



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Aportaciones al estudio filogeográfico de aislados de
Histoplasma capsulatum obtenidos de murciélagos
naturalmente infectados, utilizando el microsatélite
(GA)_n"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

LORENA HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Marzo 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1.- Datos del alumno

Hernández
García
Lorena
5534260602
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300333031

2.- Datos del tutor

Dra.
Maria Lucia
Taylor
da Cunha e Mello

3.- Datos del sinodal 1

Dr.
Joaquín
Cifuentes
Blanco

4.- Datos del sinodal 2

Dr.
Rodrigo Antonio
Medellín
Legorreta

5.- Datos del sinodal 3

Dra.
Concepción
Toriello
Nájera

6.- Datos del sinodal 4

Dra.
María del Rocío
Reyes
Montes

7.- Datos del trabajo escrito

“Aportaciones al estudio filogeográfico de aislados de *Histoplasma capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados, utilizando el microsatélite (GA)_n”
56 p
2010

El mayor privilegio que he tenido para llegar a este momento es: **la vida...**

Con dedicación especial...

- A esos seres que me dieron la vida, a mi madre **Aurelia García García** y a mi padre **Paulino Hernández Hernández** por todas sus enseñanzas, sus cuidados, sus esfuerzos, su cariño, su comprensión y su apoyo en todo momento.
- A mis hermanos **José Domingo Hernández García**, **Paulino Hernández García** y **Victor Eduardo García García** por su apoyo incondicional, y por compartir tantos momentos como buenos hermanos que somos.
- A mi prima, amiga y hermana **Esperanza García García** por compartir toda una vida de travesuras juntas.
- A mis padrinos, **Amabilia** y **Román** por ser mis segundos padres y por estar siempre a mi lado alentándome y aconsejándome para poder ser cada día una mejor persona.
- A toda mi familia: abuelos, tíos, primos, y anexos que depositaron toda su confianza y esperanza para lograr llegar a este punto en mi vida.
- A mis cuasi hermanas y más que eso mis mejores amigas, cada una con su "yo" excepcional, **Nirani Corona Romero** e **Isadora Heredia López** por dejarme entrar en su corazón y en sus vidas, por dejarme compartir momentos de alegrías y tristezas, por estar siempre y en todo momento.

- A mis amigos que ya tienen un lugar muy especial en mi corazón, Elizabeth-Lyz, Laura-vaquita, Araceli, Sandra, Chucho, Juan Carlos-Bubu, Pamela Jocelyn, Jesús, Adán, Nathaly, Jorge, Mariana, Martha, Diana, Vladimir-El Kma, Edgar, Anacaren, El Roberth, Laila, Luisa Daniel Alfonso y mi H.Jefecito Daniel.
- A mis amigos y familiares que se nos adelantaron en el camino... alguna vez nos volveremos a encontrar, en el más allá o en otra vida.
- A mi acompañante en estos años de crecimiento, principalmente académico, por ser amiga y compañera y por no ser sólo directora de tesis, por todo su apoyo, cariño y comprensión, a la **Dra. Maria Lucia Taylor**, con gran estima y cariño.
- A mis compañeros de laboratorio por ser el mejor equipo de trabajo, por haber colaborado en este trabajo, por brindarme su ayuda y por compartir sus conocimientos.
- A todas y cada una de las personas (prefiero ya no dar ningún nombre para no omitir ninguno) que estuvieron, a las que están y a las que estarán compartiendo momentos importantes de mi vida y de la suya, porque el simple hecho de conocerlas y considerarlas mis amigas hace que cada uno de los días valgan la pena y porque el compartir estos momentos, hace que todos y cada uno de nosotros crezcamos día tras día.
- ¡Y porque no!, también doy gracias a mi Terry, por acompañarme en ratos de diversión, de tristeza, en noches de vela, etcétera, etcétera, por ser un gran compañero en sus casi 11 años de vida.
- **A TODOS USTEDES.....CON TODO MI AMOR... GRACIAS POR TODO SU APOYO, CARIÑO, AMISTAD Y CONFIANZA.**

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y parcialmente apoyado por el Convenio FIOCRUZ-UNAM entre Brasil y México.

GRACIAS

Con agradecimiento especial a los revisores de la presente tesis

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dr. Rodrigo Antonio Medellín Legorreta

Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes

México D. F, marzo del 2010

“Por mi raza hablará el espíritu”

Contenido

	Página
Índice de Tablas y Figuras	6
Resumen	7
Abstract	8
I Introducción	9
II Justificación	17
III Hipótesis	18
IV Objetivo General	19
V Objetivos Particulares	19
VI Materiales y Métodos	20
<i>Histoplasma capsulatum</i>	20
Obtención de micelio de <i>H. capsulatum</i> para extracción de DNA	20
Identificación de exoantígenos específicos de <i>H. capsulatum</i> para definir la pureza de los micelios	21
Extracción de DNA de <i>H. capsulatum</i>	21
Cuantificación del DNA obtenido	22
Amplificación del microsatélite HSP-TC/(GA) _n	23
Purificación y secuenciación del microsatélite	23
Análisis genético	24
VII Resultados	26
VIII Discusión	29
IX Conclusiones	34
X Referencias	35

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

	Página
TABLA I. - Aislados de <i>H. capsulatum</i> obtenidos de murciélagos naturalmente infectados	49
TABLA II. - Datos del GenBank de las secuencias de <i>H. capsulatum</i> analizadas	51
TABLA III. - Datos de la longitud de las secuencias de (GA) _n de los aislados de <i>H. capsulatum</i> .	52
TABLA IV. - Diversidad nucleotídica (π) del (GA) _n y sus regiones flanqueantes de los aislados de <i>H. capsulatum</i> estudiados*	53

Figuras

Fig. 1. Árbol de neighbor-joining de los fragmentos de (GA) _n .	54
Fig. 2. Árbol de máxima parsimonia de los fragmentos de (GA) _n	55
Fig. 3. Dispersión de los haplotipos asociados con la longitud de las secuencias (GA) _n de <i>H. capsulatum</i> en América	56

Resumen

Se estudió la diversidad de la secuencia del motivo repetitivo (GA)_n y sus regiones flanqueantes ubicado en el gen *HSP60* (heat shock protein 60) de 47 aislados de *Histoplasma capsulatum* de nueve especies diferentes de murciélagos naturalmente infectados y capturados en México, Brasil y Argentina. Dos aislados clínicos humanos fueron usados como referencia geográfica. Las relaciones filogenéticas entre los aislados usando un fragmento de 240 nt del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes fueron evaluadas por las topologías de los árboles generados por neighbor-joining (NJ) y máxima parsimonia (MP). Estos análisis no mostraron diferencias en las topologías de ambos árboles NJ y MP y destacan diferentes grupos de aislados de *H. capsulatum* de murciélagos infectados, principalmente asociados con las mutaciones en la longitud de la secuencia (GA)_n y sus regiones flanqueantes. Los resultados revelaron dos grandes grupos, el grupo I que agrupa tres subgrupos (Ia, Ib y Ic) todos conteniendo aislados mexicanos y el grupo II que fue constituido solamente por aislados de Brasil y Argentina. El subgrupo Ia agrupa solamente aislados de los murciélagos migratorios *Tadarida brasiliensis*. Se realizó un análisis de diversidad nucleotídica (π) del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes, y se representó una red de haplotipos de la longitud de la secuencia (GA)_n en un mapa geográfico. El valor de π de cada grupo y subgrupo de aislados destacaron la alta homología del grupo II y los subgrupos Ib y Ic. Con base en las distancias genéticas entre los aislados, la red de haplotipos de (GA)_n mostró una probable dispersión filogeográfica y ecotípica de los aislados de *H. capsulatum* estudiados, a través de las áreas geográficas asociadas con el comportamiento de los murciélagos infectados.

Abstract

Diversity in (GA)_n repeated motif and its flanking sequence regions from the heat shock protein-60 gene of 47 *Histoplasma capsulatum* isolates from nine different species of naturally infected bats captured in Mexico, Brazil, and Argentina were studied. Two human clinical isolates were used as reference. The phylogenetic relationships among isolates, using a 240 nt fragment of microsatellite sequence length and flanking regions, were evaluated from neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) trees. These analyses did not show differences between both NJ and MP trees topology and highlight different clusters of *H. capsulatum* isolates from infected bats, mainly associated with mutations in microsatellite sequence lengths and their flanking regions. Results revealed two major clusters, cluster I clumped three sub-clusters (Ia, Ib, and Ic) all containing Mexican isolates and cluster II was constituted only by isolates from Brazil and Argentina. Sub-clusters Ia clumped only isolates from the migratory bat *Tadarida brasiliensis*. Nucleotide diversity (π) analysis of (GA)_n microsatellite and flanking regions were performed and a haplotypes net of (GA)_n sequence lengths was represented on a geographic map. The π value of each cluster and sub-cluster of isolates underscores the high homology of cluster II and sub-clusters Ib and Ic. Based on the genetic distances among isolates, (GA)_n haplotypes network shows a phylogeographic and ecotypic dispersion of *H. capsulatum* isolates throughout the geographic areas associated with migratory behavior of the infected bats studied.

Introducción

El hongo mitospórico *Histoplasma capsulatum* está clasificado en el Phylum Ascomycota, Clase Eurotiomycetes, orden Onygenales, familia Onygenaceae y/o Ajellomycetaceae (James *et al.* 2006; Hibbett *et al.* 2007), con base en el análisis de seis regiones génicas. Su estado asexual o anamorfo está representado por una única especie, *H. capsulatum*, la cual comprende tres variedades taxonómicas identificadas por su micromorfología, distribución geográfica y cuadro clínico: *H. capsulatum* var. *capsulatum*-Darling 1906; *H. capsulatum* var. *duboisii*-Vanbreuseghem (1952)-Ciferri 1960 e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (Rivolta, 1873)-Weeks, Padhye, et Ajello 1985 (Tewari *et al.* 1998). Su estado sexual o teleomorfo comprende una sola especie llamada *Ajellomyces capsulatus*. *Ajellomyces* e *Histoplasma* constituyen un mismo hongo holomorfo, término asignado a los hongos con esporulación teleomorfa junto con todos sus estados anamorfos.

Aunque el hongo es muy ubicuo, está más asociado a ciertos hábitat cerrados como minas, cuevas, pozos, casas y/o construcciones abandonadas, donde se puede desarrollar en guano de murciélagos y aves, debido a las altas concentraciones de nitrógeno, de fósforo y otros micronutrientes. La presencia de estos componentes, aunado a ciertas condiciones físicas, tales como, poca luz (estimula la esporulación), humedad relativa > 60% y temperaturas óptimas en un rango de 28-30 °C, favorece su ciclo biológico (Emmons 1958; Goodman & Larsh 1967; Lappe *et al.* 1998; Mahvi 1970; Taylor *et al.* 1994; 1999a; Ulloa *et al.* 1998; 2006). Los factores abióticos (físicos) junto con los bióticos, representados principalmente por una macro- y microbiota guanobia, conforman el nicho ecológico ideal para este patógeno fúngico (Hoffmann 1998; Taylor *et al.* 1999a; 2000a).

