



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**FILOGENIA MOLECULAR DE AISLADOS DE
Sporothrix schenckii EN MÉXICO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
ELBA LUCIA RANGEL GAMBOA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
LABORATORIO DE GENÉTICA Y EVOLUCIÓN, INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM

MEXICO, D.F. 30 SEPTIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Al hombre del mañana,
Mi nieto Lían Milán*

Oda al hombre del mañana

Careyes blancos desovan en la arena,
frágiles retoños regresaran al mar.
Mientras tú llegas al mundo
hermoso y convulso.
Disfrutas los primeros aromas.
En minutos libras tu primera batalla,
millones de guerreros irrumpen tus dominios.
Minúsculos soldados
repelen invasores,
convenios de paz
limitan territorios.
Bebes la miel de la victoria.
Habrá otras batallas...
Ahora anuncias tu llegada.
Pasado, presente y futuro
convergen en tu rostro,
A todos y a ninguno
Pertenece tus ojos.
Contigo soñamos y por ti
viviremos nuevas esperanzas.
Nuestros tesoros serán tuyos,
guerrero de las 7 estrellas.

Tu sangre que es mi sangre,
amarillo, azul y roja,
verde, blanca y colora.
sangre de Cuauhtémoc y de Zulia,
de Zamora y Villa;
galopa por tus venas.
Cumbres frías
caminare contigo,
para enseñarte las huellas de la historia.
Paso de Cortes, Pico Bolívar.
En el silencio de la noche,
el canto de la mujer dormida
alcanzaran tu oído.
La guerrera de Pichincha,
guiara nuestros pasos
en la mitad del mundo.
Frailes y magueyes,
cómplices silentes
de nuestra travesía,
orgullosos se levantan
sobre la tierra
que ahora es tuya.
Amala y siembra a tu paso
utopías de esperanza,
Amado hombre del mañana.

Lucía, julio 2013

*A ti luz de mi vida
Hija, amiga, hermana
Compañera de mil batallas*

Que lindas son las flores
Y el sol también,
Como tú ves
Así es.

*Ana Isabel Teresa Kruskaya
1994, a la edad de 4 años.*

A Teresa Gamboa Cáceres

1943 – 2015

Big bang

Big bang – agujero negro.
Fuerza, amor, revolución...

Seguidora de Martí
Estudiosa de Hegel, Marx,
Engels, Lenin, Bolívar...
Dialéctica y libertad
tus banderas cotidianas.

Con versos Neruda
y Benedetti cultivaste tus amores.
Mientras las coplas de tu vida
corrieron al son del cuatro y la tambora.

Madre de miles
pobres, desvalidos,
en ti encontraron guía, cobijo y pan.

En la tierra del sol amada
forjaste tu destino.
Hiciste tuyo el rayo del Catatumbo.

Del Lago de Maracaibo
al delta del Orinoco,

tu andar germinante
floreció en tierras de Añu,
Barís, Motilones y Guajiros.
Estudiando y enseñando,
amando a cada niño
flaco y tripón de nuestra tierra
tan rica y tan pobre...

Atesoraste siempre
las brisas del pamplonita,
y el canto del violín
en tu corazón Santandereano.

Las memorias de Toledo.
Corcel de doradas crines,
Honor, moral, rectitud...
Afrentas, sangre, caballos mutilados,
Guerra de los mil días...
La muerte rondado tu cuna,
pobre hija de liberal
en pueblo de conservadores.
Locuras de hombres contra hombres...
forjaron tu corazón bravío.

Mujer aguerrida y madre
Te recuerdo,
Hermosa, como eras
en el último abril...

Elba Lu.

Abril 2015

A Paco de Lucia, mi Paco

Yin and Yang

Un miércoles de bicitekas,
rodando, frente al ángel
el yin encontró al yang...

El yin,
observa las obras del Dr. Atl.

El yang,
analiza los patrones de simetría
de los marcos que rodean
las obras del Dr. Atl., R1, R2, R3, S...

El yin se preparaba para conquistar
la cima del Kilimanyaro

El yang recorría sin
preocupaciones
las geografías cotidianas.

Ahora, juntos yin y yang
van del pasado al presente
del arte a la ciencia
de la dialéctica a la fe
con una sonrisa y la esperanza
de un mundo mejor...

Lucia, septiembre 2015

A Fernando Martínez Hernández

Amigo incondicional
Maestro excepcional
Hombre generoso,
Tutor honorario.
Sin cuyo apoyo, guía y enseñanza
No hubiera sido posible esta tesis.

ÍNDICE

1.	Introducción	13
2.	Marco teórico	23
2.1	Breve reseña histórica	23
2.2	Charles Darwin y el origen de las especies	25
2.3	Panbiogeografía de Croizat	27
2.4.	Genética de poblaciones	28
2.4.1.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	30
2.4.2.	Teoría neutral	31
2.4.3.	Relaciones filogenéticas y coalescencia	33
2.4.4.	Índices de diferenciación y flujo génico	35
3.	Planteamiento del problema	36
4.	Hipótesis	37
5.	Objetivos	37
5.1.	Objetivo general	37
5.2	Objetivos específicos	38
6.	Justificación	38
7.	Diseño experimental	39
8.	Material y métodos	40
8.1.	Universo de estudio	40
8.2.	Tamaño de muestras	40

8.3.	Descripción de los procedimientos	41
8.3.1.	Manejo de los aislados de <i>S. schenckii</i>	41
8.3.2.	Comprobación de las características fenotípica	42
8.3.3.	Comprobación del dimorfismo	42
8.3.4.	Aislamiento y purificación de DNA	42
8.3.5.	Iniciadores	43
8.3.6.	Condiciones y amplificación por PCR	43
8.3.7.	Secuenciación	44
8.3.8.	Edición, alineamiento de secuencias y análisis filogenético	44
8.3.9.	Análisis de genética de poblaciones	45
8.3.10.	Genealogías	46
9.	Resultados	46
10.	Discusión	62
11.	Tabla suplementaria	67
12.	Bibliografía	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esporotricosis linfocutánea.	15
Figura 2. Estudio histopatológico.	16
Figura 3. Imágenes de cultivo macroscópicas y microscópicas de <i>S. schenckii</i> .	17
Figura 4. Representación esquemática de un fragmento de DNA que incluye los genes ribosomales y las regiones intergénicas conocidas como ITS.	19
Figura 5. Variaciones fenotípicas en los caballos paleolíticos identificadas en pinturas rupestres.	24
Figura 6. Flujograma.	39
Figura 7. Imágenes macro y microscópicas de los cultivos.	49
Figura 8. Diferenciación genética y flujo génico utilizando el gen de la calmodulina entre <i>Sporothrix schenckii</i> s. str., analizados bajo el modelo de islas infinitas.	54
Figura 9. Árbol filogenético obtenido con las secuencias parciales del gen <i>calmodulina</i> .	55
Figura 10. Árbol de redes haplotípicas de <i>S. schenckii</i> s. l. obtenido con las secuencias parciales del gen <i>calmodulina</i> .	57
Figura 11. Árbol de redes haplotípicas de <i>S. schenckii</i> s. str	58
Figura 12. Distribución geográfica de las 5 subpoblaciones de <i>S.</i>	

<i>schenckii</i> s. str. Definidas con el gen de <i>calmodulina</i> .	60
Figura 13. Árbol filogenético realizado con las secuencias parciales del gen <i>cmk1</i> .	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados reportados en este trabajo, origen, número de accenso al GenBank y presentación clínica.	48
Tabla 2. Valores de π , θ , D de Tajima, D de Fu & Li para dos loci de <i>Sporothrix schenckii</i> complex.	51
Tabla 3. Diferenciación genética y flujo génico entre las subpoblaciones de <i>Sporothrix schenckii</i> s. l. in el modelo de islas infinitas utilizando el gen de la calmodulina.	52
Tabla 4. Diferenciación genética utilizando el gen de la calmodulina entre <i>Sporothrix schenckii</i> s. str. provenientes de diferentes países, analizados bajo el modelo de islas infinitas.	53
Tabla 5. Diferenciación genética y flujo génico entre las subpoblaciones de <i>S. schenckii</i> sensu stricto. En el modelo de islas infinitas utilizando el gen de la calmodulina.	59
Tabla suplementaria 1. Datos de las secuencias obtenidas del <i>GenBank/EMBL/DDBJ international data base</i> incluidas en los análisis de genética de poblaciones que fueron obtenidas en estudios previos.	67

1. INTRODUCCION

*La vida es breve y el arte de curar largo
La oportunidad de curar es fugaz
El experimento peligroso y la decisión difícil.
Hipócrates*

Sporothrix schenckii es el agente causal de la esporotricosis, micosis subaguda o crónica, que afecta a seres humanos y algunos mamíferos, ocasionada por la inoculación directa de este hongo dimórfico, que se adquiere al manipular tierra, plantas y material orgánico contaminado.^{1 2} La esporotricosis se observa en todos los grupos etarios, siendo frecuente en niños y adultos jóvenes.³ Se considera una enfermedad ocupacional que afecta campesinos, floristas, granjeros, carpinteros y empacadores de loza, quienes manejan materiales vegetales en los que suele vivir *S. schenckii*; por lo tanto una lesión cutánea, aunque sea menor, puede jugar un papel importante en la introducción del hongo a la piel.⁴ En Australia y Estados Unidos se reportaron brotes epidémicos asociados con material orgánico contaminado, como heno o musgo esfagno (*sphagnum*).^{5 6 7} En contraste la epidemia brasileña de las últimas décadas, que afectó el sur y sureste del país, se asoció con mamíferos infectados, principalmente felinos domésticos (*Felis catus*).³

En cuanto a la presentación clínica, las lesiones causadas por *S. schenckii* se restringen frecuentemente a la piel, tejido celular subcutáneo y vasos linfáticos

adyacentes. Sin embargo, se han identificado infecciones pulmonares primarias, osteoarticulares,^{8 9} conjuntivales,¹⁰ así como una forma diseminada.^{11 12} Se consideraba que la presentación clínica dependía del estado inmune del paciente, reportándose la forma diseminada en pacientes alcohólicos o inmunocomprometidos, especialmente pacientes con VIH.¹³ En contraste a esta suposición, en Brasil *S. schenckii* se reportó en pacientes inmunocompetentes con esporotricosis diseminada y afectación pulmonar primaria. Estudios posteriores evidenciaron que algunos aislados brasileños mostraron mayor virulencia tanto en pacientes, como en el modelo murino.¹⁴ En la actualidad, se piensa que: la forma clínica depende no solo del estado inmunológico del paciente, sino también de la cantidad y profundidad del inóculo, así como de la patogenicidad y termotoleranciaⁱ de cada cepa.^{15 16} En México las formas clínicas más comunes son: la linfocutánea, seguida de la cutánea fija. La forma pulmonar primaria se diagnostica raramente en nuestro país, lo que podría estar relacionado con características genéticas o biológicas del hongo o de la población humana afectada. En adultos la forma más común de la infección se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas y subcutáneas que siguen el trayecto linfático, se denomina forma linfocutánea, está asociada con linfangitis y linfadenopatía (Figura 1). Los síntomas incluyen: aumento de volumen, dolor y disminución de la movilidad, llegando a ser incapacitantes; mientras que en niños

ⁱ Por termotolerancia se entiende la capacidad de sobrevivir a temperaturas altas por ejemplo 35 o 37°C, lo cual se asocia con mayor virulencia.

la forma cutánea localizada, es la más común y afecta con mayor frecuencia la cara.¹⁷

La enfermedad y su agente causal tienen poco más de 100 años de haber sido reportada por primera vez. En 1898 *Schenck*, describió la presencia de abscesos subcutáneos refractarios, asociados a un hongo del género *Sporotrichia*,ⁱⁱ en un paciente del Hospital Johns Hopkins en Baltimore,¹⁸ posteriormente se ha reportado en todo el mundo, especialmente en áreas tropicales y subtropicales.¹⁹ Latinoamérica presenta el mayor número de casos informados en las últimas décadas.^{20 21 22} En México representa la micosis subcutánea más frecuente²³ y se reportan áreas endémicas, como el estado de Jalisco.²⁴



Figura 1. Esporotricosis linfocutánea. **a.** Se observa la diseminación a lo largo de los vasos linfáticos en brazo y antebrazo. **b.** Nódulo inicial en la región tenar, ulcerado. **c.** El mismo paciente después de recibir 45 días de tratamiento con yoduro de potasio.

Las técnicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de esporotricosis son la intradermoreacción, la histopatología y el cultivo. Para la

ⁱⁱ *Sporotrichia* fue la denominación utilizada en la publicación original, de acuerdo a la clasificación taxonómica actual el género se denomina *Sporothrix*.

intrademorreacción se utilizan 100 μ L de antígeno, el cual es obtenido de cultivos celulares de *S. schenckii*, esta proteína denominada esporotricina, estimula la inmunidad celular en las personas infectadas; y se consideran positivas a aquellas personas que presenten una induración mayor a 5 mm de diámetro, entre las 24 a 48 horas pos-inoculación.²⁵ En cuanto al estudio de los tejidos afectados, los hallazgos histológicos incluyen infiltrado inflamatorio supurativo o granulomatoso (Figura 2a y 2b). La identificación del microorganismo se facilita con tinciones especiales como PAS (ácido peryódico de Schiff) o Gomori Grocott, que permiten visualizar esporas ovales de 4 a 6 μ m de diámetro (Figura 2c), mientras que los cuerpos en forma de cigarrillo de 8 μ m se observan con menor frecuencia.²⁶

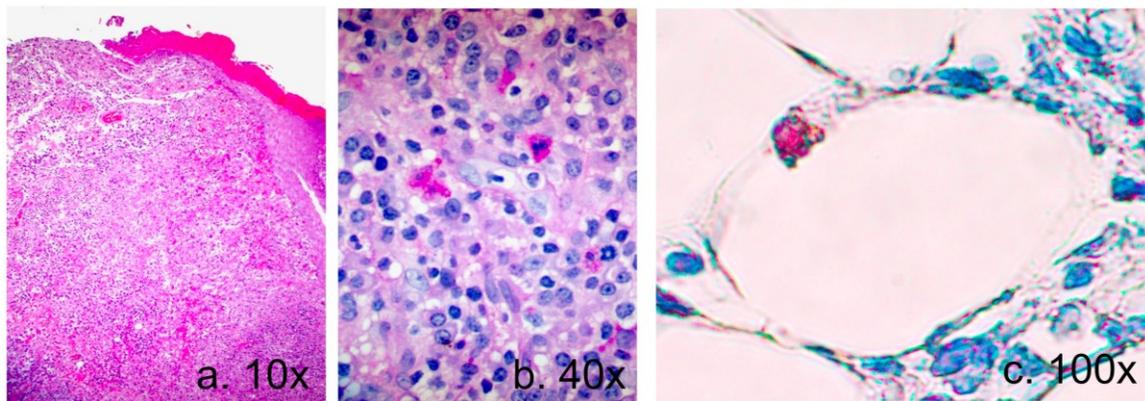


Figura 2. Estudio histopatológico. **a.** Observe el trayecto fistuloso con tejido de granulación y la pérdida de la continuidad de la epidermis. **b.** Tinción de PAS. Se observa infiltrado inflamatorio en dermis, compuesto por células plasmáticas, linfocitos, macrófagos y escasos eosinófilos. **c.** Inmunohistoquímica utilizando lactoferrina. Se observa una levadura gemante.

