

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE
Fusarium spp. DE ORIGEN HUMANO, ANIMAL Y VEGETAL

Sara María Miranda Hoyos
Nathalie Otoy Martínez

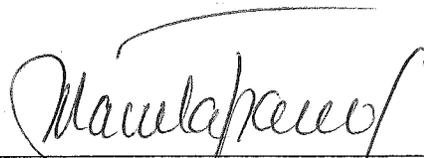


PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
Junio de 2016

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium*
spp. DE ORIGEN HUMANO, ANIMAL Y VEGETAL

Sara María Miranda Hoyos
Nathalie Otoya Martínez

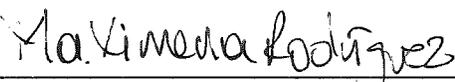
Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D
Decano Académico



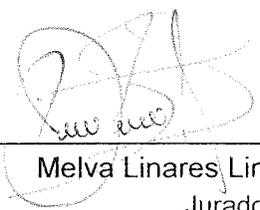
Marcela Franco Correa, Ph.D
Directora de Carrera de Microbiología Industrial

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium*
spp. DE ORIGEN HUMANO, ANIMAL Y VEGETAL

Sara María Miranda Hoyos
Nathalie Otoyá Martínez



María Ximena Rodríguez Bocanegra, Ph.D
Directora



Melva Linares Linares, M.Sc.
Jurado

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	2
2.1. Generalidades de <i>Fusarium</i> spp.	
2.2. Patologías producidas por <i>Fusarium</i> spp. en humanos y animales	
2.3. Enzimas queratinolíticas	
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general	
3.2. Objetivos específicos	
4. Metodología	5
4.1. Microorganismos de estudio	
4.2. Establecimiento del banco de trabajo	
4.3. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cualitativo	
4.3.1. Degradación de plumas de pollo	
4.3.2. Degradación de sustrato cromogénico	
4.3.3. Colonización de pelo de origen humano y animal	
4.4. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo – halos de hidrólisis en agar queratina	
4.5. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cuantitativo – degradación de sustrato cromogénico	
5. Resultados y discusión	8
5.1. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cualitativo	
5.1.1. Degradación de plumas de pollo	
5.1.2. Degradación de sustrato cromogénico (queratina azure)	
5.1.3. Colonización de pelo de origen humano y animal	
5.2. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo – halos de hidrólisis en agar queratina	
5.3. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cuantitativo – degradación de sustrato cromogénico	
6. Conclusiones	16
7. Recomendaciones	17
8. Bibliografía	17
9. Anexos	23

RESUMEN

Fusarium es un género fúngico de gran importancia en agricultura y salud debido a su patogenicidad en plantas, animales y humanos. En plantas causa marchitamiento vascular generando importantes pérdidas económicas en un amplio rango de cultivos ornamentales, hortalizas, frutales y cereales, entre otros; mientras que en humanos y animales inmunocompetentes puede producir afecciones de la piel, queratitis y onicomicosis, e infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, por lo que actualmente ha adquirido relevancia como patógeno emergente. A pesar de que se conoce que *Fusarium* presenta diversos factores de patogenicidad, existen pocos reportes de la producción de queratinasas, enzimas líticas asociadas a lesiones superficiales. Por lo anterior, es importante determinar si los aislamientos de *Fusarium* spp. de lesiones en humanos, animales y plantas presentan actividad queratinolítica.

El presente estudio evaluó la actividad queratinolítica de doce aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal a nivel cualitativo mediante la degradación de plumas blancas de pollo y sustrato cromogénico (queratina azure) y la colonización de pelo humano y animal; nivel semicuantitativo por el crecimiento en medio con queratina como única fuente de carbono y nitrógeno; y nivel cuantitativo por degradación de queratina azure. Los ensayos a nivel cualitativo y semicuantitativo determinaron que los doce aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal son queratinofílicos, mientras que el ensayo cuantitativo evidenció actividad queratinolítica. Adicionalmente, la actividad queratinolítica de *Fusarium* spp. mostró asociación al origen de aislamiento en las pruebas de colonización de pelo animal y en la de degradación de queratina azure a nivel cuantitativo a los 14 días, ya que en ambos ensayos los aislamientos de origen humano superficial arrojaron los resultados más altos. Finalmente, en las pruebas de actividad enzimática a nivel cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo los aislamientos de origen vegetal presentaron valores altos, lo que sugiere su potencial para establecer procesos infectivos superficiales en hospederos humanos y animales, haciendo así saltos entre reinos.

1. INTRODUCCIÓN

Fusarium spp. es un microorganismo de gran importancia en agricultura y salud debido a que afecta tanto a plantas como a animales y humanos causando diversas enfermedades. En plantas causa marchitamiento generando pérdidas económicas en una amplia gama de cultivos ornamentales (Gullino et al., 2015), hortalizas (Gordon et al., 2015), frutales (Wang et al., 2015) y cereales (Swett et al., 2015), entre otros; mientras que en humanos y animales inmunocompetentes puede producir afecciones de la piel, queratitis y onicomicosis, e infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (Alexandrakis et al., 1997; Ausina et al., 2005).

Se conoce que diferentes especies de *Fusarium* producen gran variedad de enzimas líticas como factores importantes de virulencia (Roncero et al., 2000), que le permiten desarrollarse en sustratos de diferente origen y naturaleza. Sin embargo, existen pocos reportes de actividad queratinolítica, que evidencien que este microorganismo pueda utilizar como sustrato para su crecimiento la queratina, factor asociado a patologías en humanos y animales, específicamente infecciones superficiales como dermatomicosis y onicomicosis.

Por lo tanto, la pregunta de investigación planteada para el desarrollo de este proyecto es: ¿Aislamientos de *Fusarium* spp. de lesiones en humanos, animales y plantas presentan actividad queratinolítica?

El presente proyecto se desarrolló en el marco del proyecto ¿*Fusarium* spp. un modelo de patogenicidad multihospedero?. Este proyecto busca caracterizar el potencial de doce aislamientos de *Fusarium* spp. de humanos, animales y plantas para generar infecciones en hospederos diferentes a los de su origen de aislamiento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Fusarium* spp.

Fusarium es un género de hongos filamentosos, que comprende especies saprófitas y parásitas, pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y se aísla fácilmente a partir de suelos de prácticamente todo el mundo (Suárez, 2002). Macroscópicamente presenta micelio de textura algodonosa, generalmente de color blanco, rosado, púrpura o amarillento (Galarza, 2002), microscópicamente presenta dos tipos de propágulos, macroconidios y microconidios (Suárez, 2002), aunque en algunas especies puede faltar o predominar uno de ellos (Mayea et al., 1983). Los macroconidios son multicelulares, septados y en forma de media luna, se producen en conidióforos simples o en esporodoquios embebidos algunas veces en una sustancia mucilaginoso. Los microconidios son generalmente unicelulares y pueden organizarse en cabezas o cadenas.

La persistencia de este género en el suelo es resultado de la formación de clamidosporas que pueden presentarse en cadenas, terminales o intercalares, sin embargo no todas las especies pueden formarlas (Mayea et al., 1983).

Algunas especies de *Fusarium* son patógenas de plantas, causando marchitamiento en una amplia gama de cultivos ornamentales (Gullino et al., 2015), hortalizas (Gordon et al., 2015), frutales (Wang et al., 2015) y cereales (Swett et al., 2015), entre otros; mientras que otras causan enfermedades en humanos y animales como afecciones de la piel, queratitis y onicomicosis, e infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (Alexandrakis et al., 1997; Ausina et al., 2005; Suárez, 2002). No obstante, este microorganismo puede colonizar organismos de reinos diferentes, lo que le da la cualidad de ser multihospedero (Baarlen et al., 2007), que puede ser atribuida a la variabilidad morfológica y fisiológica que posee este género (Monzón et al., 2007).

2.2 Patologías producidas por *Fusarium* spp. en humanos y animales

Fusarium spp. puede causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (Salah et al., 2015) con neoplasias hematológicas, quimioterapia mielosupresora (Jossi et al., 2010), cirrosis y cáncer que presentan septicemia, tras haber sido tratados con antibióticos; mientras que las infecciones superficiales ocurren tanto en hospederos inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Cocchi et al., 2011; Jossi et al., 2010). Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran principalmente la queratitis y la onicomicosis (Martínez et al., 2014).

La queratitis es una enfermedad que causa inflamación de una o más capas de los ojos y cavidades adyacentes (Safneck, 2012), ocasionada principalmente por factores como cirugía ocular, tratamiento prolongado con esteroides tópicos y uso de lentes de contacto, de la cual se ha evidenciado que el hongo más frecuentemente aislado es *Fusarium* spp. (Antequera et al., 2015). Otra de las micosis superficiales asociadas a *Fusarium* spp. es la onicomicosis (Ranawaka et al., 2012; Guilhermetti et al., 2007; Tosti et al., 2000), esta enfermedad es la infección de cualquier componente de las uñas, que puede ser causada por hongos dermatofitos, no dermatofitos y levaduras; causa dolor, incomodidad y desfiguración (Muhammad et al., 2015). Los factores predisponentes para la onicomicosis pueden ser hiperhidrosis, hábito de caminar descalzo, contacto con el suelo, humedecimiento constante de las manos, clima cálido y húmedo, inmunosupresión sistémica y diabetes (Ranawaka et al., 2012; Moreno et al., 2010).

