Sus conidios no son pigmentados, presenta crecimiento a 37°C y asimila sacarosa, pero no rafinosa (16).
- *S. humicola:* Sus conidios no son pigmentados, logra crecer a 37°C y asimila sacarosa (19).
- *S. pallida:* Sus conidios no son pigmentados, crece a 37°C y asimila sacarosa, pero no rafinosa (16).
- *S. stenoceras:* Sus conidios pueden estar pigmentados, logra crecer a 37°C y asimila sacarosa y rafinosa (20).

Macroscópicamente en la fase levaduriforme, los hongos del género *Spotorhrix*, muestran colonias cremosas, de color blanco y ligeramente amarillentas (similares a las colonias bacterianas) las cuales se obtienen a 37 °C en medios ricos con nutrientes, como gelosa sangre, gelosa chocolate y BHI agar (Agar Infusión Cerebro Corazón). Dicho crecimiento se obtiene de tres a cinco días (2). Morfológicamente las levaduras son alargadas y ovoides con gemación simple, doble o múltiple; las cuales en muestras biológicas humanas se han descrito como “cuerpo de cigarro” de 3- 10 milímetros de diámetro (17). Es común, observar fragmentos de micelio como residuo del mismo dimorfismo (2).

4.1.1.3 Patogenia

La infección ocurre por traumatismo con material contaminado con *Sporothrix* spp. como pueden ser astillas, espinas, arbustos, etc. (10). La transmisión zoonótica de la esporotricosis se describió al haberse presentado en accidentes con gatos, serpientes y aves, ratas, caballos, ardillas y peces, además de picaduras de mosquitos (21).

El tiempo de inoculación es de 1 a 3 semanas, pero en algunos casos la

lesión inicial puede ocurrir hasta 6 meses antes de que se presenten los primeros síntomas (1). El daño que puede causar la enfermedad en humanos y animales depende de variables como el tamaño del inóculo, capacidad inmune del huésped y la especie de *Sporothrix* responsable de la infección (8).

La esporotricosis se presenta en cuatro formas clínicas en el humano las cuales en orden de incidencia son: linfocutánea, fija, diseminada y extracutánea (22).

- Linfocutánea: se trata de la forma más común al estar en el 75% de los casos, es de fácil diagnóstico ya que las lesiones se encuentran principalmente en las extremidades superiores y se caracteriza por la aparición de una lesión primaria en el lugar de inoculación después de dos o tres semanas (23), posteriormente forma una cadena de nódulos indoloros a lo largo de los ganglios linfáticos a la que se le denomina propagación esporotricoidal (3).
- Fija: se reporta en el 20 % de los casos. Se cree que esta forma clínica se produce como resultado de sensibilización previa del individuo al hongo, especialmente en áreas endémicas, lo que da como resultado un mejor control inmune del huésped, limitando de este modo la lesión. Los sitios más comunes para las lesiones son las extremidades superiores e inferiores (23).
- Diseminada: raramente descrita, se tratan de lesiones que involucran la propagación a 2 sitios anatómicos diferentes por vía cutánea tras múltiples implantaciones traumáticas del hongo (24), o vía hematógena, se ha descrito en pacientes con SIDA como primera manifestación, así como en pacientes que reciben largos ciclos de terapia con esteroides. La esporotricosis cutánea diseminada se ha observado con mayor frecuencia (16% de los casos) en la esporotricosis zoonótica. En estos casos, la participación de pacientes no inmunodeprimidos ha sido atribuida a inoculaciones por gatos domésticos (25)
- Extracutánea: en este caso cualquier órgano o tejido puede verse afectado. Los más afectados son los sujetos con inmunosupresión, ya sea por alcoholismo, diabetes, SIDA, cáncer o el uso de corticosteroides u otros fármacos inmunosupresores (24). La esporotricosis extracutánea unifocal suele implicar enfermedad cavitaria de los pulmones o artritis. La enfermedad multifocal a menudo implica articulaciones, huesos y piel (23).

4.1.1.4 Factores de virulencia

Los factores de virulencia se tratan de moléculas asociadas a microorganismos que son necesarios para que este infecte a un huésped eucariota, como los humanos (26). Además del dimorfismo fúngico, *Sporothrix* spp. cuenta con otros factores de virulencia como son: producción de melanina, producción de proteasas (fosfatasa ácida, proteinasa I, proteinasa II, colagenasa y gelatinasa), presencia de adhesinas (17) y sistemas de captación de hierro mejor conocidos como sideróforos (27), los cuales se describen a continuación:

- Dimorfismo: Se trata de la capacidad con la que cuentan algunos organismos, pueden mostrar una dualidad fenotípica junto con un proceso de diferenciación celular. En respuesta a diferentes cambios como (temperatura, pH, humedad, etc.) el hongo modifica su fisiología y morfología para lograr sobrevivir, por ejemplo, al sistema inmune del huésped (17).
- Producción de melanina: La melanina contribuye a la virulencia de algunos microorganismos al protegerlos del sistema inmune del huésped, agentes oxidantes, enzimas hidrolíticas, y reduciendo la fagocitosis o la inducción de la muerte celular (17). La producción de melanina varía en diferentes cepas de *Sporothrix* spp. y se ha reportado que las cepas que producen melanina causan una infección más rápida de aquellas que no la producen (27).
- Proteasas: La presencia de proteasas varía dependiendo de la virulencia de las especies del género *Sporothrix*, en algunos estudios se han encontrado que cepas altamente virulentas muestran la presencia de diferentes enzimas secretadas, como proteinasas, caseinasas, gelatinasas, DNasa y ureasas (17).
- Adhesinas: Aumentan la unión a células epiteliales, diferentes estudios han demostrado que el hongo cuenta con integrinas o moléculas tipo lectina adhesina que reconocen la fibronectina humana en varios puntos de la molécula. Las adhesinas de fibronectina se pueden encontrar en la superficie de las células de levadura y su expresión está relacionada con la virulencia de los hongos (11).

4.1.1.5 Diagnóstico

El método considerado estándar de oro para diagnosticar la esporotricosis es el aislamiento de *Sporothrix* spp. en medios de cultivo (28), también se utilizan pruebas de intradermorreacción con esporotricina M (origen de micelio de *Sporothrix* spp.) la prueba positiva se obtiene entre 24 y 48 horas, se caracteriza por formarse una zona eritematosa y dolorosa de más de 5 mm de diámetro (5), algunos otros métodos diagnósticos no tan usados son los exámenes histopatológicos, ensayos de PCR, MALDI-TOF MS y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (29).

4.1.1.6 Tratamiento

El tratamiento contra la esporotricosis se debería definir con respecto a diferentes factores como son la manifestación clínica, el estado inmunológico en que se encuentre el huésped y la especie de *Sporothrix* (30). Sin embargo, en la mayoría de los países en vías de desarrollo se utiliza Yoduro de Potasio (KI) como tratamiento de elección (16), por su eficiencia, bajo costo, fácil administración y mínimos efectos secundarios (1). Actualmente se conoce que *S. schenckii* y *S. brasiliensis* son sensibles a itraconazol y posaconazol; para la anfotericina B tienen una respuesta intermedia y muestran resistencia a voriconazol (31).

4.1.1.7 Epidemiología

La esporotricosis afecta a hombres y mujeres de todas las edades. En la mayoría de los reportes la diferencia entre casos por edad y sexo está relacionado con la ocupación y la potencial exposición al hongo (11). Se presenta en campesinos, jardineros, floristas, carpinteros, amas de casa, y puede adquirirse de modo accidental en el laboratorio, entre otros (1). Por lo tanto, se considera una enfermedad ocupacional (31) que predomina en estratos socioeconómicos bajos (11).

Se consideran como factores predisponentes a la desnutrición y el alcoholismo, y se conoce que es una enfermedad emergente en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (32). Es una enfermedad cosmopolita, en la actualidad se tienen registro de casos en Latinoamérica, en la península de Florida,

Grecia, Portugal, Italia, el sur de África, Japón y China (16).

En México es la micosis subcutánea más frecuente, con casos en toda la República Mexicana, sobresaliendo los estados de la Ciudad de México, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Oaxaca, San Luís Potosí, Estado de México y Puebla (4). Se han reportado un mayor número de casos de esporotricosis en estaciones lluviosas y calientes o frías y secas, lo que sugiere que *Sporothrix* spp. crece mejor a más de 15 °C y en humedad de 90% (32).

4.1.2 *Sporothrix schenckii* y *Sporothrix mexicana*

Ambas especies cuentan con características similares al asimilar sacarosa y rafinosa (16), sin embargo, algunas de sus diferencias son que *S. schenckii* es la especie más reportada en casos de esporotricosis que se presenta en todo el mundo (33). Por otro lado la evidencia de esporotricosis causada por *S.mexicana* es escasa, por lo que se considera una especie perteneciente al clado ambiental (8), se encuentra presente en México y otros países latinoamericanos (33).

En una estadística de genoma se reveló que *S. schenckii* contiene 32.23Mb cuenta con 55.1% de guaninas (G) y citocinas (C) y *S. mexicana* tiene 43.74Mb con 52.79% G+C (34). La infección por *S. mexicana* se distingue de la producida por *S. schenckii* porque se reporta una baja incidencia de carga fúngica encontrada en los órganos de ratones OF1 y por su poca capacidad de reducir la supervivencia de los animales infectados (35).

4.1.3 Sideróforos

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de casi todos los microorganismos porque participa en procesos enzimáticos, en el metabolismo de oxígeno, transferencia de electrones y síntesis de ADN y ARN (36). Los microorganismos que se encuentran en forma libre sin establecer ningún tipo de relación con otro organismo tienen problemas para la adquisición de hierro (37), por esta razón producen sideróforos que son definidos como péptidos de bajo peso molecular que oscila entre 500 y 1000Da. que enlazan específicamente al hierro (Fe^{3+}), facilitando la solubilización y el transporte de este (38).

Los sideróforos se dividen en cuatro familias según su grupo funcional característico: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos y tipo mixto (39).

- Hidroxamatos: se trata del grupo más común de sideróforos que se encuentran en la naturaleza, son producidos por bacterias y hongos (40). Son muy solubles en agua, se consideran que son los más estables y son menos afectados por los cambios de pH (41). En los hongos, los sideróforos, están formados por ornitina hidroxilada y alquilada, consisten en N5-acil-N5-hidroxiornitina o N6-acil-N6-hidroxilisina, a excepción de la fusarinina C producida por *Aspergillus nidulans* que contienen enlaces éster, todos los demás tipo hidroxamato contienen enlaces peptídicos (42).

  Los sideróforos de *Sporothrix* spp. entran en este grupo (5).

  Se presentan en las siguientes familias: ácido rodotorúlico, coprógenos, fusarinas y ferricromos (43).

  - Ácido rodotorúlico: solo se ha encontrado en cepas de *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula pilimanae.* Contienen dos grupos hidroxamatos y son tetradentados. En esta familia se incluyen al ácido rodotorúlico y ácido dimerúmico (41).
  - Coprógenos: tienen como unidad central al ácido dimerúmico y presentan 3 grupos hidroxamatos. Pueden presentar actividad citotóxica, antibiótica y pueden ser factores de crecimiento para algunos microorganismos, son producidos por *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* (41).
  - Fusarinas: están formadas por una unidad de dicetopiperazina. Se subdividen en fusarinas A, B y C. Se encuentran en especies de *Fusarium* y *Aspergillus* (41).
  - Ferricromos: se identifican como deferriferricomo. Se ha observado que cuentan con actividad antibiótica contra bacterias Gram negativas y positivas. Son producidos por especies de *Microsporum, Thichophyton* y *Aspergillus* (44).