En concordancia con los postulados de Koch, el diagnóstico inequívoco se obtiene aislando y cultivando el hongo a partir de las lesiones clínicas. En cultivo, el desarrollo de la forma micelial se obtiene a 25°C en agar Sabouraud, agar dextrosa papa o agar mycoceol, mientras que el estado de levadura se consigue en Infusión cerebro corazón a 37°C, con agitación continua a 120 rpm. Macroscópicamente, la forma de micelio presenta colonias de crecimiento rápido, siendo las colonias típicas lobuladas, suaves y blancas; adquieren aspecto verrugoso, con pigmento café o negro cuando envejecen. Al microscopio se observan hifas septadas, delgadas y ramificadas de 1 a 2 micras, la forma reproductiva característica presenta simpodulosporas, que recuerdan duraznos en floración, también se pueden observar radulosporas (Figura 3).²⁷

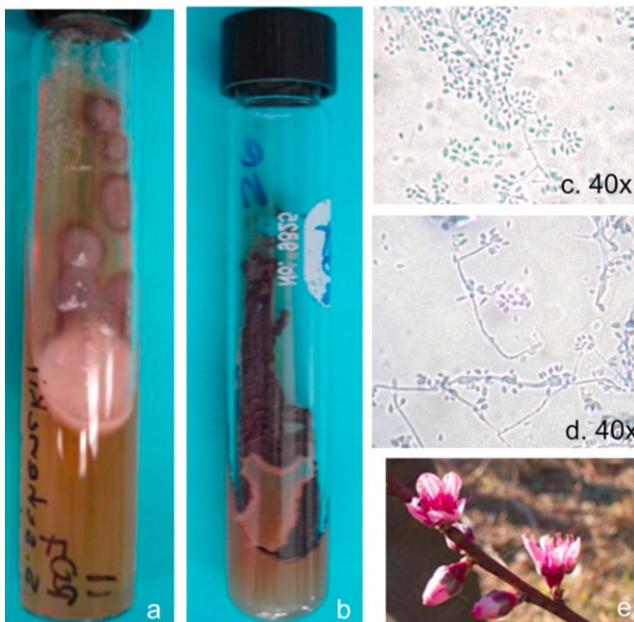


Figura 3. **a** y **b**. Imágenes macroscópicas de cultivos en agar Sabouraud a 25°C. **a** cultivo con aspecto de levadura blanca cremosa. **b**. cultivo con pigmento marrón característico de varias semanas de crecimiento. **c** y **d**. Imágenes microscópicas. Se observan hifas delgadas de 1 a 2 μm , septadas, ramificadas y simpodulosporas que recuerdan, los “duraznos en floración 3e.”

Las características morfológicas y bioquímicas establecidas en medios de cultivo de *S. schenckii*, sirvieron tradicionalmente para su identificación, sin embargo, presentan limitantes, como el tiempo necesario para cultivar al hongo, las variantes morfológicas y la similitud con hongos relacionados, lo que hizo necesario desarrollar otras herramientas, para resolver el problema de su identificación.²⁸ El análisis de *S. schenckii* y de las especies relacionadas por métodos moleculares solucionó algunas dudas taxonómicas, por ejemplo *Ophiostoma stenoceras*, se había considerado el teleomorfoⁱⁱⁱ de *S. schenckii*; no obstante, análisis filogenéticos con técnicas moleculares, permitieron concluir que son especies diferentes.²⁹ Por otra parte se abrieron nuevas interrogantes; ya que al emplear técnicas como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se describieron múltiples variantes, utilizando aislados identificados como *S. schenckii* por sus características morfológicas macro y microscópicas, lo que llevó al cuestionamiento de si estas variantes representaban especies diferentes.^{14 30 31}

Para establecer especies y subespecies se pueden emplear genes o secuencias. En este sentido fragmentos que incluyen genes altamente conservados, como los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S, correspondientes a secuencias codificantes, esenciales para la síntesis de proteínas, y las regiones variables, no codificantes, como los ITS I y II (por sus siglas en inglés, *Internal*

ⁱⁱⁱ Fase de reproducción sexual

Transcribed Spacer I e ITS-II, Figura 4) se consideran de gran utilidad taxonómica. La ITS-II es útil para estudiar taxones estrechamente relacionados que divergieron hace menos de 50 millones de años y se considera como una de las mejores herramientas para el análisis de sistemática. Por otro lado, el DNA mitocondrial evoluciona más rápido que el DNA nuclear, por lo tanto la mayoría de los genes mitocondriales que codifican para proteínas se emplean para examinar relaciones filogenéticas (géneros, especies).³² En *S. schenckii* se realizaron estudios con estas y otras regiones genómicas usando las técnicas RAPD, AFLP, RFLP, sin embargo los resultados no fueron congruentes en los diferentes trabajos, y antes de que se alcanzara consenso en con esas técnicas, se desarrollaron nuevos abordajes para el estudio de *S. schenckii*.

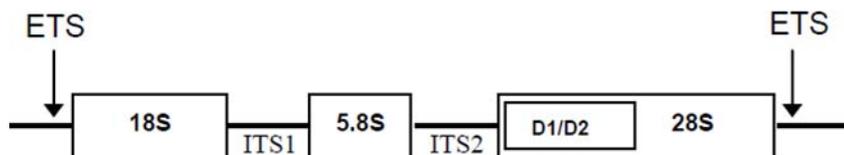


Figura 4. Representación esquemática de un fragmento de ADN que incluye los genes ribosomales (18S, 5.8S y 28S) y las regiones intergénicas ITS I y II.

Marimon y col., con base en la secuencia nuclear de la *calmodulina*, proponen que *S. schenckii* debería ser considerado un complejo de especies crípticas,³³ compuesto por diferentes especies y no solo una, como se había considerado hasta el año 2007; siendo *S. schenckii* sensu stricto (s. str.) y *S.*

brasiliensis las especies más frecuentes del complejo, que también incluye, *S. globosa* y *S. luriei*, siendo estas 4 especies relevantes como patógenos humanos,^{34 35 36} mientras que otras especies filogenéticamente relacionadas, como *S. mexicana*, *S. chiliensis* y *S. pallida* (sinonimia *S. albicans*), se encuentran preferentemente en el medio ambiente.^{37 38} Posteriormente Zhou y col.,³⁹ concluyeron que en el complejo solo deben incluirse las especies patógenas *S. brasiliensis*, *S. schenckii* s. str., *S. globosa* y *S. luriei*, considerando que *S. pallida* y *S. mexicana* son especies no patógenas, distantes de las 4 antes mencionadas.^{40 41} Por otra parte, estudios recientes en una micoteca brasileña, reportaron la presencia tanto de *S. globosa* como de *S. mexicana* en muestras aisladas de pacientes con esporotricosis, obtenidas desde 1955.⁴² Entre las especies crípticas mencionadas, *S. brasiliensis*, destaca por sus características epidemiológicas: se encuentra solo en Brasil, se identificó de manera preponderante en la epidemia brasileña; se aisló de mamíferos infectados, especialmente felinos domésticos (*felis catus*), quienes transmitieron la enfermedad a otros animales y a humanos.⁴³

El empleo de la nueva nomenclatura para las especies crípticas trajo como consecuencia el uso de la distinción *sensu lato* (s. l.) y *sensu stricto* (s. str.), *sensu lato* traduce “en sentido más amplio”; y se refiere a un taxón que incluye todos sus taxa subordinados, mientras *sensu stricto* significa “en el sentido más estricto” y se utiliza para indicar un subordinado o puede indicar la exclusión de taxa similares. Estas palabras originarias del latín, se colocan después de *S.*

schenckii para evitar confusión; se usa s.l. cuando nos referimos al grupo constituido por las diferentes especies pertenecientes al género *Sporothrix* que por métodos tradicionales (morfología macro y microscópica) se identifican como *S. schenckii*, pero que identificadas por métodos moleculares pueden pertenecer alguna de las especies crípticas, mientras que se emplea *S. schenckii* s. str., para referirse a la especie propiamente.

A partir del análisis de filogenia molecular, Marimon y col.,³³ ahondaron en la búsqueda de características morfológicas y bioquímicas, que pudieran asociarse con las especies encontradas en el árbol filogenético.^{iv} Encontraron variaciones discretas en la morfología de las conidias y diferencias sutiles en el metabolismo de carbohidratos.³⁸ Posteriormente, utilizando un modelo murino de infección, se encontraron diferencias en la virulencia de las especies crípticas.⁴⁴ Cabe señalar que el uso del gen de *calmodulina (cal)* para establecer filogenia es reciente especialmente en el reino fungi.^{45 46} Otro gen actualmente utilizado para la construcción de árboles filogenéticos en hongos es la *cinasa dependiente de calcio/calcineurina (cmk1)*. Ambos genes codifican para proteínas, y de forma similar a lo que describimos para los genes ribosomales, presenta intrones y exones por tanto posee tanto regiones codificantes (conservadas) como no codificantes (variables). Las proteínas que generan se denominan calmodulina (*cal*) y cinasa dependiente de calcio/calcineurina ($Ca^{2+}/CaMKs$), ambas pertenecientes a la vía de señalización calcio/calcineurina. En el reino fungi esta

^{iv} Comunicación personal del Dr. Josep Cano, Co-autor de Marimon en ese trabajo.

vía participa en múltiples procesos, que incluyen, respuesta a estrés oxidativo u osmótico, procesos dependientes de actina y tolerancia a drogas antifúngicas.⁴⁷ El gen *cmk1* se utilizó en la última década para la realización de árboles filogenéticos en hongos; adicionalmente, este gen se asoció con dimorfismo y virulencia en hongos patógenos.⁴⁸

En México, existen pocos estudios de epidemiología o filogenia molecular con *S. schenckii*, entre ellos se encuentran el trabajo de Arenas y col.,⁴⁹ en el que se analizaron con la técnica de RFLP 13 aislados, provenientes de 8 estados; se encontró con más frecuencia (38%), en el centro de la república el subtipo 3, de acuerdo a la clasificación por patrones de digestión del DNA mitocondrial propuesta por Ishizaki.³¹ Otro estudio importante en el que se incluyen aislados mexicanos es el de Mora-Cabrera y col., que reporto alta virulencia de los aislados mexicanos (medida por dosis letal media), comparados con aislados provenientes de Colombia y Guatemala.^{50 51} Una característica interesante reportada en los aislados mexicanos es la resistencia a fármacos, Arenas identificó 3 aislados obtenidos de pacientes que mostraron resistencia *in vivo* a los antifúngicos convencionales. Llama la atención que de acuerdo a la clasificación de Ishiazaki y col.,³¹ estos 3 aislados corresponden al mismo subgrupo por RFLP, lo que sugirió una asociación entre la clasificación molecular y el comportamiento biológico. Lamentablemente el tamaño pequeño de la muestra fue insuficiente para aportar conclusiones definitivas referentes a la relación entre genotipo y presentación clínica o distribución geográfica.

2. MARCO TEORICO

... dispusieron la creación y crecimiento de los árboles y los bejucos y el nacimiento de la vida y la creación del hombre. Se dispuso así en las tinieblas y en la noche por el corazón del cielo...

*Popol vuh, Libro sagrado de los mayas
...bien juger et distinguer le vrai d'avec le faux...
Discours de la methode,^v Descartes*

2.1 Breve reseña histórica

El interés del hombre por las especies presentes en su entorno probablemente, es tan antiguo como el hombre mismo; Evidencia de su curiosidad primigenia, se encuentra representada en pinturas rupestres de rocinés paleolíticos, donde se observan variaciones fenotípicas (forma y color). Se discutió si las pinturas eran resultado de la imaginación o representaban la realidad observada por los hombres paleolíticos. Pruvost y col., encontraron que los genotipos de los caballos paleolíticos (pre-domésticos) corresponden a los fenotipos representados en las cuevas (Figura 5).⁵² Si seguimos la historia del arte encontramos especies animales en representaciones pictóricas o escultóricas, producidas por culturas correspondientes a tiempos remotos y diversas regiones geográficas.

^v ...Juzgar bien y distinguir la verdad de la mentira... Discurso del Método.



Figura 5. Variaciones fenotípicas en los caballos paleolíticos identificadas en pinturas rupestres. Imagen tomada de Pruvost et al. 2001.

En cuanto a las primeras evidencias escritas de un proceso sistemático de recopilación y observación, estas se atribuyen a Aristóteles, quien fue maestro y amigo de Alejandro de Macedonia. Alejandro el Grande, concedió magnas sumas de dinero y los servicios de ayudantes en todo el imperio Macedónico, para que reunieran muestras de vida animal e informaran sus observaciones a Aristóteles. Tanto las colecciones creadas como la mayor parte de la información recopilada por Aristóteles, se perdieron a la caída del imperio y durante el posterior incendio de la biblioteca de Alejandría, sin embargo gracias a las obras preservadas sobre las partes e historia de los animales, se le atribuye la denominación de padre de la biología. Cabe señalar que las clasificaciones de Aristóteles se mantuvieron virtualmente inalteradas hasta el siglo XVIII.⁵³

El advenimiento del movimiento filosófico conocido como ilustración (1620 a 1780), así como los intereses económicos colonialistas de los imperios dominantes de la época,⁵⁴ promovieron que los entonces llamados naturalista, realizaran descripciones detalladas de miles de individuos categorizándolos y

creando colecciones botánicas y zoológicas, no solo de las especies presentes en Europa sino también de África, América, Australia y Asia.⁵⁵ De tal forma que para el siglo XVIII, el objetivo fundamental del naturalista consistía en descubrir semejanzas constantes en los seres vivos, las cuales se denominaron “arquetipos”. Por otra parte, el análisis sistemático de individuos llevó al cuestionamiento, al menos en algunos observadores, de la versión religiosa y creacionista del origen e inmutabilidad de las especies imperante en el mundo occidental de la época. En 1809, Jean-Baptiste Lamarck, en su libro *Philosophie Zoologique*, propone que, “el uso particular de un órgano provocara su mejoramiento funcional de forma gradual y este pasará a las futuras generaciones”. Posteriormente una generalización del mecanismo hipotético propuesto por Lamarck, se conoció como “*herencia de caracteres adquiridos*”.⁵⁶

2.2 Charles Darwin y el origen de las especies

En 1831, Darwin se embarcó en el navío de la armada Británica, HMS Beagle. Uno de los objetivos de la expedición era efectuar una serie de medidas cronométricas alrededor del mundo, hecho que le permitió a Darwin conocer una buena parte del globo terráqueo (incluyendo parte de los continentes africano y americano). Durante los casi 5 años de la travesía, Darwin paso la mayor parte del tiempo en tierra firme, recopilando muestras y datos. Este viaje y el trabajo metódico que desarrollo durante el mismo, sentó las bases para el desarrollo de los aspectos tanto biológicos como geológicos y geográficos de su teoría.⁵⁷ En

1859 Charles Darwin, desestimó la hipótesis Lamarckista,^{vi} en su libro “*El origen de las especies*”; en el cual, propone que los seres vivos evolucionan a partir de ancestros comunes, siendo la fuerza fundamental que genera el origen de nuevas especies la selección natural. Cabe señalar que de forma independiente Russel Wallace, llegó a la misma conclusión, publicada en su ensayo: “*De la tendencia de las variedades de partir indefinidamente del tipo original*”.^{vii} Por otra parte, ambos autores señalaron la influencia de la obra, “*Ensayo sobre el principio de la población*”, de Thomas Malthus, en el desarrollo de su teoría. Malthus destacó, como un principio de la naturaleza, que los seres vivos producen más descendencia de la que sobrevivirá hasta alcanzar la madurez reproductiva; y que a pesar de la capacidad de reproducción masiva en las diversas especies, la población adulta tiende a permanecer constante; la idea desarrollada por Darwin, a partir de esta premisa, fue popularizada posteriormente por Spencer en el siglo XIX, en la frase “*la supervivencia de los más aptos*”,⁵⁸ expresión de conocimiento popular en la actualidad y susceptible de diversas e incluso opuestas interpretaciones filosóficas.⁵⁹ El trabajo de Darwin introdujo entre otras ideas, el concepto del tiempo al estudio de las especies y constituyó una ruptura epistémica que se extendió a otros campos más allá de la biología (sociología, económica, incluso la política).

^{vi} En la actualidad la epigenética ha permitido retomar algunos aspectos de la hipótesis de Lamarck.

^{vii} On the Tendency of Varieties to depart indefinitely from the Original Type. Título original en inglés.

La teoría de la selección natural considera que el desarrollo de las nuevas especies y las extinciones están asociadas a los cambios geológicos sufridos por el planeta, ideas que desarrolla en los capítulos X y XI de su obra (de la imperfección de los datos geológicos y de la sucesión geológica de los seres vivos, respectivamente), así mismo reconoce la importancia del espacio en los capítulos XII y XIII (Distribución geográfica), aspectos que serían desarrollados ampliamente por Croizat, más de un siglo después.

2.3 Panbiogeografía de Croizat

En 1964, Léon Croizat publicó su obra "*Espacio, tiempo y forma*", en la que resalta la importancia de la dimensión espacial en el estudio de los patrones de biodiversidad. La panbiogeografía de Croizat, considera que las barreras geográficas evolucionan conjuntamente con las biotas; expone que en un principio los organismos se propagan activamente en su área de distribución y conquistan el mayor espacio geográfico posible. En una segunda etapa, la distribución se estabiliza, por lo que al surgir barreras a la dispersión (ríos, montañas, etc.) se produce fragmentación, lo que se denomina vicarianza. Este fenómeno genera subpoblaciones a partir de una población original, ocasionando que la mezcla genética o flujo génico disminuya entre las subpoblaciones.⁶⁰ Croizat, considera que las frecuencias génicas en las subpoblaciones se diferencian con el tiempo y la población total se aleja del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) hasta un punto donde ya no lo cumple. Si bien la idea general de Croizat, resulta fácil de comprender, esta se encuentra asociada a las teorías matemáticas de genética de

poblaciones desarrolladas durante el siglo 20.^{viii} En el siguiente apartado se explicara el equilibrio de HW, así como otros principios básicos relativos a la genética de poblaciones.