Histoplasma capsulatum es un microorganismo saprobio-geofílico, en la naturaleza a temperaturas adecuadas crece con una morfología filamentosa multicelular (fase micelial-M) y se encuentra en lugares tanto cerrados como abiertos donde existe guano de murciélagos y/o de aves (González-Ochoa 1963; Taylor *et al.* 1996; 1999a; 2000c). En estos ambientes pequeñas

estructuras reproductivas de la fase M se aerosolizan, tanto por la acción mecánica del hombre o de algunos animales como por corrientes de aire, y constituyen los propágulos infectivos del hongo (Chick *et al.* 1981). Cuando infecta un individuo el hongo se convierte en levadura unicelular (fase levaduriforme-L), la cual constituye su morfotipo virulento y crece como parásito intracelular de macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas y también de células epiteliales y endoteliales de hospederos susceptibles. Asimismo, la fase-L se desarrolla a 37 °C en medios de cultivos sintéticos o complejos enriquecidos con compuestos azufrados. La característica termodimorfa (transición de fases morfológicas dependiente de temperatura) del patógeno es de mucho interés, ya que es necesaria para la manifestación de su virulencia (Retallack & Woods 1999).

En la morfología microscópica de la fase micelial del hongo, se observan hifas que miden de 1.2 a 1.5 μm de diámetro, con dos tipos de conidios (aleuriosporas) solitarios: 1) microconidios redondos o piriformes de 1.4 x 2.6 μm , los cuales pueden estar fijos a la hifa o unidos a ellas por pequeños conidióforos; y 2) macroconidios de paredes gruesas, por lo general, redondos de 8-14 μm de diámetro, los cuales tienen proyecciones digitiformes de diferentes tamaños, típicas de la especie. Los macroconidios están adheridos a las hifas por conidióforos cortos que, con frecuencia, forman un ángulo aproximado de 90° con las mismas. La micromorfología de las levaduras está representada por células individuales uninucleadas de 2-6 μm de diámetro, en general unigemantes con brotamiento de base estrecha (Kwon-Chung & Bennett 1992; Taylor *et al.* 2000c; Tewari *et al.* 1998).

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* causa la histoplasmosis americana también conocida como enfermedad de Darling (enfermedad de las cavernas) y, actualmente, es denominada como "histoplasmosis capsulati". *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* es el agente etiológico de la histoplasmosis africana denominada "histoplasmosis duboisii" e *H. capsulatum* var. *farciminosum* afecta sólo a equinos y es el agente etiológico de la "histoplasmosis farciminosi" que ha sido reportada en Asia y África.

Aunque *H. capsulatum* infecta a diferentes mamíferos (Chávez-Tapia *et al.* 1998; Espinosa-Avilés *et al.* 2008; Pérez-Torres *et al.* 2009; Reyes-Montes *et al.* 2009; Rosas-Rosas *et al.* 2004; Taylor *et al.* 1994; 1997; 1999a; 2005a, Vargas-Yañez *et al.* 1998), se considera que los únicos mamíferos voladores, los murciélagos, y asimismo algunas aves contribuyen a la dispersión de propágulos infectivos (Taylor *et al.* 2000a; 2000b; 2000c; 2005a). Emmons (1958), evidenció por primera vez la relación entre el hábitat de murciélagos y la presencia del patógeno, y en México, Aguirre-Pequeño (1959) y González-Ochoa (1963) corroboraron esta relación. Estos mamíferos voladores pueden ser infectados e incluso cursar la histoplasmosis, por lo que son considerados como potenciales reservorios y dispersores de *H. capsulatum* en la naturaleza (Chávez-Tapia *et al.* 1998; Di Salvo *et al.* 1969; Hoff & Bigler 1981; McMurray & Greer 1979; Mc Murray & Rusel 1982; Taylor *et al.* 1999a; 2000a; 2000b; 2000c; 2005a; 2005b), además, se propone que los murciélagos infectados pueden transportar el hongo de un nicho ecológico a otro alcanzando regiones geográficas distantes (Taylor *et al.* 2005a).

La "histoplasmosis capsulati" es la micosis sistémica de mayor impacto en el continente americano. Una de sus principales zonas endémicas se encuentra en los Estados Unidos en el valle de los ríos Ohio y Mississippi y las áreas de mayor frecuencia de brotes epidémicos se encuentran en los países latinoamericanos (Taylor *et al.* 1996; 2000c). La infección subclínica con curso benigno ocurre anualmente en un número muy alto de individuos tanto en Norteamérica como en Sudamérica.

La enfermedad ha sido descrita tradicionalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, inicialmente entre los paralelos 45° N y 35° S (Kwon-Chung & Bennett 1992), sin embargo, nuevos registros geográficos han sido referidos en las latitudes 54° N (Anderson *et al.* 2006) y 38.8° Sur (Canteros *et al.* 2005a), asociados a brotes autóctonos que indudablemente evidencian una mayor dispersión del patógeno en la naturaleza. Esto sugiere que la distribución geográfica de *H. capsulatum* ha sido ampliada y está posiblemente relacionada al mayor alcance en la migración de los dispersores y reservorios del hongo, particularmente los murciélagos, lo que implica una aclimatación tanto del

dispersor como del hongo en nichos ecológicos localizados en áreas geográficas alejadas de los trópicos. En los últimos años se han detectado cambios críticos en el medio ambiente (especialmente climático) que han repercutido directa o indirectamente en las características de los nichos ecológicos de los seres vivos y en su posible distribución geográfica.

Aislados de *H. capsulatum* de diferentes orígenes geográficos han sido estudiados y/o clasificados por el polimorfismo de su DNA utilizando ensayos moleculares, los cuales han revelado una diversidad genética y generado nuevos patrones ecotípicos, dependiendo de las fuentes y orígenes geográficos del hongo (Jiang *et al.* 2000; Kasuga *et al.* 1999; 2003; Keath *et al.* 1992; Kersulyte *et al.* 1992; Komori *et al.* 2005; Medeiros-Muñiz *et al.* 2001; Poonwan *et al.* 1998; Reyes-Montes *et al.* 1998; 1999; Spitzer *et al.* 1989; 1990; 1994; Tamura *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2000a; 2005a; Vincent *et al.* 1986; Woods *et al.* 1993).

En la última década, ha surgido una clasificación filogenética de *H. capsulatum* que incluye 137 aislados procedentes de 25 países, considerando a especímenes de las tres variedades: *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum* (Kasuga *et al.* 1999; 2003). Esta clasificación se ha generado con base en el análisis independiente y/o concatenado de las secuencias parciales de los genes, ARF, H-ANTI, OLE1, TUB1, que codifican para las proteínas: factor de ribosilación del ADP; precursor del antígeno H; desaturasa Δ -9 de ácido graso y alfa tubulina, respectivamente. A la fecha, se cuenta con ocho poblaciones genéticas (clados): 1- población de la clase 1 de Norteamérica (NAM 1); 2- población de la clase 2 de Norteamérica (NAM 2); 3- población del grupo A de Latinoamérica (LAM A); 4- población del grupo B de Latinoamérica (LAM B); 5- población australiana; 6- población holandesa que incluye una población de Indonesia; 7- población eurasiática; 8- población africana. De los ocho clados siete son considerados especies filogenéticas (Kasuga *et al.* 2003).

Distintas estructuras de poblaciones (clonales y recombinantes) de aislados de *H. capsulatum* han sido referidas (Carter *et al.* 1996; 1997; 2001; Kasuga *et al.* 1999; Taylor *et al.* 1999b). El análisis de poblaciones genéticas de *H. capsulatum* con marcadores bialélicos y multialélicos (microsatélites) que se

caracterizan por tener motivos repetitivos hipervariables y ser altamente polimórficos, fue utilizado para distinguir aislados individuales e identificar poblaciones fúngicas de Estados Unidos y de otras procedencias geográficas (Carter *et al.* 1997; 2001). Se han reportado cinco loci microsátelites en el genoma de *H. capsulatum* con capacidad de discriminar aislados con características peculiares (Carter *et al.* 2001). Con base en el análisis del marcador multialélico, el microsátelite (GA)_n, Carter *et al.* (2001) observaron una gran diferencia en la estructura de población de aislados de *H. capsulatum* de Estados Unidos y de Colombia, lo que permitió la separación de ambas poblaciones del hongo en diferentes especies, tomando en cuenta el concepto de especie filogenética.

En México, aislados del hongo a partir de murciélagos naturalmente infectados han sido obtenidos, preservados y mantenidos en laboratorio (Chávez Tapia *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1994; 1999). En particular, la colección del laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM, es una de las colecciones de patógenos fúngicos en el mundo que cuenta con un gran número de aislados de *H. capsulatum* provenientes de murciélagos infectados, de los cuales algunos fueron seleccionados para el presente estudio. Éstos fueron recuperados de nueve especies diferentes de murciélagos con las siguientes características:

***Pteronotus davyi* Gray, 1838.**- Familia Mormoopidae, diferenciado de otras especies de murciélagos por tener alas que cubren su dorso, dándole la apariencia de estar desnudo; vive en colonias hasta de cientos de miles de individuos y en refugios húmedos, oscuros y calientes, los cuales comparte con especies de la misma familia. Se desplaza en grupos pequeños y es exclusivamente insectívoro, en especial se alimenta de polillas. Se distribuye ampliamente en México desde el sur de Tamaulipas y Sonora hasta Brasil, principalmente en regiones tropicales como el bosque tropical caducifolio, el bosque tropical perennifolio y matorral xerófito (Jiménez-Guzmán *et al.* 2005).

***Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810).**- Familia Phyllostomidae, se caracteriza por su locomoción cuadrúpeda y por su capacidad de elevarse al vuelo desde el suelo. Carece de cola. Vive en colonias hasta de 5 000

individuos, en refugios oscuros. Es conocido comúnmente como murciélago vampiro por ser hematófago de diferentes especies de mamíferos. Se distribuye desde el norte de Tamaulipas y Sonora hasta Argentina, restringiéndose a zonas tropicales en selvas maduras, áreas de vegetación secundaria, cultivos y pastizales (Suzán 2005).