Tanto la dermatomicosis como la onicomicosis son enfermedades que se desarrollan en tejidos epidérmicos exteriores y sus apéndices relacionados, cuyo componente principal es queratina (Voet et al., 2009), proteína que presenta una estructura de alta rigidez, compuesta por entrecruzamiento de enlaces disulfuro extensos y que puede ser degradada por microorganismos capaces de sintetizar queratinasas (EC 03.04.21 / 24 / 99.11).

2.3 Enzimas queratinolíticas

La queratina es una proteína estructural insoluble que pertenece a la superfamilia de proteínas de los filamentos intermedios y que proporciona soporte mecánico y diversas funciones de protección en la adaptación de los vertebrados en el entorno externo (Wang et al., 2016).

Esta proteína tiene un alto contenido de aminoácidos azufrados tales como cisteína (Wang et al., 2016) que le confiere su característica rigidez. El contenido de azufre en la proteína permite clasificarla en queratina blanda, que se encuentra a menudo en la epidermis y callosidades y tiene un menor contenido de azufre, y queratina dura que tiene un mayor contenido de azufre. A su vez, este tipo de queratina se puede clasificar en dos grupos, α -queratina que tiene una estructura hélice- α y se encuentra en tejidos epidérmicos de mamíferos, tales como cuernos, pelos y uñas, y β -queratina que tiene estructura de hoja plegada- β y se encuentra en tejidos de aves y reptiles tales como plumas, piel, pico y garras (Zhang et al., 2015).

Las enzimas queratinolíticas son un grupo de metalo o serín proteasas que pueden ser sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos filamentosos, son capaces de degradar la estructura insoluble de la queratina (Jaouadi et al., 2015) mediante el mecanismo de sulfitólisis, que consiste en la reducción de los puentes disulfuro por medio de una molécula de sulfito (Grumbt et al., 2013), causando así diversas patologías. Los microorganismos más reportados como productores de queratinasas no dermatofitos son *Streptomyces*, *Bacillus*, y *Chrysosporium* (Kornikowicz et al., 2011), sin embargo *Fusarium* spp. también puede sintetizar estas enzimas (Kaul et al., 1999), lo que le permite desarrollarse en sustratos queratináceos como pelo de animales y humanos, lana, plumas, uñas y piel (Blyskal, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad queratinolítica de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal.

3.1. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad queratinolítica a nivel cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal.
- Comparar la actividad queratinolítica entre los aislamientos de diferente origen.

4. METODOLOGÍA

4.1 Microorganismos de estudio

Los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. a evaluar fueron identificados a nivel de especie por caracterización morfológica y secuenciación de una región ribosomal ADNr (región ITS4-ITS5) y factor de elongación 1 α (Linares, 2011; Vega, 2010) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Aislamientos de *Fusarium* spp. en estudio.

Origen de aislamiento	Código	Especie*	Características de la lesión de aislamiento
Animal (superficial)	108	<i>F. solani</i>	Micosis superficial - Ojo de bovino
	161	<i>F. verticillioides</i>	Micosis superficial - Cola de canino
	162	<i>F. oxysporum</i>	Micosis superficial - Lomo superior de canino
Humano (superficial)	201	<i>F. sporotrichioides</i>	Onicomycosis
	203	<i>F. verticillioides</i>	Queratitis
	205	<i>F. oxysporum</i>	Onicomycosis
Vegetal	310	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de tomate
	314	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de clavel
	319	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de gulupa
Humano (sistémico)	404	<i>F. solani</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico
	406	<i>F. oxysporum</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico
	409	<i>F. oxysporum</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico

Como controles positivos se evaluaron cinco hongos dermatofitos conocidos por su actividad queratinolítica: *Mycrosporium gypseum* (Giudice et al., 2012), *Mycrosporium canis* (Brouta et al., 2001), *Trichophyton mentagrophytes* (Scott et al., 2004), *Trichophyton rubrum* (Maranhao et al., 2007), obtenidos de la colección activa del cepario de hongos de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) y *Trichophyton mentagrophytes* del laboratorio de Micosis Humanas de la PUJ.

4.2 Establecimiento del banco de trabajo

El banco de trabajo se estableció en base al método de conservación por desecación en papel filtro, a partir del banco realizado por Alvarado (2014) en la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la PUJ. Los doce aislamientos se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA) y en agar avena por triplicado y se incubaron durante 8 días a 28°C. A partir de cada uno de los cultivos se inocularon 20 papeles filtro de 1cm² en PDA y agar avena durante 8 días a 28°C. Se transfirieron 10 papeles a una caja de Petri vacía, se secaron a 37°C durante 15 días y finalmente se conservaron en sobres de pergamino estériles a temperatura de refrigeración.

4.3 Evaluación de actividad queratinolítica a nivel cualitativo

4.3.1 Degradación de plumas de pollo

En tubos tapa rosca de 16 x 150 mm con una pluma de pollo blanco, esterilizada por tres ciclos completos en autoclave, en 25mL de caldo basal (1g/L KH₂PO₄; 2g/L MgSO₄·7H₂O; 1g/L CaCl₂·2H₂O; 3g/L NH₄Cl) se inocularon 0.5mL de suspensión de conidios (10⁶ conidios/mL), se incubó a temperatura ambiente durante cuatro semanas y se revisó semanalmente la degradación de la pluma comparada frente a un control sin inocular (Moreira et al., 2007).

4.3.2 Degradación de sustrato cromogénico

En frascos tapa rosca de 8mL con 4mL de medio basal (Anexo 1) y 0.27mL de queratina azure 4mg/mL preparada en medio basal sin agar-agar, se inocularon 10µL de suspensión conidial (10⁶ conidios/mL) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante cuatro semanas, revisando semanalmente el cambio de color en el medio (Scott et al., 2004).

4.3.3 Colonización y daño de pelo de origen humano y animal

En cajas Petri pequeñas se depositaron fragmentos de pelo de origen humano (rubio oscuro y lacio) y animal (Golden retriever) de 1cm y se esterilizaron en tres ciclos de autoclave, posteriormente se adicionó 3mL de medio basal (1g/L K_2HPO_4 y 0.5g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), se inoculó con la suspensión de conidios (10^6 conidios/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante cuatro semanas. Se evaluó por microscopía, realizando montajes de fragmentos de pelo con azul de lactofenol a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación (Arenas, 2008), observando el tipo de colonización y de daño.

4.4 Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo - halos de hidrólisis en agar queratina

Se extrajo queratina a partir de plumas de pollo blanco por ebullición en DMSO (Dimetil sulfóxido) y posterior precipitación en acetona. El precipitado se lavó varias veces y finalmente se resuspendió en buffer fosfato de potasio 0.1M, pH 8.0 obteniendo una suspensión final de queratina al 1% (Wawrzkiec et al., 1991). Posteriormente el medio de cultivo se preparó con la suspensión de queratina a una concentración de 0.1%, agar agar 15g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L (Wawrzkiec et al., 1991; El-Naghy et al., 1998). Se inoculó 50 μ L de suspensión conidial (10^6 conidios/mL) con 50 μ L de agar agua (agar agar 10g/L), en un pozo de 1cm de diámetro en el centro de la placa de agar, se incubó a 28°C durante 8 días y se observó la presencia de halo de hidrólisis diariamente.

4.5 Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cuantitativo - degradación de sustrato cromogénico

En base a la metodología de Giudice et al. (2012), se inoculó 0.4mL de suspensión conidial (10^6 conidios/mL) en 20mL de medio con sales basales (6.g/L $MgSO_4$, 1mL/L vitaminas Pediavit y 0.111g/L $CaCl_2$), leche descremada 1% p/v y casco de bovino pulverizado 1% p/v como únicas fuentes de carbono y nitrógeno. El medio inoculado se incubó durante 28 días a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó 1mL del cultivo a 10000rpm durante 10 minutos, posteriormente se extrajo el sobrenadante para mezclarlo con 0.8mL de buffer (200mM TrisHCl y 100mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a pH 8) y 0.2mL de queratina azure a una concentración de 2.5mg/mL. La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 1 hora (Letourneau et al., 1998), para luego medir la absorbancia a una longitud de onda de 595nm, donde una Unidad Queratinolítica (UQ) se definió como el incremento de 0.01 en la absorbancia comparado con el control negativo, referente a un caldo no inoculado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de actividad queratinolítica a nivel cualitativo

5.1.1. Degradación de plumas de pollo

Con base en la observación periódica de las plumas, se determinó crecimiento fúngico, tanto en los aislamientos de *Fusarium* spp. como en los controles positivos empleados; sin embargo, únicamente *Trichophyton mentagrophytes* presentó deterioro de la pluma (Anexo 2). Los aislamientos de *Fusarium* spp. mostraron dos patrones de crecimiento en el medio basal con pluma blanca de pollo como único sustrato, el primero alrededor de la pluma a manera de “nata” (**Figura 1a**) y el segundo en la superficie del medio formando una capa de micelio (**Figura 1b**). Lo que demuestra que todos los aislamientos pueden utilizar componentes de las plumas para su desarrollo, sin embargo debido a que en ninguno de los aislamientos se evidenció degradación de las barbas plumáceas, no se puede caracterizar a *Fusarium* spp. como queratinolítico, para descomponer el sustrato como lo hizo *T. mentagrophytes*, sino como queratinofílico, porque crece sobre este tipo de sustrato (Mitola et al., 2001).