2.4 Genética de poblaciones

Existe un lazo indisoluble entre las bases genéticas de la evolución y la genética de poblaciones. Los fundamentos teóricos de la genética de poblaciones se encuentra en la genética mendeliana y la evolución neo-Darwinista. A diferencia de otras áreas de la biología, la genética de poblaciones, es teórica más que observacional o experimental. Sus principales objetos de estudio son: la *frecuencia* y la *adecuación* de los genotipos en las poblaciones naturales. En genética de poblaciones, se considera la evolución como el cambio en las frecuencias de los genotipos a través del tiempo, debido probablemente a sus diferencias en adecuación. En general, las frecuencias genotípicas se determinan con facilidad, no así su cambio; ya que la escala de tiempo en que se producen dichas transformaciones en la naturaleza, generalmente es muy larga, en el orden de cientos, miles o millones de años; en consecuencia resulta imposible observar directamente cambios tan lentos; además, las diferencias en adecuación entre los genotipos que pudieran ser responsables por variaciones de frecuencia, son extraordinariamente pequeñas, probablemente menos de 0.01%, siendo igualmente imposibles de medir directamente. Por lo tanto los avances en

^{viii} Si bien en el marco teórico mencionamos algunos conceptos matemáticos fundamentales de la genética de poblaciones, el desarrollo teórico matemático no es el objetivo de esta tesis, por lo que a los lectores interesados les sugerimos revisar los textos referidos en relación al tema.

genética de poblaciones se lograron construyendo modelos matemáticos de evolución, estudiando su comportamiento, y verificando si el estado de la población es compatible con dicho comportamiento.⁶¹

Desde el punto de vista práctico, determinar la variación presente en el genoma de un grupo de individuos, es relativamente sencillo en la actualidad. Una vez obtenido el DNA de una muestra, en nuestro caso cultivos de *S. schenckii* s. l., se puede amplificar el gen o región de interés utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tras lo cual es posible obtener la secuencia específica presente en cada muestra. Las secuencias conseguidas se analizan para determinar la variación presente, se cuantifican los sitios conservados, sitios polimórficos, mutaciones silentes, no silentes, o fijadas; se determina si las diferencias observadas se encuentran o no en equilibrio de HW; y se pueden calcular índices de diferenciación y flujo génico como la variación nucleotídica π (π), θ , flujo genético (F_{ST}), índice de migración (Nm), etc.

Los datos de variación genética pueden relacionarse con otros datos como distribución geográfica, morfología o variaciones bioquímicas entre las poblaciones; empero, no siempre es fácil establecer la relación entre la variación genética y la fenotípica. Estudios en modelos experimentales bacterianos⁶² y situaciones especiales como el estudio del virus de inmunodeficiencia adquirida,⁶³ donde la selección y los cambios en las frecuencias genómicas ocurren en corto tiempo, han permitido comprobar la practicidad de los modelos matemáticos de

evolución, en los estudios de genética de poblaciones. A continuación se da una breve explicación de los principios de genética de poblaciones que se utilizaron para el análisis en este trabajo.

2.4.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg se considera el punto de partida de la genética de poblaciones, fue postulada por Godfrey Hardy y Wilhelm Weinberg en 1908,⁶⁴ establece una relación que puede usarse para predecir las frecuencias alélicas al contar con las frecuencias genómicas y viceversa, en un locus autosómico de una población diploide; asumiendo que la población es infinita, el apareamiento ocurre al azar y la población no se encuentra bajo el influjo de otras fuerzas evolutivas (deriva genética, endogamia). Esta relación se representa con la siguiente ecuación:

$$p^2+2pq+q^2=1$$

En la ecuación, p y q representan las frecuencias de los alelos para un locus génico con 2 alelos. Si, las frecuencias observadas de los genotipos se encuentran conforme con las frecuencias esperadas de acuerdo a las frecuencias alélicas observadas, se concluye que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Por otra parte, la variación en las poblaciones naturales que no se encuentran en equilibrio de HW requiere una investigación evolutiva.

En poblaciones que no cumplen la ley de HW, la heterocigosis se puede emplear para evaluar los niveles de variación; y se entiende por heterocigosis la frecuencia de heterocigotos (individuos pq) en una población diploide apareada al azar. La heterocigosis se calcula a partir solo de las frecuencias alélicas, no de las genotípicas por lo que se puede utilizar incluso para describir variación en bacterias. La ecuación que define la heterocigosis (Hs) en un locus es:

$$Hs = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Por otra parte la desviación del nivel esperado de heterocigosis o índice de fijación, constituye un concepto crítico para entender los efectos del tamaño de la población en la heterocigosis, así mismo resulta útil como un estimador del impacto de la estructura poblacional en la distribución de la variación genética.⁶⁵

2.4.2 Teoría neutral

Kimura y Ohta,⁶⁶ en la década de los setenta concluyeron que los polimorfismos pueden utilizarse para comprender los procesos evolutivos y formularon la hipótesis neutral, esto con los datos de electroforesis de proteínas disponibles para la época. No obstante, posteriormente se observó que la predicción se cumplía igualmente para las secuencias de DNA de las regiones no codificantes y se asumió que la mayoría de las sustituciones de aminoácidos en las proteínas no son neutrales, sino discretamente deletéreas. La teoría neutral

constituye la forma más empleada de hipótesis nula en los modelos de evolución molecular. Esta, sostiene que gran parte de la evolución se debe a la deriva génica más que a la selección natural; considera que la mayor parte de la variación en los alelos y las sustituciones presentes en las proteínas o el DNA tiene poca o ninguna ventaja o desventaja adaptativa y por tanto son neutrales desde el punto de vista de selección. Por tanto la mayoría de las sustituciones no tienen influencia en la supervivencia de los genotipos, además predice la cantidad de polimorfismos para una muestra de secuencias en una población de una especie dada y puede predecir tanto el grado como la tasa de divergencia entre secuencias de una muestra de especies diferentes. La teoría neutral considera que la mutación introduce variación en una población a una tasa de $2N\mu$. Donde μ es la probabilidad de que aparezca una mutación en uno de los alelos en el locus de estudio, también se denomina tasa de mutación; N se refiere al tamaño inicial de población efectiva, es decir el número de individuos en una población definida que puede reproducirse y por tanto aportar diversos alelos. A partir de aquí la teoría neutral permite calcular las tasas de sustitución, denominadas (p). Por otra parte utilizando análisis de secuencias la teoría neutral permite calcular el polimorfismo presente en las secuencias de DNA utilizando el número de sitios segregantes. El cálculo de la tasa de mutación a partir de los sitios segregantes en una muestra de secuencias de DNA se denomina theta (θ). Mientras que la suma del número de diferencias nucleotídicas para cada par de secuencias de DNA es la diversidad nucleotídica (π).⁶⁵ Además las tasas de sustitución, se puede estimar dividiendo el número de sustituciones que separan un par de

especies (secuencias en estudio) entre el tiempo total en que los 2 linajes divergieron a partir del ancestro común, lo que se ha denominado reloj molecular.⁶⁷ Para probar el modelo neutral de evolución molecular se han desarrollado diferentes pruebas, como la D de Tajima. Esta prueba del modelo estándar de coalescencia, se utiliza comúnmente para muestras de polimorfismos de DNA. Para el cálculo de la D de Tajima se utiliza la diversidad nucleotídica y el número de sitios segregantes observados en una muestra de secuencias de DNA. La hipótesis nula de la prueba es que las muestras de DNA se tomaron de una población con un tamaño efectivo de población constante y selección neutral de todas las mutaciones. Por tanto la selección natural trabajando sobre las secuencias o cambios en el tamaño de la población efectiva con lleva a rechazar la hipótesis nula.

2.4.3 Relaciones filogenéticas y Coalescencia

Desde el desarrollo de la teoría evolutiva, una de las tareas de la biología ha sido investigar las relaciones filogenéticas entre las especies. Esta tarea es importante dado que todas las diferencias que existen entre las especies, en morfología, fisiología, ecología, o en comportamiento, incluso en distribución geográfica, han evolucionado como las especies mismas en el curso de la filogenia. Hennig en 1950, planteó que, las nuevas especies se originan exclusivamente cuando una parte de una comunidad reproductiva existente queda aislada del resto o de otras partes de dicha comunidad por periodos prolongados, de forma que se produce aislamiento genético, el cual imposibilita las relaciones

reproductivas entre los grupos cuando las barreras externas que llevaron a ese aislamiento desaparecen. Por lo tanto, todas las especies (comunidades reproductivas) que existen conjuntamente en un momento de tiempo, se originaron por división de unidades reproductivas homogéneas, anteriores. En este hecho se sustenta el concepto de relaciones filogenéticas, existiendo un grado variable de relación entre todos los organismos vivos. Consecuentemente, el objetivo en las investigaciones de sistemática filogenética es descubrir el grado apropiado de relación filogenética entre un grupo dado de organismos.⁶⁸ Las relaciones filogenéticas pueden representarse gráficamente utilizando los modelos de *coalescencia* y se entiende por coalescencia, el linaje de alelos en una muestra remontado hacia atrás en el tiempo hasta su ancestro común. La coalescencia también se denomina genealogía de la muestra, ya que captura las relaciones genealógicas o filogenéticas de una muestra de alelos. En la actualidad se utilizan diversos programas para la obtención de los árboles filogenéticos, estos programas consideran los procesos básicos de mutaciones como sustituciones, inserciones y deleciones. El proceso de análisis probabilístico, es complejo e implica la construcción de matrices de sustitución, algoritmos de alineamiento (heurísticos como BLAST y FASTA), así como la aplicación de las formulas derivadas de la teoría neutral y el uso de modelos de análisis, como el Bayesiano utilizado en este trabajo.⁶⁹

2.4.4 Índices de diferenciación y flujo génico

Los índices de diferenciación y flujo génico permiten definir la estructura de una población y/o subpoblaciones. La comparación de la heterocigosis observada y la esperada permite definir el índice de fijación (F) para un alelo. Asimismo, se puede extender el índice de fijación para aplicarlo al caso de múltiples subpoblaciones. En estos casos más complejos pueden existir desviaciones de las frecuencias esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg, en 2 niveles. En primer término en cada subpoblación ocasionadas porque el apareamiento no sea al azar o entre las subpoblaciones debidas a la existencia de una estructura poblacional. Con objeto de una mejor comprensión de los resultados de este trabajo definimos:

F_{ST} , como la reducción en la heterocigosis debida a la divergencia en la frecuencia alélica entre subpoblaciones. El F_{ST} considera la diferencia entre el promedio de la heterocigosis esperada en las subpoblaciones y la heterocigosis esperada del total de la población y se calcula con la siguiente formula:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

El F_{ST} se utiliza cuando solo existen 2 alelos en un locus, mientras que el G_{ST} se aplica cuando se encuentran múltiples alelos.⁶⁵ Los valores que se aceptan

comúnmente en diferenciación genética para el F_{ST} , son: 0 a 0.05 indica poca diferenciación, 0.05 a 0.15 moderada, 0.15 a 0.25 grande, valores por encima de 0.25 indican una gran diferenciación.⁷⁰ El número de migrantes entre 2 poblaciones o índice de migración (N_m) puede calcularse a partir del F_{ST} con la fórmula:

$$N_m = \frac{1 - F_{ST}}{4 \times F_{ST}}$$

Se considera que el N_m indica el número de migrantes entre 2 poblaciones en estudio en un momento dado o en una generación particular. Poblaciones bien diferenciadas presentan un $N_m < 1$, mientras $N_m > 4$ sugieren una unidad panmíctica.⁷¹

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien se han comparado los aislados mexicanos en diversos estudios con los de otras latitudes, no existe un análisis que relacione la distribución geográfica de los aislados mexicanos con sus características moleculares. Cabe destacar el trabajo de Arenas y col.,⁴⁵ que si bien no describe la taxonomía del grupo de acuerdo a la clasificación actual, evidencia la diversidad presente en los aislados mexicanos que se identifican en varios de los grupos propuestos por

Ishizaki.³¹ Por otra parte las especies presentes del complejo *S. schenckii* y su relación con la distribución geográfica no han sido estudiadas en México. Esto es importante ya que los patrones de especiación pueden estar influidos por las condiciones del medio ambiente en cada localidad. En este contexto, el propósito del presente trabajo fue evaluar los polimorfismos genéticos presentes en la población mexicana de aislados obtenidos de pacientes con esporotricosis, estudiar su relación filogenética y su genética de población en relación a aislados de otros países.

4. HIPÓTESIS

Los aislados de *S. schenckii* s. l., obtenidos de pacientes mexicanos con esporotricosis que provienen de diversas áreas geográficas en México pertenecen a diferentes genotipos de acuerdo a la clasificación propuesta por Marimon y col.³⁸

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar las características genéticas de los aislados del complejo *S. schenckii* en México obtenidos de pacientes con esporotricosis, y describir su estructura desde el punto de vista de genética de poblaciones en relación con aislados del resto del mundo.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Obtener aislados de *S. schenckii* de origen clínico provenientes de diferentes estados de México.

5.2.2 Estudiar la variabilidad genética de las secuencias del gen *cal* y el gen *cmk* en los aislados obtenidos.

5.2.3 Determinar las relaciones filogenéticas de los aislados analizados.

5.2.4 Con base en la variabilidad genética evaluar si existen diferentes especies del complejo *S. schenckii* en México.

5.2.5 Describir la genética de población de los aislados mexicanos de *S. schenckii*.

6. JUSTIFICACIÓN

Con técnicas como RFLP se ha identificado alta variabilidad genética de *S. schenckii* en México. Con todo, no se han correlacionado los patrones genéticos, la distribución geográfica con las variantes descritas y la estructura genética de la población de *S. schenckii* en México. Por lo tanto este trabajo pretende recolectar y clasificar aislados provenientes de localidades geográficas representativas de diferentes regiones del país para estudiar sus características

genéticas y determinar la estructura genética de la población de *S. schenckii* en México.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

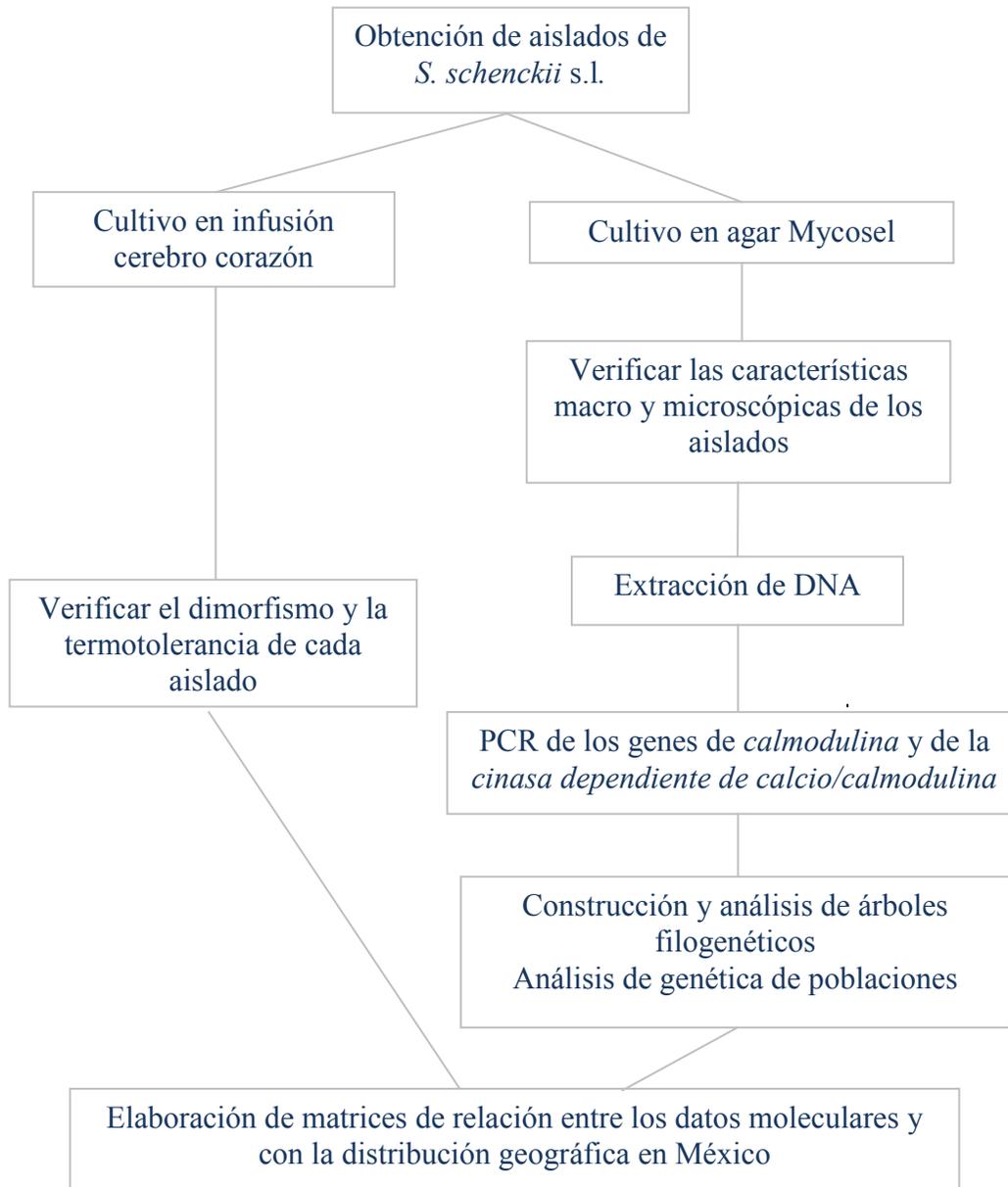


Figura 6. Flujograma del diseño experimental.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Universo de estudio

