



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“APORTACIÓN A LA FILOGEOGRAFÍA
DE *Histoplasma capsulatum*: ANÁLISIS
MULTIGÉNICO DE AISLADOS DE
MURCIÉLAGOS Y HUMANOS,
PROCEDENTES DE LATINOAMÉRICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

TANIA MAYELA VITE GARÍN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARIA LUCIA TAYLOR

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES
DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna VITE GARÍN TANIA MAYELA con número de cuenta 97159535 con la tesis titulada: "APORTACIÓN A LA FILOGEOGRAFÍA DE *Histoplasma capsulatum*: ANÁLISIS MULTIGÉNICO DE AISLADOS DE MURCIÉLAGOS Y HUMANOS, PROCEDENTES DE LATINOAMÉRICA." realizada bajo la dirección de: DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUHNA E MELLO

Presidente: DRA. ESPERANZA MARÍA MARTÍNEZ ROMERO
Vocal: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Secretario: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCIO REYES MONTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de octubre de 2011

María del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional y terminar en tiempo y forma la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 324232 / 231985, del 1 de agosto de 2009 al 30 de julio de 2011 sin la cual no hubiera sido posible el desarrollo de la presente tesis.

Al proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM referencia IN-204210, el cual financió parcialmente esta tesis.

A la Dra. Maria Lucia Taylor por la confianza depositada en mí, por su valiosa orientación y por el gran conocimiento compartido a lo largo de mis estudios de posgrado.

A los miembros de mi Comité Tutor, Dra. María del Rocío Reyes Montes y Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, por el tiempo invertido y por cada una de sus aportaciones que contribuyeron a mejorar la calidad académica de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, “la Abi”, y a mi hermana “lala” por la ardua labor desempeñada como niñeras de mi nene. Gracias por aportarme tiempo indispensable que me ha permitido dar clases, estudiar y llevar a cabo esta tesis.

A mi papá quien financió una parte importante de los gastos generados para la impresión de mi tesis y mi titulación. Gracias, porque si ese apoyo este último jalón no habría sido posible.

Al M en C. Antonio Ramírez Barcenas por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de los ensayos de ésta tesis.

Al Dr. Daniel A. Estrada Bárcenas por el apoyo otorgado para la realización de los análisis de éste trabajo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina: Gaby, Toño G., Jorge y Raúl por los buenos y no tan buenos momentos compartidos, y porque de cada uno he aprendido algo acerca del trabajo diario en el lab.

DEDICATORIA

*A mi amor, mi compañero de vida, lo mejor que me ha pasado,
Ulises: cielo, lo logramos.*

*A mi "bebé de mamá", mi mayor pretexto para seguir siempre
adelante: Urieloso, por ser...aunque no siempre estuviste
dispuesto a cooperar, gracias.*

*A mi querida viejita, quien siempre está en mis
pensamientos...ojalá aun estuvieses aquí.*

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
Taxonomía de <i>H. capsulatum</i>	10
Características morfológicas y ecológicas de <i>H. capsulatum</i>	10
Antecedentes genéticos y filogeográficos de <i>H. capsulatum</i>	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
General	16
Particulares	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Aislados fúngicos	17
Procedimientos de bioseguridad	17
Cultivo de micelio de <i>H. capsulatum</i> y extracción del DNA	18
Determinación de la concentración y pureza del DNA	19
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los marcadores moleculares utilizados para los análisis filogenéticos de <i>H. capsulatum</i>	20
Amplificación de los genes: <i>ARF</i> , <i>H-ANTI</i> , <i>OLE1</i> , <i>TUB1</i>	20
Amplificación del microsatélite (GA) _n (HSP-TC)	20
Secuenciación de los marcadores	21
Análisis genéticos	22
Alineamientos	22
Análisis filogenéticos	22
Diversidad nucleotídica	23
Redes haplotípicas	23
RESULTADOS	24
Aislados de <i>H. capsulatum</i> estudiados	24
Extracción, amplificación y purificación del DNA	24