- Catecolatos: producidos únicamente por bacterias como *Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Klebsiella pneumoniae.* Cada grupo de catecolatos suministra dos átomos de oxígeno para la quelación con hierro y así formar un complejo octaédrico hexadentado (45)

- Carboxilatos: son producidos por bacterias como *Rhizobium* y *Staphylococcus* y hongos mucorales. Une al hierro a través de grupos carboxilo e hidroxilo (46).

- Tipo mixto: Algunos microorganismos producen sideróforos mixtos que contienen tanto el grupo catecolato como el grupo hidroxamato, como la bacteria Gram+, *Rhosococcus erythropolis* (42).

4.1.3.1 Sideróforos en la virulencia de los hongos

La mayoría de los hongos producen sideróforos del tipo hidroxamato y carboxilato (42). Se sugiere que los sideróforos fúngicos actúan como factores de virulencia ya que facilitan el crecimiento de los hongos bajo condiciones limitadas de hierro, proporcionan resistencia al estrés oxidativo, y participan en el desarrollo asexual y sexual (6). En *Candida albicans* se ha descrito que el daño que produce a las células epiteliales es dependiente de hierro (7).

En los mamíferos existen dos proteínas capaces de secuestrar sideróforos, las lipocalinas Lcn2 y Lcn1. La Lcn2, también llamada siderocalina o NGAL, protege a los mamíferos de la infección por *E. coli* secuestrando al sideróforo enterobactina y así evitando la adquisición de hierro, sin embargo, la glicosilación de enterobactina inhibe el reconocimiento por Lcn2, permitiendo la evasión del sistema inmunológico. Lcn1 cuenta con una especificidad de sustratos más amplia, debido a que reconoce una variedad de sideróforos del tipo catecolato e hidroxamato de origen bacteriano y fúngico, por lo tanto, cuentan con actividad bacteriostática y fungistática, pero tienen una menor afinidad (46).

4.1.3.2 Mecanismos de liberación y adquisición de sideróforos fúngicos

1. Mecanismo tipo *shuttle* o disparo: El sideróforo es liberado al exterior por el hongo con el objetivo de que forme un complejo con el hierro (ferrisideróforo), posteriormente el complejo entra al hongo mediante una enzima reductasa (que reduce Fe^{3+} a Fe^{2+}), y así el sideróforo queda listo para su siguiente salida (47).

2. Mecanismo de transferencia directa o tipo *taxicap*: El sideróforo es liberado al exterior por el hongo, con el objetivo de que forme un complejo con el hierro (ferrisideróforo), posteriormente el complejo interacciona con receptores en la membrana del hongo, y ahí es depositado el hierro, en el interior hay otro sideróforo que toma el

hierro de la membrana para después con ayuda de una enzima reductasa (que reduce Fe^{3+} a Fe^{2+}) el hierro es liberado en el interior (46).

3. Mecanismo tipo hidrolítico: El sideróforo liberado al exterior cuenta con enlaces tipo éster, una vez formado el complejo con el hierro (ferrisideróforo), entra al hongo por completo donde las esterasas van a degradar a los enlaces del sideróforo y una enzima reductasa va a reducir al hierro (Fe^{3+} a Fe^{2+}), posteriormente el sideróforo libre es expulsado al exterior, recuperado vuelve a unir sus enlaces, quedando totalmente funcional (46).

4. Mecanismo tipo reductivo: El sideróforo es liberado al exterior por el hongo, con el objetivo de que forme un complejo con el hierro (ferrisideróforo), posteriormente el sideróforo deja el hierro en la membrana donde se encuentra una enzima reductasa (que reduce Fe^{3+} a Fe^{2+}), el hierro reducido es quien exclusivamente va a ingresar al interior del hongo (46).

En el interior del hongo dependiendo de sus necesidades, el hierro puede ser parte del metabolismo celular o almacenarse, para ser usado cuando se necesite (47).

4.1.3.3 Biosíntesis de sideróforos fúngicos

La detección de sideróforos producidos por los hongos se realiza mediante métodos cualitativos y cuantitativos. Un ejemplo de método cualitativo es la utilización del agar de cromoazurol S “CAS” (48), en donde este compuesto forma un complejo con el hierro produciéndose un color azul en el medio, cuando un quelante de hierro, como un sideróforo está presente, el cromoazurol toma al hierro del complejo y se pone en evidencia al formarse un halo de color amarillo-naranja alrededor del crecimiento del microorganismo (49).

Para evaluar la producción de sideróforos por parte de los hongos existen medios sintéticos de composición química conocida, como son el medio McVeigh Morton o el medio LIM, los cuales tienen una baja concentración de hierro ocasionando un estrés férrico el que permite que los hongos produzcan y liberen sideróforos en el medio (48).

La detección de los sideróforos del tipo hidroxamato se pueden realizar por

las pruebas de reacción con $FeCl_3$ y oxidación con peryodato de ácidos hidroxámicos (38).

Para la obtención de sideróforos, los métodos de extracción pueden ser:

1. Extracción con Cloroformo-Fenol: se obtiene una fase orgánica, que se vuelve a extraer con un exceso de éter etílico y con ¾ de volúmenes de agua, hasta la transferencia completa de los sideróforos, esto es evaporado y el residuo es solubilizado en metanol (50) (51).
2. Utilización con resina XAD2: Se prepara una columna con XAD2, la cual es prelavada con agua y metanol, el sobrenadante acuoso que contiene a los sideróforos es pasado lentamente por la columna, los sideróforos se enlazan a la superficie de la columna, la columna es lavada con agua para remover los componentes del medio que no fueron enlazados, entonces se cambia el solvente por metanol con el cual se extraen los sideróforos (50) (51).
3. Extracción con Cloroformo: El sobrenadante es mezclado con cloroformo en una relación volumen: volumen, obteniéndose dos fases, una orgánica y otra acuosa dependiendo del carácter de nuestro sideróforo, se evapora la fase que interese a sequedad para posteriormente solubilizarlo en metanol (51).

4.2 Antecedentes específicos

Neilands en 1952 observa sideróforos en cultivos de *Ustilago shaerogena*, al que ahora conocemos como ferricromo, siendo el primer sideróforo en ser aislado e identificado (51).

En 1982 Burt y colaboradores, observan la producción de ácidos hidroxámicos por levaduras de *Histoplasma capsulatum* en medio BHI, en donde reportaron que al adicionar medio filtrado en una concentración de 2% al medio sólido, existía un incremento en el crecimiento de 9 cepas homologas en fase levaduriforme y micelial (52).

Holzberg y Artis en 1983 reportan que *S. schenckii* produce sideróforos tipo hidroxamato, y que estos podrían funcionar como toxinas o factores de virulencia, ya que facilitan el crecimiento en condiciones limitadas de hierro (40).

Pacheco en 1999, utiliza espectrofotometría de absorción molecular VIS-UV en

cepas de *S. schenckii,* concluyendo que es capaz de producir sideróforos (53).

En 1999, Hernández caracteriza mediante cromatografía en capa fina los sideróforos producidos por *S. schenckii,* y los identificó como tipo hidroxamato (54).

Gómez y Ramos, en 2001 determinan la dosis letal 50 (LD_{50}) de cepas silvestres y mutantes con baja producción de sideróforos, concluyendo que los sideróforos podrían estar involucrados en la virulencia de *S. schenckii* (55).

Fernández en 2003, realiza curvas de producción de sideróforos en cepas silvestres y mutantes de *S. schenckii*, concluyendo que las cepas silvestres producen más sideróforos y en menos tiempo (56).

Pérez y colaboradores en 2010, basándose en trabajos de Zarnowski y Woods del 2005, determinan que *S. schenckii* utiliza sideróforos para la captura de hierro del ambiente y dentro de su anfitrión (57).

5. Planteamiento del problema

La esporotricosis es la micosis subcutánea más común en países latinoamericanos (2), teniendo una gran incidencia en México (9). En el estado de Puebla se han aislado cepas de *S. schenckii* y *S. mexicana*, siendo *S. schenckii* la principal especie causante de esporotricosis en humanos y la *S. mexicana* totalmente endémica de este estado (14), por tal motivo, es en estos agentes en los que se busca potenciales factores de virulencia.

La presencia de sideróforos en *Sporothrix* spp. ha sido registrada por diferentes autores a lo largo del tiempo, sin embargo, la información del efecto de estos quelantes de hierro producidos por *Sporothrix* spp. sobre sí mismo, es escasa. Una de sus potenciales funciones se basa en la comparación con otros patógenos fúngicos productores de sideróforos, donde actúan en la invasión del hospedero y sobrevivencia del microorganismo en este (37). Por lo cual se plantea en este trabajo conocer el efecto de los sideróforos de *S. schenckii* sobre el crecimiento de *S. schenckii* y *S. mexicana.*

6. Objetivos

6.1 General

Determinar el efecto que tienen los sideróforos en el crecimiento de *Sporothrix schenckii y Sporothrix mexicana.*

6.2 Específicos

- Determinar el efecto de los sideróforos procedentes de *Sporothrix schenckii* cepa 553 aislada del ambiente, en el crecimiento de cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas de casos clínicos en fase micelial.
- Determinar el efecto de los sideróforos procedentes de *Sporothrix schenckii* cepa 553 aislada del ambiente, en el crecimiento de cepas de *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix schenckii* aisladas del ambiente en fase micelial.

7. Material y métodos

7.1 Cultivo de cepas de *S. schenkii* y *S. mexicana*

Se utilizaron 4 cepas de *S. schenckii,* 2 aisladas del ambiente 540 y 553 y 2 aisladas de casos clínicos una de humano cepa 185 y otra perteneciente a una mascota cepa R-03-8-M. Además de 2 cepas de *S. mexicana* aisladas del ambiente 542 y 551. Cada cepa se inoculó en placas Petri con Agar Mycosel, manteniéndose a temperatura ambiente (25°C – 28°C) por 7 días, para su crecimiento.

7.2 Obtención de la suspensión celular

Una vez obtenido el crecimiento en placa de cada cepa, se colocó una pequeña porción de micelio (aproximadamente de 5 mm de diámetro) en matraces Erlenmeyer de 250ml con Caldo dextrosa Sabouraud y se mantuvo en agitación a 150 r.p.m. a 28°C durante 3 días.

7.3 Obtención de sideróforos

Los sideróforos utilizados se encontraban almacenados en el laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM-ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), etiquetados como pertenecientes a la cepa ambiental 553 de *Sporothrix schenckii* y extraídos por el método Cloroformo–Fenol.

7.4 Efecto de los sideróforos sobre el crecimiento de cepas de *Sporothrix schenckii* y *Sporothrix mexicana*

Se prepararon 108 placas Petri con Agar glucosa Sabouraud, de las cuales a 18 no se les adicionó sideróforos (control), a las siguientes 90 placas, por triplicado se les colocó 5,10,15, 20 y 200 microlitros de sideróforos.