Los aislados de *S. schenckii* se obtuvieron con la colaboración de las siguientes instituciones: Servicio de Micología del Hospital “Dr. Manuel Gea González”, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM; del Instituto de Referencia Epidemiológica (InDRE); así como de algunos colaboradores, como el Dr. Heliodoro Herver, Director del Hospital General de Huatusco,^{ix} Estado de Veracruz; y el Dr. Miguel Bada del Moral adscrito al Departamento de Inmunología y Dermatología, de la Universidad Veracruzana. Gracias a las diversas colaboraciones se obtuvieron aislados provenientes de los siguientes estados: Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, y Zacatecas (Tabla 1). Para preservar los aislados se obtuvieron suspensiones de conidias en agua destilada estéril y cubiertas con aceite mineral, se preservaron en ultracongelador a -70°C.

8.2. Tamaño de la muestra.

No se han reportado estudios epidemiológicos que refieran la prevalencia por número de habitantes de la esporotricosis en la República Mexicana, si bien diversos autores la consideran la micosis subcutánea más frecuente en México. El

^{ix} En el año 2009 en que se recolecto la muestra directamente de un paciente visto en esa institución por lesiones cutáneas.

número de casos por año varía ampliamente de acuerdo a cada región geográfica del mundo,⁷² México no es la excepción, por ejemplo en el servicio de Dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González ubicado en el D.F, se reportaron de uno a 5 casos por año, en un periodo de 5 años; mientras que en el estado de Jalisco, Mayorga y col., publicaron 822 casos en 37 años lo que da un promedio de 22 casos por año.⁷³ Dada la ausencia de información epidemiológica nacional y la gran variabilidad en las entidades reportadas, los casos se asignaron de forma secuencial. Se recopilaron 30 muestras, obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de esporotricosis, y en los cuales se comprobó la presencia de *S. schenckii* mediante cultivo. Se excluyeron 6 aislados, en 2 casos los cultivos se encontraban contaminados con ácaros, en los otros 4 casos no existían datos clínicos correspondientes a la muestras.

8.3 Descripción de procedimientos

Se realizaron de manera secuencial, siguiendo lo propuesto en el diseño experimental (Figura 6) los siguientes procedimientos:

8.3.1 Manejo de los aislados de *S. schenckii*

Dado que *S. schenckii* es un hongo patógeno clasificado como agente biológico de grupo 2, se siguieron las normas generales para laboratorios con nivel de contención 2, así como la NOM-010-STPS-1999.

8.3.2 Comprobación de las características fenotípicas

Para observar las características de la colonia fúngica todos los aislados se sembraron independientemente en 2 medios de cultivo, en agar Sabouraud (Bioxon) y agar dextrosa papa (Bioxon) a 28°C se observaron las características macroscópicas (textura, color) y microscópicas de los cultivos de 10 días. Para la observación microscópica de los cultivos se utilizaron tinciones con azul de lactofenol, KOH al 10% y negro de calcoflúor.

8.3.3 Comprobación del dimorfismo

Para observar el cambio de la forma de micelio a levadura se utilizaron 100 µL, con 10^{-6} conidias por µL, obtenidas de cultivos en agar Mycosel. Para ajustar la concentración de las conidias se utilizó la cámara de Neubauer y se sembraron en medio líquido de Infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) a 37°C en agitación continua a 120 rpm.

8.3.4 Aislamiento y purificación de DNA

Para la extracción de DNA de *S. schenckii* se probaron diferentes kits comerciales así como la técnica tradicional utilizando fenol/cloroformo/alcohol isoamilico. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen) con 2 modificaciones al protocolo de extracción descrito por el fabricante, la primera modificación consistió en agregar a cada muestra de cultivo buffer de sorbitol (1 M sorbitol, 14 mM β-mercaptoetanol, 10 mM EDTA) y por otra parte se aumentó la cantidad de proteinasa *K* sugerida 10 veces, a 200

µg/mL; con estas modificaciones se consiguió mayor cantidad de DNA y de mejor calidad al comparar con los otros métodos. El DNA extraído se preservó a -20°C hasta su uso.

8.3.5 Iniciadores

Los oligonucleótidos reversos y directos para el gen de calmodulina fueron diseñados a partir de las secuencias de DNA genómico de especies de *S. schenckii* reportados en el GenBank. Siendo: primer directo 5'-CCCGCTCCCGATRCAACGGC-3', y primer reverso 5'-CCGTCCTGGTCGGCCTCACGG-3' con temperatura de alineación de 64.11 y 64.81 °C respectivamente y que amplificaron un fragmento de 650 pb aproximadamente. Con relación al gen para la cinasa dependiente de calcio/calmodulina utilizamos los oligonucleótidos directo 5'-GATGCTTCCCAGACCATC-3' y reverso 5'-TATGACACCCATTGACCA-3' descritos en el trabajo de Valle-Aviles y col.,⁴⁸ que amplifican un segmento de 320 pb.

8.3.6 Condiciones y Amplificación por PCR

Para la amplificación se utilizó el equipo MaxyGene Thermal Cyclers modelo THERM-1000 (www.appliedbiosystems.com), el programa para amplificar la secuencia del fragmento del gen de *calmodulina* fue el siguiente: 94°C durante 5 minutos para desnaturalizar la doble cadena de DNA, seguido por 35 ciclos conformados por una temperatura de 94°C durante 60 segundos, temperatura de

alineamiento de 64°C durante 60 segundos, y extensión a 72°C durante dos minutos, posterior a los 35 ciclos se dio una extensión final a 72°C durante 7 minutos. La temperatura de alineamiento y la concentración de magnesio óptimos, se obtuvieron después de realizar ensayos de gradiente de temperatura y curvas de concentración de magnesio. Para mejorar la calidad del amplificado se agregó 1 µL de albúmina al 1%. La amplificación del fragmento del gen de la *cinasa dependiente de calcio/calcineurina (cmk1)* se estandarizó usando el mismo programa pero con una temperatura de alineamiento de 46°C; se utilizaron 8 µL de MgCl₂, con 0.25 µL de *Taq* DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) por cada volumen de reacción de 50 µL, para la amplificación de ambos genes. Los fragmentos obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 1% y teñidos con 5mg/ml de bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador Gel Logic 212 Pro (Carestream).

8.3.7 Secuenciación

Los productos amplificados por PCR se extrajeron directamente de los geles de agarosa, con QIAquick gel extraction kit (QIAGEN cat. 28706), el producto purificado fue cuantificado y enviado a secuenciar mediante el sistema automático ABI Prism 310 (www.appliedbiosystems.com)

8.3.8 Edición, Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se procesaron usando el programa BioEdit v7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para verificar que no

existieran errores en el proceso de la secuenciación y para obtener las secuencias consenso, así mismo cada una de las secuencias fue analizada con la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar su identidad genética. Posteriormente se realizó el alineamiento múltiple con el software Clustal W v2.0,⁷⁴ y se ejecutó ajuste manual usando el programa MEGA v5.^{75 76}

Para calcular el modelo de evolución se manejó el programa Model test v3.7,⁷⁷ el mejor modelo para ambos genes resultó ser Tamura-Nei considerando tasas gamma (TrNef+G). Para la reconstrucción filogenética se usaron inferencias bayesianas, el análisis se realizó con el software MrBayes v3.2.^{78 79} Los arboles con valores menores a la fase estacionaria (*burnin*) se descartaron del análisis, mientras que aquellos que alcanzaron la fase estacionaria se seleccionaron para la construcción del árbol consenso.⁸⁰

8.3.9 Análisis de genética de poblaciones

Para determinar la variación poblacional entre los aislados mexicanos se utilizaron secuencias de referencia obtenidas del GenBank y se aplicaron los siguientes índices: diversidad nucleotídica (π), entendido como el promedio entre la proporción de diferentes nucleótidos entre todos los pares de secuencias posibles en la muestra; el polimorfismo de los haplotipos (θ) que se refiere a la proporción de sitios nucleotídicos que se espera que sean polimórficos en una muestra; índices de diferenciación genética, como heterocigosis (H_s) que indica el

grado de alelos diferentes en una población, coeficiente de ancestría (F_{ST}),⁸¹ que cuantifica la reducción en la heterocigosis debida a la divergencia entre subpoblaciones, utilizando las frecuencias alélicas; y el índice de migración (Nm) o tasa de migración efectiva esperada, que indica el número de organismos que migran de una población a otra en una generación determinada. Estos índices expresan la diferenciación genética entre las subpoblaciones de acuerdo al modelo de islas infinitas.^{65 82} Todos los índices mencionados se calcularon con el software DNAsp v5.⁸³

8.3.10 Genealogías

Para determinar la diferencias entre los diferentes haplotipos obtenidos entre los individuos estudiados se realizó un análisis de redes haplotípicas con la aplicación del software Network v5.⁸⁴ El cual analiza las genealogías utilizando parsimonia no enraizada. Las redes haplotípicas se anidaron de acuerdo a las reglas de *Median-Joining networks*, en las cuales el estatus interior es considerado un clado/haplotipo y el haplotipo ancestral tiene prioridad sobre los haplotipos perdidos.

9. RESULTADOS

Se cultivaron 24 aislados de *S. schenckii*, 22 aislados mexicanos, un aislado colombiano y una cepa ATCC aislada en Georgia, Estados Unidos, la

cual se utilizó como control (Tabla 1). Realizamos curvas de crecimiento y observamos que a los 10 días obteníamos crecimiento máximo (Figura 7) y que a los 14 días los cultivos iniciaban en algunos casos la fase de muerte, por lo que utilizamos cultivos de 10 días para la extracción de DNA.

Se obtuvieron 22 secuencias del gen de la *cal* y 24 de la *cmk1*; así mismo se incluyeron en el análisis las secuencias disponibles en el GenBank provenientes de otros países y en el árbol filogenético de la *cmk1* se incluyó la secuencia XM_010764690 correspondiente a *Paracoccidioides brasiliensis* como grupo externo (Tabla suplementaria). La variabilidad genética se analizó para 343 secuencias de *S. schenckii* s.l con el gen de la *cal*, se determinó un 23% (155/651) de sitios polimórficos y 18% (119/651) informativos, los cuales correspondieron a 61 haplotipos diferentes ($p < 0.05$). La diversidad expresada como diversidad haplotípica (H_d), π y θ se calculó para todas las secuencias, los valores obtenidos son 0.86, 0.06 y 0.08 respectivamente. Mientras que para el gen *cmk1*, pocas secuencias estaban disponibles en el GenBank por lo que el análisis se realizó solo para 26 secuencias y mostro 13% (41/320) de sitios polimórficos y 9% (30/320) de sitios informativos, correspondientes a 17 haplotipos con valores de $\pi = 0.032$ y $\theta = 0.037$.

Tabla 1. Aislados reportados en este trabajo, origen, numero de accenso al GenBank y presentación clínica.

Aislado	Especie	Fuente	Numero de accenso al GenBank/EMBL/DDBJ		Presentación Clínica
			<i>cal</i>	<i>cmk</i>	
ATCC®26331™	<i>S. schenckii</i>	humano, Georgia, USA	KP644397	KP684125	No reportado
hgdmgg05	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644398	KP684126	Linfocutánea
hgdmgg09	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644399	KF483853	Linfocutánea
hgdmgg14	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644400	KF483858	Linfocutánea
hgdmgg15	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644401	KP684127	Fija
hgdmgg17	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644402	KF498623	Linfocutánea
hgdmgg18	<i>S. schenckii</i>	humano, Jal, Mx.	KP644403	KP684128	Fija
hgdmgg20	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644404	KP684129	Linfocutánea
hgdmgg21	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644405	KF498610	Linfocutánea
hgdmgg23	<i>S. schenckii</i>	humano, Zac, Mx.	KP644406	KF498611	Linfocutánea
hgdmgg24	<i>S. schenckii</i>	humano, SLP, Mx.	KP644407	KF498612	Linfocutánea
hgdmgg26	<i>S. schenckii</i>	humano, Pue, Mx.	KP644409	KF498613	Linfocutánea
hgdmgg27	<i>S. schenckii</i>	humano, Pue, Mx.	KP644410	KF498614	Linfocutánea
hgdmgg31	<i>S. globosa</i>	humano, Mic, Mx.		KP684136	Linfocutánea
hgdmgg33	<i>S. schenckii</i>	humano, Pue, Mx.	KP644411	KF498617	Linfocutánea
hgdmgg34	<i>S. schenckii</i>	humano, DF, Mx.	KP644412	KF483859	Linfocutánea
hgdmgg61	<i>S. globosa</i>	humano, DF, Mx.		KP684138	Linfocutánea
hgdmgg73	<i>S. schenckii</i>	humano, Qto, Mx.	KP644413	KF483857	Linfocutánea
hgdmgg78	<i>S. schenckii</i>	humano, Gto, Mx.	KP644414	KF483860	Linfocutánea
hgdmgg79	<i>S. schenckii</i>	humano, Gro, Mx.	KP644415	KP684133	Linfocutánea
hgdmgg80	<i>S. schenckii</i>	humano, Colombia	KP644416	KP684135	No reportado
hgdmgg81	<i>S. schenckii</i>	humano, Gto, Mx.	KP644417	KP684134	Diseminada
hgdmgg44	<i>S. globosa</i>	humano, Mor, Mx.	KP644418	KP684137	Fija
hgdmgg63	<i>S. globosa</i>	humano, EM, Mx.	KP644419	KP684139	Fija

USA= Estados Unidos de América; Mx=México, DF=Distrito Federal, Jal=Jalisco, Gue= Guerrero, Gto= Guanajuato, Mic= Michoacán, Mor=Morelia EM=Estado de México Pue=Puebla, Qto= Querétaro, SLP=San Luis Potosí, Zac=Zacatecas.