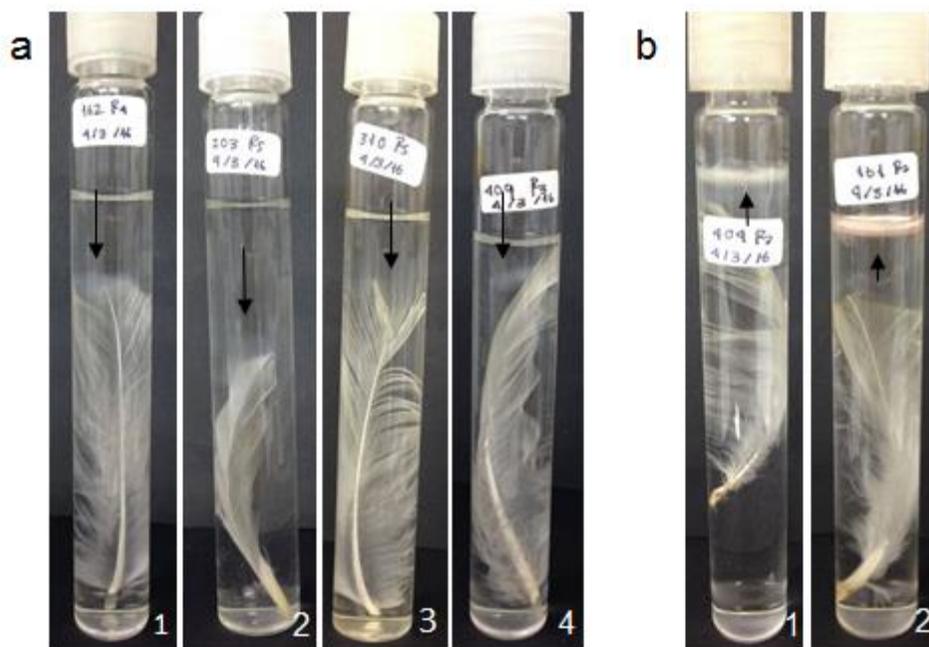


Figura 1. Evaluación de la degradación de plumas de pollo **a.** Aislamientos representativos de cada origen de aislamiento en los que se observa el crecimiento alrededor de la pluma, 1. aislamiento 162, 2. aislamiento 203, 3. aislamiento 310, 4. aislamiento 409. **b.** Aislamientos en los que se observa crecimiento en la superficie del medio, 1. aislamiento 409, 2. aislamiento 162.

Este método ha sido empleado para evaluar la degradación de queratina por actinobacterias como *Streptomyces* sp. (Bockle et al., 1995), bacterias como *Bacillus*

subtilis (Grohs et al., 2016) y *B. licheniformis* (Okoroma et al., 2012) y en hongos filamentosos como *Myrothecium verucaria* (Moreira et al., 2007), donde el daño que se observa es la disminución de las barbas plumáceas, quedando únicamente el raquis que es la estructura rígida del centro de la pluma (Cuevas, 2010), estructura en la que posiblemente se presenta mayor cantidad de cisteína, lo cual dificulta su degradación (Wang et al., 2016).

5.1.2. Degradación de sustrato cromogénico (queratina azure)

En este ensayo donde el objetivo era observar la difusión de color azul (Anexo 3) como consecuencia de la degradación del sustrato cromogénico empleado, queratina azure, tanto en los aislamientos de *Fusarium* spp. como en los controles positivos, no se observó color. Aunque la prueba se llevó a cabo dos veces en el tiempo, no se descarta que los microorganismos evaluados tengan la capacidad de utilizar la queratina como único sustrato para su desarrollo, posiblemente porque la prueba pudo verse influenciada por el tamaño y la uniformidad de las partículas del sustrato y su completa adsorción al agar, aspectos que no se lograron mantener durante los dos ensayos. Por lo tanto no se cumplió este objetivo.

5.1.3. Colonización y daño de pelo de origen humano y animal

En la evaluación cualitativa de colonización pelo de origen humano y animal se observaron diferentes características asociadas al daño que los aislamientos de *Fusarium* spp. generaron, así que para cuantificar dicha alteración se diseñó una escala de grados de daño causados a la estructura del pelo; donde se tomaron dos parámetros de evaluación, el primero relacionado con el tipo de colonización, clasificada como endótrix (interna) o ectótrix (externa), como se observa en la **Figura 2a**, y el segundo al tipo de daño causado al pelo, donde se observó escamación, quebrado y presencia de bulbos (**Figura 2b**). A cada tipo de colonización y a cada lesión, le fue asignado un valor que representa la intensidad de daño (**Tablas 2 y 3**), los cuales posteriormente fueron sumados para obtener un valor de grado de daño, basado en la escala de lesiones histopatológicas propuesta por Gibson-Corley et al. (2013) (**Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4**).

Tabla 2. Tipo de colonización de pelo.

Característica	Abreviatura	Valor
Ectótrix	EC	1
Endótrix	EN	2

Tabla 3. Tipo de daño causado al pelo.

Característica	Abreviatura	Valor
Escamación	ES	1
Quebrado	QE	2
Bulbo	BU	3

La suma de los valores obtenidos tanto en colonización como en tipo de daño, tras la observación microscópica, se asociaron con un valor correspondiente al grado de daño.

Tabla 4. Escala del grado de daño causado al pelo

Valor	Grado de daño
1, 2 y 3	1
4 y 5	2
6, 7 y 8	3

La colonización ectótrix, representada por un valor de 1 en la escala, consiste en el crecimiento micelial alrededor del exterior del cabello, a diferencia de la endótrix donde el micelio invade el interior del pelo, por lo tanto esta colonización está representada por un valor de 2 (Varade et al., 2013). La escamación es el daño más superficial asociado a colonización ectótrix, seguido del quebrado, que representa la presencia de quiebre con la entrada de micelio, y finalmente el bulbo, daño originado por el crecimiento interno (Gómez, 2011), por lo que los valores asignados para este parámetro fueron de 1 a 3, respectivamente.