***Leptonycteris curasoae* Miller, 1900.**- Familia Phyllostomidae, se distingue de *Leptonycteris nivalis* por características craneales, su tamaño menor, pelaje, y por tener las alas y la última falange del tercer dedo, más cortas. Forma colonias de hasta 100 000 individuos y se refugia principalmente en cuevas y minas abandonadas. Es conocido comúnmente como murciélago magueyero, es polínivoro y nectarívoro de bombacáceas, magueyes y cactáceas, frugívoro de cactáceas y a veces insectívoro. Se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos y el norte de México hasta el Salvador. En México, se distribuye en zonas tropicales y subtropicales secas. Estas poblaciones son migratorias. Existen otras poblaciones en Colombia y Venezuela (Arita 2005a).

***Leptonycteris nivalis* (Saussure, 1860).**- Familia Phyllostomidae, se distingue de *L. curasoae* por su tamaño mayor, el pelaje dorsal más grisáceo y largo, y las alas más largas. Las colonias son de menos de 500 individuos y se refugia principalmente en cuevas, túneles y minas abandonadas. Es polínivoro y nectarívoro de magueyes y otras plantas. Es una especie prácticamente endémica de México, aunque se localice en el Condado de Hidalgo en Nuevo México y en el Parque Nacional Big Bend en Texas. Se encuentra principalmente en matorrales xerófilos, en bosques de pino-encino y en la transición entre éste y el bosque tropical caducifolio. Es una especie migratoria, al menos en la parte norte de su distribución, mientras que en las poblaciones del sur es posible que hagan migraciones altitudinales (Arita 2005b).

***Artibeus hirsutus* Andersen, 1906.**- Familia Phyllostomidae, su principal característica es la presencia de un fleco de pelos en el borde de la membrana Interfemoral que se extiende hasta la tibia. Se refugia en cuevas, minas abandonadas y a veces en casas habitación, estos refugios los comparten con otras especies. Es frugívoro y es una especie endémica de México distribuida en la vertiente del Pacífico desde el sur de Sonora hasta el sur del estado de

Guerrero; se encuentra principalmente en bosque tropical caducifolio y en cultivos frutales (Téllez-Girón 2005).

***Eumops bonariensis* (Peters, 1874).**- Familia Molossidae, es la especie más pequeña del género, se caracteriza por tener orejas grandes, redondeadas y unidas en la parte frontal. No se conocen los sitios de refugio natural, se le ha encontrado bajo tejas de construcciones. Es insectívoro y se distribuye desde el sur de Veracruz y la Península de Yucatán hasta Buenos Aires, Argentina; se le encuentra en bosques tropicales secos, zonas urbanas y suburbanas (Arita 2005c).

***Molossus molossus* (Pallas, 1766).**- Familia Molossidae, se caracteriza por tener la cola libre y gruesa, alas angostas y largas, pelaje corto y aterciopelado, orejas anchas que se proyectan hacia los ojos y la cara prácticamente desnuda. Los murciélagos *M. molossus* centroamericanos son de color café acaramelado, más pálidos y opacos que los *M. molossus* color ébano de las antillas menores. Suele encontrarse junto con *M. rufus*, formando colonias de cientos de individuos y se refugian en cuevas, troncos huecos y construcciones. Es insectívoro, se alimenta al vuelo y forrajea en cercanías de arroyos. Su distribución tiene un rango muy amplio, desde México hasta Uruguay y Argentina. Esta especie junto con *M. rufus*, *M. coibensis* y *M. pretiosus*, prefiere áreas abiertas como sabanas, pastizales, matorrales espinosos y zonas similares (Santos *et al.* 2005a).

***Molossus rufus* E. Geoffroy, 1805.**- Familia Molossidae, es la especie más grande del género y se caracteriza por tener la cola libre y gruesa, alas angostas y largas, pelaje corto y aterciopelado, orejas anchas que se proyectan hacia los ojos y la cara prácticamente desnuda. Forma colonias de aproximadamente 50 individuos y se refugia en cuevas, troncos huecos y construcciones. Es insectívoro, se alimenta principalmente de escarabajos hidrofílicos y crisomélidos. En la noche, la mayoría de la colonia sale del refugio una sola vez para alimentarse. Su distribución comprende desde Nuevo León y Sinaloa hasta Argentina, se le encuentra en bosques húmedos y muchos ambientes secos, en poblados y ciudades (Santos *et al.* 2005b).

***Tadarida brasiliensis* (I. Geoffroy, 1824).**- Familia Molossidae, se distingue de otros molosidos mexicanos, a excepción del género *Nyctinomops* por tener el labio superior marcado por una serie de profundos surcos. Forma colonias desde cientos hasta varios millones de individuos, con una densidad hasta de 1800 adultos/m² ó 5000 crías/m². Sus refugios son principalmente cuevas, no obstante también utilizan huecos de árboles, bodegas, estadios y edificios altos. Comparte estos sitios con muy pocas especies. Es conocido comúnmente como murciélago guanero, ya que su guano se acumula en grandes cantidades en las cuevas que ocupa. Es insectívoro, se alimenta principalmente de polillas. Su distribución abarca desde los 40° de latitud norte en Estados Unidos hasta los 40° de latitud sur en Chile y Argentina. En México, se encuentra principalmente en matorral xerófilo, en bosques tropicales secos y en bosques de pino-encino, siempre cerca de zonas áridas. Se han identificado cuatro grupos migratorios separados, el patrón general es que los individuos pasan el otoño e invierno en el sur (en México) y se mueven en la primavera y verano hacia el norte (en el suroeste de Estados Unidos). Al parecer las poblaciones de Baja California Sur y de Chiapas no presentan movimientos migratorios (Arita *et al.* 2005d).

Justificación

Considerando varios hallazgos que enfatizan una alta frecuencia y riesgo de infección natural del murciélago con *H. capsulatum* en ambientes cerrados y la gran plasticidad de migración de algunas especies de murciélagos, con lo cual son capaces de sobrepasar barreras geográficas (Wilson & Reeder 1993), el uso de patrones polimórficos de DNA de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados debe ser explorada por especialistas con el fin de: definir patrones filogeográficos del hongo; actualizar los datos de la epidemiología de la histoplasmosis al delimitar áreas de mayor o menor riesgo de infección para el humano; y utilizar el patrón molecular del hongo aislado de murciélagos para rastrear movimientos de algunas especies de estos mamíferos voladores con el fin de precisar sus rutas migratorias.

El presente trabajo analizó el polimorfismo genético de aislados de *H. capsulatum* de murciélagos infectados, capturados en tres diferentes áreas geográficas de Latinoamérica con el fin de distinguir y/o relacionar aislados de diferentes orígenes. Para este propósito se seleccionó al microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes ya que este marcador fue usado exitosamente para discriminar aislados clínicos humanos de Estados Unidos y Colombia, como se refirió anteriormente.

Hipótesis

La diversidad genética generada por el marcador molecular (GA)_n asociada al tamaño de su secuencia y de sus regiones flanqueantes permite relacionar aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados de diferentes procedencias geográficas y proponer patrones moleculares que identifiquen con precisión una distribución filogeográfica y ecotípica del hongo.

Objetivo General

Analizar el polimorfismo genético y la distribución nativa de algunos genotipos de *H. capsulatum* asociados con murciélagos infectados, provenientes de tres países de Latinoamérica, a través del microsatélite (GA)_n.

Objetivos Particulares

Obtener el DNA de todos los aislados de *H. capsulatum* a estudiar.

Amplificar el marcador microsatélite (GA)_n a partir del DNA de los aislados de *H. capsulatum* estudiados.

Secuenciar el marcador microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes para cada aislado.

Analizar las secuencias obtenidas del microsatélite para identificar cambios genéticos (mutaciones) en la región que define su longitud.

Establecer relaciones filogeográficas entre los aislados, con base en el largo del microsatélite y sus regiones flanqueantes.

Analizar la homología genética de los aislados a través de la determinación de la diversidad nucleotídica (π) del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes y relacionarla con la procedencia geográfica de los aislados.

Construir una red de haplotipos para representar la posible dispersión del hongo en ciertas regiones de América.

Materiales y Métodos

Histoplasma capsulatum

Se estudiaron 47 aislados del hongo recuperados de murciélagos naturalmente infectados y capturados al azar en México, Brasil y Argentina (Tabla I), junto con dos aislados clínicos utilizados como referencia geográfica: EH-53 de Hidalgo, México y 01869 de Buenos Aires, Argentina. Los aislados procedentes de Brasil provienen del "Laboratorio de Micología, Setor de Imunodiagnóstico, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)", bajo la responsabilidad de la Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira con la cual existe un convenio de colaboración entre la Facultad de Medicina-UNAM y la FIOCRUZ. Los aislados de México y Argentina pertenecen a la Colección de Cultivos de *H. capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>), registrada en la base de datos del Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Centre on Microorganisms (WDCM)) de la Federación Mundial para Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collections (WFCC) bajo el número LIH-UNAM-WDCM817.

Obtención de micelio de *H. capsulatum* para extracción de DNA

La fase micelial de *H. capsulatum* fue cultivada a 28 °C en medio GYE (glucosa al 2% y extracto de levadura al 1%) con agitación constante, hasta alcanzar su fase log-tardía de crecimiento, entre 3 y 4 semanas. El micelio fue separado utilizando filtros Whatman No.1 y almacenado a -20 °C en tubos Falcon de 50 ml debidamente etiquetados, hasta su uso. Para obtener el exoantígeno crudo del micelio, cada filtrado de los cultivos fue procesado por una serie de membranas Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA) con poros de tamaño decreciente de 1.2 hasta 0.22 µm y enseguida almacenados en tubos plásticos

de 50 ml a -20 °C para congelamiento. Se recuperó la capa superior de cada filtrado congelado (fracción oscura) y se depositó en microtubos de 1.7 ml, seguido de almacenamiento en congelación hasta su uso para la determinación de exoantígenos específicos. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de seguridad biológica y en condiciones estrictas de esterilidad.

Identificación de exoantígenos específicos de *H. capsulatum* para definir la pureza de los micelios

Con el filtrado obtenido de cada micelio se realizó la identificación de los exoantígenos H y M específicos de *H. capsulatum* (Standard & Kaufman 1976; Kaufman & Standard 1987) por medio de la prueba de inmunodifusión en gel (IDG) (Ouchterlony & Nilsson 1978), utilizando suero hiperinmune de conejo conteniendo anticuerpo anti-*H. capsulatum*. Se procesaron como testigos, el suero de un paciente con histoplasmosis (positivo) y el suero de un conejo no inmunizado (negativo). Esta prueba se realizó para seleccionar los micelios cuyos filtrados resultaron positivos a la reacción de IDG y, sólo éstos fueron procesados para la extracción de DNA.