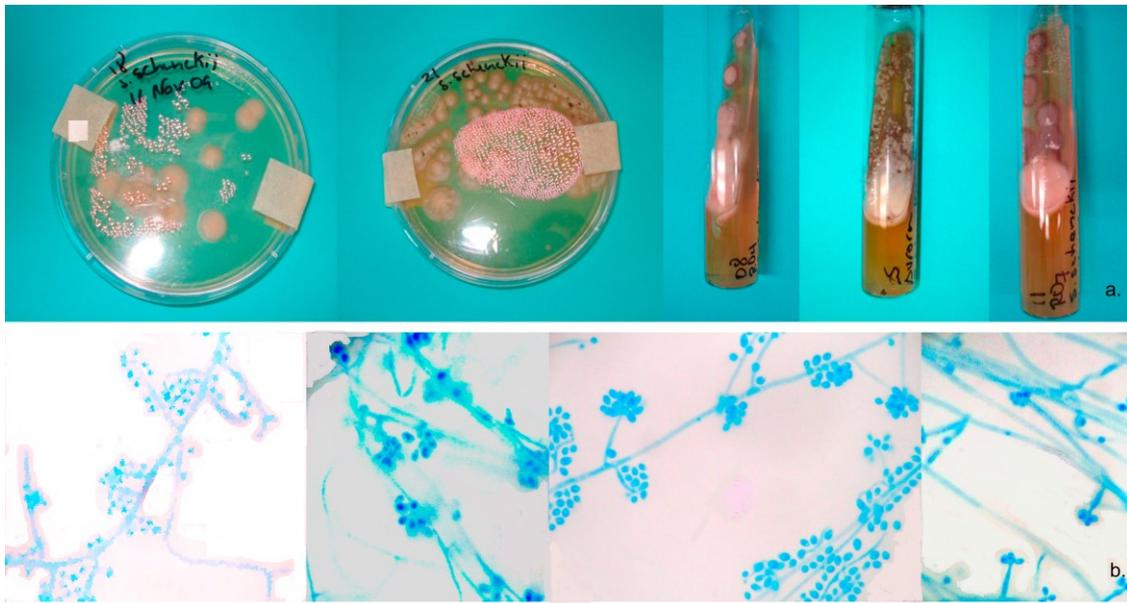


Figura 7. **a.** Imagen macroscópica de los cultivos, Inicialmente los cultivos presenta aspecto de levadura cremosa y brillante, a medida que envejecen adquieren un aspecto membranoso. **b.** Imagen microscópica obtenida con la técnica de micro-cultivo, la cual permite observar claramente las simpodulosporas.

En relación a los índices de diversidad genética para las diferentes especies de *Sporothrix* (*S. schenckii* s. str., *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. pallida* y *S. mexicana*) llama la atención que los valores de θ fueron siempre mayores a los de π . Además la D de Tajima para las secuencias de *cal* reporta valores negativos con significancia estadística para *S. globosa* (-2.20, $p < 0.01$), *S. brasiliensis* (-1.90, $p < 0.05$) y *S. schenckii* s. str. (-1.81, $p < 0.05$). Mientras que se encontraron valores significativo con el gen *cmk1* para *S. schenckii* s.l., y s. str., así como para los aislados mexicanos de *S. schenckii* s. str. (-1.96, -1.66, y -1.69 respectivamente y

todos con $p < 0.05$); siempre los valores de la D de Fu & Li fueron negativos y congruentes con la D de Tajima (Tabla 2).

En términos generales, la diferenciación entre las especies propuestas por Marimon et al.,³⁸ de *Sporothrix* utilizando el gen de la calmodulina muestra un amplio rango de valores de Hs (desde ~0.1 a ~0.9) con $F_{ST} > 0.69$ y $Nm < 0.11$ (Tabla 3).

Por otra parte el análisis de migración y flujo génico considerando las subpoblaciones *S. schenckii* s. str. conforme a la división geopolítica del mundo (países, Tabla 4), exhibe a los aislados mexicanos sin diferenciación genética y alto flujo génico en relación al grupo conformado por Brasil-Argentina-Bolivia ($F_{ST} = 0.06$ and $Nm = 3.91$); mientras que existe mayor diferenciación cuando se compara con Colombia, Venezuela o Perú ($F_{ST} \geq 0.18$ y $Nm \leq 1.13$). En contraste, se observó mayor diferenciación genética ($F_{ST} > 0.19$) sin movimiento de individuos ($Nm < 1$) entre las poblaciones cuando se analizaron las poblaciones de Estados Unidos de América (USA) con México, o USA y Sur América, así como Sur América y el grupo representado por Francia/África. Al contrario cuando México o Sur América se estudiaron en relación a Japón mostraron poca diferenciación genética y un alto flujo génico ($F_{ST} < 0.01$ y $Nm > 2$, Figura 8).

Tabla 2. Valores de π , θ , D de Tajima, D de Fu & Li para dos loci de *Sporothrix schenckii* s.l.

	Sit*	Sq ^a	Hp [□]	Hd	II	θ	SS	M	Tajima's D ^{&}	Fu & Li's D [€]
Cal										
<i>S. schenckii</i> s.l.	362	343	61	0.861	0.060	0.079	145	200	-0.81, $P>0.10$	-0.75, $P>0.10$
<i>S. schenckii</i> s. str.	537	172	61	0.943	0.015	0.035	99	109	-1.81, $P<0.05$	-3.31, $P<0.02$
<i>S. schenckii</i> s. str. aislados mexicanos	505	25	19	0.967	0.017	0.022	41	43	-0.88, $P>0.10$	-1.80, $P>0.10$
<i>S. brasiliensis</i>	555	72	8	0.547	0.001	0.004	12	12	-1.90, $P<0.05$	-5.65, $P<0.02$
<i>S. globosa</i>	460	61	10	0.495	0.003	0.010	22	22	-2.20, $P<0.01$	-4.27, $P<0.02$
<i>S. pallida</i>	532	21	7	0.710	0.005	0.007	14	15	-1.06, $P>0.10$	-1.26, $P>0.10$
<i>S. mexicana</i>	529	7	2	0.286	0.001	0.002	3	3	-1.36, $P>0.10$	-1.423, $P>0.10$
									Tajima's D[¥]	Fu & Li's D[¥]
<i>S. schenckii</i> s.l.	320	26	17	0.908	0.032	0.037	46	48	-1.96, $P<0.05$	-2.52, $P<0.05$
<i>S. schenckii</i> s. str.	321	21	14	0.867	0.010	0.017	19	20	-1.66, $P<0.05$	-2.51, $P<0.05$
Mexican isolates of <i>S. schenckii</i> s. str.	321	18	11	0.817	0.008	0.015	16	17	-1.69, $P<0.05$	-2.15, $P<0.10$

*Número total de sitios excluyendo gaps/datos perdidos; Número de secuencias; □Haplotipos, Hd= diversidad haplotípica (gen); € bajo el modelo de sitios finitos; SS = Número de sitios polimórficos (segregantes); m = Número total de mutaciones. & para las regiones codificantes; ¥ En un rango de ventanas no superpuestas entre nucleótido 179 y 278 del alineamiento. Dado que solo una secuencia de *S. brasiliensis* y 4 de *globosa* estaban disponibles para el análisis del gen *cmk1*, no se calcularon la TD y FD para este gen y dichas especies.

Tabla 3. Diferenciación genética y flujo génico entre las subpoblaciones de *Sporothrix schenckii* s. l. in el modelo de islas infinitas utilizando el gen de la *calmodulina* y el *cmk1*.

Población 1	Población 2	H _s	F _{ST}	N _m
<i>Cal</i>				
<i>S. schenckii</i> s. str.	<i>S. brasiliensis</i>	0.533	0.692	0.111
<i>S. schenckii</i> s. str.	<i>S. Mexicana</i>	0.861	0.980	0.005
<i>S. schenckii</i> s. str.	<i>S. pallida</i>	0.728	0.973	0.007
<i>S. schenckii</i> s. str.	<i>S. globosa</i>	0.743	0.914	0.023
<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 1	<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 2	0.863	0.702	0.106
<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 1	<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 3	0.909	0.645	0.137
<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 1	<i>S. schenckii</i> s. str. grupo 4	0.772	0.924	0.020
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. mexicana</i>	0.099	0.997	0.000
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. pallida</i>	0.158	0.990	0.002
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. globosa</i>	0.245	0.975	0.007
<i>S. mexicana</i>	<i>S. pallida</i>	0.485	0.972	0.007
<i>S. mexicana</i>	<i>S. globosa</i>	0.456	0.993	0.002
<i>S. pallida</i>	<i>S. globosa</i>	0.487	0.986	0.003
<i>S. globosa</i> cluster a	<i>S. globosa</i> cluster b	0.449	0.216	0.907
<i>cmk1</i>				
<i>Sporothrix schenckii</i> s. str.	<i>S. globosa</i>	0.847	0.931	0.018

H_s= heterocigosis, F_{ST}= coeficiente ancestría y N_m= flujo génico.

Cabe señalar que un grupo de secuencias originarias de Perú se diferencia de las provenientes de países vecinos como Colombia y Venezuela con un F_{ST} elevado (≥ 0.37) y un bajo N_m (≤ 0.42), estando por el contrario relacionadas con las provenientes del grupo Brazil-Argentina-Bolivia (F_{ST}=0.19 y

Nm>1; Tabla 4).

Tabla 4. Diferenciación genética utilizando el gen de la *calmodulina* entre *Sporothrix schenckii* s. str. provenientes de diferentes países, analizados bajo el modelo de islas infinitas.

	Países	Hs	Gst	Fst	Nm
Mexico	USA	0.81	0.1	0.51	0.23
Mexico	Brasil-Arg-Bol.	0.87	0.03	0.06	3.91
Mexico	Peru	0.93	0.03	0.23	0.85
Mexico	Venezuela	0.87	0.06	0.18	1.13
Mexico	Colombia	0.86	0.08	0.18	1.13
Mexico	France/Africa	0.96	0.09	0.22	0.86
Mexico	Japan	0.96	0.09	-0.13	∞
Brasil-Arg-Bol	USA	0.80	0.09	0.55	0.20
Brasil-Arg-Bol	Peru	0.85	0.04	0.19	1.06
Brasil-Arg-Bol	Venezuela	0.82	0.01	0.08	2.87
Brasil-Arg-Bol	Colombia	0.82	0.02	0.07	3.32
Brasil-Arg-Bol	France/Africa	0.84	0.1	0.23	0.83
Brasil-Arg-Bol	Japan	0.86	0.1	-0.09	∞
Peru	Japan	0.88	0.07	0.09	2.29
Peru	Venezuela	0.80	0.09	0.37	0.42
Peru	Colombia	0.79	0.11	0.37	0.42
Peru	France/Africa	0.88	0.09	0.03	7.8
Japan	Venezuela	0.68	0.11	0.01	12
Japan	Colombia	0.60	0.13	0.00	∞
Japan	France/Africa	0.00	0.00	0.08	2.87
Venezuela	Colombia	0.65	-0.02	-6	∞
Venezuela	France/Africa	0.67	0.11	0.46	0.29
Colombia	France/Africa	0.6	0.13	0.46	0.29

H_S= heterocigosis, G_{ST}= diferenciación genética, F_{ST}= coeficiente ancestría y Nm= flujo génico.

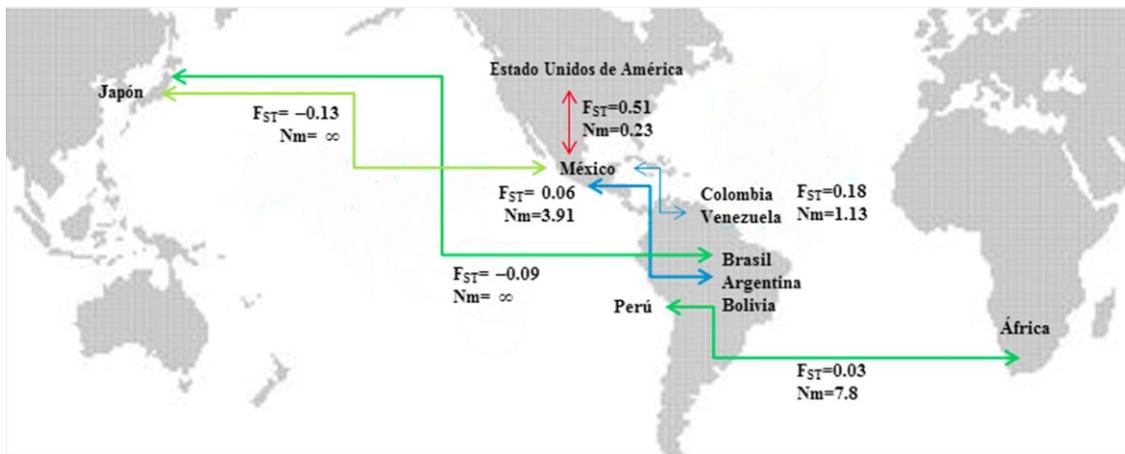


Figura 8. Mapamundi donde se indican los coeficiente de ancestría y flujo génico obtenidos con el gen de la *calmodulina* entre las subpoblaciones formadas de acuerdo al país de origen de *Sporothrix schenckii* s. str. En la figura se muestran las relaciones más destacadas de los aislados mexicanos en relación a los del resto del mundo.

Los arboles filogenético y de redes haplotípicas muestran seis clados correspondiente con *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. luriei*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* y *S. schenckii* s. str. (Figuras 9 y 10). 20 secuencias mexicanas, la colombiana (KP644416) y la obtenida de la cepa de referencia ATCC®26331TM (KP644397) se ubicaron en el conjunto correspondiente a *S. schenckii* s. str. Mientras que solo 2 secuencias pertenecientes a nuestros aislados (KP644418 y KP644419) se ubicaron en el clado que representa a *S. globosa*. Ninguno de nuestros aislados, se incorporó en el grupo de *S. mexicana*, cabe señalar que *S. mexicana* se aisló originalmente de planta mientras que todos nuestros aislados fueron obtenidos de pacientes (humanos con esporotricosis).

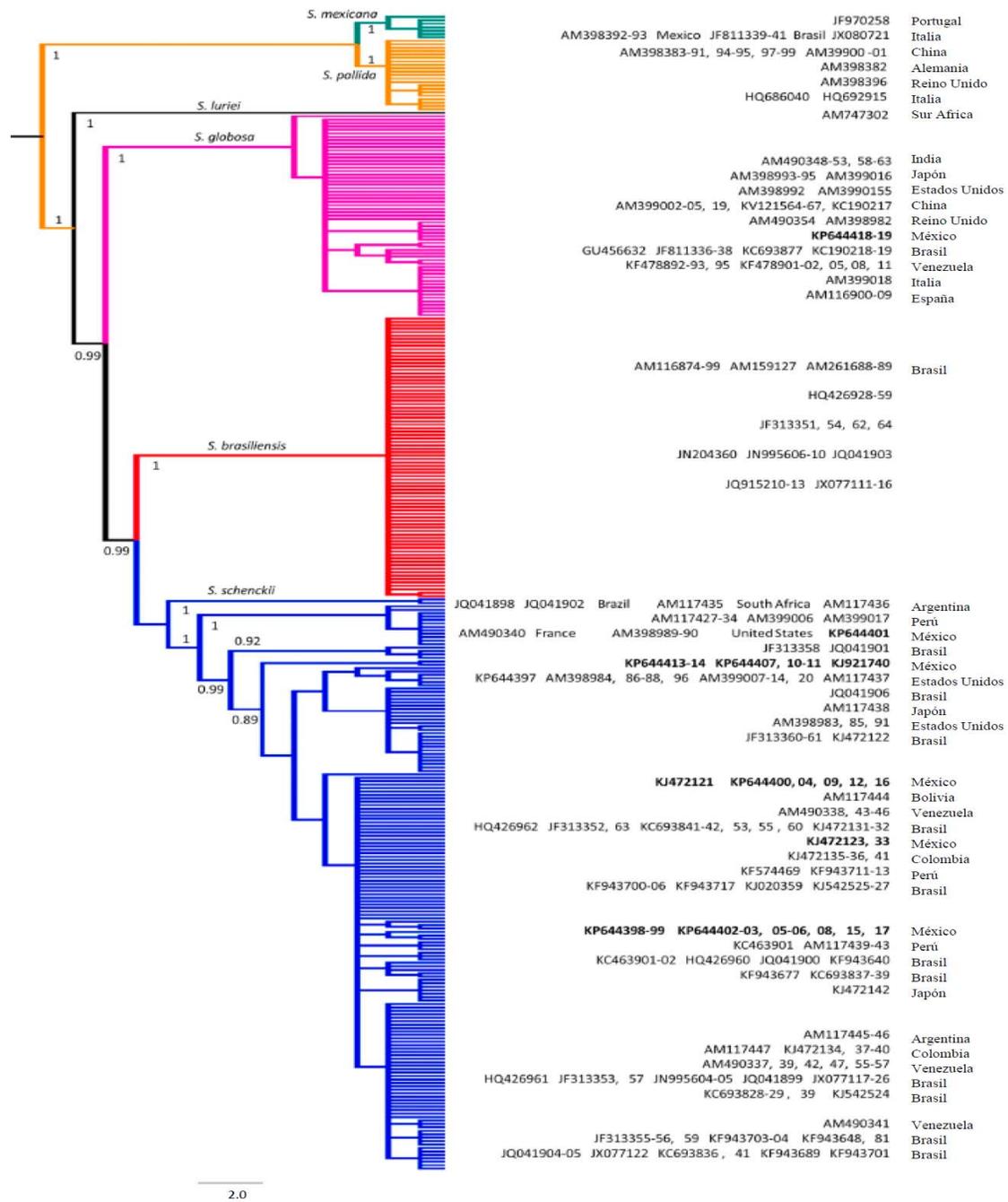


Figura 9. Árbol filogenético obtenido con las secuencias parciales de calmodulina. Se observan seis clados *Sporothrix mexicana* (verde), *S. pallida* (amarillo), *S. luriei* (negro), *S. globosa* (violeta), *S. brasiliensis* (rojo), *S. schenckii* s. str. (Azul).