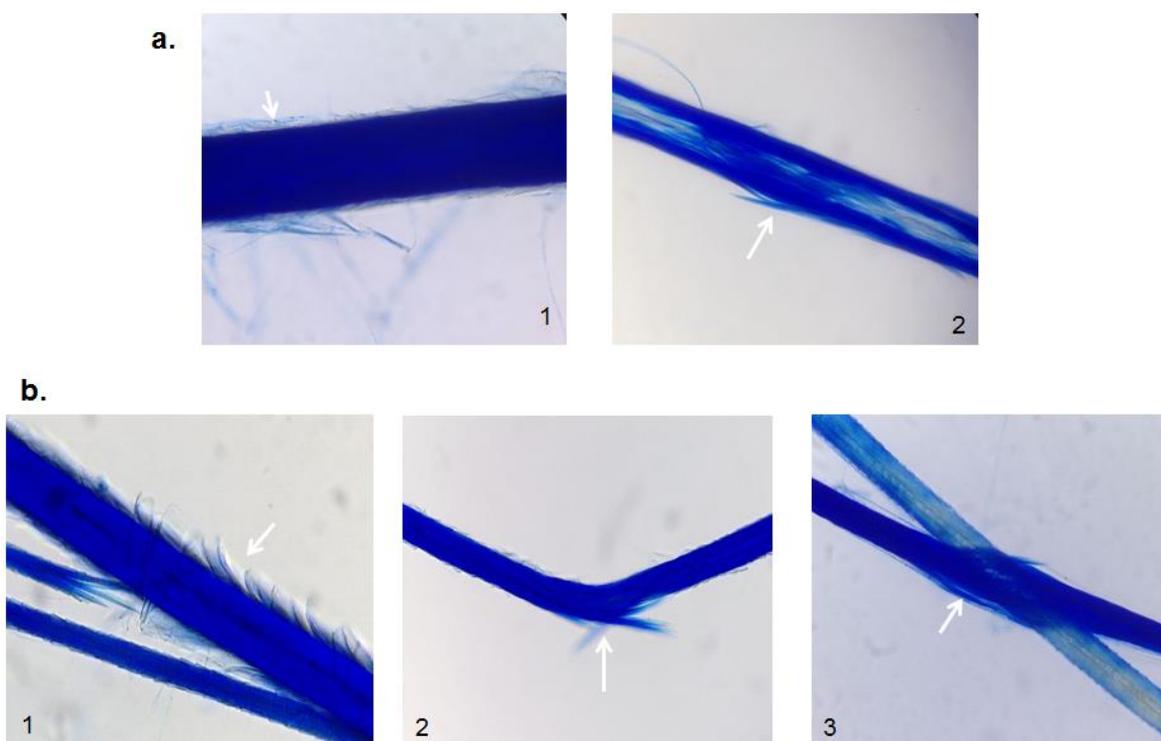


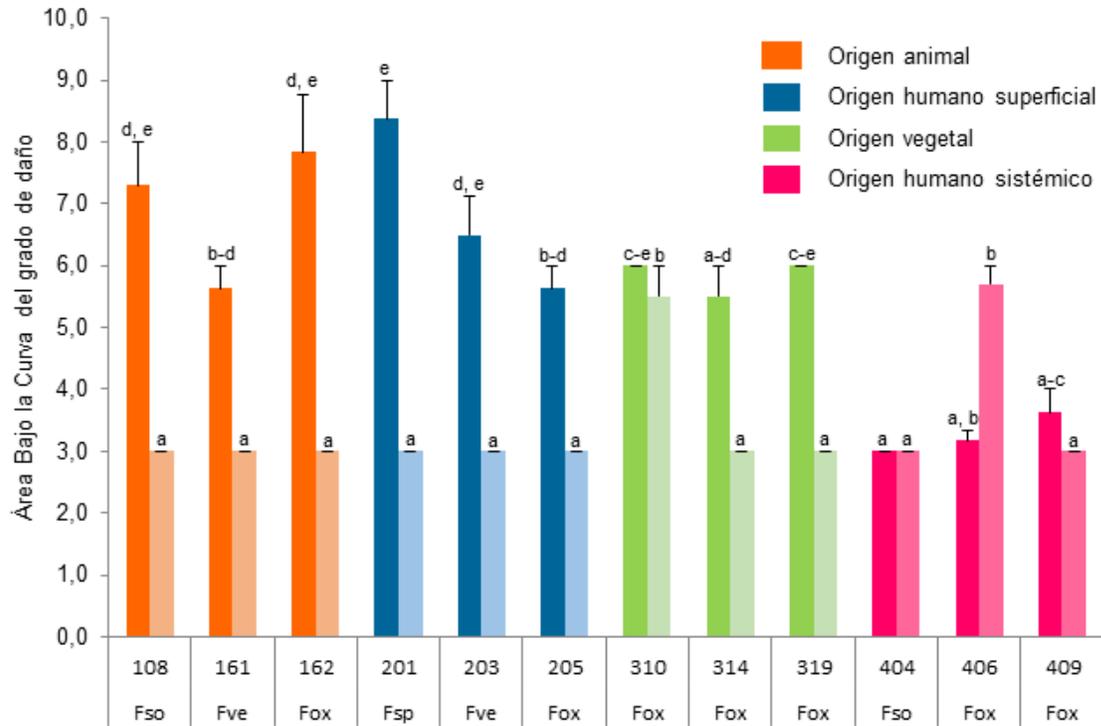
Figura 2. Tipo de colonización y daño en pelo. a. Tipos de colonización: 1. Ectótrix y 2. Endótrix. b. Tipos de daño causado al pelo: 1. Escamación, 2. Quebrado y 3. Bulbo.

Posteriormente con el fin de comparar el grado de daño causado se realizó la cuantificación de cada semana y se calculó el área bajo la curva del grado de daño causado al pelo tanto de origen animal como humano, resultados que se presentan en la **Figura 2**.

En general todos los aislamientos de *Fusarium* spp. tuvieron la capacidad de desarrollarse tanto en el pelo animal como humano, causando daño a manera de escamación, quebrado y bulbos, al igual que los controles positivos empleados, reportados como dermatofitos (Brouta et al., 2001; Giudice et al., 2012; Maranhao et al., 2007; Scott et al., 2004), por lo tanto se puede considerar que los aislamientos evaluados son capaces de degradar sustratos queratináceos como el pelo.

El pelo de origen animal era más delgado y claro, por lo tanto tenía menor cantidad de puentes disulfuro, los cuales otorgan rigidez (Thibaut et al., 2009), y menor cantidad de melanina, pigmento que inhibe la actividad queratinolítica por estar unido a la queratina (Okoroma et al., 2012). Estas características facilitan su degradación, lo cual es coherente con los resultados del ensayo, puesto que este tipo de pelo presentó los valores más altos de daño. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (p -valor = 1.15×10^{-8}) en el grado de daño causado al pelo animal entre los diferentes aislamientos analizados (**Figura 3**). Los aislamientos de origen humano superficial fueron los que causaron un mayor grado de daño, seguido de los de origen animal superficial, lo que probablemente está asociado al origen del aislamiento, dado que estos provienen de lesiones como onicomiosis (Ranawaka et al., 2012; Guilhermetti et al., 2007; Tosti et al., 2000) y micosis superficiales (Antequera et al., 2015), asociadas a tejidos ricos en queratina; mientras que los aislamientos de origen vegetal y humano sistémico presentaron menor grado de daño, esto puede deberse posiblemente a que el tipo de lesión de la que provienen no está asociada a tejidos con queratina, por lo tanto presentan menor adaptación a utilizar la queratina como sustrato.

La evaluación en pelo humano muestra resultados contrastantes, el mayor grado de daño se observó para los aislamientos 310 (origen vegetal) y 406 (origen humano sistémico), ambos de la especie *F. oxysporum*, agrupados en el grupo a, mientras que el resto de los aislamientos (83.3%) presentaron menor actividad con un grado de daño similar entre ellos (**Figura 3**). La resistencia del pelo de origen humano a la descomposición por hongos fue reportada por Deshmukh et al. (1982), quienes evaluaron el detrimento de pelo humano por *T. rubrum* y *T. terrestre*, encontrando que sólo fue de un 33.4 a un 37.8% a las 6 semanas de incubación. En el estudio de Wawrzkievicz et al. (1997), se determinó que esta resistencia a la acción enzimática ejercida por hongos puede estar relacionada con que el cabello humano contiene aproximadamente 13-14% p/p de cisteína, lo que confiere mayor resistencia a la acción de las queratinasas porque se generan más puentes disulfuro en la estructura protéica.



Aislamiento *Fusarium* spp.

Figura 3. Área bajo la curva del grado de daño causado al pelo, de origen animal (color oscuro) y de origen humano (color claro), por los 12 aislamientos evaluados de *Fusarium* spp. luego de 28 días de incubación. Fso (*F. solani*), Fve (*F. verticillioides*), Fsp (*F. sporotrichioides*) y Fox (*F. oxysporum*). Las barras de error hacen referencia al error típico. Sobre las barras representan las agrupaciones generadas mediante comparaciones múltiples de Tukey.

5.2. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo - halos de hidrólisis en agar queratina

En la mayoría de los hongos evaluados no se evidenció halo de hidrólisis, excepto en los aislamientos 108, 404, y 409, correspondientes a *F. solani*, *F. solani* y *F. oxysporum*, respectivamente (**Figura 3**), y en los controles positivos. En el caso del aislamiento 108 la hidrólisis generada puede deberse a que proviene de una micosis superficial lo que le confiere la capacidad de degradar la queratina y generar el halo en el medio, mientras que en el caso de los aislamientos 404 y 409, si bien no se esperaba este comportamiento por ser de origen humano sistémico, la degradación de queratina que presentó puede ser consecuencia de la capacidad de este género de crecer en diferentes condiciones por la variabilidad morfológica y fisiológica que posee (Monzón et al., 2007). Aunque no todos los aislamientos de *Fusarium* spp. presentaron halo de hidrólisis, sí tuvieron la capacidad de crecer en el medio, por esta razón el parámetro que se tuvo en cuenta en el momento de realizar el análisis estadístico fue el crecimiento radial.

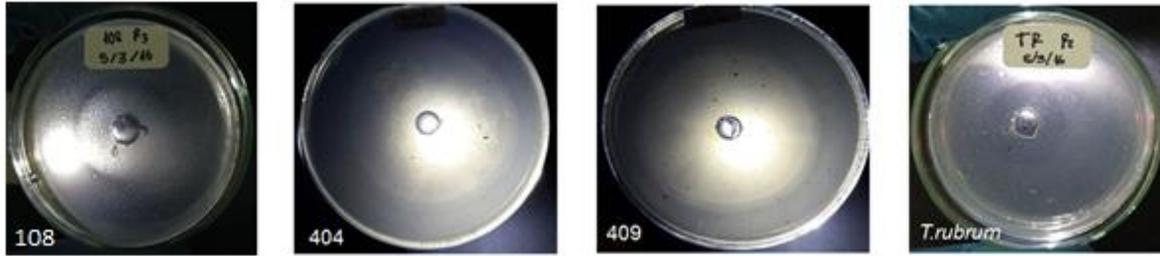


Figura 3. Halos de hidrólisis en agar queratina.