A cada placa se le inoculó 5 microlitros de la suspensión celular obtenida de la fase micelial de *S. schenckii* y *S. mexicana,* posteriormente al ser comparada con

el tubo número 7 del nefelómetro de McFarland, con la finalidad de adicionar la misma cantidad de conidios formadores de micelio. Cada una de las cepas de *S. schenckii y S. mexicana* fueron inoculadas en 3 placas que no tenían sideróforos, posteriormente a cada una de las placas restantes por triplicado se adicionó 5, 10, 15 ,20 y 200 microlitros (Se) de sideróforos (108 placas en total).

Se mantuvieron a 28°C durante 96 horas, monitoreando el diámetro de crecimiento colonial (todo el micelio), cada 24 horas, con ayuda de una regla graduada, plana y rectangular.

Finalmente, después de las 96 horas transcurridas se observó la morfología microscópica de la cepa 540 de *S. schenckii*, con aumento de 40X.

8. Resultados

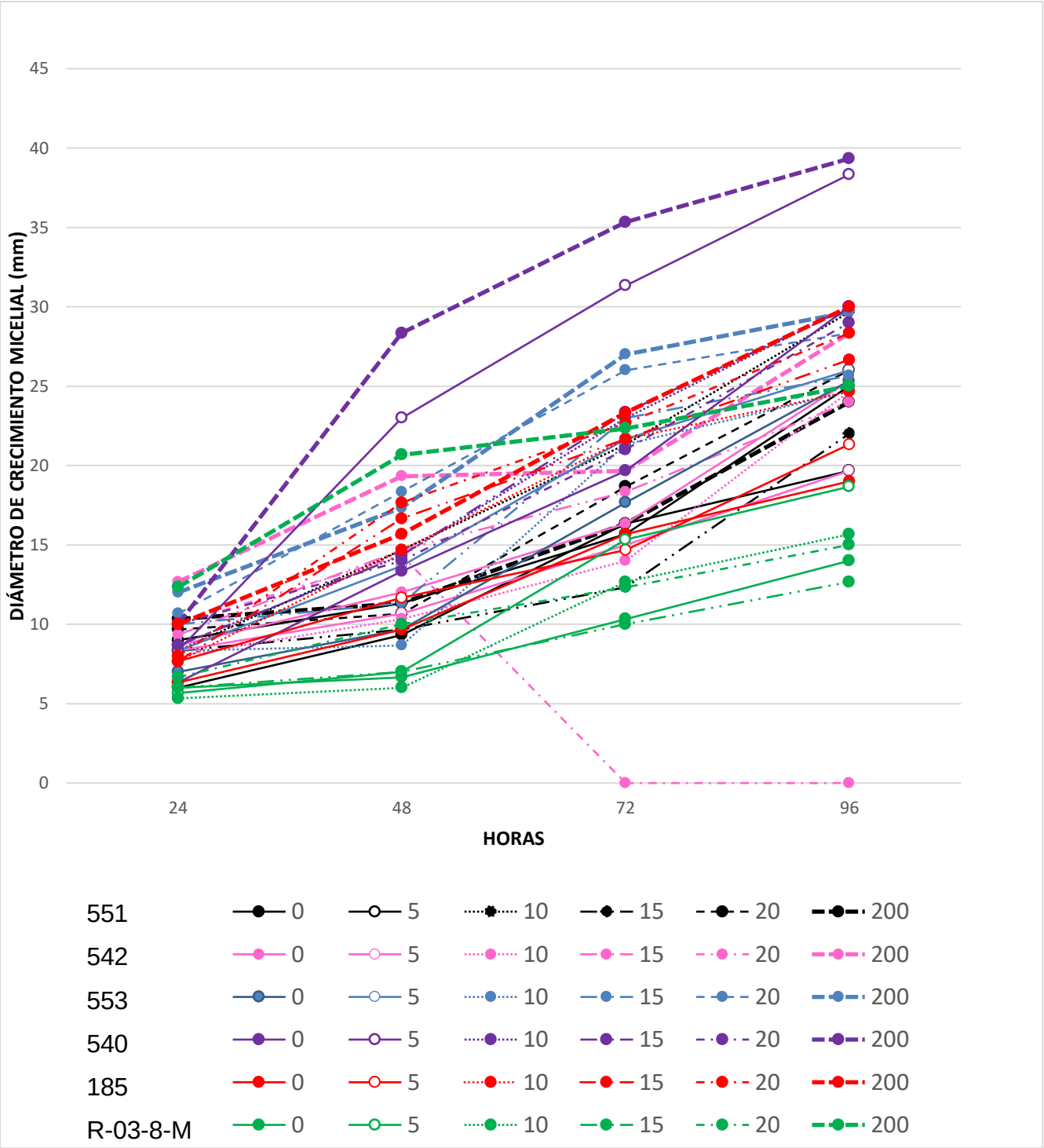
Con el objetivo de ver el efecto de los sideróforos en el crecimiento micelial de las cepas de *S. mexicana* y *S. schenkii*, se lograron inocular por triplicado 5, 10, 15, 20 y 200 microlitros de sideróforos en placas Petri con micelio de 4 cepas de *S. schenckii* y 2 cepas de *S. mexicana,* haciendo uso de un control de crecimiento al no adicionarle sideróforos.

Las observaciones macroscópicas se realizaron al comparar entre cada cepa una placa Petri de cada concentración (una del triplicado), después de transcurridas las 96 horas de inoculación.

Con la finalidad de conocer los cambios en la morfología microscópica, se observó a la cepa 551 de *S. schenckii*, después de 96 horas de inoculación a 40X en un microscopio óptico compuesto.

De las cepas analizadas, al final de las 96 horas, la que logró crecer más en comparación a las demás fue la cepa 540 de *S. schenckii* con un diámetro de crecimiento micelial igual a 39.93 mm cuando se le adicionó 200 µL de sideróforos al medio, sin embargo, la mayor diferencia entre el crecimiento micelial se presentó en la cepa R-03-8-M de *S. schenckii*, con un 44 % más grande entre los 200 µL de sideróforos y cuando no se le adicionaron al medio (Gráfica 1).

En ninguno de los casos después de haber transcurrido las 96 horas, las cepas que crecieron en medios sin sideróforos mostraron igualdad o similitud entre sí, con respecto a las cepas a las que se les adicionó más de 20 µL de sideróforos en el medio (Gráfica 1).



Gráfica 1. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *Sporothrix* spp., después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada línea (arriba hacia abajo) indica el crecimiento de las cepas de *Sporothrix mexicana* (551 y 542) y las cepas *Sporothrix schenckii* (553,540,185 y R-03-8-M), compararas a las horas de 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). Gráfico realizado en Excel 2016®.

8.1 *S. mexicana* cepa 551 aislada del ambiente

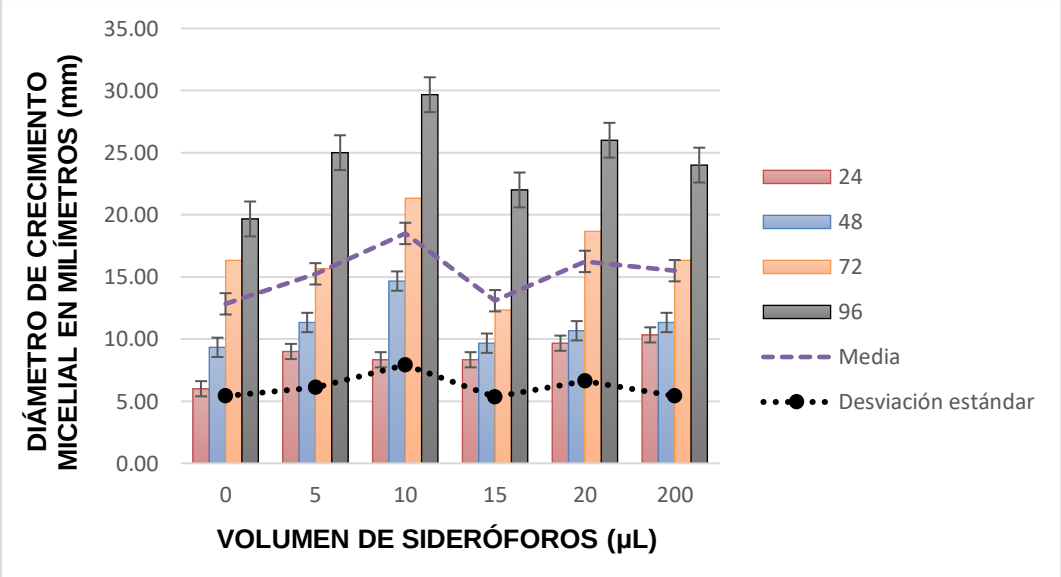
En el caso de la cepa 551 de *S. mexicana* se observó que a las 24 horas posteriores a su inoculación comenzó a crecer su micelio en forma gradual, es

decir, era mayor cuando se le ha adicionado alguna concentración de sideróforos en comparación a la placa control. Después de realizar el promedio de crecimiento entre el triplicado de placas (para cada concentración), se destaca que el mayor crecimiento micelial se presentó con la adición de 200 µL de sideróforos con 10.33 mm en comparación a la placa sin sideróforos con 6.00 mm de crecimiento, 41.9 % más grande (Grafica 2).

Finalmente, posteriores a las 96 horas, el mayor crecimiento micelial se presentó con 20 µL de sideróforos con 26.00 mm 7.7% más grande que con 200 µL (24.00 mm) y 24.3 % mayor que cuando no se le adicionó sideróforos (19.67 mm) (Gráfica 2).

Se destaca que todas las cepas monitoreadas, este fue el único caso en que en promedio el mayor diámetro ce crecimiento micelial se presentó con la adición de 20 µL de sideróforos transcurridas las 96 horas (Gráfica 1).

Respecto a la morfología macroscópica de la cepa 551 de *S. mexicana* es de destacar la aparición de rugosidad en el micelio que creció en la placa con 15 µL de sideróforos con respecto a las otras concentraciones, incluyendo al micelio de la placa donde no se adicionó sideróforos. También se observa la presencia de un valle irregular en el centro del micelio de la placa con 5 µL de sideróforos (Tabla 1) (Figura 1).