Asimismo en el árbol de redes haplotípicas puede observarse que el agregado identificado como *S. schenckii* s. str., está formado por 4 subgrupos mientras que en el clado *S. globosa* encontramos 2 subpoblaciones (**a** y **b**). El conjunto **b**, está compuesto exclusivamente por aislados publicados recientemente en Venezuela, mientras el grupo **a**, de mayor tamaño comprende aislados de Europa, Asia, Norte y Sur América.

Algunos haplotipos de México y Perú (grupo 3 y 4 respectivamente, Figuras 10 y 11) muestran índices de diferenciación genética elevados ($F_{ST} \geq 0.645$, $N_m \leq 0.137$; Tabla 3 y 5) en relación a las otras subpoblaciones. Esos grupos se ubican en la figura 10 lejos del centro de dispersión ancestral (grupo 1), que incluye la mayoría de las secuencias provenientes de Sur América; mientras que el segundo conjunto se incluyen secuencias obtenidas en su mayoría de Estados Unidos de América, así como algunos aislados brasileños, japoneses y mexicanos; El conjunto 3 lo forman aislados de México en su mayoría, 2 aislados de Estados Unidos y el aislado francés; Por último el grupo 4, comprende secuencias provenientes de Perú, Sur África y Argentina. Para comprobar esta distribución se realizó un árbol de redes haplotípicas utilizando solo las secuencias de *S. schenckii* s. str. (Figura 11), en este se observa 5 grupos.

En relación a las subpoblaciones de *S. globosa*, la distancia fue menor entre ellas, sin embargo suficiente para considerar 2 poblaciones independientes ($F_{ST} = 0.22$ y $N_m = 0.91$, tabla 3).

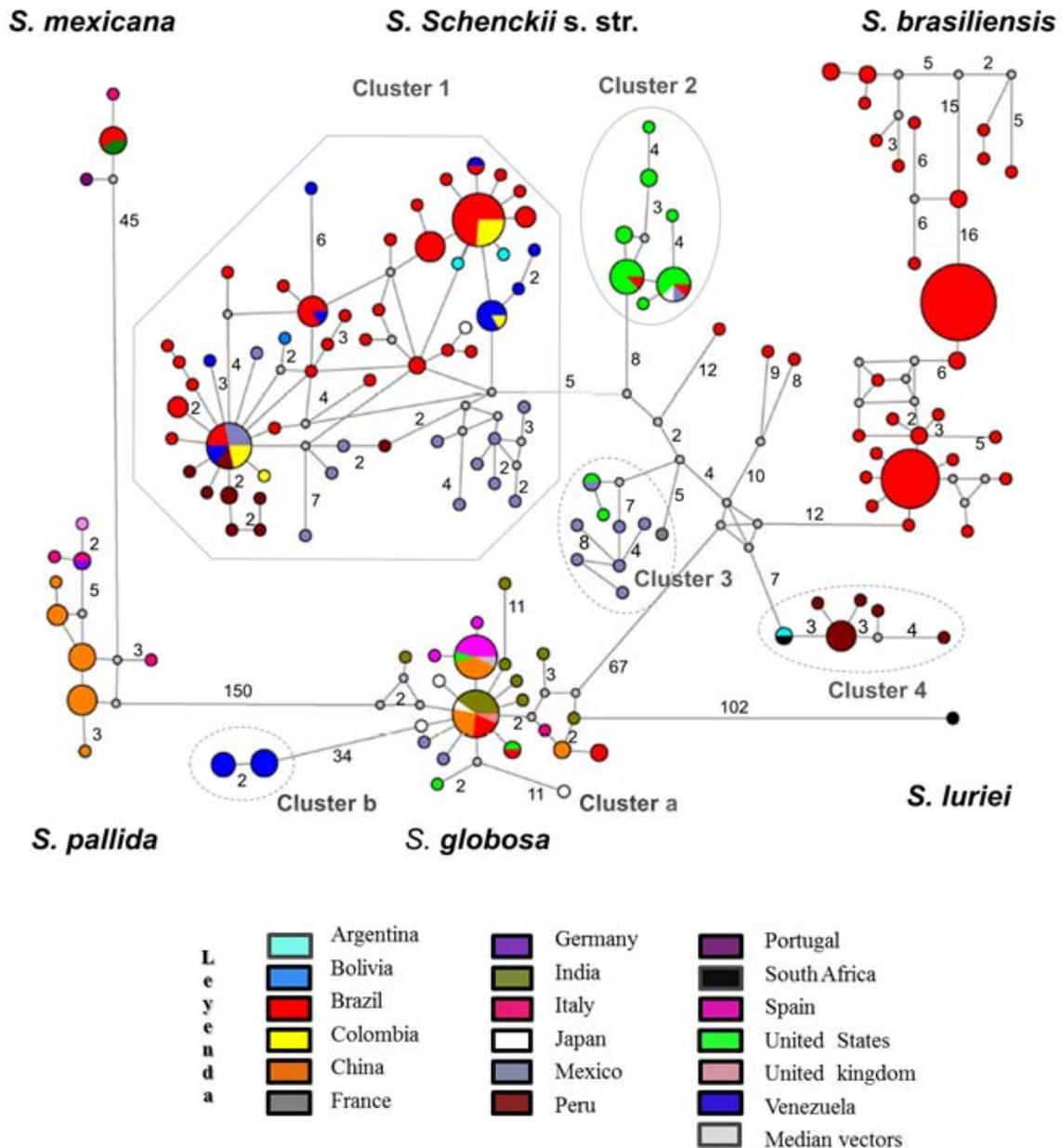


Figura 10. Árbol de redes haplotípicas de *S. schenckii* s. l. Los círculos de mayor tamaño representan los haplotipos ancestrales. Los colores simbolizan los países de origen o los vectores intermedios. Los números indican el número de mutaciones entre los haplotipos o entre un haplotipo y un vector intermedio. La ausencia de número indica que solo ocurrió una mutación entre los haplotipos. Se observan clados que representan las seis especies mencionadas, así como 4 grupos para *S. schenckii* s. str., y 2 clusters para *S. globosa*.

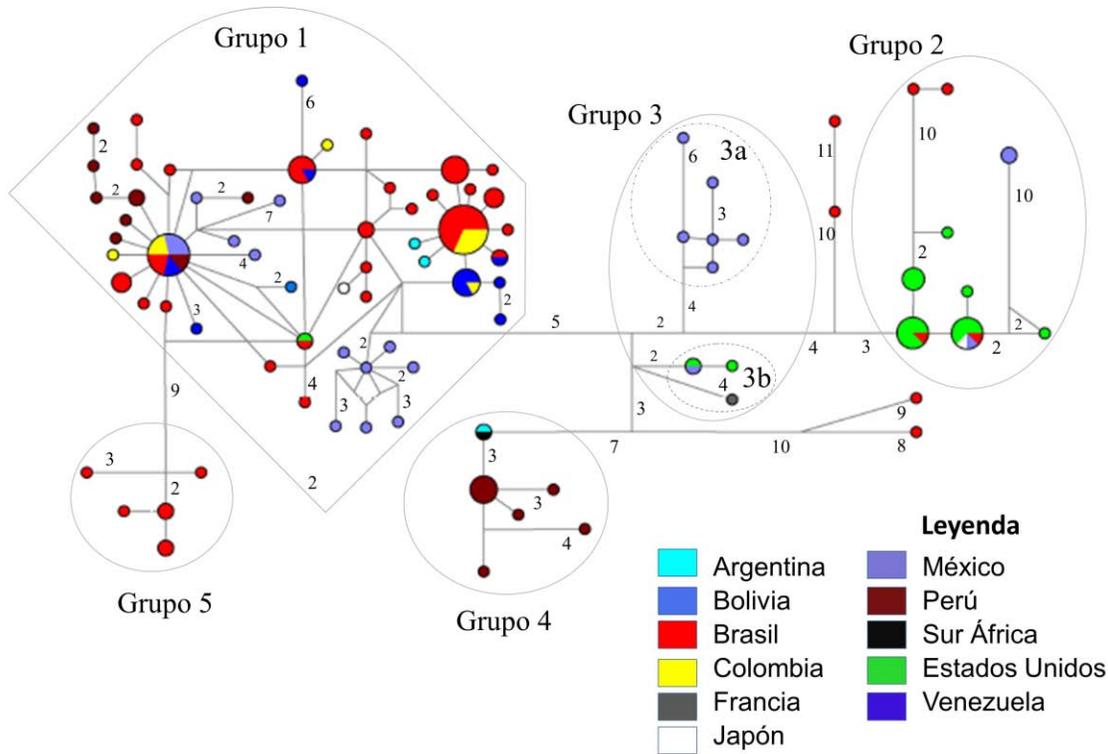


Figura 11. Árbol de redes haplotípicas de *S. schenckii* s. str. Los círculos de mayor tamaño representan los haplotipos ancestrales. Los colores simbolizan los países de origen. Los números indican el número de mutaciones entre los haplotipos o entre un haplotipo y un vector intermedio. La ausencia de número indica que solo ocurrió una mutación entre los haplotipos. Se observan cinco grupos que representan subpoblaciones de *S. schenckii* s. str.

Los índices de diferenciación genética y flujo génicos muestra separación entre todas las subpoblaciones, con excepción del análisis entre el grupo 1 y el 5 que muestra baja diferenciación con elevado flujo génico ($F_{ST}=0.024$ y $Nm=10.16$,

Tabla 5), es decir estos grupos se comportan en realidad como una población única. Con la intención de conocer la distribución geográfica de cada conjunto se identificó el lugar de origen de cada aislado en el mapa mundial, de acuerdo a la información disponible en el GenBank, y se observó la distribución espacial de cada subpoblación (Figura 12).

Tabla 5. Diferenciación genética entre las subpoblaciones de *S. schenckii* s. str. En el modelo de islas infinitas.

Población 1	Población 2	Hs	G _{ST}	F _{ST} *	Nm [□]
Grupo 1	Grupo 2	0.808	0.109	0.851	0.042
Grupo 1	Grupo 3	0.877	0.037	0.543	0.210
Grupo 1	Grupo 3a	0.871	0.052	0.799	0.063
Grupo 1	Grupo 3b	0.873	0.063	0.630	0.146
Grupo 1	Grupo 4	0.845	0.072	0.885	0.032
Grupo 1	Grupo 5	0.871	0.027	0.024	10.16
Grupo 2	Grupo 3	0.612	0.171	0.693	0.111
Grupo 2	Grupo 3a	0.546	0.183	0.892	0.030
Grupo 2	Grupo 3b	0.527	0.160	0.863	0.039
Grupo 2	Grupo 4	0.518	0.292	0.956	0.012
Grupo 2	Grupo 5	0.558	0.187	0.890	0.031
Grupo 3	Grupo 4	0.716	0.154	0.777	0.072
Grupo 3	Grupo 5	0.872	0.074	0.584	0.178
Grupo 3a	Grupo 3b	0.811	0.101	0.788	0.067
Grupo 4	Grupo 5	0.643	0.186	0.912	0.024

Heterocigosis Inter-población (Hs), coeficiente de ancestría (F_{ST}), diversidad del gen (G_{ST}), índice de migración (Nm). *

En los análisis realizados con el gen *cmk1* solo se evidencian 3 clados, los aislados mexicanos se ubican en el conjunto correspondiente a *S. schenckii* s. str., o en el grupo de *S. globosa* y mientras la secuencia de referencia correspondiente a *S. brasiliensis* se ubica de forma independiente en el árbol filogenético obtenido con el gen *cmk1* (Figura 13), en concordancia con lo observado previamente en los análisis con calmodulina.

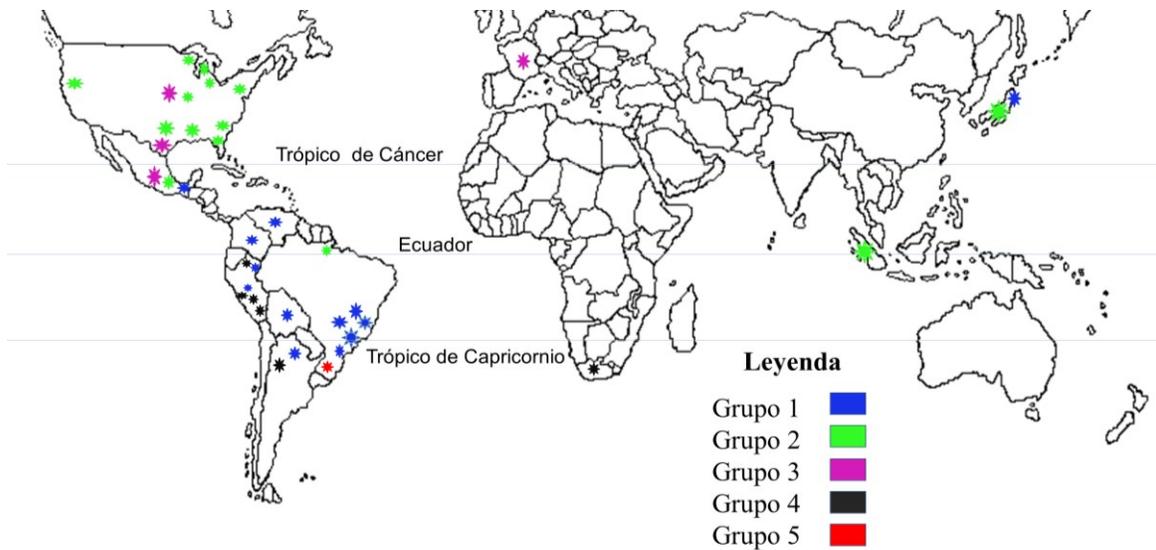


Figura 12. Distribución geográfica de las 5 subpoblaciones de *S. schenckii* s. str. Definidas con el gen de calmodulina. El grupo 1 (azul) se distribuye entre en Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio imperando en Sur América y Japón; El grupo 2 (verde) se ubica por arriba del Ecuador, especialmente arriba del trópico de Cáncer en Norte América; Grupo 3 (lila) se encuentra en USA y Francia; el grupo 4 (negro) se encuentra por debajo del ecuador en Argentina, Perú y Sur África; grupo 5 (rojo) solo se presenta en el sur de Brasil.

En el mapa de la figura 12 se puede observar la distribución limitada a ciertas regiones de cada grupo.