Como se observa en la **Figura 4**, el área bajo la curva del crecimiento fúngico en agar queratina presentó diferencias significativas (p -valor = 6.0×10^{-9}). Todos los aislamientos de *Fusarium* spp. pudieron desarrollarse en este medio, independientemente del origen de hospedero, lo cual les otorga la característica de ser queratinofílicos (Kaul et al., 2000). Porque tienen la capacidad de desarrollarse en un medio basal con queratina como única fuente de carbono y nitrógeno, resultado que concuerda con el estudio de Blyskal (2009), quien hizo una revisión de la capacidad de colonizar e hidrolizar queratina de algunos hongos filamentosos y encontró que *Fusarium* es uno de los géneros predominantes.

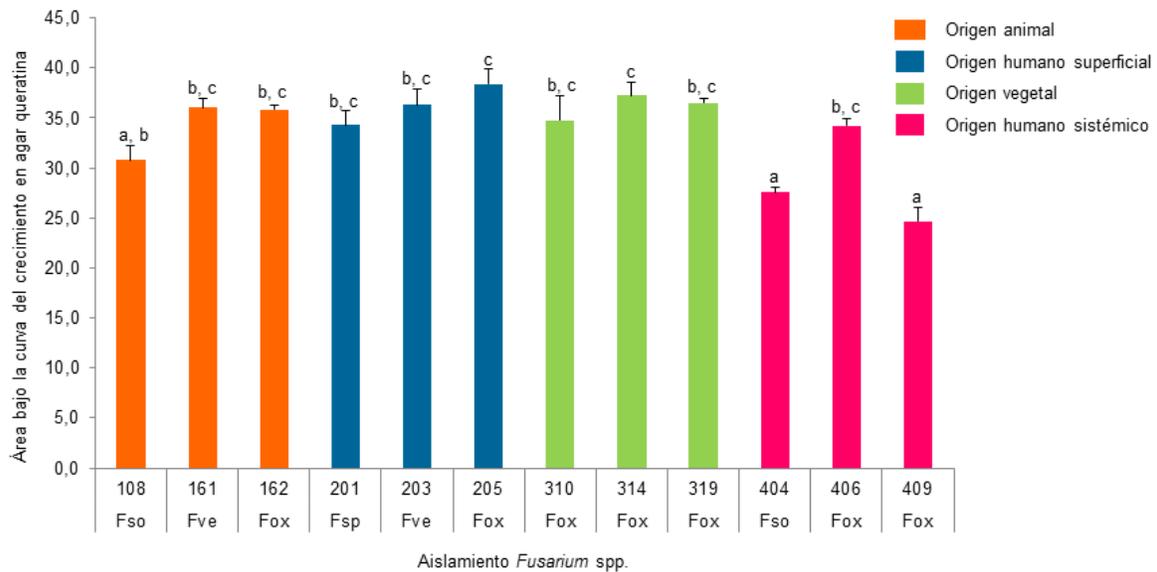


Figura 4. Evaluación del crecimiento en agar queratina de los 12 aislamientos evaluados de *Fusarium* spp. durante 7 días de incubación. Fso (*F. solani*), Fve (*F. verticillioides*), Fsp (*F. sporotrichioides*) y Fox (*F. oxyporum*). Las barras de error hacen referencia al error típico. Las letras sobre las barras representan las agrupaciones generadas mediante comparaciones múltiples de Tukey

5.3. Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cuantitativo - degradación de sustrato cromogénico

A los 14 días de cultivo todos los aislamientos evaluados presentaron actividad queratinolítica según los resultados presentados en la **Figura 5**, lo que concuerda con Kaul et al. (1999) quienes encontraron que *Fusarium* sp. presentó uno de los valores más altos de UQ (Unidades queratinolíticas) frente a los demás aislamientos evaluados en su estudio. Sin embargo, en este caso existen diferencias significativas ($p\text{-valor} = 1.34 \times 10^{-13}$) dependiendo del origen del aislamiento según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 6). Los aislamientos de origen humano superficial presentaron mayor actividad queratinolítica (grupo f), seguidos de los de humano sistémico, vegetal y animal superficial, a manera general. Los valores de UQ obtenidos son coherentes con los resultados obtenidos por Giudice et al. (2012), quienes emplearon el mismo método para evaluar la actividad queratinolítica del dermatofito *Microsporum gypseum*.

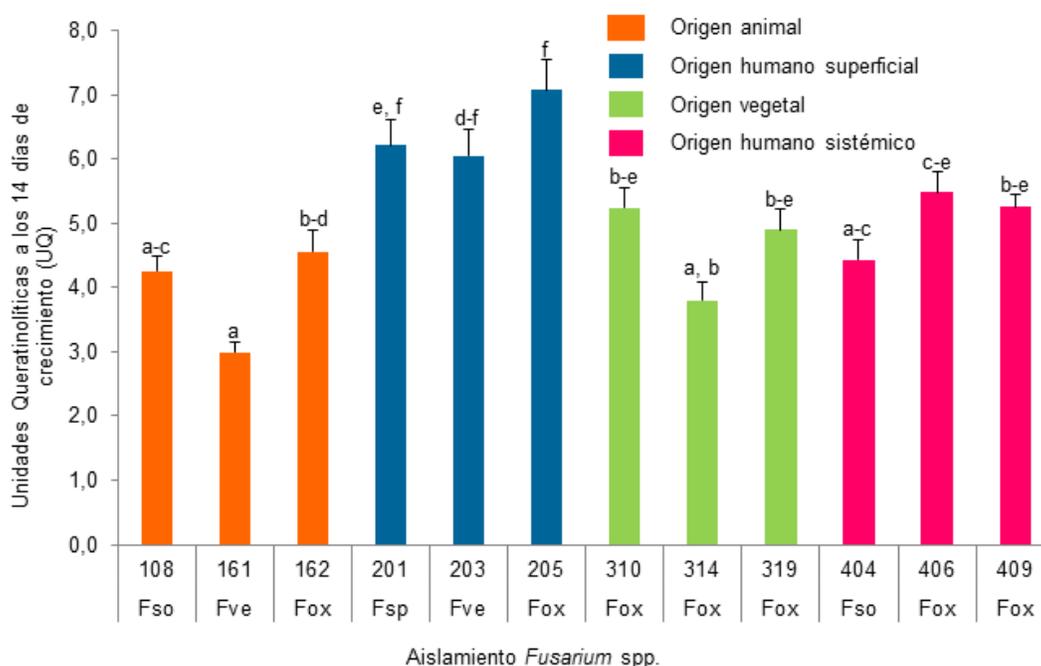


Figura 5. Actividad queratinolítica de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. determinada por degradación de sustrato queratina azure luego de 14 días de incubación en medio basal con casco de bovino como sustrato queratináceo y leche descremada. Fso (*F. solani*), Fve (*F. verticillioides*), Fsp (*F. sporotrichioides*) y Fox (*F. oxysporum*). Las barras de error hacen referencia al error típico. Las letras sobre las barras representan las agrupaciones generadas mediante comparaciones múltiples de Tukey.

El aislamiento 205, correspondiente a *F. oxysporum*, tuvo la mayor actividad queratinolítica entre los 12 evaluados, lo que puede deberse a que proviene de una lesión de onicomicosis, donde para poder desarrollarse en el tejido afectado, compuesto principalmente por

queratina, debió sintetizar queratinasas, por lo tanto este microorganismo ya se encuentra adaptado a medios donde este sustrato sea el único disponible para el crecimiento. Lo anteriormente mencionado también aplica para el aislamiento 201 que proviene del mismo origen (onicomicosis) (Carvalho et al., 2014; Tosti et al., 2000; Naiker et al., 2004).

Por otro lado, al evaluar la actividad queratinolítica a los 28 días (**Figura 6**) también hubo diferencias estadísticamente significativas según el análisis de varianza (p -valor = 4.13×10^{-17}), pero a diferencia de la evaluación a los 14 días, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 7) agrupó los aislamientos independientemente de su origen.