Extracción de DNA de *H. capsulatum*

Se lavó el micelio en amortiguador estéril TE (Tris-HCl 1M pH 7.1, EDTA 0.5 M pH 8.0) y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml conteniendo amortiguador de lisis (Tris-HCL 50 mM pH 7.1, EDTA 50 mM pH 8.0, SDS 3%, β -mercaptoetanol 1%), agitando en vortex 5 min a temperatura ambiente. Enseguida, el micelio fue homogeneizado en un aparato Ultra-Turrax T8 (IKA Works, Inc., Wilmington, NC), distribuido en microtubos estériles de baja retención de DNA de 1.7 ml (Axygen Scientific, Inc., Union City, CA) y centrifugado a 14000 rpm a 4 °C, 15 min. El sobrenadante, 500 μ l/tubo aproximadamente, fue transferido a un nuevo microtubo Axigen y tratado con proteinasa K (Qiagen, Valencia, CA) a una concentración final de 100 μ g/500 μ l, e incubado a 55-65 °C, 2 h. Enseguida, se acrecentó RNAsa (Qiagen) a una concentración final de 250

$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}/\text{tubo}$ y se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche. Posteriormente, se añadió v/v la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1 (Invitrogen, Accesolab, México, DF). Enseguida, se agitó y centrifugó en refrigeración a 14000 rpm durante 15 min. La fase acuosa superior de cada tubo fue recuperada y procesada nuevamente con la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico. Se precipitó el DNA agregando acetato de sodio 3M (1/40 del volumen obtenido) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó suavemente y se incubó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche. A continuación, se centrifugó en refrigeración a 14000 rpm durante 5 min, para obtener el botón de DNA. Las hebras de DNA fueron lavadas con etanol al 70%, centrifugadas a 14000 rpm durante 5 min y resuspendidas en $50 \mu\text{l}/\text{tubo}$ de agua milliQ, hasta su cuantificación.

Cuantificación del DNA obtenido

La pureza y concentración del DNA fueron determinadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% preparado con amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM) y bromuro de etidio ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) para observar la tinción del DNA. Se corrió la electroforesis a 120 V por 50 min en amortiguador TBE 0.5X. Se utilizó el fago λ (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) como marcador molecular estándar para estimar la concentración de DNA de cada muestra. Se empleó el transiluminador UV MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP Inc., Upland, CA) para la visualización de las imágenes capturadas como archivo TIF, usando el programa Vision Works LS versión 6.1.1 (UVPC Inc.). La pureza y cuantificación del DNA se realizó con base en la imagen capturada e impresa, analizando la limpieza de las bandas del DNA y valorando la concentración de las mismas por comparación con el marcador λ , colocado en carriles opuestos en distintas concentraciones. Finalmente, el DNA cuantificado fue almacenado en microtubos (Axygen) de 1.7 ml para su preservación a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su requerimiento.

Amplificación del microsatélite HSP-TC/(GA)_n

El microsatélite HSP-TC que contiene secuencias repetitivas de $(GA)_n$ (microsatélite $(GA)_n$) y que se encuentra corriente-arriba del exón 3 del gen HSP60 (heat shock protein 60), fue elegido para la tipificación de aislados de *H. capsulatum* de murciélagos. Esta región génica fue amplificada usando oligonucleótidos específicos: HSP-TC/U (5' GACCACGAGTGGTTCCCGAA-3') y HSP-TC/L (5' GAAGCCCTGGAGGTAGACGA-3') (Invitrogen) como fue descrito por Carter *et al.* (1997).

Antes de la amplificación, las muestras de DNA fueron incubadas a 55 °C durante 1h y homogeneizadas en vortex. La PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 25 µl, conteniendo 200 µM de dNTPs (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA), 2.0 mM de MgCl₂, 100 pmoles/ml de cada oligonucleótido, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Applied Biosystems), 1 X del amortiguador comercial B10X de la *Taq* y 2 µl de muestra de DNA (10 ng/µl). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Thermal iCycler™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) con el siguiente programa: un ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 60 °C (alineación) y 1 min a 72 °C (extensión); y un ciclo final de extensión de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron resueltos por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% bajo las mismas condiciones mencionadas para la cuantificación de DNA. Se utilizó como marcador molecular, la escalera del 100 bp DNA Ladder (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Los amplicones obtenidos fueron visualizados con el transiluminador MultiDoc-It System (UVP Inc) y las imágenes fueron capturadas como archivos TIF, como se mencionó previamente.

Purificación y secuenciación del microsatélite

Los productos de la PCR (amplicones) fueron purificados con el kit de purificación de DNA de Montage® PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore) y mandados a secuenciar en un aparato ABI-automatizado (Applied Biosystems)

del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La secuenciación se realizó para ambas hebras del DNA, generando una secuencia consensus para cada aislado. Todas las secuencias estudiadas fueron depositadas en la base de datos del GenBank y los respectivos números de acceso se encuentran en la Tabla II.

Análisis genético

Las secuencias de DNA de 47 aislados de murciélagos y dos aislados clínicos humanos fueron alineadas en ClustalW ver. 2.0 (National Center for Biotechnology Information-NCBI-Databases). Para el alineamiento se consideraron 240 nucleótidos (del 1971 al 2210 nt) que contienen el fragmento (Ga)_n con sus regiones flanqueantes. La secuencia de la cepa G-217B de *H. capsulatum* de Louisiana, Estados Unidos (número de acceso del GenBank en Tabla II) fue usada como grupo externo en los diferentes análisis.

Todos los análisis filogenéticos se realizaron con base en Tamura *et. al.* (2007), utilizando el programa MEGA ver. 4.0 (<http://www.megasoftware.net>). Las relaciones filogenéticas entre los aislados se evaluaron por medio de las topologías de los árboles generados por: 1) el algoritmo "neighbor-joining" (NJ) (Saitou & Nei 1987) utilizando el modelo de distancias genéticas 2-Parámetro de Kimura (Kimura 1980) considerando las inserciones/delecciones de pares de bases y las tasas de mutación uniformes entre los sitios analizados; 2) el método de máxima parsimonia (MP) (Eck & Dayhoff 1966), empleado para inferir los árboles del algoritmo del vecino más cercano (close-neighbor-interchange) (Nei & Kumar 2000); los "gaps" fueron utilizados como quinto carácter. La prueba de bootstrap (Felsenstein 1985) con 1000 réplicas fue procesada tanto para NJ como para MP.

Se realizó para todos los aislados *de H. capsulatum* el análisis de diversidad nucleotídica (π) del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes entre los aislados del mismo grupo y subgrupo, usando el programa DNAsp ver. 4.20. Se construyó una red de haplotipos asociados con la longitud de la secuencia (GA)_n sobre un mapa del continente americano, especificando gráficamente cada distancia genética generada por el programa TCS ver. 2.0

(http://www.eng.auburn.edu/deparment/cse/research/graph_drawing/graph_drawing.html).

Resultados

Se encontró una alta congruencia entre los árboles generados por los análisis de NJ y MP, con base en la reconstrucción filogenética de 47 aislados de *H. capsulatum* recuperados de murciélagos naturalmente infectados y dos aislados humanos (Figs. 1 y 2). Los árboles mostraron dos grandes grupos (I y II) bien separados del grupo externo (cepa G-217B). Los grupos I y II, así como los subgrupos (Ia, Ib y Ic) se agruparon principalmente según el origen geográfico del aislado de *H. capsulatum* asociado al lugar de captura de los murciélagos, además mostraron una clara asociación con las mutaciones en la longitud del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes (Tabla III, Figs. 1 y 2).

El primer grupo se formó con 36 aislados de *H. capsulatum* de murciélagos (*T. brasiliensis*, *L. nivalis*, *L. curasoae*, *A. hirsutus*, *P. davyi* y *D. rotundus*) capturados en México además del aislado clínico mexicano EH-53; mientras que el segundo grupo se constituyó por 11 aislados de murciélagos infectados procedentes de Brasil (*M. molossus* y *M. rufus*) y Argentina (*E. bonariensis*), e incluyó el aislado clínico de referencia 01869 de Argentina (Tabla III, Figs. 1 y 2). Dentro del primer grupo, constituido por todos los aislados mexicanos de *H. capsulatum*, se formaron tres subgrupos apoyados por los altos valores de bootstrap (Figs. 1 y 2). El primer subgrupo (Ia) se formó por nueve aislados fúngicos recuperados de murciélagos migratorios *T. brasiliensis* con un haplotipo GACG(GA)₁₁GA asociado a la longitud del microsatélite (Tabla III) y con valores de bootstrap de 85% (NJ) y 83% (MP) (Figs. 1 y 2). Dentro del segundo subgrupo (Ib), 10 aislados de *H. capsulatum* de murciélagos migratorios (*L. nivalis* y *L. curasoae*) y de una especie no migratoria (*A. hirsutus*) compartieron el haplotipo GACGGACG(GA)₇GA (Tabla III) y se agruparon en los árboles tanto de NJ (Bt=94%) como de MP (Bt=99%) (Figs. 1 y 2). El tercer subgrupo (Ic) estuvo representado por 18 aislados (BT=93%, tanto para NJ como para MP) con los haplotipos GACG(GA)₆GA y GACG(GA)₇GA asociados a la longitud del microsatélite (Tabla III). Estos haplotipos fueron detectados en muestras de *H. capsulatum* de los murciélagos migratorios *L. nivalis* y *L. curasoae* y en especies de murciélagos no migratorios (*A. hirsutus*,

P. davyi y *D. rotundus*), así como en el aislado clínico humano EH-53 (Tabla III, Figs. 1 y 2). Con base en la longitud de la secuencia (GA)_n del microsatélite, el segundo (Ib) y tercer (Ic) subgrupos están estrechamente relacionados y claramente divergen del primer (Ia) subgrupo.

Como se indicó anteriormente, el grupo II se formó solamente por muestras de *H. capsulatum* de murciélagos infectados no migratorios de Sudamérica, 10 de Brasil (*M. rufus* y *M. molossus*) y uno de Argentina (*E. bonariensis*), incluyendo el aislado clínico 01869 como haplotipo hermano del aislado de murciélago argentino (Tabla III, Figs. 1 y 2).

El polimorfismo en la longitud del microsatélite varió entre (GA)₁₅ de la cepa G-217B de Estados Unidos y (GA)₆ de los aislados argentinos 01869 y EH-575B (Tabla III). Las regiones flanqueantes del microsatélite (GA)_n presentaron mutaciones relevantes en algunos sitios. Con base en la secuencia de referencia de la cepa G-217B, las sustituciones en la longitud del microsatélite se correlacionaron con el origen de las muestras: una sustitución de una guanina por una citosina en la posición 2031 se presentó en todos los aislados de México y una sustitución de una adenina por una guanina en la posición 2032 se encontró en todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados. Además, sustituciones de una guanina por una citosina en la posición 2035 y de una adenina por una guanina en la posición 2036 ocurrieron en 10 aislados de *H. capsulatum* de las especies de murciélagos, *L. nivalis*, *L. curasoae* y *A. hirsutus*, capturados en la zona central del territorio Mexicano (Tabla III). Una sustitución compartida fue detectada en los dos aislados de *H. capsulatum* de Argentina, donde una guanina fue sustituida por una adenina en la posición 2045 (Tabla III). Es importante señalar que los aislados de Sudamérica no presentaron mutación en la posición 2031, como se encontró en los aislados mexicanos.