Gráfica 2. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. mexicana* cepa 551, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 1. Observación macroscópica de *S. mexicana* cepa 551 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Superficie	Plana	Plana	Rugosa	Plana	Plana	Plana
Margen	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
Borde	Radiado	Plano	Radiado	Plano	Radiado	Radiado
Centro	Radiado	Presencia de un valle irregular	Radiado	Plano	Radiado	Plano

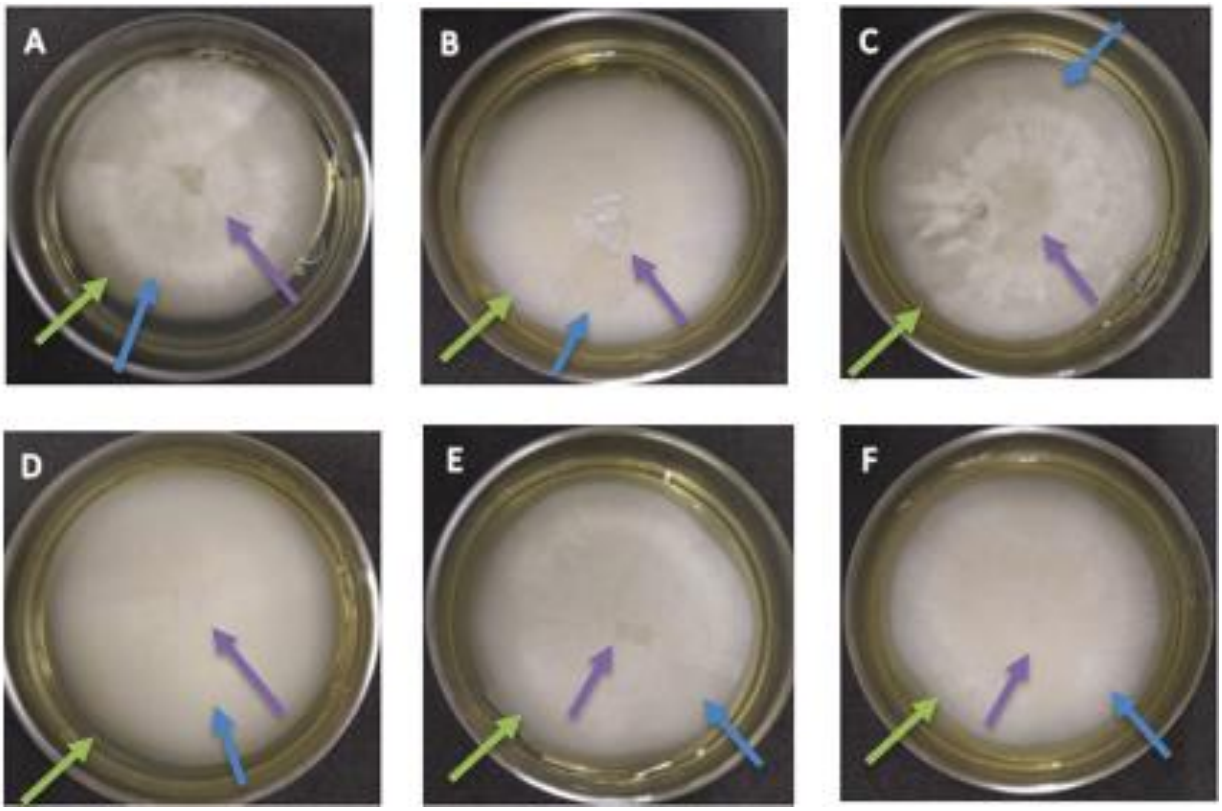


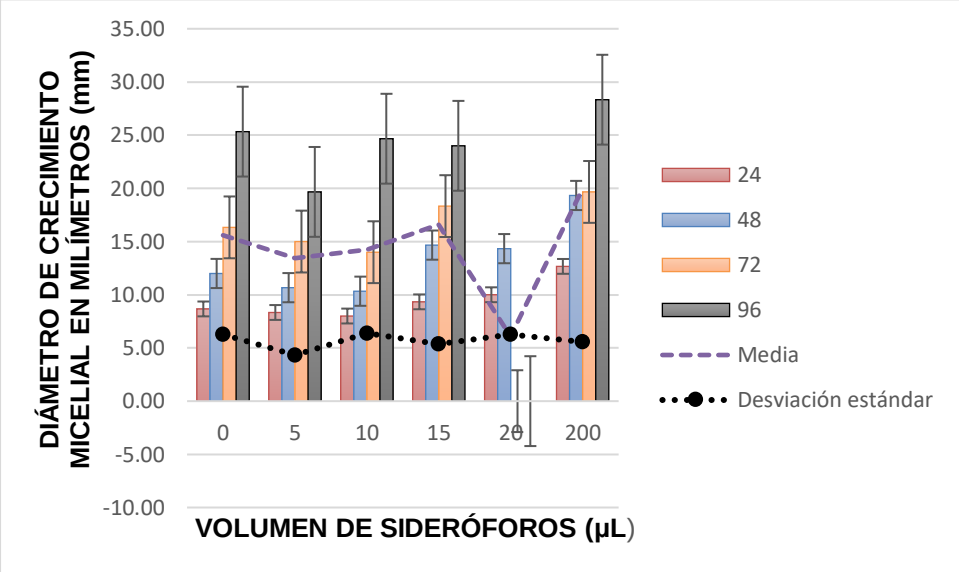
Figura 1. Morfología macroscópica de colonias de *S. mexicana* cepa 551 a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 20 µL de sideróforos. **F.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio.

8.2 *S. mexicana* cepa 542 aislada del ambiente

En el caso de la cepa 542 de *S. mexicana* se observó que, a las 96 horas posteriores de la inoculación, el mayor crecimiento de diámetro micelial fue con 200 µL (29.33 mm), 13.6 % más grande que cuando no se le adicionó sideróforos (25.33 mm) (Gráfica 3).

Esta cepa fue la única que presentó contaminación (después 48 horas) en el triplicado de placas Petri a las que se les adicionó 20 µL de sideróforos, es por esto por lo que no se muestran los resultados.

En la morfología macroscópica de la cepa 542 de *S. mexicana* se observa que se comparten características entre las placas, excepto que el centro del micelio es radiado cuando no hay sideróforos en el medio, así como que el borde es radiado en los casos cuando las placas tienen concentraciones de 5, 15 y 200 µL de sideróforos (Tabla 2) (Figura 2).



Gráfica 3. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. mexicana* cepa 542, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 2. Observación macroscópica de *S. mexicana* cepa 542 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	-*	Beige
Superficie	Plana	Plana	Plana	Plana	-*	Plana
Margen	Regular	Regular	Regular	Regular	-*	Regular
Borde	Radiado	Plano	Radiado	Plano	-*	Radiado
Centro	Radiado	Plano	Plano	Plano	-*	Plano

*Presentó contaminación.

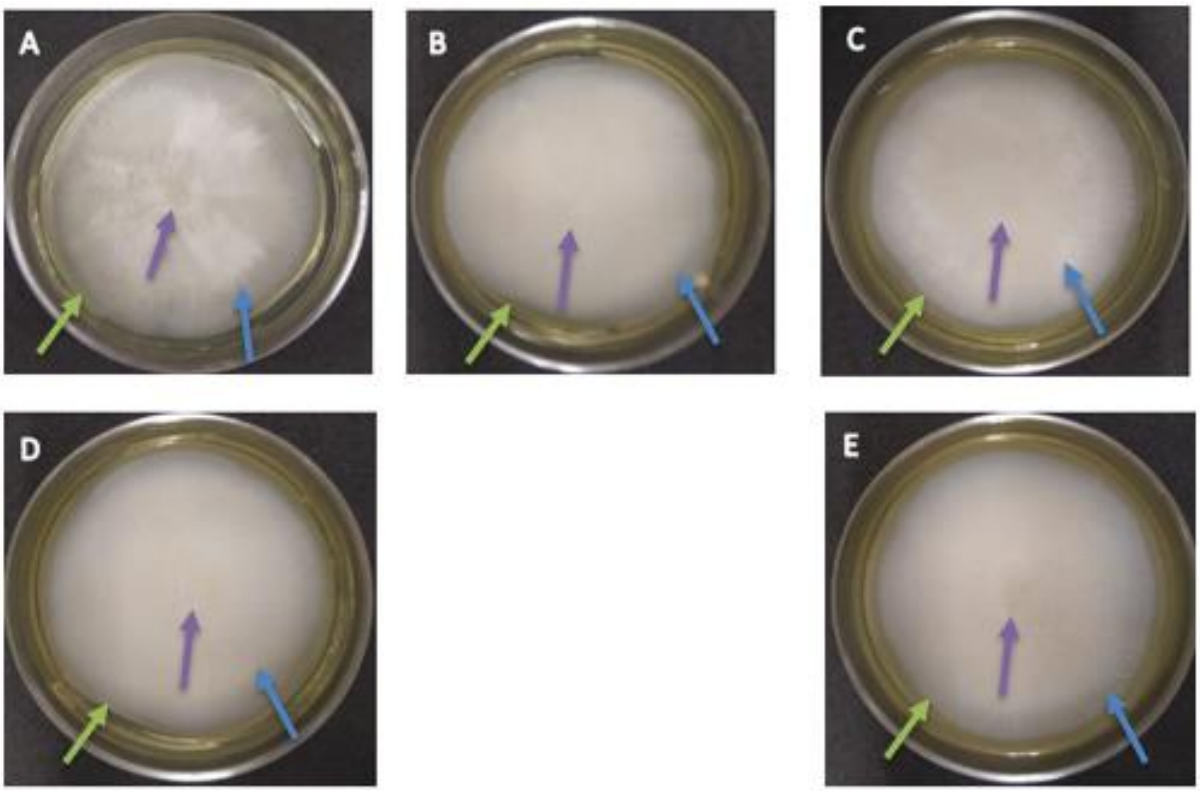
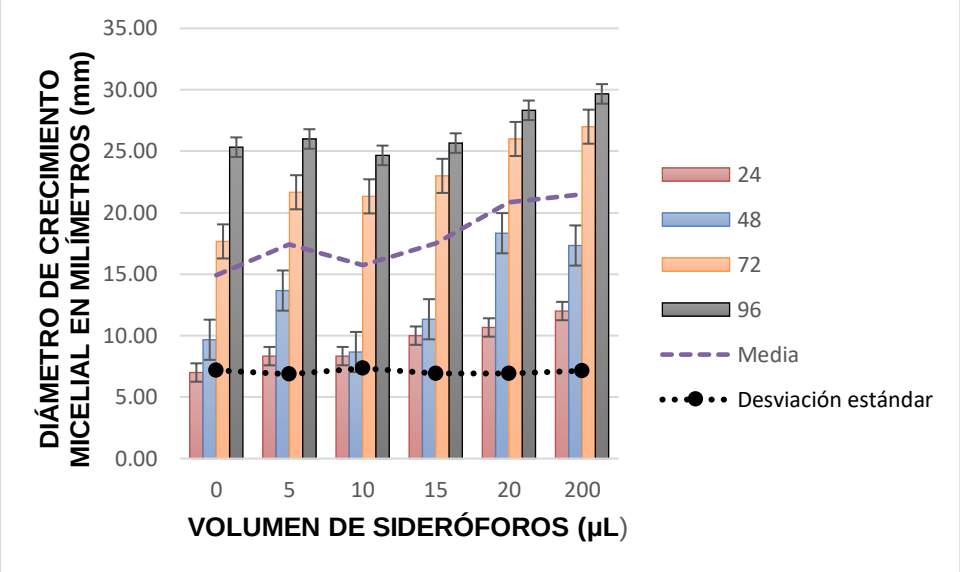


Figura 2. Morfología macroscópica de colonias de *S. mexicana* cepa 542 a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio. La adición de 20 µL en el medio no se muestra, por presentar contaminación en el proceso.

8.3 *S. schenckii* cepa 553 aislada del ambiente

En cuanto a la cepa 553 de *Sporothrix schenckii* su monitoreo a las 96 hrs mostró un mayor crecimiento en promedio en las cajas con respecto al volumen de 200µL al ser de 26.97 mm en comparación a las cajas que no tenían sideróforos donde solo crecieron en promedio 25.33 mm, un 6.09 % más grande (Gráfica 4).

En la morfología macroscópica de la cepa 553 de *S. schenckii* se observan márgenes irregulares en los casos donde no hay adición de sideróforos y con 200 µL. Así como, la aparición de rugosidad en el centro del micelio cuando no hay sideróforos y con 20 µL de sideróforos en el medio; es decir características que se presentaron en la placa donde no hay adición de sideróforos, desaparecieron con 5, 10 y 15 µL, para volver a presentarse a los 20 y 200 µL (Tabla 3) (Figura 3).