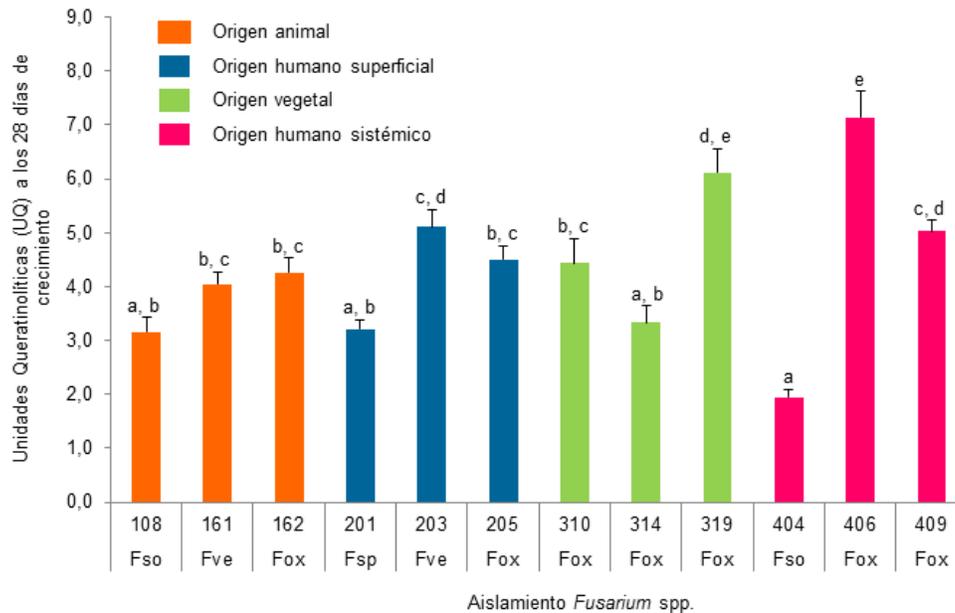


Figura 6. Actividad queratinolítica de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. determinada por degradación de sustrato queratina azure luego de 14 días de incubación en medio basal con casco de bovino como sustrato queratináceo y leche descremada. Fso (*F. solani*), Fve (*F. verticillioides*), Fsp (*F. sporotrichioides*) y Fox (*F. oxyporum*). Las barras de error hacen referencia al error típico. Las letras sobre las barras representan las agrupaciones generadas mediante comparaciones múltiples de Tukey.

En este caso el aislamiento 406, de origen humano sistémico, y el 319, de origen vegetal, presentaron los valores más altos de UQ. Esto puede deberse a que aunque estos microorganismos no se encuentran adaptados a un medio rico en queratina, el género *Fusarium*, como se mencionó anteriormente, presenta diversidad morfológica y fisiológica (Monzón et al., 2007), lo que le permite desarrollarse en diferentes sustratos, diferentes al de su origen de aislamiento.

Los valores de la actividad queratinolítica en el día 28 no mostraron un incremento relacionado con los valores de actividad en el día 14, pues en algunos casos la actividad fue menor, contrario a lo que se esperaba. Esto pudo verse influenciado por la técnica

empleada para determinar la actividad enzimática, debido a que el sustrato cromogénico utilizado no es soluble en agua, siendo este uno de los requisitos para poder realizar la hidrólisis enzimática (Fuentes et al., 1998). Adicionalmente, el tamaño de partícula empleado posiblemente fue mayor al adecuado, lo cual no sólo no permite evidenciar la actividad enzimática en caso de haberla, sino que genera variabilidad en los resultados en función de los días, puesto que se obtuvo mayor actividad enzimática en un aislamiento diferente en cada evaluación. Por otro lado, esta diferencia no esperada en los resultados también puede deberse a que la cinética de reacción de cada aislamiento es diferente, esperando un aumento de actividad enzimática cuando posiblemente el pico de actividad se presentó antes del día 14 de cultivo.

Otro aspecto que pudo influir en la actividad queratinolítica fue la presencia de leche descremada en el medio de cultivo, adicionada con el fin de inducir actividad proteolítica, ya que se ha reportado tanto para *Fusarium* como para dermatofitos que la expresión de enzimas para degradar sustratos complejos no se da hasta que los sustratos de fácil asimilación no hayan sido totalmente degradados (Roncero et al., 2000; Vermout et al., 2008; Vignardet et al., 2001).

Los resultados obtenidos en los ensayos a nivel cualitativo y semicuantitativo permitieron determinar que los doce aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal son queratinofílicos, ya que tuvieron la capacidad de desarrollarse sobre plumas de pollo, pelo y agar con queratina como única fuente de carbono y nitrógeno. Por otro lado, el ensayo cuantitativo permitió determinar que estos aislamientos presentan actividad queratinolítica, la cual está asociada al origen de aislamiento, tanto a los 14 días de esta prueba como en las pruebas de colonización de pelo animal, ya que en ambos ensayos los aislamientos de origen humano superficial arrojaron los resultados más altos, lo que demuestra su adaptación a sustratos queratináceos. Finalmente, en todas las pruebas realizadas los aislamientos de origen vegetal presentaron valores altos, lo que sugiere su capacidad para establecer procesos infectivos superficiales en hospederos humanos y animales, haciendo así saltos entre reinos.

6. CONCLUSIONES

Los ensayos a nivel cualitativo y semicuantitativo determinaron que los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano, animal y vegetal son queratinofílicos, mientras que el ensayo cuantitativo permitió determinar que presentan actividad queratinolítica.

La actividad queratinolítica de *Fusarium* spp. mostró asociación al origen de aislamiento en las pruebas de colonización de pelo animal y en la de degradación de queratina azure a nivel cuantitativo a los 14 días, ya que en ambos ensayos los aislamientos de origen humano superficial arrojaron los resultados más altos, lo que demuestra su adaptación a sustratos queratináceos.

En las pruebas de actividad enzimática a nivel cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo los aislamientos de origen vegetal presentaron valores altos, lo que sugiere su capacidad para establecer procesos infectivos superficiales en hospederos humanos y animales, haciendo así saltos entre reinos.

7. RECOMENDACIONES

En la evaluación de actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo se recomienda emplear una concentración de queratina de 0.2% o 0.3% p/v, debido a que con la utilizada (0.15%) los halos de hidrólisis no se observaban con facilidad.

Pulverizar la queratina azure mediante equipos especializados para este fin, para poder obtener un tamaño de partícula mínimo y uniforme, y así garantizar los resultados de la degradación de este sustrato tanto a nivel cuantitativo como a nivel cualitativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P (1997) Diagnosis of *Fusarium* keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction. *British Journal of Ophthalmology* 82: 306-311

Alvarado A (2014) Caracterización molecular por AFLP y evaluación de factores de patogenicidad de *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas como herramientas para el planteamiento de un modelo multihospedero. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Antequera P, García V, Martín C, Ortíz V (2015) Multidrug resistant *Fusarium* keratitis. *Sociedad Española de Oftalmología* 90: 382-384

Arenas R (2008) Micología Médica Ilustrada tercera edición. Editorial McGraw Hill Interamericana, México D.F., México, pp 48 –79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93

Ausina V, Moreno S (2005) Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 653-654

Baarlen PV, Velkum AV, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BP (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 239-277

Blyskal B (2009) Fungi utilizing keratinous substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 631-653

Bockle B, Galunsky B, Muller R (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and environmental microbiology* 61: 3705-3710

Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, et al. (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Medical Mycology Case Reports* 39: 269–275

Carvalho VO, Vicente VA, Werner B, Gomes RR, Fornari G (2014) Onychomycosis by *Fusarium oxysporum* probably acquired in utero. *Medical Mycology Case Reports* 6: 58-61

Cocchi S, Codeluppi M, Venturelli C, Bedini A, Grottola A, et al. (2011) *Fusarium verticillioides* fungemia in a liver transplantation patient: successful treatment with voriconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71: 438-441

Cuevas R (2010) Los canarios lipocrómicos y melánicos. Editorial Hispano Europea S.A., Barcelona, España, pp 27-29

Deshmukh SK, Agrawal SC (1982) *In vitro* degradation of human hair by some keratinophilic fungi. *Mykosen* 25: 454-458

El-Naghy M, El-Ktatny M, Fadi-Allah E, Nazeer W (1998) Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. *Mycopathology* 143: 77-84

Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM (1998) Bioquímica Química y Patología Molecular Volumen I. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España, pp 350

Galarza UP (2002) Estudio de la afinidad de especie de Caricaceae como patrones de babaco (*Carica heilbornii* nothovar *pentagona*) y su reacción a *Fusarium oxysporum*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK (2013) Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology* 00: 1-9

Giudice MC, Reis-Menezes AA, Gomes GM, Mota AJ, Gambale W (2012) Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012: 895-902

Gómez FA (2011) Evaluación de la actividad queratinolítica en pelo de *Fusarium* spp. asociados a procesos patogénicos en humanos, animales y plantas. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Gordon TR, Koike ST (2015) Management of *Fusarium* wilt of lettuce. *Crop protection* 73: 45-49

Grohs A, Folmer AP, Brandelli A (2016) Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* In Press, Accepted Manuscript

Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, et al. (2013) Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine deoxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology* 133: 1550-1555

Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Estivalet TI (2007) *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *International Journal of Dermatology* 46: 822-826

Gullino ML, Daughtrey ML, Garibaldi A, Elmer WH (2015) *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. *Crop Protection* 73: 50-59

Jaouadi NZ, Rekik H, Elhoul MB, Rahem FZ, Hila CG (2015) A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *International Journal of Biological Macromolecules* 79: 952-964

Jossi M, Ambrosioni J, Macedo-Vinas M, Garbino J (2010) Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases* 14: e354-e356

Kaul S, Sumbali G (1999) Production of extracellular keratinases by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*): A comparison. *Mycopathologia* 146: 19-24

Kaul S, Sumbali G (2000) Keratinophilic fungi from feathers of Indian poultry birds. *Mycologist* 14: 148-150