En la zona central de México, representada por los estados de Morelos, Puebla, Oaxaca e Hidalgo (Tabla I) hay dos haplotipos, GACG(GA)₇GA y GACG(GA)₆GA en el subgrupo Ic y un haplotipo GACGGACG(GA)₇GA, en el subgrupo Ib, todos asociados con los murciélagos migratorios *L. nivalis*, *L. curasoae* y todos los no migratorios de México estudiados, independientemente de una especie

particular de murciélago. En cambio, el haplotipo GACG(GA)₁₁GA (subgrupo Ia) fue único para los murciélagos migratorios *T. brasiliensis*, muestreados en los estados mexicanos de Oaxaca y Chiapas, los cuales son contiguos (Tabla III). Las diferencias en las distancias genéticas de los haplotipos (GA)_n también se correlacionaron con el origen geográfico de las muestras de *H. capsulatum* de México.

Una alta homología, de acuerdo con el valor de π del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes, se encontró en el grupo II ($\pi = 0.00586$) con 10 aislados de *H. capsulatum* de Brasil y dos de Argentina. Al contrario, una divergencia genética ($\pi = 0.02618$) se detectó entre 37 aislados mexicanos de *H. capsulatum* agrupados en el grupo I (Tabla IV). En relación con la diversidad nucleotídica de los subgrupos Ia (nueve aislados), Ib (10 aislados) y Ic (18 aislados), una alta homología fue detectada en los subgrupos Ic ($\pi = 0.00000$) y Ib ($\pi = 0.00472$), mientras que el subgrupo Ia ($\pi = 0.01271$) presentó disimilaridad (Tabla IV).

La dispersión de los haplotipos asociados a la longitud de las secuencias (GA)_n de todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados fue representada en una red haplotípica graficada en un mapa de América (Fig. 3), donde las distancias genéticas entre los haplotipos son señaladas por un nodo y además se muestra el probable flujo del microsatélite (GA)_n en el continente americano.

Discusión

El panorama epidemiológico de la histoplasmosis enfermedad no corresponde a la dimensión real de ésta en América, debido a que existe un gran sesgo que conduce a una ausencia de información veraz relacionada a la subnotificación de la enfermedad, la cual adquiere dimensiones críticas en su forma epidémica, particularmente, en países donde existe una fuerte asociación entre riesgos de infección y actividades laborales que se desarrollan en ambientes saturados de propágulos infectivos que constituyen el hábitat preferencial tanto del patógeno fúngico como de animales silvestres que, con frecuencia, actúan como dispersores y reservorios de *H. capsulatum* (Hoff & Bigler 1981; Kleite & Diercks 1965; McMurray & Greer 1979; McMurray & Rusel 1982; Taylor *et al.* 2000c; 2005a).

El uso de las técnicas moleculares ha propiciado el desarrollo de la epidemiología molecular que evidencia nuevas zonas endémicas y epidémicas, así como aporta nuevos conocimientos de la relación paciente-fuente de infección, con lo cual es posible determinar una relación genotípica entre aislados tanto de humanos como de animales silvestres de diferentes procedencias geográficas.

Un aspecto medular de la epidemiología molecular proviene de las diferentes clasificaciones moleculares de *H. capsulatum* que han surgido en los últimos años. Los métodos más utilizados en estas clasificaciones son: hibridación con sondas específicas, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP), amplificación al azar del DNA polimórfico por PCR (RAPD-PCR), PCR de regiones espaciadoras internas transcritas (ITS), secuencias génicas específicas y marcadores microsatélites. Actualmente, se han propuesto nuevos métodos para la clasificación de *H. capsulatum*, como electrocariotipificación y determinación del polimorfismo del largo del cromosoma (Canteros *et al.* 2005b) así como el análisis del perfil de ácidos grasos (Zarnowski *et al.* 2007).

De los métodos anteriores, los microsatélites destacan por ser altamente polimórficos en sus regiones flanqueantes y por aportar información importante acerca de poblaciones del hongo distribuidas geográficamente, además de ser

marcadores muy utilizados para estudiar estructura de poblaciones (recombinantes y clonales).

Los modelos más comunes para analizar los microsatélites son: el modelo mutacional paso a paso (Kimura & Ohta 1978) que asume que los eventos mutacionales implican un cambio en la unidad repetitiva sólo en un número detectable de alelos considerando una población finita; y el modelo de dos fases (Di Rienzo *et al.* 1994) que permite una proporción de mutaciones que involucra cambios en la unidad repetitiva en un número de individuos limitado o muy pequeño. Estos modelos no fueron considerados para nuestro procesamiento de datos debido a la homoplasia frecuentemente asociada con estos tipos de marcadores genéticos (Grimaldi & Crouau-Roy 1997). Una aportación al estudio de dinámicas evolutivas y de procesos mutacionales de microsatélites es el revelar mutaciones en la longitud de la secuencia del microsatélite y sus regiones flanqueantes (Estoup *et al.* 2002). Por lo tanto, el microsatélite $(GA)_n$ fue estudiado tomando en cuenta la longitud de su secuencia y como un fragmento génico junto con sus regiones flanqueantes. El análisis filogenético de 50 secuencias con 240 nucleótidos cada una, del $(GA)_n$ y sus regiones flanqueantes, no mostró diferencias en las topologías de los árboles NJ y MP. El estudio del microsatélite $(GA)_n$ permitió un análisis robusto de *H. capsulatum* aislado de nueve especies de murciélagos infectados de diferentes áreas geográficas, resaltando dos grandes grupos (I y II). Por otro lado, se formaron tres subgrupos dentro del grupo I, definidos cada uno con base en los cambios encontrados en el fragmento de 240 nt analizado del $(GA)_n$ y sus regiones flanqueantes.

Los análisis NJ y MP del microsatélite $(GA)_n$ como un fragmento génico, realiza mutaciones dentro de la longitud del microsatélite así como sustituciones dentro de sus regiones flanqueantes, revelando las complejidades de los eventos mutacionales generados en la diversidad de haplotipos del $(GA)_n$ valorada en la población de aislados de *H. capsulatum* estudiados de murciélagos naturalmente infectados. La distribución de los haplotipos está asociada posiblemente al origen geográfico de los aislados de *H. capsulatum* que a su vez puede estar relacionado con desplazamientos de algunas especies

migratorias de murciélagos. Esto es notable en la longitud de la secuencia del GACG(GA)₁₁GA, un haplotipo único encontrado en todos los aislados de *H. capsulatum* de la especie migratoria *T. brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) y la alta homología de los haplotipos fúngicos del grupo II de Argentina y Brasil (Tabla III y IV), considerando la divergencia genética con otros aislados de *H. capsulatum* del grupo I de México y del grupo externo de Estados Unidos.

La más alta diversidad genética fue asociada al grupo I que contiene los tres subgrupos de aislados mexicanos.

La diversidad nucleotídica (π), la cual es el promedio de la distancia entre pares de aislados, sugiere una posible población recombinante entre los aislados del subgrupo Ia y Ib, en contraposición con el subgrupo Ic que podría ser propuestos como monofiléticos.

La presencia de tres haplotipos distintos de *H. capsulatum*, GACG(GA)₆GA, GACG(GA)₇GA y GACGGACG(GA)₇GA, compartido por los murciélagos migratorios *L. nivalis* y *L. curasoae* y los no migratorios (*A. hirsutus*, *P. davyi* y *D. rotundus*), compromete a *L. nivalis* y *L. curasoae* como responsables del flujo genético en *H. capsulatum* dentro del territorio mexicano. Ambas especies, *L. nivalis* y *L. curasoae* migran entre México y Estados Unidos (Arita 2005a; 2005b; Wilson & Reeder 1993), sin embargo, a la fecha, los alelos mexicanos de (GA)_n no han sido identificados en los Estados Unidos.

El microsatélite (GA)_n agrupa, de un modo independiente, a todos los aislados de los murciélagos migratorios *T. brasiliensis*, lo que apoya la asociación de un haplotipo (GA)_n particular de *H. capsulatum* con esta especie de murciélago en la región sureste de México (estado de Chiapas y Oaxaca). Este hecho sugiere que este haplotipo de *H. capsulatum* asociado con *T. brasiliensis* puede tener otro origen geográfico, aunque *T. brasiliensis* comparte refugios con muy pocas especies de murciélagos. El murciélago de cola libre, *T. brasiliensis*, es una de las especies más abundantes en el hemisferio occidental, formando colonias numerosas de hasta decenas de millones de individuos (Arita 2005d; McCracken *et al.* 1994). Esta especie es encontrada a lo largo de América Central y Sudamérica, asimismo en Norteamérica desde la costa del Atlántico a la del Pacífico, en la latitud 40° N (Hall 1981). Dentro de Norteamérica, la subespecie

T. brasiliensis mexicana se presenta en México y en las partes sur y oeste de Estados Unidos. Las colonias en el suroeste de Estados Unidos y noreste de México son migratorias, con murciélagos hibernando en la parte central de México (Russell *et al.* 2005). Hallazgos filogeográficos recientes, utilizando cinco marcadores moleculares analizados en forma independiente y/o concatenada, apoyan la existencia de una población genética de aislados de *H. capsulatum* asociada a los murciélagos migratorios de la especie *T. brasiliensis* capturados en refugios de tres estados (Nuevo León, Oaxaca y Chiapas) localizados alejadamente en la República Mexicana (Taylor *et al.* 2009).

Con base en las distancias genéticas entre los aislados estudiados, la red de haplotipos del (GA)_n muestra una probable dispersión filogeográfica y ecotípica de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos infectados, y también sugiere una especiación alopátrica ecológicamente dirigida, debido a un circunscrito flujo genético a través de una limitada dispersión geográfica de *H. capsulatum* por murciélagos.

Los cambios genéticos dentro del microsatélite (GA)_n y regiones flanqueantes de *H. capsulatum* pueden ser propuestos como un marcador biogeográfico de acuerdo con la distribución de los haplotipos (GA)_n del hongo y con las rutas de migración de los murciélagos en América. Además, la correlación entre los cambios genéticos del hongo y los hábitos migratorios del murciélago pueden ayudar a conocer mejor las rutas migratorias de los murciélagos.