Gráfica 4. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. schenckii* cepa 553, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 3. Observación macroscópica de *S. schenckii* cepa 553 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Superficie	Rugosa	Plana	Rugosa	Plana	Rugosa	Rugosa
Margen	Irregular	Regular	Regular	Regular	Regular	Irregular
Borde	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado
Centro	Radiado y rugoso	Plano	Radiado	Plano	Radiado y rugoso	Plano

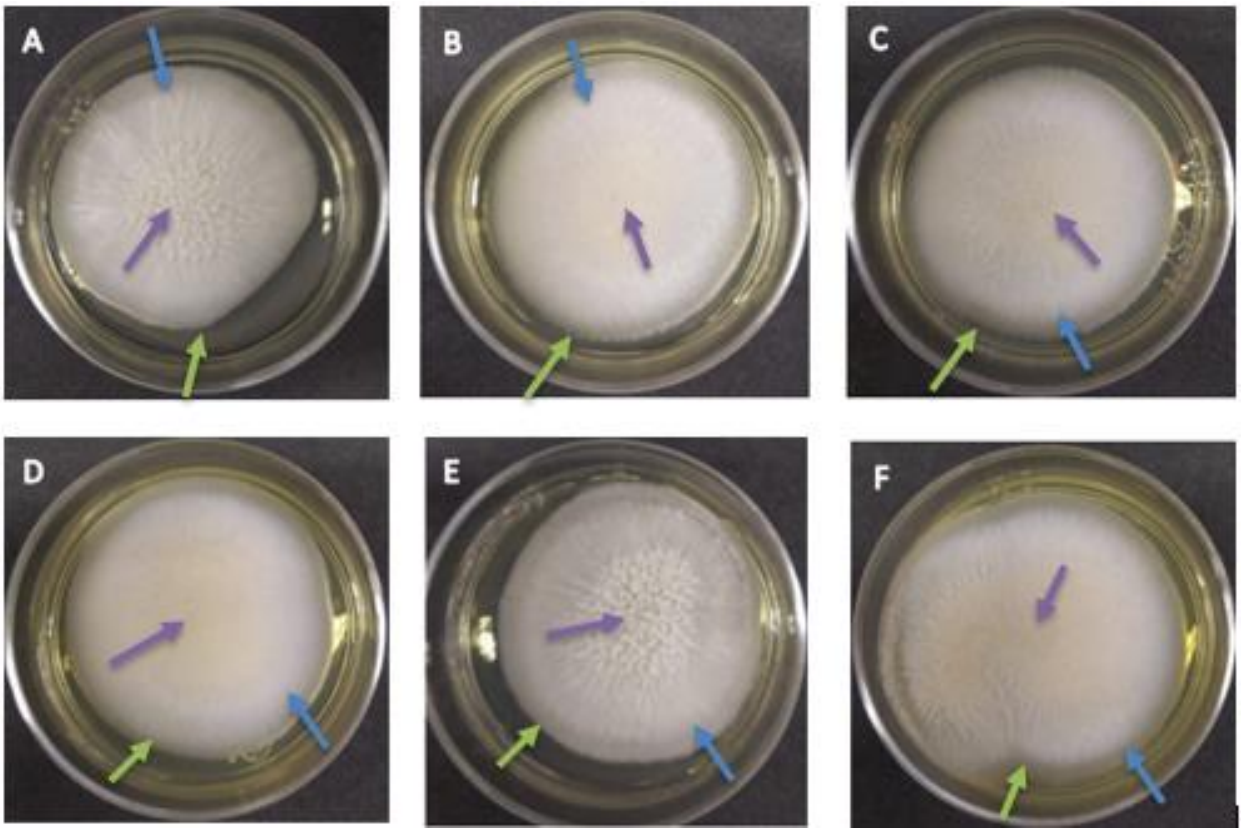


Figura 3. Morfología macroscópica de colonias de *S. schenckii* cepa 553 a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 20 µL de sideróforos. **F.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio.

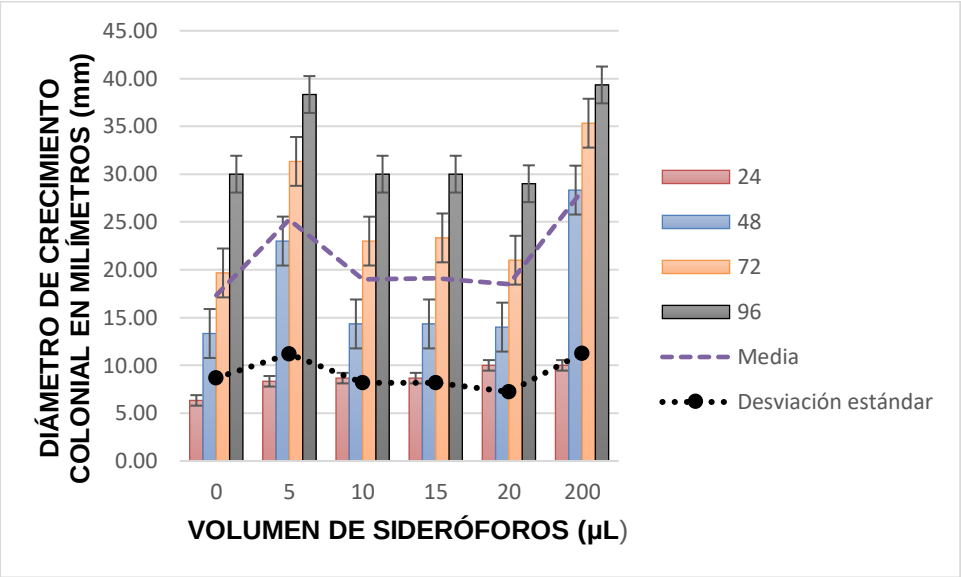
8.4 *S. schenckii* cepa 540 aislada del ambiente

En el caso de la cepa 540 de *S. schenckii* se observó que, conservó un crecimiento gradual, es decir, entre más aumenta la concentración de sideróforos mayor es el diámetro de crecimiento micelial. Las mediciones tomadas a las 96 horas muestran que en promedio el mayor crecimiento fue cuando había 200 µL de sideróforos en el medio (39.33 mm), 23.73 % más grande en comparación al micelio de la cepa donde no se adicionó sideróforos (30.00mm) (Gráfica 5).

La morfología macroscópica de la cepa 540 de *S. schenckii*, presentó márgenes irregulares cuando se le adicionó 5 y 200 µL de sideróforos al medio, observándose una pequeña protuberancia que parece surgir a partir del centro, extendiéndose hasta un borde. Se destaca, que se mantuvo uniforme la presencia de rugosidad en la superficie y un centro radiado, lo que puede hacer característica a esta especie de *S. schenckii* (Tabla 4) (Figura 4).

En la morfología microscópica de la cepa 540 de *S. schenckii,* al observar el micelio a 40X en un microscopio compuesto, se presentan cambios como la ramificación de los filamentos que desaparece conforme aumenta la concentración

de sideróforos, así como la aparición de simpodulosporas y la escasez de conidióforos (Tabla 5) (Figura 5).



Gráfica 5. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. schenckii* cepa 540, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 4. Observación macroscópica de *S. schenckii* cepa 540 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Superficie	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Rugosa
Margen	Regular	Irregular	Regular	Regular	Regular	Irregular
Borde	Radiado	Plano	Plano	Plano	Plano	Radiado
Centro	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado

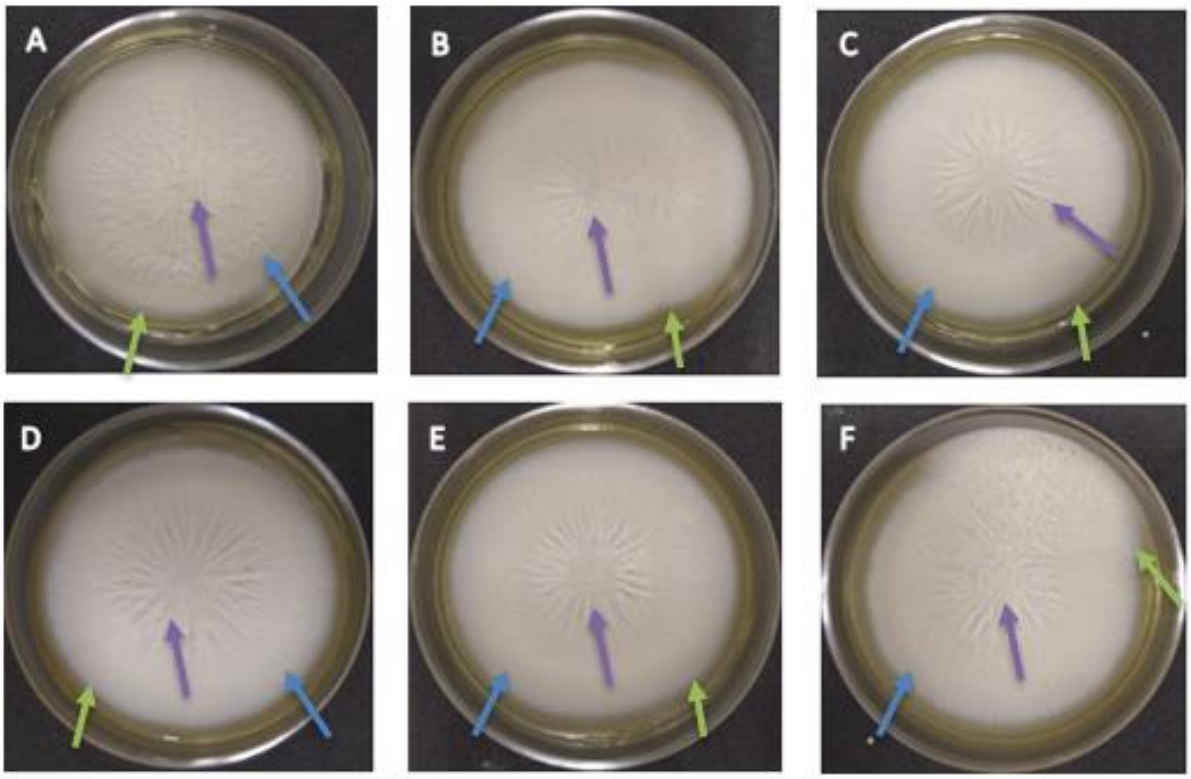


Figura 4. Morfología macroscópica de colonias de *S. schenckii* cepa 540 a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 20 µL de sideróforos. **F.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio.