Análisis genéticos	25
Análisis de los alineamientos de las secuencias obtenidas	25
Análisis filogenéticos	32
<i>ARF</i>	32
<i>H-ANTI</i>	32
<i>OLE1</i>	33
<i>TUB1</i>	33
(GA) _n	34
Cinco marcadores concatenados	35
Diversidad nucleotídica	36
Redes haplotípicas	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	59
Tabla 2. Número de sitios informativos de los marcadores procesados en los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	60
Tabla 3. Valores de diversidad nucleotídica (π), considerando los cinco marcadores analizados en forma individual, para los grupos y subgrupos de aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	61
Tabla 4. Valores de diversidad nucleotídica (π), considerando los cinco marcadores analizados en forma concatenada, para los grupos y subgrupos de aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Alineamiento de las secuencias del marcador <i>ARF</i> para 38 aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados.	64
Fig. 2. Alineamiento de las secuencias del marcador <i>H-ANTI</i> para 38 aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados.	65
Fig. 3. Alineamiento de las secuencias del marcador <i>OLE1</i> para 38 aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados.	66
Fig. 4. Alineamiento de las secuencias del marcador <i>TUB1</i> para 38 aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados.	67
Fig. 5. Alineamiento de las secuencias del marcador (GA) _n para 33 aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados.	68
Fig. 6. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando el marcador <i>ARF</i> .	69
Fig. 7. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando el marcador <i>H-ANTI</i> .	70
Fig. 8 Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando el marcador <i>OLE1</i> .	71
Fig. 9 Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando el marcador <i>TUB1</i> .	72
Fig. 10. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando el marcador (GA) _n .	73
Fig. 11. Árbol de NJ de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando los cinco marcadores analizados en forma concatenada.	74
Fig. 12. Árbol de MP de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados, utilizando los cinco marcadores analizados en forma concatenada.	75
Fig. 13. Red de haplotipos para el marcador <i>ARF</i> .	76
Fig. 14. Red de haplotipos para el marcador <i>H-ANTI</i> .	77
Fig. 15. Red de haplotipos para el marcador <i>OLE1</i> .	78
Fig. 16. Red de haplotipos para el marcador <i>TUB1</i> .	79
Fig. 17. Red de haplotipos para el marcador (GA) _n .	80

RESUMEN

El hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* (*H.c.*) causa la micosis sistémica de mayor prevalencia en México y en el mundo, la histoplasmosis. Actualmente, es considerado un complejo de especies distribuidas en ocho clados y siete especies filogenéticas. Para generar mayor conocimiento de su diversidad genética y contribuir a su filogeografía, se han realizado varios estudios filogenéticos y de estructura de población, sin embargo, persisten muchas limitantes asociadas al manejo de un bajo número de aislados disponibles debido a su lento crecimiento y al sesgo generado por el origen de los aislamientos que no proceden de los diferentes huéspedes de la naturaleza. Con base en los antecedentes de marcadores filogenéticos del hongo que discriminan ecotipos de *H.c.* asociados a su diversidad genética intraespecífica, se planteó un estudio multigénico de aislados fúngicos obtenidos de murciélagos (principalmente) y de origen clínico con marcadores conocidos del hongo, analizándolos en forma independiente y/o concatenada. Se utilizaron aislados de *H.c.* de distintas procedencias geográficas (México, Brasil y Colombia) de murciélagos naturalmente infectados (30) y de casos clínicos (cinco), además de cepas de referencia (tres) adquiridas del ATCC, G-217B y Downs (Estados Unidos) y G-186B (Panamá). Los marcadores seleccionados fueron fragmentos de los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1*, *TUB1* y el microsatélite (GA)_n, los cuales se amplificaron y secuenciaron. La diversidad genética entre los aislados se analizó por el algoritmo “neighbor-joining” (NJ) con el modelo 2-parámetro de Kimura y por la búsqueda heurística a través del método de máxima parsimonia (MP). Ambos análisis se realizaron con 1000 réplicas, valores de BT \geq 70% y empleando la cepa G-217B como grupo externo. Se determinó la diversidad nucleotídica entre aislados y entre grupos y subgrupos de éstos, y asimismo, se construyeron redes haplotípicas para cada marcador. En general, los análisis de NJ y MP no mostraron diferencias en sus topologías y destacaron dos grandes grupos de aislados de *H.c.*, uno formado por todos los aislados obtenidos de murciélagos de la especie *Tadarida brasiliensis*, el único aislado de *Mormoops megalophylla* y los dos aislados de murciélagos del género *Molossus* procedentes de Brasil, mientras que el otro grupo incluyó el resto de los aislados. Algunos grupos de aislados de murciélagos procedentes de la misma

localidad y fecha de captura tendieron a formar grupos relacionados. Los análisis de diversidad nucleotídica para cada marcador individual y los cinco concatenados confirmaron la alta similitud de los grupos y subgrupos de aislados de *H.c.* revelados por los análisis filogenéticos, lo que aporta mayor robustez a los resultados arrojados por los árboles de NJ y MP. Las redes haplotípicas para cada marcador sugirieron una probable dispersión filogeográfica y ecotípica de los aislados de *H.c.* estudiados asociada con el comportamiento migratorio de los murciélagos que fueron fuente de aislamiento del hongo y las posibles áreas de infección de los casos clínicos humanos.