Con base en el primer reporte de un fósil de *T. brasiliensis* del Pleistoceno Tardío (Morgan 1985) y en el reporte del fósil más antiguo del género *Tadarida* del Plioceno Tardío (Morgan & Ridgway 1987) y considerando además que la radiación del complejo *Histoplasma* inició, probablemente en Sudamérica, desde 3-13 Ma (millones de años) (Mioceno) (Kasuga *et al.* 2003), es posible suponer que la interacción entre *T. brasiliensis* e *H. capsulatum* pudo haber iniciado desde el Pleistoceno Tardío.

Entre las siete especies filogenéticas de *H. capsulatum* propuestas por Kasuga *et al.* (2003), una de ellas, la de LAm A es la que presenta mayor diversidad y por ende, se ha sugerido que la radiación del hongo empezó en Latinoamérica. En esta población genética se ubicaron varios aislados del hongo obtenidos en

México y once de éstos (EH-53, EH-372, EH-373, EH-374, EH-376, EH-377, EH-378, EH-383P, EH-391, EH-394P y EH-408P), fueron analizados con el microsatélite (GA)_n en el presente estudio. Estos aislados se ubicaron en el grupo I, dentro de dos subgrupos: en el Ib que presentó mayor diversidad genética con valores de n más altos se ubicaron los aislados EH-378, EH-383P y EH-408P; en el Ic que reveló mayor homología con valores de n tendientes a cero se ubicaron los demás aislados de Lam A arriba mencionados. El aislado G-217B de Estados Unidos que fue utilizado como grupo externo en los análisis filogenéticos del presente estudio, pertenece a la especie filogenética NAM 1. Ninguno de los aislados del subgrupo Ia fue analizado por Kasuga *et al.* (2003), sin embargo, el estudio de Taylor *et al.* (2009) empleando un análisis multigénico con cinco marcadores agrupa a todos los aislados de *H. capsulatum* procedentes de *T. brasiliensis* (subgrupo Ia) con el linaje EH-315 propuesto previamente por Kasuga *et al.* (2003) correspondiente a un aislado de *H. capsulatum* obtenido de *Mormoops megalophylla*, capturado en Coapala, Guerrero. Estos hallazgos apoyan la propuesta de que los aislados de *H. capsulatum* del subgrupo Ia junto con el linaje EH-315 pueden constituir una nueva especie filogenética, que esta distribuida en el territorio mexicano, principalmente asociada a la especie migratoria *T. brasiliensis*.

Los patrones de distribución fúngica en la naturaleza asociada a dispersores y/o reservorios del hongo, inferidos por marcadores moleculares, podrían ser importantes para identificar en un mapa epidemiológico, áreas geográficas con alto riesgo de infección para hospederos mamíferos. Además, los marcadores moleculares específicos de *H. capsulatum* podrían ser útiles como herramientas potenciales para asociar la distribución geográfica de los murciélagos, considerando el tamaño y comportamiento de sus colonias, su habilidad de vuelo y hábitat específico.

Conclusiones

El análisis del microsatélite HSP-TC/(GA)_n destaca que los grupos y subgrupos en los árboles de NJ y MP de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados se asociaron de acuerdo con el largo de las secuencias de (GA)_n que comparten entre sí y los cambios genéticos de sus regiones flanqueantes. Esta diversidad genética se asocia al hábito migratorio de las especies de murciélagos estudiadas y/o con el origen geográfico del aislado.

Se destacan dos grandes grupos, el I que incluye todos los aislados de México y que presenta la más alta diversidad genética y el II que incluye los aislados de Brasil y Argentina, el cual tiene una alta homología.

Dentro del grupo I, el subgrupo Ia representado por el haplotipo GACG(GA)₁₁GA asociado a los aislados de *T. brasiliensis* resalta su distancia genética con los demás subgrupos del grupo I.

El subgrupo Ic puede ser considerado como monofilético, con base en los valores de π.

robustece la propuesta de la distribución filogeográfica y ecotípica de la especie *H. capsulatum* en ciertas regiones de América.

Referencias

Aguirre-Pequeño E. 1959. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México. *Gaceta Medica de México* **89**: 243-257.

Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuik C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. 2006. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 163-165.

Arita HT. 2005a. *Leptonycteris curasoae* Miller, 1900, Murciélago, pp. 221-222. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Arita HT. 2005b. *Leptonycteris nivalis* (Saussure, 1860), Murciélago, pp. 223-224. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Arita HT. 2005c. *Eumops bonariensis* (Peters, 1874), Murciélago, pp. 316-317. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Arita HT. 2005d. *Tadarida brasiliensis* (L. Geoffroy, 1824), Murciélago, pp. 335-337. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Canteros CE, Zuiani MF, Davel G, Schmidt G, Ritacco V, Taylor ML. 2005a. Brote de histoplasmosis en la Patagonia: Identidad genética de los aislamientos. *V*

Congreso Latino-Americano de Micología. Asociación Latinoamericana de Micología. Brasilia, Brasil. Agosto 1-5, resumen 258.

Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, Perrotta DE, Reyes-Montes MR, Granados J, Zúñiga G, Taylor ML, Davel GO. 2005b. Electrophoresis karyotypes and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **45**: 423-428.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. 1997. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* **18**: 1047-1053.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. 1996. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2577-2584.

Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. 2001. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genetics and Biology* **34**: 37-48.

Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1998. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)* **11**: 187-191.

Chick EW, Compton SB, Pass HT, Mackey B, Hernández C, Austin JRE, Pitzer FR, Flaningan C. 1981. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. *Chest* **80**: 434-438.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 3166-3170.

Di Salvo AF, Ajello L, Palmer JW Jr, Winkler WG. 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *American Journal of Epidemiology* **89**: 606-614.

Eck RV, Dayhoff MO. 1966. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation. Silver Spring, Maryland.

Emmons CW. 1958. Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Reports* **73**: 590-595.

Espinosa-Avilés D, Taylor ML, Reyes-Montes MR, Pérez-Torrez A. 2008. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **39**: 450-454.

Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**: 1591-1604.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach to using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

González-Ochoa A. 1963. Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México* **23**: 81-86.

Goodman NL, Larsh HW. 1967. Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* **33**: 145-156.

Grimaldi MC, Crouau-Roy B. 1997. Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 336-340.

Hall ER. 1981. *The Mammals of North America*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten-Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.

Hoff GL, Bigler WJ. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *Journal of Wildlife Diseases* **17**: 191-196.

Hoffmann A. 1998. Los ácaros asociados a hongos, su papel en la naturaleza. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México* **11**: 183-186.

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J,

Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.

Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, Lee CH. 2000. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 241-245.

Jiménez-Guzmán A, Ceballos G. 2005. *Pteronotus davyi* Gray, 1838, Murciélago, pp. 179-180. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Kasuga T, Taylor JW, White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 653-663.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology* **12**: 3383-3401.

Kaufman L, Standard PG. 1987. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annual Review of Microbiology* **41**:209–225.

Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1992. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *Journal of Clinical Microbiology* **30**: 2104-2107.

Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Bacteriology* **174**: 7075-7079.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.

Kimura M, Ohta T. 1978. Stepwise mutational model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **75**: 2868–2872.

Kleite PD, Diercks FH. 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and origins of bats in the canal zone. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **14**: 433-435.

Komori T, Sano A, Yarita K, Kitagawa T, Kamei K, Nishimura K. 2005. Phylogenetic analysis of *Histoplasma capsulatum* based on partial sequence of the D1/D2 region of the 28S rRNA gene. *Japanese Journal of Medical Mycology* **46**: 291-295.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

Lappe P, Ulloa M, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 1998. Levaduras asociadas con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)* **11**: 162-172.

Mahvi TA. 1970. Factors governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* **41**: 167-176.

McCracken GF, McCracken MK, Vawter AT. 1994. Genetic structure in migratory populations of the bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. *Journal of Mammalogy* **75**: 500-514.

McMurray DN, Greer DL. 1979. Immune responses in bats following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **28**: 1036-1039.

McMurray DN, Rusel LH. 1982. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**: 527-531.

Medeiros-Muniz M, Vera-Pizzini C, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira R. 2001. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 4487-4494.

Morgan GS. 1985. Fossil bats (Mammalia: Chiroptera) from the late Pleistocene and Holocene Vero fauna, Indian River County, Florida. *Brimleyana* **11**: 97-117.

Morgan GS, Ridgway RB. 1987. Late Pliocene (late Blancan) vertebrates from the St. Petersburg Times site, Pinellas County, Florida, with a brief review of Florida Blancan faunas. *Florida Paleontology* **1**: 1-22.

Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Ouchterlony O, Nilsson LA. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, pp. 19.1-19.44. In: Weir DM (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.

Pérez-Torres A, Rosas-Rosas A, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. 2009. Second case of histoplasmosis in a captive mara (*Dolichotis patagonum*): pathological findings. *Mycopathologia* **168**: 95-100.

Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y. 1998. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 3073-3076.

Retallack DM, Woods JP. 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Microbes and Infection* **1**: 817-825.

Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1998. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)* **11**: 195-201.

Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1404-1408.

Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. 2009. Identification of histoplasmosis

infection source from two captive maras (*Dolichotis patagonum*) of the same colony by using molecular and immunologic assays. *Revista Argentina de Microbiología* **41**: 102-104.

Rosas-Rosas A, Juan-Sallés C, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Garner MM. 2004. Disseminated *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection in a captive mara (*Dolichotis patagonum*). *The Veterinary Record* **155**: 426-428.

Russell AL, Medellín RA, McCracken GF. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. *Molecular Ecology* **14**: 2207-2222.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.

Santos GM, Castro-Arellano I. 2005a. *Molossus molossus* (Pallas, 1766), Murciélago, p. 324. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Santos GM, Castro-Arellano I. 2005b. *Molossus rufus* E. Geoffroy, 1805, Murciélago, pp. 325-326. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Spitzer ED. 1994. RFLP and its application to epidemiology of *Histoplasma capsulatum*, pp. 375-379. In: Maresca B, Kobayashi GS (eds.), *Molecular Biology of Pathogenic Fungi: A Laboratory Manual*. Telos Press, New York.

Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. 1990. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from

patients with acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* **162**: 258-261.

Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity* **57**: 1409-1412.

Standard PG, Kaufman L. 1976. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *Journal of Clinical Microbiology* **3**: 191–199.

Suzán GA. 2005. *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810), Murciélago vampiro, pp. 193-194. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.

Tamura M, Kasuga T, Watanabe K, Katsu M, Mikami Y, Nishimura K. 2002. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. *Japanese Journal of Medical Mycology* **43**: 11-19.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genetics and Biology* **30**: 207-212.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M; Zuñiga G. 2005a. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in

a central zone of Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **45**: 451-458.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. 1999a. Environmental conditions favoring bat infections with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **61**: 914-919.