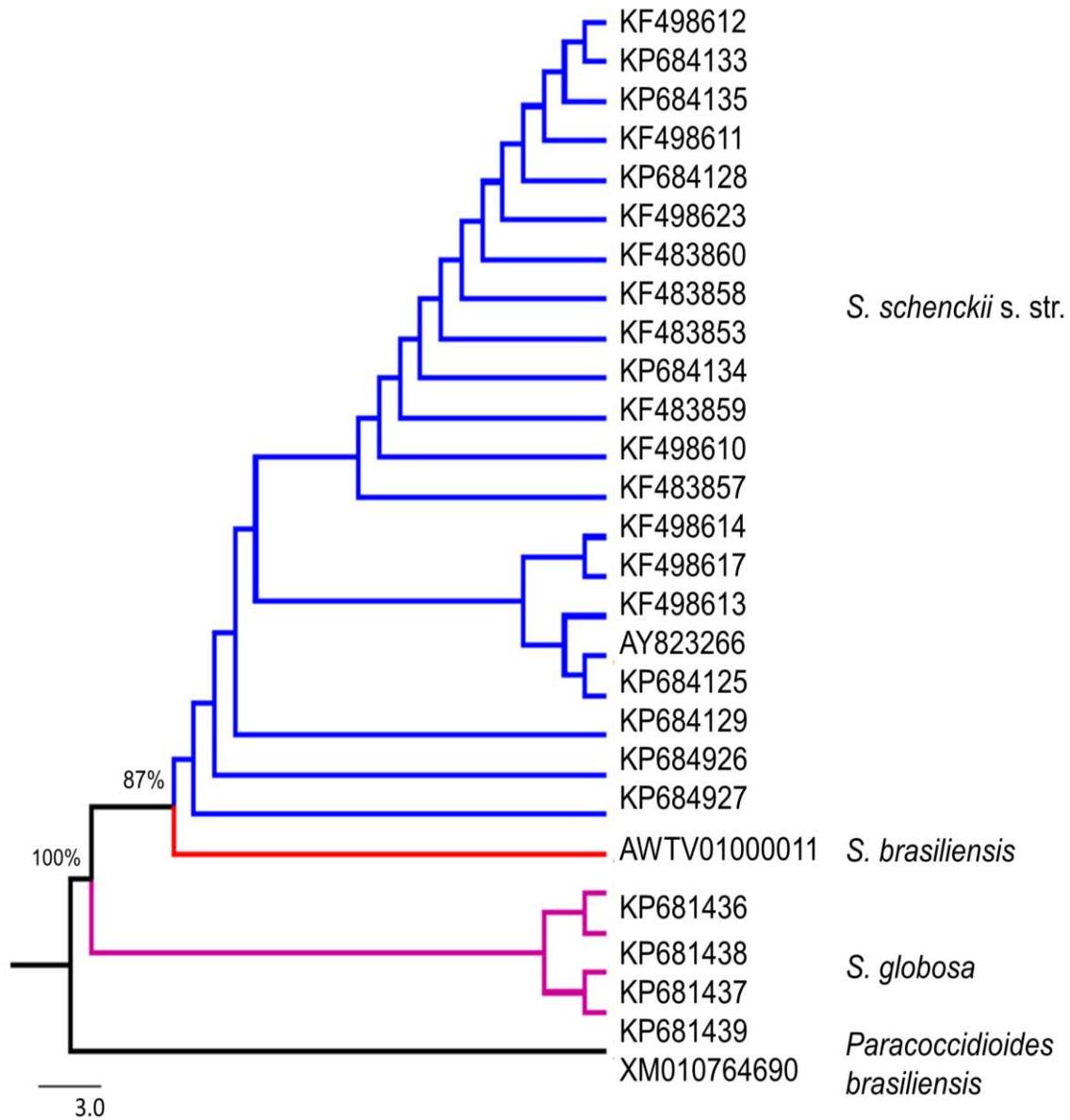


Figura 13. Árbol filogenético realizado con el gen *cmk1*. Se observa como la mayoría de los aislados mexicanos conjuntamente con la secuencia de referencia proveniente de puerto Rico se ubican en el clado correspondiente a *S. schenckii* s. str., mientras que los aislados identificados con el gen de la calmodulina como *S. globosa* conforma un clado independiente, de igual manera la secuencia de referencia perteneciente a *S. brasiliensis*.

10. DISCUSIÓN

Si bien algunos aislados mexicanos han sido incluidos en estudios internacionales de filogenia,^{33 85} esta es la primera vez que se estudia la estructura de genética poblacional de aislados mexicanos de *S. schenckii* obtenidos de pacientes con esporotricosis, utilizando las secuencias parciales de los genes *cal* y *cmk1*. Con el DNA mitocondrial se reportó la presencia de diferentes subtipos en México con la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Los aislados mexicanos se agruparon con aislados provenientes de Sur África, así como de América del norte, central y del Sur, conformando el grupo A de Ishizaki.^{28 31} Posteriormente se demostró que el grupo A de Ishizaki corresponde a *S. schenckii* s. str. Por otra parte, 2 muestras obtenidas del medio ambiente en México se definieron como una nueva especie denominada *S. mexicana*,³⁴ mientras que la presencia de *S. globosa* en México fue reportada en aislados de origen clínico por Madrid y col.⁸⁶ En este estudio encontramos que 81% de los aislados mexicanos provenientes de muestras clínicas pertenecen a *S. schenckii* s. str., mientras que el 19% restante fue identificado como *S. globosa*.

El gen *cmk1* se identificó en diversos hongos siendo al igual que otras cinasas, útil para su reconocimiento y análisis filogenéticos.^{87 88} Desafortunadamente, el número de secuencias disponibles en el GenBank para las especies del género *Sporothrix* para el gen *cmk1* es muy limitado. Más aun, no

existían secuencias de *cmk1* pertenecientes a *S. globosa* disponibles previamente a las obtenidas de nuestros aislados. Por tanto las secuencias publicadas en este trabajo y presentadas en el GenBank, son las primeras. Se demostró que este gen es igualmente útil para la identificación de las 3 especies patógenas más frecuentes del complejo *S. schenckii* (*S. schenckii* s. str., *S. brasiliensis* y *S. globosa*) y puede utilizarse como un marcador molecular de polimorfismo. El producto de este gen es una proteína denominada cinasa dependiente de calcio/calmodulina (Ca²⁺/CaMKs), que desempeña un papel destacado en la adaptación al medio ambiente en condiciones de estrés.^{89 90} Participa en diferentes procesos, incluyendo respuesta a estrés oxidativo, dimorfismo, virulencia y tolerancia a drogas.⁴³ Consideramos que las diferencias en los perfiles de susceptibilidad antifúngica en las especies crípticas del complejo *S. schenckii*,⁹¹ podrían estar asociadas con las diferencias en la proteína Ca²⁺/CaMKs encontradas entre *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. schenckii* s. str.

En hongos dimórficos como los pertenecientes al complejo *S. schenckii*, la habilidad para sobrevivir en las condiciones fisiológicas del huésped es primordial para la patogenicidad y por lo tanto impacta en la selección genética.^{92 93} De acuerdo a la teoría neutral se espera que el valor de π sea igual a θ ;⁹⁴ Sin embargo nuestros datos revelan valores de θ mayores a los valores de π , en *S. schenckii* s. str., *S. globosa* y *S. brasiliensis*, lo que habla en contra de la neutralidad. Valores negativos de TD y FD, sostienen esta declaración y también sugieren selección direccional o purificadora, o expansión de la población.⁷⁷

En relación a los aislados mexicanos y basados en el árbol de redes haplotípicas y el análisis de genética de poblaciones, concluimos que la mayoría de los haplotipos presentes en México se relacionan con los haplotipos suramericanos más que con los ubicados en norte América. Lo que descarta a los Estados Unidos como la principal fuente de introducción de *S. schenckii* a México.

Por otra parte investigaciones recientes revelaron diferencias en los perfiles de virulencia, secreción de proteínas e inmunogenicidad entre aislados de *S. schenckii* s. str.⁸⁸ Nuestros datos revelan alta diversidad genética en *S. schenckii* s. str., y sugieren que esta especie se encuentra en un proceso de diferenciación y expansión. Identificamos cinco subgrupos de haplotipos; de los cuales los conjuntos 1 y 2 presentan una topografía general congruente con los estudios previos. Mientras que la subpoblación 3 está formada principalmente por aislados mexicanos. El grupo 4 lo integran haplotipos provenientes de Argentina, Perú y África; por el contrario, el grupo 5 se encuentra limitado al sur de Brasil. La formación de los grupos observados en el árbol de redes se soporta con los valores de F_{ST} y Nm , que también indican la presencia de más de un subtipo de *S. schenckii* s. str., en México (1, 2 y 3), Brasil (1, 2 y 5), Perú (1 y 5) y Estados Unidos de América (2 y 3), lo cual podría tener implicaciones clínicas y epidemiológicas. Finalmente, la presencia de los grupos 3 y 4 de *S. schenckii* s. str., en México y Perú respectivamente, plantea la interrogante de si estos deberían considerarse como variantes diferentes dada la enorme distancia

genética entre ellos y el conjunto 1, incluso mayor que la distancia existente entre especies reconocidas como *S. brasiliensis* y *S. schenckii* s. str.

Con objeto de explicar estos hallazgos, consideramos que algunos polimorfismos genéticos pueden desarrollarse y ser seleccionados en hospederos preferenciales, como por ejemplo *S. brasiliensis*, presente en huéspedes felinos.^{39 95} Publicaciones recientes sostienen la expansión clonal de *S. brasiliensis*, evidencia un único “tipo sexual” (*mating type*) asociado con la epidemia de *S. brasiliensis*, en la cual se encontraron afectados tanto felinos como humanos.^{36 96 97} Estos datos apoyan la hipótesis de un proceso de selección purificadora, seguido por expansión clonal de la población. Por otra parte, Zhang et al.,⁹⁸ revisaron la información epidemiológica de 14000 casos, y destacan la asociación entre la infección por *S. brasiliensis* y la transmisión por mamíferos, en contraste con la transmisión de *S. globosa* a través de material orgánico como plantas en descomposición; señalan que estas especies difieren en virulencia, transmisión y tipo de epidemia que originan. Con base en lo antes señalado y considerando los resultados del análisis filogenético y de genética de poblaciones realizado, concluimos que *S. schenckii* s. str., *S. globosa*, y *S. brasiliensis* se originaron de un ancestro común; la alta variabilidad genética de *S. schenckii* s. str., se asocia a la reproducción sexual y correlaciona con su capacidad de sobrevivir en diferentes ambientes, incluyendo diversos animales y plantas, mientras que *S. brasiliensis* y *S. globosa* parecen no presentar reproducción sexual y se encuentra limitadas a pocos hospederos. En conclusión

la distribución global y su poca variabilidad genética (expansión clonal rápida) de *S. globosa*, podría estar asociada con el intercambio de productos orgánicos en el mercado mundial actual; por el contrario la restricción de *S. brasiliensis* a Brasil se correlaciona con la baja movilidad del gato doméstico, el cual representa un vector lento de dispersión. Mientras que las poblaciones identificadas en *S. schenckii* s. str., podrían estar asociadas a nichos ecológicos y hospederos específicos aun por identificar.

La especiación es un proceso evolucionario fundamental, que puede variar ampliamente dependiendo del organismo que se considere. La genética es un criterio importante pero no absoluto para esclarecer los asuntos de especiación en hongos. En el reino fungi más que en otros reinos, el concepto de especie se basa en criterios biológicos, morfológicos, ecológicos y filogenéticos los cuales pueden ser controversiales y conflictivos.⁹⁹ En general se considera que una especie nueva emerge cuando un miembro de una especie existente adquiere una función (por mutación o recombinación) que le permite establecerse en un nuevo nicho ecológico, fundando una población independiente. Teniendo en cuenta lo anterior es necesario estudiar y caracterizar los grupos antes mencionados en busca de evidencias que apoyen el proceso de especiación.

11. TABLA SUPLEMENTARIA

Datos de las secuencias obtenidas del *GenBank/EMBL/DDBJ international data base* incluidas en los análisis de genética de poblaciones, las cuales fueron obtenidas en estudios previos.

Especies	País de origen	Fuente de aislamiento	Numero de ascenso al GenBank/EMBL/DDBJ	Referencias
<i>S. brasiliensis</i>	Brasil	Humano, piel	<i>calmodulin</i> AM116874-75	33, 38
		Humano, piel	AM116877	33, 38
		Humano, piel	AM116879-80	33, 38
		Humano, piel	AM116883-90	33, 38
		Humano, piel	AM116892	33, 38
		Humano, piel	AM116894-99	33, 38
		Polvo domiciliario	AM116876	33, 38
		Líquido cefalorraquídeo	AM116878	33, 38
		Humano, esporotricosis diseminada	AM116881	33, 38
		Humano, sangre	AM116882	33, 38
		Humano, biopsia de	AM116891	33, 38
		Humano, esputo	AM116893	33, 38
		Humano, piel	AM159127	33, 38
		Muestra clínica	AM261688-89	33, 38
		Muestra clínica	HQ426928-59	
		NR	JF313351	x
			JF313354	
			JF313362	
			JF313364	
		Humano, válvula mitral	JN204360	87
NR	JN995606-10	87		
Muestra clínica	JQ041903	92		

^xTeixeira, M, Lopes-Bezerra LM. Phenotypic aspects of *Sporothrix* species complex during fungal-host Interaction Unpublished. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF313351>).

<i>S. brasiliensis</i>	Brasil	Muestra clínica	JQ915210-13	xi
		<i>Homo sapiens</i>	JX077111-16	
<i>S. globosa</i>	Brasil	Humano, piel	GU456632	100
		Clínica	JF811336-38	42
			KC693877	43
<i>S. globosa</i>	China	Trigo	AM399002	38
<i>S. globosa</i>	China	Caña	AM399003-04	38
		Suelo	AM399005	38
		Medio ambiente	AM399019	38
		Muestra clínica	KC121564-67	34
			KC190217-19	34
<i>S. globosa</i>	India	Clínica	AM490348-53	38
<i>S. globosa</i>	Italia	Humano, nódulo cutáneo	AM490358-63	38
<i>S. globosa</i>	Japón	Clínica	AM399018	38
<i>S. globosa</i>	México	Humano, esporotricosis Linfocutánea	AM398993-95, AM399016	38
<i>S. globosa</i>			FM179331	88
<i>S. globosa</i>	España	Humano, dedo de la mano	AM116901	33, 38
		Humano, brazo	AM116902 AM116903	33, 38
		Humano, muñeca	AM116905	33, 38
		Humano, mano	AM116906 AM116909	33, 38
		Humano, pierna	AM116907	33, 38
		Humano, cara	AM116908	38
		<i>S. globosa</i>	Reino Unido	Clínica
<i>S. globosa</i>	Estados Unidos de Norte América	Clínica	AM398982	38
		Clínica	AM398992	38
		Clínica	AM399015	38
<i>S. globosa</i>	Venezuela	Cutáneo fija	KF478892-93	101
		Cutáneo fija	KF478895	101
		Cutáneo fija	KF478901-02	101
		Cutáneo fija	KF478904-05	101

^{xi} Oliveira MM, et al. Feline sporotrichosis and familiar outbreak caused by *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo State, southeast region of Brazil. Unpublished.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ915210>).

<i>S. globosa</i>	Venezuela	Cutáneo fija	KF478908	101
		Cutáneo fija	KF478911	101
<i>S. mexicana</i>	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	JF811339-41	42
<i>S. mexicana</i>	Italia	Perro con cáncer	JX080721	87
<i>S. mexicana</i>	México	Suelo	AM398392 AM398393	38
<i>S. mexicana</i>	Portugal	Esporotricosis linfocutánea humana	JF970258	41
<i>S. pallida</i>	China	Suelo	AM398383	38
		Suelo	AM398385	38
		Suelo	AM398394-95	38
		Caña	AM398384	38
		Caña	AM398386-89 AM398391	38
		Caña	AM399000	38
		Trigo	AM398390	38
		NR	AM399001	38
		Suelo Comercial	HQ686039	102
<i>S. pallida</i>	Italia	Suelo Comercial	HQ686040	102
<i>S. pallida</i>	Alemania	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	AM398382	33, 38
<i>S. pallida</i>	Reino Unido	Suelo	AM398396	38
<i>S. pallida</i>	España	Medio ambiente	HQ692915	102
<i>S. schenckii</i>	Argentina	Humano, esporotricosis diseminada	AM117436	38
		Humano, nódulo linfático cutáneo	AM117445	38
	Argentina	Humano, biopsia cutánea	AM117446	38
	Bolivia	Humano, nódulo	AM117444	38
	Brasil	Muestra clínica	HQ426960-62	35
		NR	JF313352-53	xii
		NR	JF313355-58	
		NR	JF313359	
		NR	JF313360-61	
		NR	JF313363	
		NR	JN995604-05	87
		<i>Homo sapiens</i>	JQ041898-902	93
		<i>Homo sapiens</i>	JQ041904-06	93
		<i>Homo sapiens</i>	JX077117-26	42
	Muestra clínica	KC463901-02	103	
	<i>Felis catus</i>	KC693828	43	

^{xii} Teixeira, M., Lopes-Bezerra, L.M. Phenotypic aspects of *Sporothrix* species complex during fungal-host Interaction Unpublished. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuc core/JF313352>).