Korniłowicz T, Bohacz J (2011) Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* 31: 1689-1701

Letourneau F, Soussotte V, Bressollier P, Branland P, Verneuil B (1998) Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K₁₋₀₂: a new isolated strain. 26: 77-80

Linares M (2011) *Fusarium* spp.: un modelo para el análisis de patógenos multihospedero. Trabajo de Grado de Maestría. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, pp 193

Maranhao FCA, Paiao NM, Martinez R (2007) Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microbial Pathogenesis* 43: 166-172

Martínez L, Haydee C, Sánchez C, Bonifaz A (2014) Infecciones por *Fusarium*. *Dermatología Revista Mexicana* 58: 432-442

Mayea S, Padrón J (1983) Bacterias y hongos fitopatógenos. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, pp 182

Mitola G, Escalona F, Ledesma A (2001) Queratinolisis causada por hongos no dermatofitos aislados de una tenería y un matadero en Maracaibo-Venezuela: Revisión de la expresión morfológica. *Kasme* 29: 1-21

Monzón A, Rodríguez T (2007) Infecciones causadas por el género *Fusarium*. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>. Otenido Enero 10 2016

Moreira FG, de Souza CGM, Costa MAF, Reis S, Peralta RM (2007) Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*. *Mycopathologia* 163: 153-160

Moreno G, Arenas R (2010) Other fungi causing onychomycosis. *Clinics in Dermatology* 28: 160-163

Muhammad S, al-Shatouri MA, Nasr YS, Atwa MA (2015) Ultrasonographic characterization of the nails in patients with psoriasis and onychomycosis. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine* 46: 733-739

Naiker S, Odhav B (2004) Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses* 47: 50-56

Okoroma EA, Garelick H, Abiola OO, Purchase D (2012) Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. *International Biodeterioration & Biodegradation* 74: 54-60

Ranawaka RR, Silva N, Ragunathan RW (2012) Non-dermatophyte mold onychomycosis in Sri Lanka. *Dermatology Online Journal* 18: 710-712

Roncero MI, Di Pietro A, Ruíz MC, Huertas MD, García FI, et al. (2000) Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: s47-s53

Safneck JR (2012) Endophthalmitis: a review of recent trends. *Saudi Journal of Ophthalmology* 26: 181-189

Salah H, Al-Hatmi AMS, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, et al. (2015) Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *Journal of Infection* 71: 658-666

Scott JA, Untereiner WA (2004) Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology* 42: 239-246

Suárez F (2002) Persistencia y capacidad infectiva del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* en residuos vegetales de melón. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Almería, España

Swett CL, Gordon TR (2015) Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology* 13: 120-129

Thibaut S, Cavusoglu N, de Becker E, Zerbib F, Bednarczyk A, et al. (2009) Transglutaminase-3 Enzyme: a putative actor in human hair shaft scaffolding?. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 449-459

Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S (2000) Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 42: 217-224

Varade RS, Burkemper NM (2013) Cutaneous fungal infections in the elderly. *Clinics in Geriatric Medicine* 29: 461-478

Vega DR (2010) Identificación y caracterización enzimática y molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. de lesiones en animales, humanos y plantas. Trabajo de grado de Maestría. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, pp 149

Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, et al. (2008) Pathogenesis of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166: 267-275

Vignadert C, Guillaume YC, Michel L, Friedrich J, Millet J (2001) Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of keratinase using an experimental design. *International Journal of Pharmaceutics* 224: 115-122

Voet D, Voet JG, Pratt C (2009) Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 138

Wang B, Li R, Ruan Y, Ou Y, Zhao Y, et al. (2015) Pineapple–banana rotation reduced the amount of *Fusarium oxysporum* more than maize–banana rotation mainly through modulating fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 86: 77-86

Wang B, Yang W, McKittrick J, Meyers MA (2016) Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science* 76: 229-318

Wawrzkievicz K, Wolski T, Lobarzewski J (1991) Screening the keratinolytic activity of dermatophytes *in vitro*. *Mycopathology* 114: 1-8

Wawrzkievicz K, Zitikowska G, Wawrzkievicz J (1997) *In Vitro* Biodegradation of Hair from Different Animal Species by *Microsporum canis*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39: 15-25

Zhang Q, Shan G, Cao P, He J, Lin Z, et al. (2015) Mechanical and biological properties of oxidized horn keratin. *Materials Science and Engineering C47*: 123-134

9. ANEXOS

Anexo 1

Preparación de medio de cultivo para evaluación cualitativa de actividad queratinolítica

Solución A	
Componente	Concentración (g/L)
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	54.4
FeCl ₃ 6H ₂ O	12.6

Solución B	
Componente	Concentración (mg/L)
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1000
MnCl 6H ₂ O	1000
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	100
CaSO ₄ 5H ₂ O	250

Solución stock de sales mayores	
Componente	Concentración (g/L)
KCl	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.01

Solución stock buffer fosfato de potasio(pH 8.0)		
Componente	Volumen (mL)	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	6.0	1
K ₂ HPO ₄	94.0	1

Solución stock de micronutrientes	
Componente	Volumen (mL)
Solución A	5
Solución B	1

Medio de cultivo (pH 8.0)		
Componente	Volumen (mL)	Concentración (g/L)
Agar- agar	-	15
Solución stock de sales mayores	100	-
Solución stock micronutrientes	100	-
Solución stock buffer fosfato	100	-

Anexo 2

Degradación de plumas de pollo

Controles



Anexo 3

Degradación de sustrato cromogénico

Difusión de color esperada:



Imagen tomada de Scott et al. (2004)

Anexo 4

Colonización de pelo de origen humano y animal

1. Análisis de varianza del área bajo la curva del grado de daño causado al pelo animal

ANOVA

abcA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	124,668	11	11,333	11,069	1.15 x 10 ⁻⁸
Intra-grupos	37,883	37	1,024		
Total	162,551	48			

abcA							
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD de Tukeya,b	404	4	3,0000				
	406	3	3,1667	3,1667			
	409	4	3,6250	3,6250	3,6250		
	314	5	5,5000	5,5000	5,5000	5,5000	
	161	4		5,6250	5,6250	5,6250	
	205	4		5,6250	5,6250	5,6250	
	310	5			6,0000	6,0000	6,0000
	319	3			6,0000	6,0000	6,0000
	203	5				6,5000	6,5000
	108	5				7,3000	7,3000
	162	3				7,8333	7,8333
	201	4					8,3750
	Sig.			,052	,060	,079	,090

abcA con controles							
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD de Tukeya,b	404	4	3,000				
	406	3	3,167				

409	4	3,625	3,625		
314	5	5,500	5,500	5,500	
161	4	5,625	5,625	5,625	
205	4	5,625	5,625	5,625	
310	5	6,000	6,000	6,000	6,000
319	3	6,000	6,000	6,000	6,000
203	5		6,500	6,500	6,500
MG ^a	7			7,143	7,143
108	5			7,300	7,300
162	3			7,833	7,833
201	4			8,375	8,375
TMMH ^b	4			8,375	8,375
TM ^c	4				9,000
MC ^d	5				11,100
Sig.		,061	,088	,088	,061

a. MG: *M. gypseum*

b. TMMH: *T. mentagrophytes* del laboratorio de micosis humanas

c. TM: *T. mentagrophytes*

d. MC: *M. canis*

2. Análisis de varianza del área bajo la curva del grado de daño causado al pelo humano

ANOVA

abCH	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	47,182	11	4,289	55,890	8.21 x 10 ⁻²²
Intra-grupos	3,300	43	,077		
Total	50,482	54			

abCH			
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1 2
HSD de Tukeya,b	108	5	3,0000
	161	5	3,0000

162	5	3,0000	
201	4	3,0000	
203	3	3,0000	
205	5	3,0000	
314	5	3,0000	
319	5	3,0000	
404	5	3,0000	
409	5	3,0000	
310	3		5,5000
406	5		5,7000
Sig.		1,000	,994

abch con controles						
HSD de Tukeya,b	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
	TMMH ^a		5	2,8000		
108		5	3,0000	3,0000		
161		5	3,0000	3,0000		
162		5	3,0000	3,0000		
201		4	3,0000	3,0000		
203		3	3,0000	3,0000		
205		5	3,0000	3,0000		
314		5	3,0000	3,0000		
319		5	3,0000	3,0000		
404		5	3,0000	3,0000		
409		5	3,0000	3,0000		
TM ^b		5	3,0000	3,0000		
MC ^c		5	3,0000	3,0000		
MG ^d		8		4,1875	4,1875	
310		3			5,5000	5,5000
406		5				5,7000
Sig.			1,000	,133	,058	1,000