Taylor ML, Estrada-Bárceñas DA, Hernández-García L. 2009. Diversidad genética de *Histoplasma capsulatum* asociada a murciélagos cavernícolas. *IX Congreso Nacional Mexicano de Espeleología*. Unión Mexicana de Asociaciones Espeleológicas (UMAE) y Sociedad Espeleológica de Tabasco. Villa Hermosa, Tabasco, México. Enero-febrero, pp 1-4.

Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999b. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 126-146.

Taylor ML, Granados J, Toriello C. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* **39**: 375-379.

Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montañón-Ortiz G, Pedroza-Serés M. 2000b. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gaceta Médica de México* **136**: 441-448.

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. 2000c. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico, pp. 29-35, In: Mojan RM, Benedik M (eds.), *Research Advances in Microbiology*. Global Research Network, Kerala.

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. 1997. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* **23**: 58-63.

Taylor ML, Ruíz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Álvarez RO, Roldán-Aragón Y, Romero-Martínez R, Sahaza-Carmona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval G. 2005b. Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **45**: 435-441.

Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C. 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: a biological approach. *Revista Mexicana de Micología* **10**: 49-62.

Téllez-Girón G. 2005. *Artibeus hirsutus* Andersen, 1906, Murciélago, pp. 226-227. In: Ceballos G, Oliva G (coords.), *Los Mamíferos Silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México.

Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis, pp. 373-407, In: Ajello L, Hay RJ (eds.), *Medical Mycology. Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. Arnold London and Oxford University Press, New York.

Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Park H, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 2006. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum* an integrative study in Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **77**: 153-168.

Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 1998. Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)* **11**: 173-182.

Vargas-Yáñez R, Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML. 1998. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)* **11**: 192-194.

Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. 1986. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *Journal of Bacteriology* **165**: 813-818.

Wilson DE, Reeder DAM. 1993. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 2nd ed. Smithsonian Institution Press. Washington.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology* **31**: 463-464.

Zarnowski R, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM, Woods JP. 2007. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 788-797.

TABLA IAislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados

Aislado	Especie	Hábito migratorio	Origen
EH-372	<i>A. hirsutus</i> (Ah)*	No migratorio	MS, MX
EH-373	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-374	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-375	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-376	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-377	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-378	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-383H	<i>L. nivalis</i> (Ln)*	Migratorio	MS, MX
EH-383I	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-383P	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-384H	<i>T. brasiliensis</i> (Tb)**	Migratorio	OC, MX
EH-384I	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	OC, MX
EH-384P	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	OC, MX
EH-391	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-393	<i>L. curasoe</i> (Lc)*	Migratorio	OC, MX
EH-394B	<i>L. curasoe</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-394H	<i>L. curasoe</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-394P	<i>L. curasoe</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-395B	<i>L. curasoe</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-395P	<i>L. curasoe</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-397I	<i>P. davyi</i> (Pd)***	No migratorio	OC, MX
EH-408H	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	PL, MX
EH-408P	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	PL, MX
EH-436	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-437	<i>D. rotundus</i> (Dr)*	No migratorio	MS, MX

TABLA I

Aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados
(continuación)

Aislado	Especie	Hábito migratorio	Origen
EH-449B	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-449I	<i>L. nivalis</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-450H	<i>L. curasoae</i> *	Migratorio	OC, MX
EH-522	<i>A. hirsutus</i> *	No migratorio	MS, MX
EH-575B	<i>E. bonariensis (Eb)</i> **	No migratorio	BA, AR
EH-626B	<i>L. curasoae</i> *	Migratorio	MS, MX
EH-655I	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
EH-655P	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
EH-658H	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
EH-658P	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
EH-670B	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
EH-670H	<i>T. brasiliensis</i> **	Migratorio	CS, MX
190/03	<i>M. rufus (Mr)</i> **	No migratorio	SP, BR
154/04	<i>M. molossus (Mm)</i> **	No migratorio	SP, BR
232/04	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
376-04	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
523/04	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
55/05	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
156/05	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
505/05	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
613/05	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR
631/05	<i>M. molossus</i> **	No migratorio	SP, BR

MS (Morelos); OC (Oaxaca); PL (Puebla); CS (Chiapas); BA (Buenos Aires); SP (São Paulo); MX (México); AR (Argentina); BR (Brasil). *Familia Phyllostomidae, **Familia Molossidae, ***Familia Mormoopidae.

TABLA IIDatos del GenBank de las secuencias de *H. capsulatum* analizadas

Aislado	No. Acceso	Aislado	No. Acceso
EH-53	GQ223268	EH-437	GQ223276
EH-372	GQ223269	EH-449B	GQ223280
EH-373	GQ223270	EH-449I	GQ223277
EH-374	GQ223271	EH-450H	GQ223278
EH-375	GQ184595	EH-522	GQ223279
EH-376	GQ223272	EH-575B	GQ131797
EH-377	GQ223273	EH-626B	GQ223267
EH-378	GQ219669	EH-655I	GQ180986
EH-383H	GQ219672	EH-655P	GQ180985
EH-383I	GQ219670	EH-658H	GQ180987
EH-383P	GQ219671	EH-658P	GQ254643
EH-384H	GQ180984	EH-670B	GQ180988
EH-384I	GQ180983	EH-670H	GQ180989
EH-384P	GQ180982	190/03	FJ977618
EH-391	GQ223274	154/04	FJ977617
EH-393	GQ219673	232/04	FJ977626
EH-394B	GQ225774	376-04	FJ977619
EH-394H	GQ225773	523/04	FJ977620
EH-394P	GQ225775	55/05	FJ977624
EH-395B	GQ225776	156/05	FJ977625
EH-395P	GQ254644	505/05	FJ977621
EH-397I	GQ223275	613/05	FJ977622
EH-408H	GQ223265	631/05	FJ977623
EH-408P	GQ223264	01869	GQ131798
EH-436	GQ223266	G-217B	L11390

TABLA III

Datos de la longitud de las secuencias de (GA)_n de los aislados de *H. capsulatum*

Muestra	No.	Origen	Especie	Haplotipos (GA) _n *	Grupo
Murciélagos	3	OC, MX	<i>Tb</i>	GAC CG (GA) ₁₁ GA	Ia
migratorios	6	CS, MX	<i>Tb</i>	GAC CG (GA) ₁₁ GA	Ia
	5	OC, MX	<i>Lc</i>	GAC CG (GA) ₆ GA	Ic
	3	MS, MX	<i>Ln</i>	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
	1	OC, MX	<i>Lc</i>	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
	3	MS, MX	<i>Ln</i>	GAC CG GAC CG (GA) ₇ GA	Ib
	1	OC, MX	<i>Lc</i>	GAC CG GAC CG (GA) ₇ GA	Ib
	2	PL, MX	<i>Ln</i>	GAC CG GAC CG (GA) ₇ GA	Ib
	1	MS, MX	<i>Lc</i>	GAC CG GAC CG (GA) ₇ GA	Ib
Murciélagos	3	MS, MX	<i>Ah</i>	GAC CG GAC CG (GA) ₇ GA	Ib
no migratorios	6	MS, MX	<i>Ah</i>	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
	1	OC, MX	<i>Pd</i>	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
	1	MS, MX	<i>Dr</i>	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
	9	SP, BR	<i>Mm</i>	GAG G (GA) ₆ GA	II
	1	SP, BR	<i>Mr</i>	GAG G (GA) ₆ GA	II
	1	BA, AR	<i>Eb</i>	GAG G (GA) ₆ AA	II
Cepa referencia	1	BA, AR	Hu	GAG G (GA) ₆ AA	II
Cepa referencia	1	HG, MX	Hu	GAC CG (GA) ₇ GA	Ic
Grupo externo	1	LA, EU	Hu	GAGAGAGA(GA) ₁₀ GA	

No. = Número de murciélagos de diferentes orígenes y especies. *La longitud de la secuencia (GA)_n está representada desde la primera guanina en la posición 2029 de la cepa G-217B (grupo externo). Las mutaciones del microsatélite están resaltadas en gris. Hu = Humano. Las abreviaturas están especificadas en la Tabla I, a excepción de HG (Hidalgo), LA (Louisiana) y EU (Estados Unidos).

TABLA IV

Diversidad nucleotídica (π) del (GA)_n y sus regiones flanqueantes de los aislados de *H. capsulatum* estudiados*

Origen		No.	π
	Grupo		
MX	I	37	0.02618
BR, AR	II	12	0.00586
	Subgrupo		
MX	Ia	9	0.01271
MX	Ib	10	0.00472
MX	Ic	18	0.00000

*Fragmentos (GA)_n = 240 nt/aislado. No. = Número de secuencias evaluadas. EU (Estados Unidos); MX (México); BR (Brasil); AR (Argentina). El análisis de diversidad nucleotídica se realizó con el programa DnaSP para Windows ver. 4.20.