<i>S. schenckii</i>	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	KC693829	43		
		<i>Homo sapiens</i>	KC693836-39	43		
		<i>Homo sapiens</i>	KC693841-42 KC693853	43		
		<i>Homo sapiens</i>	KC693855	43		
		<i>Homo sapiens</i>	KC693860	43		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943640	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943648	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943677	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943681	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943689	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943700-06	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943717	36		
		<i>Homo sapiens</i>	KJ020359	36		
		Clínica	KJ472131-32	87		
		<i>Homo sapiens</i>	KJ542524-27	36		
		<i>S. schenckii</i>	Colombia	Esporotricosis humana	AM117447	33, 38
				Clínica	KJ472134	87
Clínica	KJ472137-40			87		
<i>S. schenckii</i>	France	NR	AM490340	38		
<i>S. schenckii</i>	Japón	NR	AM117438	38		
		Clínica	KJ472142	85		
<i>S. schenckii</i>	México	Suelo	KJ472121 KJ472122	85		
		Planta de rosas	KJ472123	85		
		Clínica	KJ472133	85		
		Humano, esporotricosis linfocutánea	KJ921740	93		
		Humano, esporotricosis	AM117427-34	33, 38		
<i>S. schenckii</i>	Perú	Humano esporotricosis	AM117439-43	33, 38		
		Clínica	AM399006 AM399017	38		
		<i>Homo sapiens</i>	KF574469	97		
		<i>Homo sapiens</i>	KF943711-13	36		
		NR	AM117435	33, 38		
<i>S. schenckii</i>	Sur África	NR	AM117435	33, 38		
<i>S. schenckii</i>	Estados Unidos de Norte América	Clínica	AM117437	38		
		Clínica	AM398983-91 AM398996	38		
		Clínica	AM399007-14	38		
		Clínica	AM399020	38		
		Clínica	AM490337-39	38		
		Clínica	AM490341-47	38		
<i>S. schenckii</i>	Venezuela	Clínica	AM490337-39	38		
		Clínica	AM490341-47	38		

<i>S. schenckii</i>	Venezuela	Clínica	AM490355-57	38
<i>S. luriei</i>	Sur África	Humano, infección craneal	AM747302 (ATCC 18616)	104
<i>cmk1</i>				
<i>S. brasiliensis</i>	Brasil	Felino, lesión cutánea de esporotricosis	AWTV01000011 (ATCC:MYA-4823)	97
<i>S. schenckii</i>	Puerto Rico	Aislado de origen clínico	AY823266 (ATCC 58251)	48
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		Humano	XM_010764690	105

12. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Hektoen L, Perkins CF. refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J Exp Med*. 1901; 5:77-89.
- ² Nicot J, Mariat F. Caractères morphologiques et position systématique de *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose humaine. *Mycopath Mycol appl*. 1973; 49:53-65.
- ³ Bastos M, Macedo D, Pacheco T, et al. Endemic of zoonotic sporotrichosis. Profile of cases in children. *Ped Infec Dis J*. 2008; 27:246-250.
- ⁴ Bastos M, de Oliveira A, Gutierrez M, et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol*. 2003; 42:677-681
- ⁵ Feeney K, Arthur I, Whittle A, Altman S, Speers D. Outbreak of sporotrichosis, Wester Australia. *Emer Infec Dis*. 2007; 13:1228-1231.
- ⁶ O'Reilly L, Altman S. Macrorestriction Analysis of Clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2547-2552.
- ⁷ Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, et al. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J Infect Dis*. 1997; 176:499-504.
- ⁸ Orofino R, Celso K, Damasco P, et al. Infectious arthritis as the single manifestation of sporotrichosis: Serology from serum and synovial fluid samples as an aid to diagnosis. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25:54-56.
- ⁹ Gordhan A, Ramdial P, Morar N, Devi S, Aboodaker J. Disseminated cutaneous sporotrichosis: a marker of osteoarticular sporotrichosis masquerading as gout. *Int J Dermatol*. 2001; 40:717-719.
- ¹⁰ Schubach A, Bastos M, Pacheco T, et al. Primary Conjuntival Sporotrichosis. *Cornea*. 2005; 24:491-493.
- ¹¹ Zhang Z, Liu X, Lv X, Lin J. Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2011; 172:439-446.
- ¹² Kosinski R, Axelrod P, Rex J, Burday M, Sivaprasad R, Wreiole A. *Sporothrix schenckii* fungemia without disseminated sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:501-503.
- ¹³ Tomoko M, Pinheiro A, Baby C, Wernwe B, Filus J, Queiroz F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev Brasil Med Trop*. 2002; 35:655-659.
- ¹⁴ Kong X, Xiao T, Wang Y, Chen H. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:1077-1081.

- ¹⁵ Arrillaga-Moncrieff I., Capilla J, Mayayo E, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:651-655.
- ¹⁶ Caspeta L, Nielsen J. Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *mBio* 2015; 6:e00431-15.
- ¹⁷ Da Rosa A, Scroferneker M, Vettorato R, et al. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52:451-459
- ¹⁸ Schenck B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Johns Hopkins Hosp Bull.* 1898; 9:286-290.
- ¹⁹ Devi KR, Devi MU, Singh TN, et al. Emergence of sporotrichosis in Manipur. *Ind J Med Microbiol.* 2006; 24:216-219.
- ²⁰ Campos P, Arenas R, Coronado H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol.* 1994; 33:38-41.
- ²¹ Coti I. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia.* 1989; 108:113-116.
- ²² Evangelista M, Almeida R, Meideiros M, Gutierrez M, Zancope R. Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 2011; 172:257-267.
- ²³ Espinosa-Texis A, Hernandez-Hernandez F, Lavallo P, Barba-Rubio J, López-Martínez R. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. *Gac Méd Méx.* 2001; 137:111-116.
- ²⁴ Mayorca-Rodríguez J, Barba-Rubio J, Muñoz-Estrada V et al. Esportricosis en el estado de Jalisco, estudio clínico-epidemiológico (1960-1996). *Dermatol Rev Mex.* 1997; 41:105-8.
- ²⁵ Arenas R. Micología Médica ilustrada. Segunda edición. *McGraw-Hill Interamericana.* 2003.
- ²⁶ Barhill R, Crowson N. Dermatopathology. Second Edition. *McGraw-Hill.* 2004.
- ²⁷ Bonifaz A. Micología Médica Básica. Segunda Edición. *Mendez Editores.* 2005; 198-199.
- ²⁸ Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions of *Sporothrix schenckii*. *J Med Mycol.* 2004; 45:165-175.
- ²⁹ De-Beer W, Harrington, Vismer H, Wingfield B, Wingfield M. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia.* 2003; 95:434-411.
- ³⁰ Neyra E, Fonteyne P, Swinne D, Fauche F, Bustamante B, Nolard N. Epidemiology of Human Sporotrichosis Investigated by Amplified Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:1348-1352.
- ³¹ Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Miyaji M, Nishimura K, Fernandez J. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in Costa Rica. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34:71-73.

- ³² Mas-Coma S, Bargues M. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vector inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* 2009; 110:112-36.
- ³³ Marimon R, Gene J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3251–3256.
- ³⁴ Yu X, Wan Z, Zhang Z, Li F, Li R, Liu X. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. *Mycopathologia.* 2013; 176, 67–74.
- ³⁵ Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 2011; 172:257–267.
- ³⁶ Rodrigues AM, Hoog, GS, Zhang Y, Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microb Infect.* 2014; 3:e32.
- ³⁷ Rodrigues AM, Cruz R, Fernandes GF, De Hoog GS, De Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.* 2015; 1-19. (article in press)
- ³⁸ Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton D, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3198-3206.
- ³⁹ Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, Hoog GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers.* 2014; 66:153-165.
- ⁴⁰ Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015; 53:3-14.
- ⁴¹ Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg infect Dis.* 2011; 17:1975-1976.
- ⁴² Rodrigues AM, Hoog S, Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol.* 2013; 51:405–412.
- ⁴³ Rodrigues AM, de-Melo-Teixeira M, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2281.
- ⁴⁴ López-Romero E, Reyes-Montes M, Perez-Torres A, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, and emerging health problem. *Future Microbiol.* 2011; 6:85-102.
- ⁴⁵ LéJohn H. Structure and Expression of Fungal Calmodulina Gene. *J Biol Chem.* 1989; 264:19366-19372.
- ⁴⁶ Houbraken J, Visagie CM, Meijer M, et al. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol.* 2014; 78:373-451.

- ⁴⁷ Risपालi N, Soanes D, Ant C, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signaling components in plant and human pathogenic fungi. *Fun Gen Biol.* 2009; 49:287-298
- ⁴⁸ Valle-Aviles L, Valentin-Berros S, González-Mendez RR, Rodríguez-Del Valle N. Functional, genetic and bioinformatics characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol.* 2007; 7:107–119.
- ⁴⁹ Arenas R, Miller D, Campos-Macias P. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. *Int J Dermatol.* 2007; 46:177-179.
- ⁵⁰ Mora-Cabrera M, Alonso RA, Ulloa-Arvizu R, Torres-Guerrero H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA análisis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Med Mycol.* 2001; 39:439-444.
- ⁵¹ Mesa-Arango AC, Del Rocío M, Pérez-Mejía A, et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to Geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J clin Micro.* 2002; 40:3004-3011.
- ⁵² Pruvost M, Bellone R, Benecke N, et al. Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic Works of cave art. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 108:18626-18630.
- ⁵³ Greene J. 100 Grandes Científicos. 4° impresión. Editorial Diana, S.A. México. 1970.
- ⁵⁴ Irwin D. Mercantilism as strategic trade policy: the Anglo-Dutch Rivalry for the east India trade. *J Political Economy.* 1991; 99:1296-1314.
- ⁵⁵ Golinski J. Science in the Enlightenment. *History of Science.* 1984; 24:411-24.
- ⁵⁶ Koonin E, Wolf Y. Is evolution Darwiniano or/and Lamarckian?. *Biol Dir.* 2009; 4:1-14.
- ⁵⁷ Darwin C. Diario del viaje de un naturalista alrededor del mundo. (En el navío S:M Beagle). *Elaleph.com*, 2000.
- ⁵⁸ Darwin C. El origen de las especies. 10ª Edición. Editorial Porrúa. México. 2008.
- ⁵⁹ Richard Darkins. The selfis gene. (Audio-libro). Audible Studios. 2013.
- ⁶⁰ Posadas P, Crisci JV, Katinas L. Historical biogeography: A review of its basic concepts and critical issues. *J Arid Environm.* 2006; 66:389-403.
- ⁶¹ Gillespie J. Population Genetics. A Concise Guide. Second Edittion. *The Jonns Hopkins University Press. Baltimore and London.* 2004.
- ⁶² Lenski R, Travisano M. Dynamics of adaptation and diversification: A 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:6808-6814.
- ⁶³ Freeman S, Herron J. Capítulo 1: Un caso para pensar evolutivamente comprendiendo el VIH. En, Análisis Evolutivo. 2da edición. *Prentice Hall.* 2002.

- ⁶⁴ Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. Discussion and correspondence. *Science* 1908; XXVIII:49-50.
- ⁶⁵ Hamilton M. Population Genetics. Wiley-Blackwell. 2010.
- ⁶⁶ Kimura M, Ohta T. The age of a neutral mutant persisting in a finite population. *Genetics*. 1973; 75:199-212.
- ⁶⁷ Núñez-Farfán J, Eguiarte L. Evolución Biológica. Una guía para principiantes a la Genética de Poblaciones. *Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio*. 1999.
- ⁶⁸ Morrone JJ. SISTEMÁTICA, BIOGEOGRAFÍA, EVOLUCIÓN los patrones de la biodiversidad en tiempo y espacio. 1º Edición 2001, 1º reimpresión. *Las prensas de Ciencias*. 2005.
- ⁶⁹ Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison G. Biological sequence analysis. Probabilistic models of protein and nucleic acids. 17th printing. *Cambridge university press. Cambridge, UK*. 2013.
- ⁷⁰ Martínez-Hernandez F, Jimenez-Gonzalez D, Martinez-Flores A, et al. What happened after the initial global spread of pandemic human influenza virus A (H1N1)? *Virology*. 2010; 7:196-205.
- ⁷¹ Hartl DL, Clark AG, 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- ⁷² Lavalle P, Mariat F. Sporotricosis. *Bull Inst Pasteur*. 1983; 81:295-331
- ⁷³ García V, Mayorga J, Soto O, Barba G. esporotricosis en niños. Estudio de 133 casos en el Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio". *Med Cut Ibero Lat Am*. 2008; 36:18-26
- ⁷⁴ Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22:4673-4680.
- ⁷⁵ Kimura M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16:111-120.
- ⁷⁶ Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004; 5:150-163.
- ⁷⁷ Posada D and Crandall A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998; 14:817-818.
- ⁷⁸ Huelsenbeck J, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 2001; 17:754-755.
- ⁷⁹ Ronquist F, Huelsenbeck P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; 19:1572-1574.
- ⁸⁰ Martínez-Hernandez F, Jimenez-Gonzalez D, Chenillo P, Alonso-Fernandez C, Maravilla P, Flisser A. Geographical widespread of two lineages of *Taenia solium* due to human

- migrations: Can population genetic analysis strengthen this hypothesis?. *Inf Genet Evolut.* 2009; 9:1108-1114.
- ⁸¹ Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 1965; 19:395-420.
- ⁸² Slakin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics.* 1994; 139:457-462.
- ⁸³ Librado P, Rozas J. DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25:1451-1452.
- ⁸⁴ Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt H-J, Nørby S. mtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion. *Am J Hum Genet.* 2000; 67:718-726.
- ⁸⁵ Oliveira MM, Franco-Duarte R, Romeo O, et al. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. *FEMS Microbiol Let.* 2015; 362:1–7.
- ⁸⁶ Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26:218–222.
- ⁸⁷ Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995; 9:576–596.
- ⁸⁸ Scheeff E, Bourne P. Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Computat Biol.* 2005; 1:e49.
- ⁸⁹ Rodriguez-Caban J, Gonzalez-Velazquez W, Perez-Sanchez L, Gonzalez-Mendez R, Rodriguez-del Valle N. Calcium/calmodulin kinase 1 and its relation to thermotolerance and HSP90 in *Sporothrix schenckii*: an RNAi and yeast two-hybrid study. *BMC Microbiol.* 2011; 11:1–16.
- ⁹⁰ Kumar R, Tamuli R. Calcium/calmodulin-dependent kinases are involved in growth, thermotolerance, oxidative stress survival, and fertility in *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol.* 2014; 196:295–305.
- ⁹¹ Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues, AM, Sasaki AA, Burger E, Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence.* 2013; 4:241–249.
- ⁹² Jung KW, Bahn YS. The stress-activated signaling (SAS) pathways of a human fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiology.* 2009; 37:161–170.
- ⁹³ Romo-Lozano Y, Hernandez-Hernandez F, Salinas E. *Sporothrix schenckii* yeasts induce ERK pathway activation and secretion of IL-6 and TNF-alpha in rat mast cells, but no degranulation. *Med Mycol.* 2014; 52:862–868.
- ⁹⁴ Lott T, Fundyga RE, Kuykendall RJ, Arnold J. The human commensal yeast, *Candida albicans*, has an ancient origin. *Fungal Genet Biol.* 2005; 42:444–451.

- ⁹⁵ Lima-Barros MB, Oliveira-Schubach A, Galhardo MC, Schubach TM, dos-Reis RS, Conceição MJ, do Valle AC. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003; 42:677–681.
- ⁹⁶ Sasaki AA, Fernandes GF, Rodrigues AM, et al. Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. *PLoS one.* 2014; 9:E86819.
- ⁹⁷ Teixeira M, Rodrigues AM, Tsui CK, et al. Asexual propagation of a Virulent clones complex in a human and feline outbreak of Sporotrichosis. *Eukaryotic Cell.* 2015; 14:158–169.
- ⁹⁸ Zhang Y, Hagen F, Stielow B, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14000 human and animal case reports. *Persoonia* 2015; 35:1-20.
- ⁹⁹ Leducq JB. Charter 4, in Ecological Genomics: Ecology and the evolution of genes and genomes. Editors Landry C, Aubin-Hirth N. *Springer* 2014; 49-72.
- ¹⁰⁰ Oliveira MM, Almeida-Paes R, de Medeiros-Muniz M, et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, brazil: case report. *Mycopathologia* 2010; 169, 359–363.
- ¹⁰¹ Camacho E, Leon-Navarro I, Rodriguez-Brito S, Mendoza M, Nino-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 94.
- ¹⁰² Romeo O, Scordino F, Criseo G. New Insight into Molecular Phylogeny and Epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex Based on Calmodulin-Encoding Gene Analysis of Italian Isolates. *Mycopathologia.* 2011; 172, 179–186.
- ¹⁰³ Almeida-Paes R, de Oliveira MM, Freitas DF, do Valle AC, Zancope-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: E3094
- ¹⁰⁴ Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antim Agen Chemoth.* 2008; 52:732-734.
- ¹⁰⁵ Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011; 7:e1002345.