Tabla 5. Observación microscópica de *S. schenckii* cepa 540 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Filamentos	Entrecruzados	Escasos	Entrecruzados y ramificados	Separados	Escasos y ramificados	Escasos
Conidioforos	Muchos	Pocos	Pocos	Muchos	Pocos	Pocos
Simpodulosporas	No	No	Sí	Sí	Sí	No

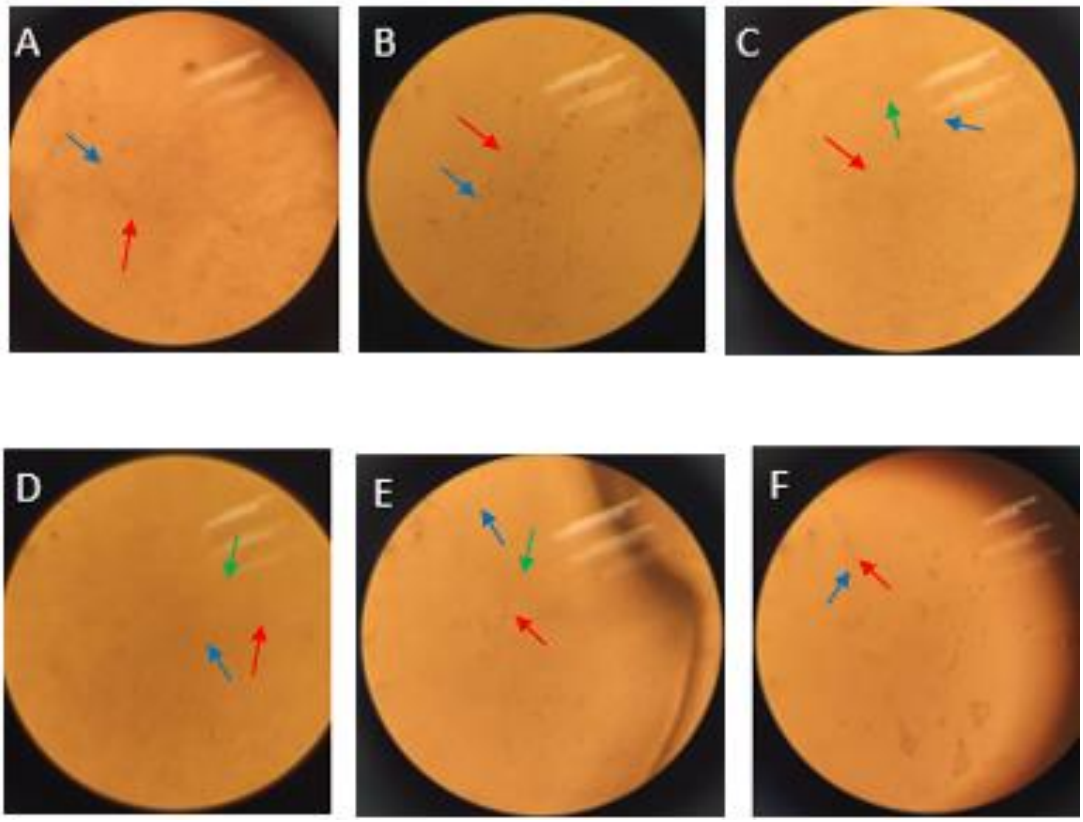
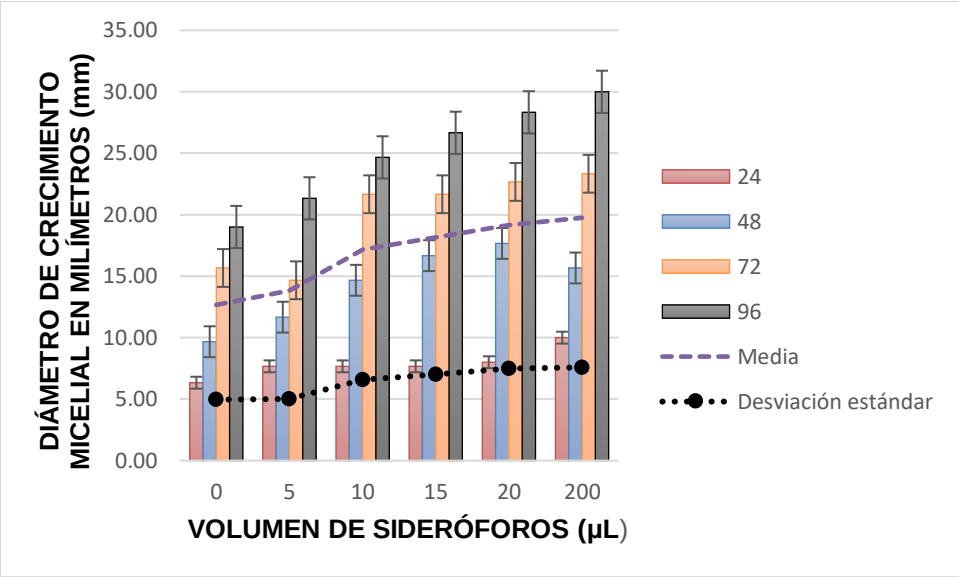


Figura 5. Características microscópicas aumento 40X de colonias de cepas de *S. schenckii* cepa 540 a 96horas de su inoculación a 28°C. A. sin sideróforos en el medio. B. 5 µL de sideróforos. C. 10 µL de sideróforos. D. 15 µL de sideróforos. E. 20 µL de sideróforos. F. 200 µL de sideróforos.

8.5 *S. schenckii* cepa 185 aislada de paciente (humano)

En el caso de la cepa 185 de *S. schenckii* se observó que, a las 96 horas posteriores a su inoculación, el mayor diámetro de crecimiento micelial en promedio fue cuando se adicionaron 200 µL de sideróforos al medio con 26.00 mm, un 26.93 % más grande en comparación al que no se le adicionó sideróforos con 19.00 mm (Gráfica 6).

La morfología macroscópica de la cepa 185 de *S. schenckii* aislada de un paciente humano, presentó el único caso de pigmentación al tener un centro amarillo, así como, en este caso después de los 10 µL de sideróforos se observan márgenes irregulares (Tabla 6) (Figura 6).



Gráfica 6. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. schenckii* cepa 185, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 6. Observación macroscópica de *S. schenckii* cepa 185 a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Superficie	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
Margen	Regular	Regular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
Borde	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado
Centro	Amarillo y radiado	Amarillo y radiado	Amarillo y radiado	Amarillo y radiado	Amarillo y radiado	Amarillo y radiado

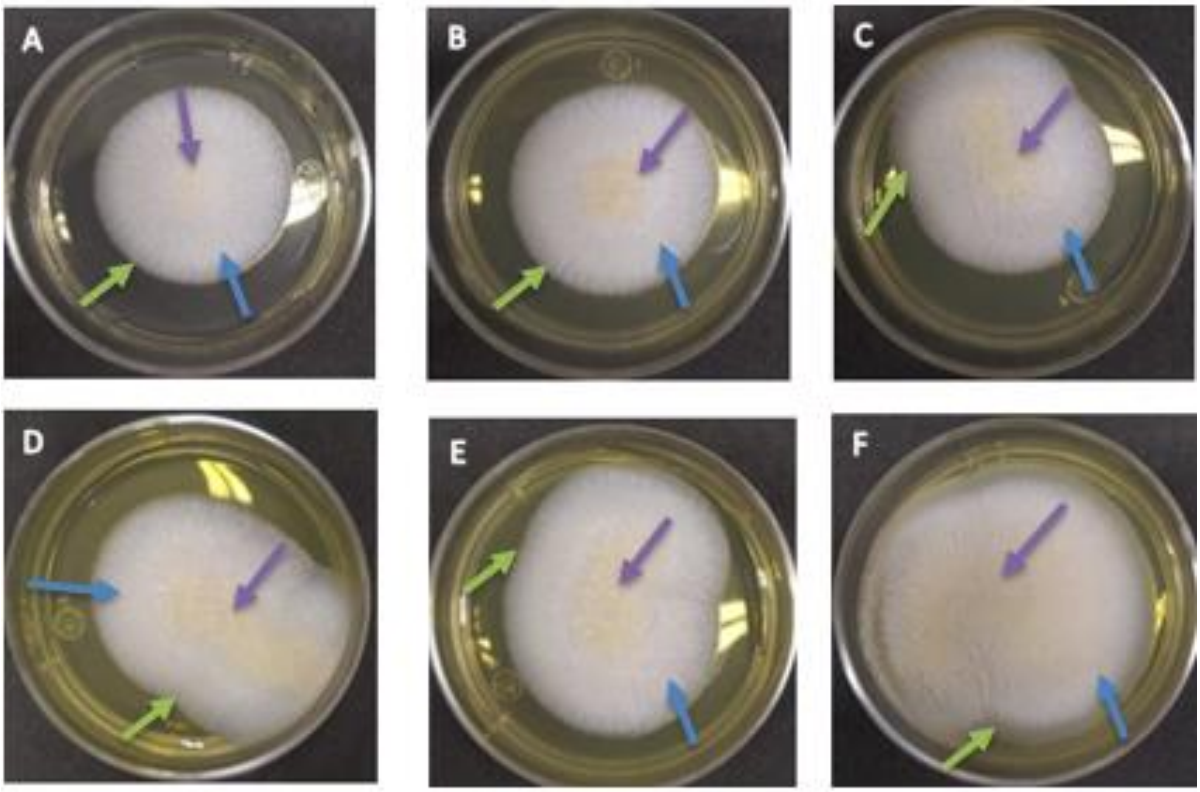
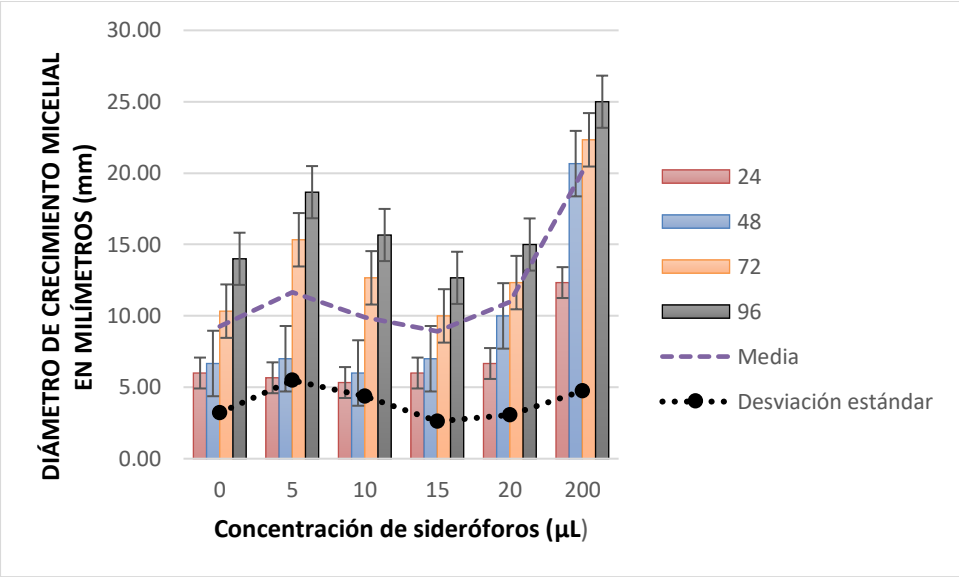


Figura 6. Morfología macroscópica de colonias de *S. schenckii* cepa 185 a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 20 µL de sideróforos. **F.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio.

8.6 *S. schenckii* cepa R-03-8-M aislada de paciente (mascota)

En el caso de la cepa R-03-8-M de *S. schenckii* se observó que, a las 96 horas posteriores a su inoculación, el mayor diámetro de crecimiento micelial en promedio fue cuando se adicionaron 200 µL de sideróforos al medio con 25.00 mm, un 44 % más grande en comparación al que no se le adicionó sideróforos con 14.00 mm (Gráfica 7). Es de destacar que está fue la cepa que en porcentaje presentó una mayor diferencia de diámetro de crecimiento micelial cuando se le ha adicionado sideróforos en comparación a la cepa que no los tenía (Gráfica 1).