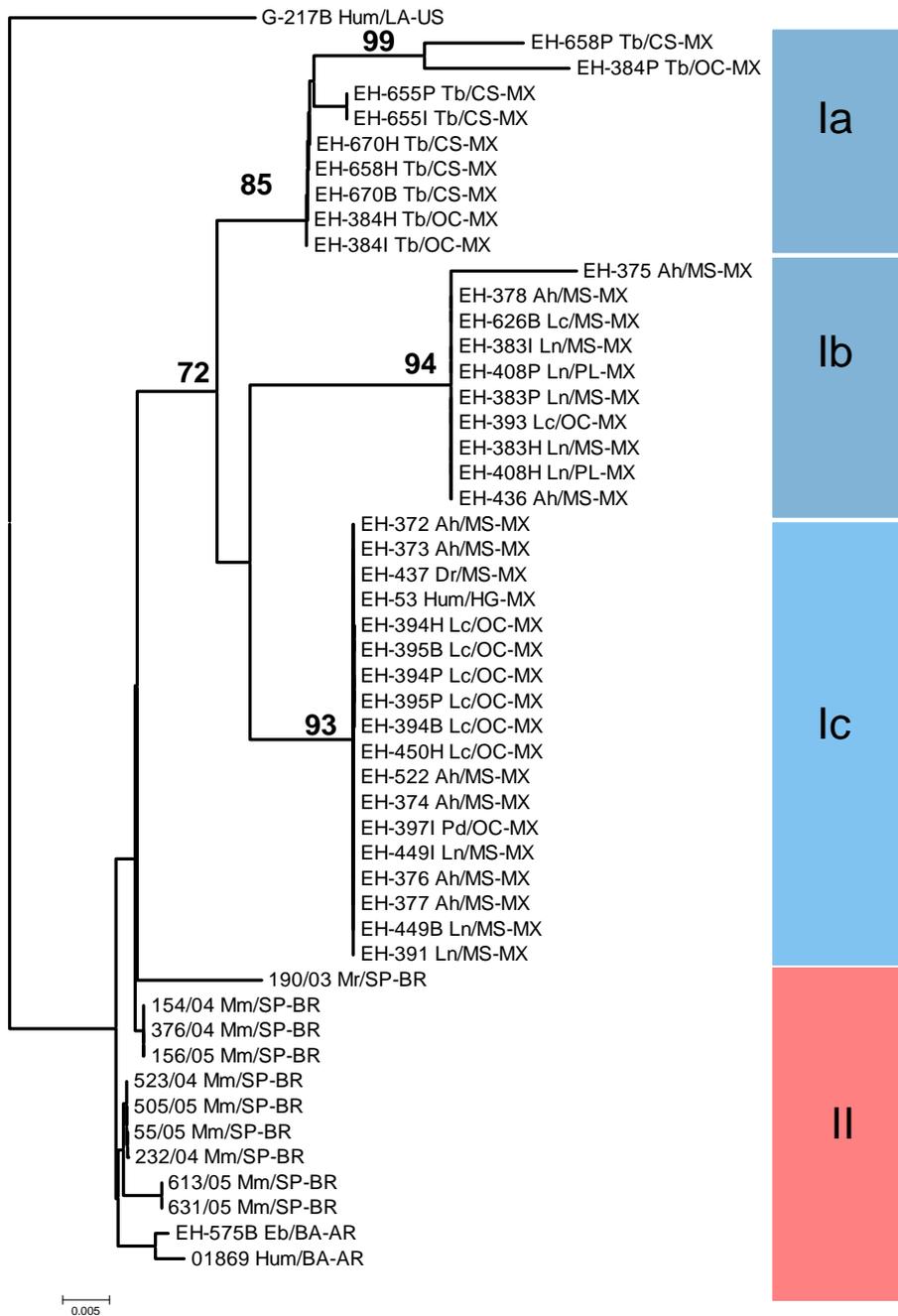


Fig. 1. Árbol de neighbor-joining de los fragmentos de $(GA)_n$. El árbol fue generado usando el modelo 2-parámetro de Kimura. El árbol fue construido en MEGA ver. 4.0 y arbitrariamente enraizado considerando 50 secuencias con un fragmento de 240 nt del gen *HSP60* de la cepa G-217B, LA-EU, utilizada como grupo externo. Se consideraron bootstrap $\geq 70\%$ y 1000 réplicas para el análisis de topología del árbol (ver detalles en Materiales y Métodos). MS (Morelos), OC (Oaxaca), PL (Puebla), CS (Chiapas), BA (Buenos Aires), SP (São Paulo), MX (México), AR (Argentina), BR (Brasil); *Ah* (*A. hirsutus*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Ln* (*L. nivalis*), *Pd* (*P. davyi*), *Dr* (*D. rotundus*), *Eb* (*E. bonariensis*), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Mr* (*M. rufus*), *Mm* (*M. molossus*).

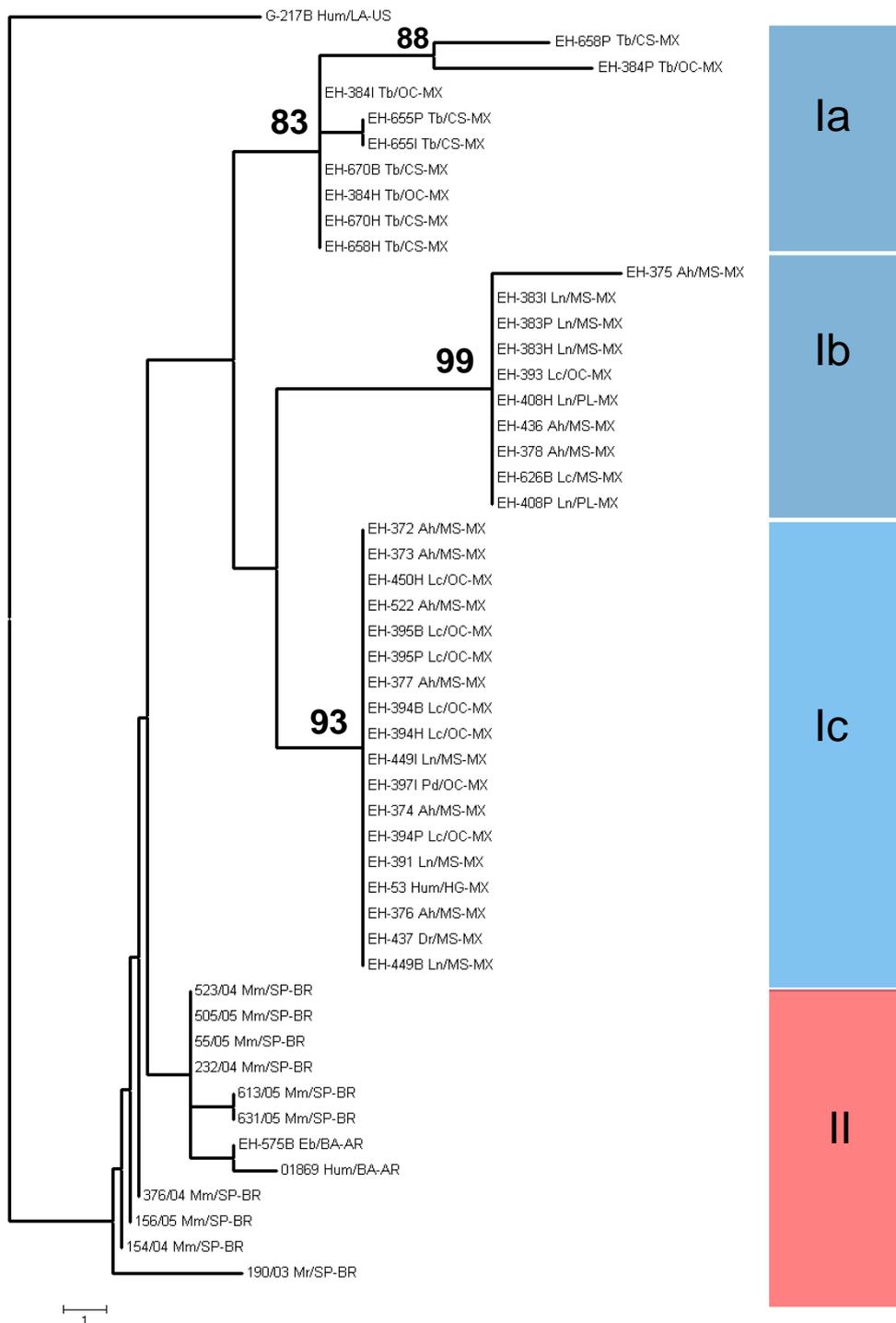


Fig. 2. Árbol de máxima parsimonia de los fragmentos de $(GA)_n$. El árbol fue generado por búsqueda heurística en MEGA ver. 4.0 y arbitrariamente enraizado considerando 50 secuencias con 240 nt. Se consideraron bootstrap $\geq 70\%$ y 1000 réplicas para el análisis de topología del árbol. El gen *HSP60* de la cepa G-217B, LA-EU fue utilizado como grupo externo. El análisis se realizó con los siguientes parámetros: MPT = 452; LT = 41; CI = 0.818182; HI = 0.181818; RI = 0.9741. Las abreviaturas están especificadas en la Fig. 1.

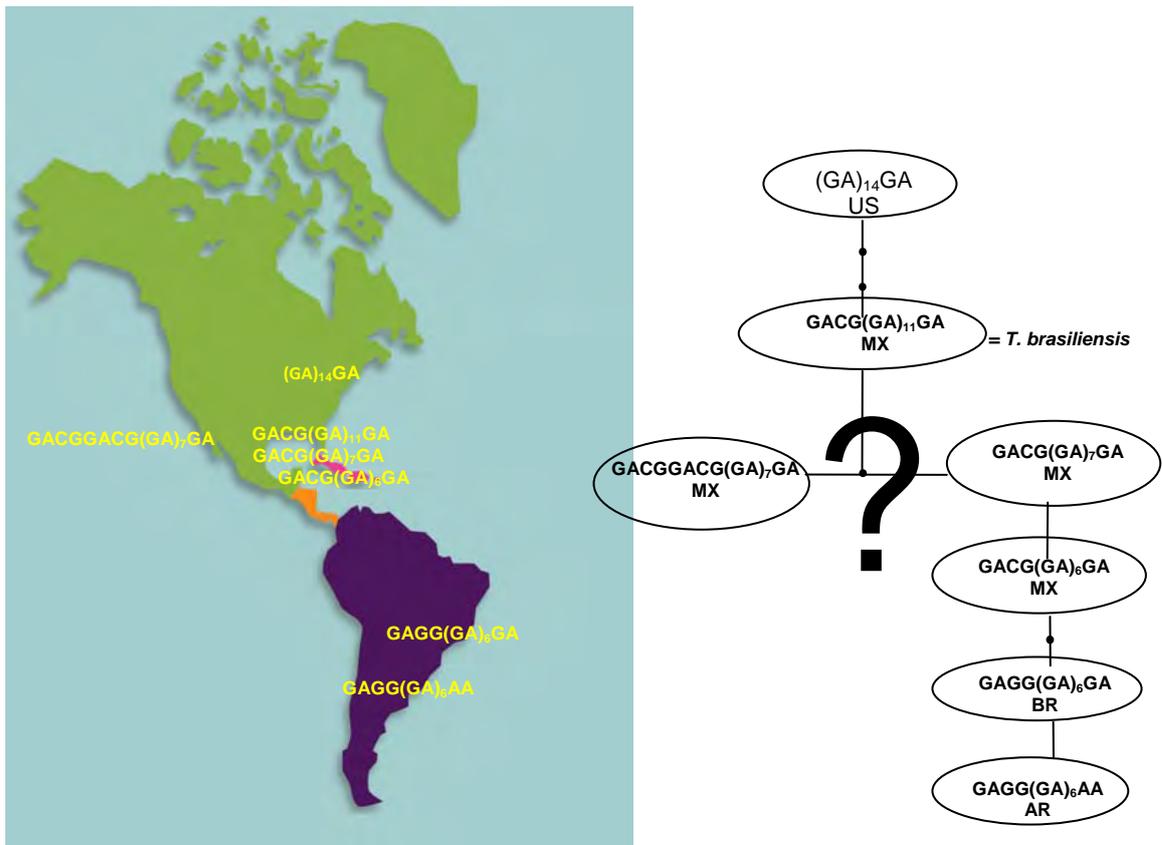


Fig. 3. Dispersión de los haplotipos asociados con la longitud de las secuencias (GA)_n de *H. capsulatum* en América. Se construyó un mapa de distancia genética del microsatélite (GA)_n, representado por nodos trazados (red haplotípica). Las distancias genéticas fueron realizadas por TCS ver. 2.0 (http://www.eng.auburn.edu/deparment/cse/research/graph_drawing/graph_drawing.html).