a. TMMH: *T. mentagrophytes* del laboratorio de micosis humanas

b. TM: *T. mentagrophytes*

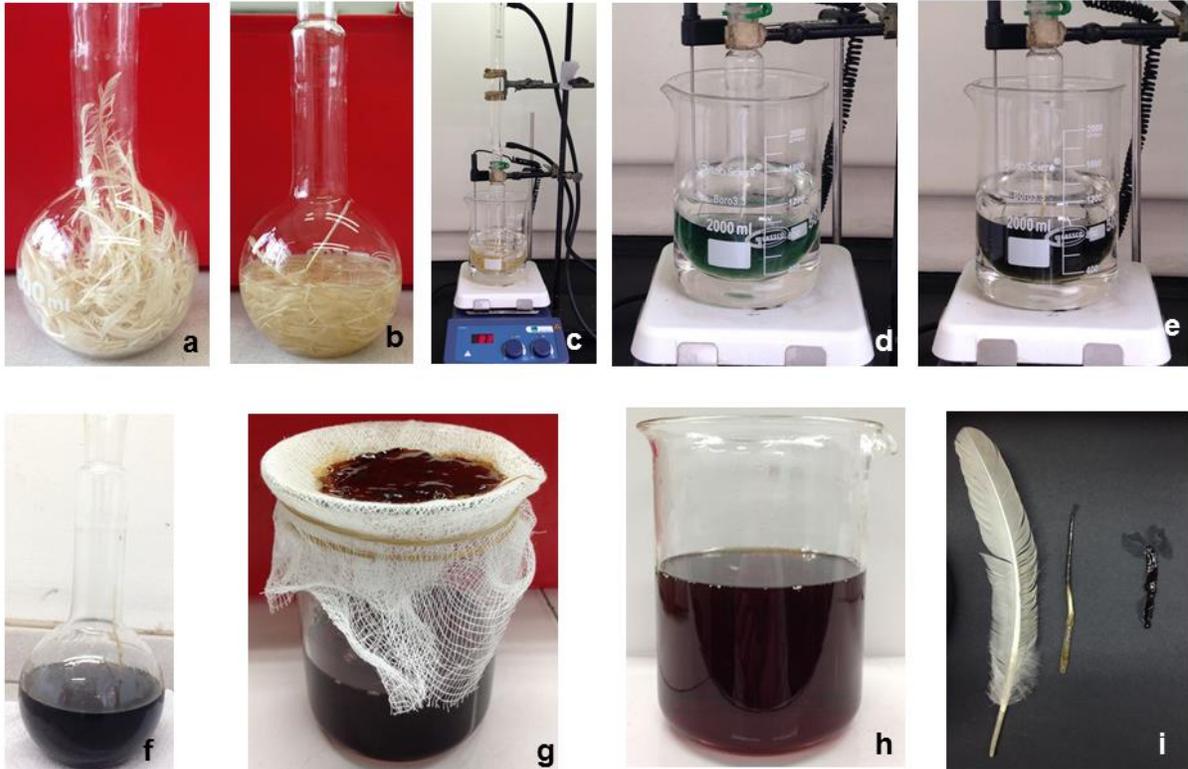
c. MC: *M. canis*

d. MG: *M. gypseum*

Anexo 5

Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel semicuantitativo - halos de hidrólisis en agar queratina

1. Extracción de queratina



- a. 5 g de plumas blancas
- b. Sustrato de queratina y 250 mL de DMSO
- c. Montaje de balón en aceite mineral y condensador de reflujo
- d. Cambio de color a verde de la solución de queratina a 100°C pasados 40 minutos
- e. Cambio de color a negro de la solución de queratina a 100°C pasados 50 minutos con respecto al verde
- f. Solución de queratina a temperatura ambiente
- g. Filtrado de los residuos de plumas
- h. Solución de queratina sin residuos de plumas

i. Comparación de la pluma antes y después de la extracción de queratina

2. Análisis de varianza del área bajo la curva del crecimiento en agar queratina

ANOVA

abc					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	918,206	11	83,473	9,877	6.0 x 10 ⁻⁹
Intra-grupos	397,221	47	8,452		
Total	1315,427	58			

	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD de Tukeya,b	409	5	24,6752			
	404	5	27,5702			
	108	5	30,7926	30,7926		
	406	5		34,1978	34,1978	
	201	5		34,2576	34,2576	
	310	5		34,7300	34,7300	
	162	5		35,8540	35,8540	
	161	5		36,0228	36,0228	
	203	5		36,2776	36,2776	
	319	5		36,5176	36,5176	
	314	5			37,2576	
	205	4			38,3625	
	Sig.			,072	,118	,530

Análisis estadístico con controles positivos

	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
MG ^a		3	12,1920				

HSD de Tukeya,b	TM ^b	4	12,7503			
	409	5		24,6752		
	404	5		27,5702		
	108	5		30,7926	30,7926	
	406	5			34,1978	34,1978
	201	5			34,2576	34,2576
	310	5			34,7300	34,7300
	162	5			35,8540	35,8540
	161	5			36,0228	36,0228
	203	5			36,2776	36,2776
	319	5			36,5176	36,5176
	314	5			37,2576	37,2576
	205	4				38,3625
	Sig.		1,000	,085	,053	,595

a. MG: *M. gypseum*

b. TM: *T. mentagrophytes*

Anexo 6

Evaluación de la actividad queratinolítica a nivel cuantitativo - degradación de sustrato cromogénico

1. Análisis de varianza de la actividad enzimática evaluada a los 14 días

ANOVA

UQ14d						
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Inter-grupos	123,246	11	11,204	11,542	1.34	x
Intra-grupos	97,073	100	,971		10 ⁻¹³	
Total	220,319	111				

UQ14d									
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	
HSD de Tukeya,b	161	9	2,9933						
	314	6	3,8000	3,8000					
	108	11	4,2500	4,2500	4,2500				
	404	8	4,4375	4,4375	4,4375				
	162	8		4,5625	4,5625	4,5625			
	319	8		4,9000	4,9000	4,9000	4,9000		
	310	10		5,2400	5,2400	5,2400	5,2400		
	409	12		5,2583	5,2583	5,2583	5,2583		
	406	11			5,4818	5,4818	5,4818		
	203	9				6,0444	6,0444	6,0444	
	201	11					6,2182	6,2182	
	205	9						7,0778	
	Sig.			,094	,087	,265	,076	,180	,535

UQ14d con controles positivos										
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	
HSD de Tukeya, b	TMMH ^a	6	2,800 0							
	TM ^b	10	2,930 0	2,930 0						
	161	9	2,993 3	2,993 3						
	314	6	3,800 0	3,800 0	3,800 0					
	108	11	4,250 0	4,250 0	4,250 0	4,250 0				
	404	8		4,437 5	4,437 5	4,437 5				
	MC ^c	9		4,466 7	4,466 7	4,466 7				
	162	8			4,562 5	4,562 5	4,562 5			
	MG ^d	11			4,600 0	4,600 0	4,600 0			
	319	8			4,900 0	4,900 0	4,900 0	4,900 0		
	310	10			5,240 0	5,240 0	5,240 0	5,240 0		
	409	12			5,258 3	5,258 3	5,258 3	5,258 3		
	406	11				5,481 8	5,481 8	5,481 8		
	203	9					6,044 4	6,044 4	6,044 4	
	201	11						6,218 2	6,218 2	
	205	9							7,077 8	
	Sig.			,101	,059	,096	,308	,083	,206	,616

a. TMMH: *Trichophyton mentagrophytes* del laboratorio de micosis humanas

b. TM: *T. mentagrophytes* del cepario

c. MC: *Microsporum canis*

d. MG: *M. gypseum*

2. Análisis de varianza de la actividad enzimática evaluada a los 28 días

ANOVA

UQ28d

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	168,628	11	15,330	15,663	4.13 x 10 ⁻¹⁷
Intra-grupos	94,937	97	,979		
Total	263,564	108			

UQ28d						
HSD de Tukeya,b						
Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
404	6	1,9500				
108	6	3,1500	3,1500			
201	9	3,2111	3,2111			
314	8	3,3250	3,3250			
161	10		4,0400	4,0400		
162	11		4,2545	4,2545		
310	12		4,4417	4,4417		
205	10		4,5000	4,5000		
409	12			5,0250	5,0250	
203	8			5,1125	5,1125	
319	8				6,1125	6,1125
406	9					7,1444
Sig.		,161	,181	,516	,494	,576

UQ28d con controles positivos							
	Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD de Tukeya,b	404	6	1,9500				
	TR ^a	10	3,1300	3,1300			
	108	6	3,1500	3,1500			
	201	9	3,2111	3,2111			
	314	8	3,3250	3,3250			
	161	10		4,0400	4,0400		
	TM ^b	6		4,0833	4,0833		
	162	11		4,2545	4,2545		
	310	12		4,4417	4,4417		
	205	10		4,5000	4,5000		

MG ^c	12	4,6250	4,6250	4,6250	
MC ^d	8	4,7125	4,7125	4,7125	
409	12		5,0250	5,0250	
203	8		5,1125	5,1125	
TMMH ^e	9		5,3111	5,3111	
319	8			6,1125	6,1125
406	9				7,1444
Sig.		,180	,053	,296	,097
					,666

a. *T. rubrum*

b. *T. mentagrophytes*

c. *M. gypseum*

d. *M. canis*

e. *T. mentagrophytes* del laboratorio de micosis humanas