En la morfología macroscópica de la cepa R-03-8-M de *S. schenckii* aislada de un caso de esporotricosis en mascota, se presentan márgenes irregulares en las concentraciones de 5, 20 y 200 µL, las demás características se mantienen constantes (Tabla 7) (Figura 7).



Gráfica 7. Promedios del diámetro de crecimiento micelial de *S. schenckii* cepa R-03-8-M, después de haber sido monitoreado cada 24hrs por 96hrs de incubación a 28°C. En cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200 µL), cada barra indica: 24 (promedio a las 24 horas), 48 (promedio a las 48 horas), 72 (promedio a las 72 horas) y 96 (promedio a las 96 horas). La línea morada indica la media de crecimiento en relación con el volumen, la línea punteada negra indica la desviación estándar. Las barras de error hacen referencia al error típico entre ensayos en cada volumen de sideróforos (0, 5, 10, 15, 20 y 200µL).

Tabla 7. Observación macroscópica de *S. schenckii* cepa R-03-8-M a las 96 horas de inoculación a 28° C en placas Petri con Agar glucosa Sabouraud.

Concentración de sideróforos	Sin la adición de sideróforos	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	200 µL
Color	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
Superficie	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
Margen	Regular	Irregular	Regular	Regular	Irregular	Irregular
Borde	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado	Radiado
Centro	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano	Plano

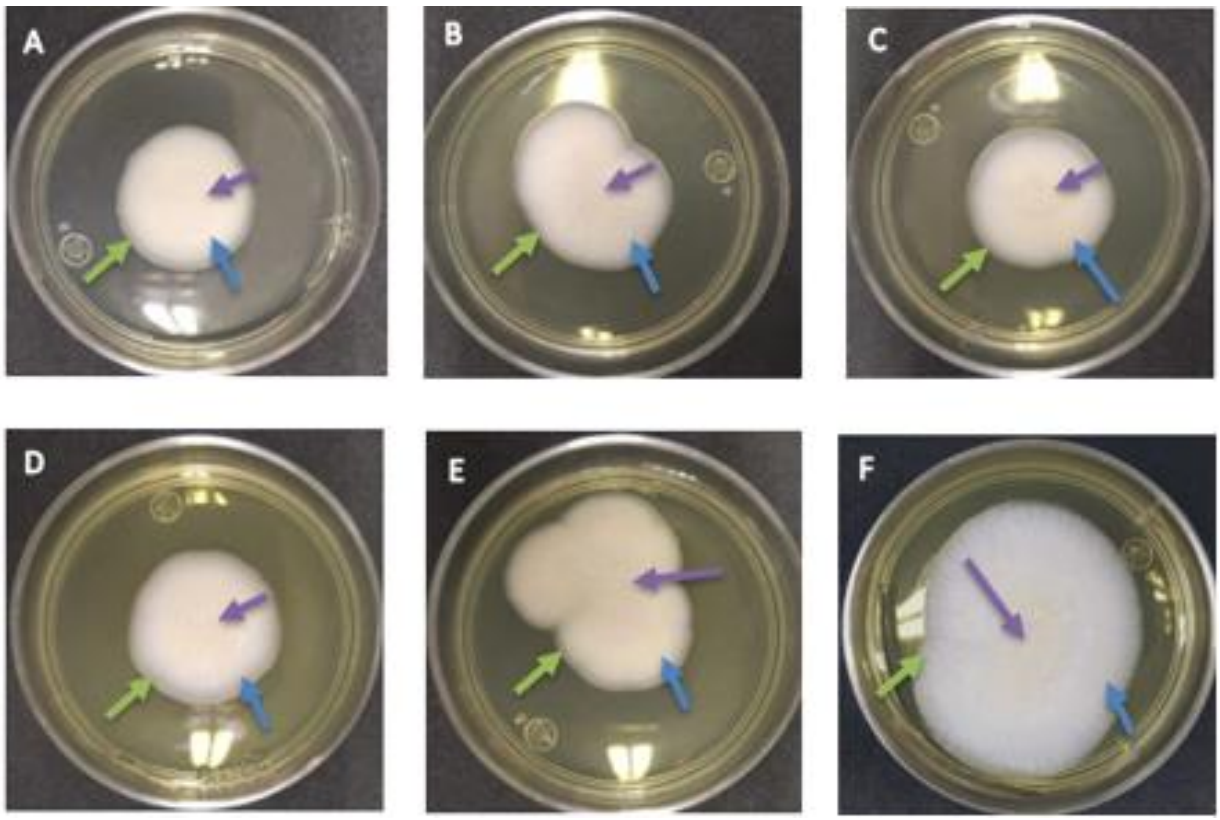


Figura 7. Morfología macroscópica de colonias de *S. schenckii* cepa R-03-8-M a 96 horas de su inoculación a 28 °C **A**. sin la adición de sideróforos. **B.** 5 µL de sideróforos. **C.** 10 µL de sideróforos. **D.** 15 µL de sideróforos. **E.** 20 µL de sideróforos. **F.** 200 µL de sideróforos. La línea verde indica el margen, la línea azul indica el borde y la línea morada indica el centro del micelio.

9. Discusión

En el presente estudio se determinó la actividad de los sideróforos previamente obtenidos de la cepa ambiental 553 de *Sporothrix schenckii,* adicionados en volúmenes de 5, 10, 15, 20 y 200 microlitros, al ser adicionados al medio Agar glucosa Sabouraud con 4 cepas de *Sporothrix schenckii*. Dos cepas aisladas del ambiente 540 y 553 y 2 aisladas de casos clínicos una de humano cepa 185 y otra perteneciente a una mascota cepa R-03-8-M; y 2 cepas de *Sporothrix mexicana* aisladas del ambiente cepas 542 y 551. Por ser éste un hongo dimórfico, el ensayo estaba planeado para ser aplicado tanto en la fase micelial como para la levaduriforme, pero debido a la pandemia por COVID-19, la cual tuvo su llegada a México el día 27 de febrero de 2020, solo se lograron obtener los resultados del análisis en la fase micelial, así pues, solo se analizó el micelio macroscópico y no microscópico. Sin embargo, de este último se tiene evidencia de una única toma de muestra para la cepa 540 *S. schenckii.*

Se ha demostrado que, en condiciones deficientes de hierro, se ve afectado el crecimiento de los microrganismos. Los sideróforos pueden mejorar el

crecimiento de microorganismos no cultivables en medios artificiales o inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos (*Phytophthora parasitica, Pythium ultimum* y *Sclerotinia sclerotiorum*) (40). La información sobre el efecto que tienen los sideróforos en el crecimiento de los hongos es escasa a pesar de que desde 1983 Holzberg y Artis describieron que diferentes hongos de interés médico, incluyendo a *Sporothrix schenckii* producen sideróforos (5).

A partir del año 1999 en el Laboratorio de Micología del CICM-ICUAP se han realizado diferentes estudios sobre la obtención y caracterización de los sideróforos en cepas de *Sporothrix* spp. En 1999 Pacheco realizó un estudio para determinar la producción de sideróforos por el método Cloroformo-fenol, donde concluyó que en ambas fases del hongo se encuentran sideróforos, sin embargo, la fase micelial mostró una mayor presencia de ellos que la fase levaduriforme, sugiriendo que el micelio pueda requerir más hierro que la fase levaduriforme *in vitro* y posiblemente se deba a la complejidad del micelio en comparación a las levaduras.

Las levaduras al igual que el micelio producen sideróforos del tipo hidroxamato, con los resultados de nuestro estudio y tomando en cuenta que se ha reportado una menor presencia de sideróforos en comparación a la fase micelial, se podría hipotetizar que la presencia de sideróforos en la fase levaduriforme cambiará su morfología estructural en función de agregar una cantidad menor de sideróforos en el medio de la que necesitó la fase micelial, que fue de 5 µL, sin embargo, en el caso de las levaduras, el medio a utilizar deberá ser el agar infusión de cerebro-corazón, que a diferencia del medio utilizado en el micelio (agar dextrosa Sabouraud) no contiene glucosa, lo que podría ocasionar una deficiencia en su crecimiento, ya que esta es necesaria para la obtención de la energía, y utilizada en la transición de micelio a levadura. Por lo tanto, los sideróforos estarán aumentando la proliferación de levaduras, pero no de manera notable, debido a que los sideróforos no son necesarios para la proliferación, así como la interacción del hierro con la glucosa en el medio. Las levaduras se tratan de la forma parasitaria de *Sporothrix* spp. tomando esto en cuenta, y que en 2006 Sabanero y colaboradores (58) concluyeron que la adhesión de las levaduras al epitelio, promueven la alteración morfológica en el huésped y la pérdida del arreglo de la red microtubular sugiriendo que la adhesión del patógeno al epitelio conlleva una invasión y daño a los tejidos. Así como, conocemos que el aumento de la concentración de hierro libre son factores de riesgo para el desarrollo de la infección en el huésped (53), se sugiere que *In vivo* la producción de sideróforos deberá de promover la proliferación

de levaduras y la adhesión al epitelio, aumentando en consecuencia la capacidad de infección y de causar enfermedad.

El crecimiento de cepas de *Sporothrix* spp. en fase micelial a 28°C es aproximadamente de 72 a 120 horas (3-5 días) (16). Vásquez y Castillo en 2017, realizaron la caracterización fenotípica de aislamientos clínicos de *Sporothrix schenckii*, manteniendo las cepas en medio PDA durante 21 días, donde se alcanzó en promedio un diámetro de crecimiento colonial de 44.40 mm (59), en nuestro estudio después de solo 4 días con la adición de 200 µL de sideróforos en el medio se reportó en promedio un diámetro de crecimiento colonial de 39.33mm en la cepa 540. Solo una diferencia de 5.07 mm, en 17 días menos.

En todas las cepas excepto a la R-03-8-M de *S. schenckii,* después de las 72 horas se cubrió casi por completo la superficie de la caja Petri, y se podría suponer que esto limitó el crecimiento del hongo a las 96 horas, sin embargo, no fue así debido a que en la cepa R-03-8-M aún existía espacio para su crecimiento y no alcanzó a las demás cepas. La cepa 542 de *Sporothrix mexicana* fue la única que presentó contaminación en los tres ensayos, esta fue a la adición en el medio de 20µL de sideróforos, y debido a que la cepa 551 de *Sporothrix mexicana*, presentó su mayor diámetro de crecimiento colonial a los 20µL, y que *Sporothrix mexicana* es considerada una especie ambiental, quizás ponga sus sideróforos disponibles a la disposición de otros microorganismos presentes en el ambiente para su crecimiento, basándose en una posible simbiosis.

Existen diferencias macroscópicas en la adición de sideróforos, así como en el aumento del volumen de éstos, al compararlas con aquellas cepas que no cuentan con sideróforos en el medio, presentando rugosidad, alterando sus márgenes de regulares a irregulares o hasta de cambiar la pigmentación de las colonias. Las diferencias microscópicas son notables entre cada concentración de sideróforos, a pesar de que solo se cuenta con una muestra tomada, la aparición de estructuras hace suponer los variables cambios morfológicos que presenta *Sporothrix spp*. con la presencia de sideróforos.

Se propone que este estudio sirva de base para fomentar el estudio de los sideróforos producidos por las especies de *Sporothrix*, para concluir sus efectos en la fase levaduriforme, a exposición de antifúngicos, en la formación de biopelículas, así como, en su capacidad de producir una infección.

10. Conclusiones

1. Se observó que todas las cepas tienden a aumentar su diámetro de crecimiento colonial de la fase micelial cuando se les adiciona sideróforos.

2. Las cepas de *S. mexicana* mantienen comportamientos similares de crecimiento entre sí al igual que las cepas de *S. schenckii* a excepción de la cepa R-03-8-M.

3. La morfología macroscópica es notablemente cambiante en aquellas cepas que cuentan con sideróforos en su medio, al dejar de ser regulares en su margen o comenzar a presentar rugosidad.

4. Los cambios en la morfología microscópica de *S. schenckii* cepa 540, son variables conforme se aumenta la concentración de sideróforos, con la aparición de simpodulosporas y la desaparición de filamentos ramificados.

11. Perspectivas

Dado que no existen datos relacionados con el tema de investigación de esta tesis, por los resultados obtenidos y por el alcance de este trabajo, quedan abiertos algunos temas a indagar como son:

- Analizar el efecto de los sideróforos de *Sporothrix* spp. sobre la formación y crecimiento de sus levaduras.
- Estudiar microscópicamente el efecto de los sideróforos de *Sporothrix* spp. sobre su crecimiento.
- Analizar el efecto de los sideróforos de *Sporothrix* spp. en la formación de biopelículas.
- Evaluar el efecto de los sideróforos en pruebas antifúngicas de *Sporothrix* spp.
- Realizar una comparación del efecto de los sideróforos producidos por cada una de las especies del género *Sporothrix.*
- Estudiar efecto de los sideróforos de *Sporothrix* spp. en la esporotricosis.

12. Bibliografía

1. Arenas R, Sanchez Cardenas CD, Ramirez Hobak L, Ruiz AL, Vega MM. Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. Journal of Fungi. 2018; 4(2): p. 62.
2. Gavira Giraldo CM, Cardona CN. Sporotrichosis and chromobastomycosis: literature review. CES Medicina. 2017; 31(1): p. 79-91.
3. Bravo T. Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. Rev Lationoamer Patol Clin. 2012; 59(3): p. 147-71.
4. Toriello C, Brunner Mendoza C, Ruiz Baca E, Duarte Escalante E, Pérez Mejía A, del Rocío Reyes Montes A. Sporothricosis in Mexico. In.; 2020. p. 1-14.
5. Holzberg M, Artis WM. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. 1983; 40(3): p. 9-134.
6. Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. Siderophores in fungal physiology and virulence. Annu Rev phypathol. 2008; 46(1): p. 149-87.
7. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors od medically important fungi. Clinical microbiology reviews. 1996; 9(4): p. 469-88.
8. Messias Rodrigues A, Portella Della Terra P, Dib Greiao I, Pereira SA, Orofino Costa R, Pires de Camargo Z. The threat of emerging and re-emerging pathogenic Sporothrix species. Mycopathologia. 2020; 185: p. 813-842.
9. Rubio G, Sánchez G , Porras L, Alvarado Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. Revista Iberoamericana de Micologia. 2010; 27(2): p. 75-9.
10. Sizar O, Talati R. Sporotrichosis. StatPearls Publishing. 2020.
11. Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(4): p. 633-54.
12. Xue SL, Li L. Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. Mycopathologia. 2009; 167(6): p. 355-6.
13. Kwon Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1992; 34(6): p. 504-504.
14. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana, three new Sporothrix species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45(10): p. 3198-206.
15. Hoog S, Paul D, Denning D, Vushnu C. Commentaries: Name Changes in Medically Important Fungi and Their Implications for Clinical Practice. Journal of Clinical Microbiology. 2015 March.
16. Arenas Guzmán R, Torres Guerrero E. Esporotricosis. Micología Médica Ilustrada. 2020; 6e.
17. Ruiz BE, Alba Fierro CA, Pérez Torres A, Toriello C. Components and Virulence Factors of the Sporothrix schenckii Species Complex. Sporotrichosis. 2015;: p. 37-52.
18. Iglesias Osores S. Características microscópicas de Sporothrix sp.. Galería fotográfica. 2019 Abril-Junio; 5(2).
19. Evangelista Oliveira MM, Almeida Paes R, Gutierrez Galhardo MC, Zancope Oliveira R. Molecular identification of the Sporothrix schenckii. Revista Iberoamericana de micología. 2014 Enero-Marzo; 31(1): p. 2-6.
20. Ostafinska A, Jankowiak R, Bilanski P, Solheim H, Wingfield MJ. Six new species of Sporothrix from hardwood trees in Poland. MycoKeys. 2021 Agosto; 82: p. 1-32.

21. Orofino Costa R, Macedo P, Rodrigues AM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. Anais brasileiros de dermatologia. 2017; 92(5): p. 606-20.
22. Tellez M, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne Hernández R, Carlos IZ. Sporothrix schenckii complex biology, enviroment and fungal pathogenecity. Microbiology. 2014; 160(11): p. 2352-65.
23. Batista Duharte A, Martínez DT, da Graca Sgarbi DB, Carlos IZ. Enviromental conditions and fungal pathogenicity. Sporotrichosis: Springer. 2015;: p. 53-72.
24. Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. Dermatology research and practice. 2014.
25. de Lima Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clinical microbiology reviews. 2011; 24(4): p. 633-54.
26. Abedon ST, Duffy S, Turner PE. Bacteriophage Ecology. Encyclopedia of Microbiology. 2009;: p. 42-57.
27. Prakash H, Karuppiah P, Al-Dhabi A, Prasad GS, Badapanda C, Chakrabarti A. Comparative genomics of Sporothrix species and identification of putative pathogenic gene determinants. Future Microbiol. 2020; 15(15): p. 1465-81.
28. Silva JN, Miranda LH, Menezes RC, Gremiao ID, Oliveira RV, Viera SM. Coparison of the sensitivy of three methods for the early diagnosis of sporotrichosis in cats. Comp Pathol. 2018; 160: p. 72-8.
29. Rudramurthy SM, Chakrabarti A. Sporotrichosis: Update on diagnostic techniques. Current Fungal Infection Reports. 2017; 11(3): p. 134-40.
30. Garcia Carnero LC, Lozoya Perez NE, Gonzalez Hernandez SE, Martinez AJ. Immunity and treatment of sporotrichosis. Journal of Fungi. 2018; 4(3): p. 100.
31. Waller SB, Dalla Lana DF, Quatrin PM, Ferreira MR, Fuentefria AM, Mezzari A. Antifungal resistance on Sporothrix species: an overview. Brazilian Journal of Microbiology. 2020;: p. 1-8.
32. Trujillo. Esporotricosis. Micología Médica. 2020; 6e.
33. Kauffman CA, Marr KA, Bogorodskaya M. Basic biology and epidemiology of sporotrichosis. UpToDate. 2021.
34. Huang M, Ma Z, Zhou X. Comparative Genomic Data Provide New Insight on the Evolution of Pathogenicity in Sporothrix Species. Frontiers in Microbiology. 2020 September.
35. Arrillaga Moncrieff I, Capilla J, Fernández A, Fariñas F, Mayayo E. Diferencias en la patogenicidad del complejo de especies Sporothrix en un modelo animal. Patología, revista latinoamericana. 2010; 48(2): p. 87-82.
36. Ali SS, Vidhale N. Bacterial siderophore and their application: a review. Int J Curr Microbiol App Sci. 2013; 2(12): p. 303-12.
37. Ahmed E, Holmstrom SJ. Siderophores in enviromental research: roles and applications. Microbial biotechnology. 2014; 7(3): p. 196-208.
38. Aguado Santacruz GA, Moreno Gomez B, Jiménez Francisco B, García Moya E, Preciado Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Rev fitotec mex. 2012; 35(1): p. 9-21.
39. Kramer J, Özkaya Ö , Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. Nature Microbiology. 2020; 18(3): p. 152-63.
40. Saha M , Sarkar S, Sarkar B, Sharma B, Bhattacharjee S, Triberdi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environmental Science and Pollution Research. 2016; 23(5): p. 3984-99.

41. van der Helm D, Winkelmann G. Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. Metal ions in fungi. 1994; 11: p. 39-98.
42. Khan A, Singh P, Sirvastava A. Syntesis, nature and utiliry of universal iron chelator - Siderophore: A review. Microbiol Res. 2017;: p. 212-213:103-11.
43. Dave B, Anshuman K, Hajela P. Siderophores of halophilic archaea and their chemical characterization. 2006.
44. Neilands J. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry. 1955; 270(45): p. 23-6.
45. Velasquez I. Characterization of siderophores in the Southern Ocean. University of Otago. 2011.
46. Howard DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(3): p. 394-404.
47. Neilands J, Nakamura K. Detection, determination, isolation, characterizarion and regulation of microbial iron chelates. Handbook of microbial iron chelates. 1991;: p. 1-15.
48. Schwyn B, Neilands J. Siderophores from agronomically important species of the Rhizobiacae. Comments on Agricultural and Food Chemistry. 1987; 1(2): p. 95-114.
49. Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. Journal of mycrogiology and biology education: JMBE. 2011; 12(1): p. 51.
50. Jalal M, Van Der Helm D. Isolation And Spectrescopic Identification of Fungal Siderophores. Crc Handbook Of Microbial Iron Chelates. 1991;: p. 1-105.
51. Neillands J. Siderophore Systems of Bacteria and fungi. Metal Irons and Bacteria. 1989.
52. Burt W. Identification of coprogen B and its Breakdow products from Hystoplasma capsulatum. Department of Mycrobiology and Inmunyty. 1982;: p. 900-996.
53. Pacheco R. Producción de sideróforos de Sporothrix shenckii. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tesis profesional para obtener el título de Químico Farmacobiólogo; 1999.
54. Hernández H. Aislamiento e Identificación de los Sideróforos producidos por Sporothrix schenckii. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tesis profesional para obtener el título de Químico Farmacobiólogo; 1999.
55. Gomez S, Ramos A. Determinación de las LD50 de cepas mutantes no productores de sideróforos y de cepas silvestres de S. schenckii en ratones. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tesis profesional para obtener el título de Químico Farmacobiólogo; 2001.
56. Fernández S. Producción de sideróforos de cepas silvestres y mutantes de Sporothrix schenckii. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tesis profesional para obtener el título de Químico Farmacobiólogo; 2003.
57. Pérez Sánchez L, González E, Colón Lorenzo E, González Velázquez W, González Méndez R, Rodríguez del Valle N. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of Sporothrix schenckii with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. BMC Microbiol. 2010; 10(317).
58. Sabanero LM, Tsutsumi FV, Barbosa SG, López Romero E, Sandoval Bernal G. Interacción de Levaduras de Sporothrix. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2006 Septiembre-Diciembre;(36).
59. Vásquez AM, Castillo JJ. Caracterización fenotípica de aislamientos clínicos de Sporothrix schenckii, sensu lato. Universidad de San Carlos de Guatemala, Tesis profesional para obtener el título de Químicas Biólogas; 2017.
60. Lopes Bezerra LM, Mora Montes HM, Zhang Y, Nino Vega G, Messias Rodrigues A, Pires de Camargo Z. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of

knowledge on a chageable disease and on emerging etiological agents. Medical Mycology. 2018 April; 56(1): p. 143-126.

PUEBLA, FEBRERO, 2022