ABSTRACT

CONTRIBUTION TO THE PHYLOGEOGRAPHY OF *Histoplasma capsulatum*: MULTIGENETIC ANALYSIS OF BAT AND HUMAN ISOLATES FROM LATIN AMERICA

The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* (*H.c.*) causes histoplasmosis, the most prevalent systemic mycosis in Mexico and worldwide. Currently, it is considered a complex of species distributed in eight clades and seven phylogenetic species. To generate more knowledge on its genetic diversity and to contribute to its phylogeography, several genetic and population structure studies have been performed; however, there are still many limitations associated to the low number of available isolates because of their slow growth and bias due to the origin of isolates that do not come from the different hosts in nature. Based on the phylogenetic marker antecedents of the fungus that discriminate *H.c.* ecotypes associated to its intraspecific genetic diversity, we designed a multigenic study of fungal isolates obtained from bats (mainly) and of clinical origin with known markers of the fungus, analyzing them independently and/or in a concatenated manner. We used *H.c.* isolates from diverse geographical origins (Mexico, Brazil, and Colombia) from naturally infected bats (30) and from clinical cases (5), aside from reference strains (3) acquired from the ATCC, G-217B and Downs (USA) and G-186B (Panama). The chosen markers were fragment of the genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1*, *TUB1*, and the microsatellite (GA)_n, which were amplified and sequenced. Genetic diversity among the isolates was analyzed with the neighbor-joining (NJ) algorithm using Kimura's 2-parameter model, and through a heuristic search through the maximum parsimony (MP) method. Both analyses were performed in 1000 replicates with a BT value $\geq 70\%$ and using the G-217B strain as outgroup. We determined the nucleotide diversity among isolates and among groups and subgroups of isolates, and besides haplotype nets was constructed for each marker. In general, NJ and MP analyses revealed no differences in their topologies and pointed out two large groups of *H.c.* isolates. One constituted by all the isolates obtained from *Tadarida brasiliensis* bats, the sole isolate of *Mormoops megalophylla*, and the two isolates of bats of the *Molossus* genus from Brazil;

whereas the other group included the rest of the isolates. Some groups of isolates from bats captured from the same locality and at the same date tended to form related groups. Nucleotidic diversity analysis for each individual and the five concatenated markers confirmed the high similarity of the groups and subgroups of *H.c.* isolates as revealed by the phylogenetic analysis, providing more robustness to the data from the NJ and MP trees. The haplotypic nets for each marker suggested a probable phylogeographic and ecotypic dispersion of the studied *H.c.* isolates associated with the migratory behavior of the bats from which the fungal isolates were retrieved and with the possible infective areas of the human clinical cases.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la incidencia de enfermedades producidas por hongos patógenos se ha incrementado en humanos. Una de las razones de este aumento es la mayor exposición del huésped a factores que inducen inmunosupresiones de diferentes tipos que llevan a éstos a un mayor riesgo de infección con propágulos fúngicos. Entre estos factores se encuentran la administración de medicamentos y procedimientos inmunosupresores, además de diferentes enfermedades asociadas que alteran el sistema inmune, como es el caso de pacientes con SIDA. Entre las enfermedades de etiología fúngica asociada a huéspedes susceptibles inmunocomprometidos o inmunocompetentes, expuestos en zonas de alto riesgo de infección, destaca la histoplasmosis, micosis sistémica con compromiso respiratorio inicial de mayor impacto en el continente americano. Sus principales zonas endémicas se encuentran entre los valles de los ríos Mississippi y Ohio en los Estados Unidos y las áreas de mayor frecuencia de brotes epidémicos se localizan en los países latinoamericanos (Taylor *et al.* 1996; 2000b). Esta enfermedad fue descrita originalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, entre los paralelos 45° N y 35° S (Kwon-Chung & Bennett 1992); sin embargo, un nuevo registro de un brote autóctono en la latitud 54° N en Alberta, Canadá (Anderson *et al.* 2006), sugiere una mayor dispersión del patógeno en la naturaleza. Esto indica que la distribución geográfica del agente etiológico de la histoplasmosis se ha extendido y que, posiblemente, está relacionada al mayor alcance en la migración de mamíferos y de aves que actúan como dispersores de éste. En particular, destacan los murciélagos, mamíferos voladores que además de dispersores pueden servir como reservorios del patógeno, lo que implica una aclimatación tanto del dispersor como del hongo en nichos ecológicos localizados en áreas geográficas alejadas de los trópicos.

El hongo dimórfico, *Histoplasma capsulatum* Darling 1906 (anamorfo o asexual) o *Ajiellomyces capsulatus* (Kwon-Chung) McGinnis & Katz 1979 (teleomorfo o sexual) es el agente etiológico de la histoplasmosis.

Taxonomía de *H. capsulatum*

H. capsulatum comprende las tres variedades taxonómicas: *H. capsulatum* var. *capsulatum* - Darling, 1906; *H. capsulatum* var. *duboisii* (Vanbreuseghem, 1957) - Ciferri, 1960; y *H. capsulatum* var. *farciminosum* (Rivolta, 1873) - Weeks, Padhye, et Ajello, 1985. Las tres variedades se identifican por su micromorfología, distribución geográfica, asociación con el huésped y formas clínicas de la enfermedad que producen. Mientras que, *A. capsulatus* comprende una única especie.

Los géneros *Histoplasma* y *Ajellomyces* son el mismo hongo holomorfo, terminología asignada a los hongos con esporulación teleomorfa junto con todos sus estados anamorfos.

La especie *H. capsulatum* se sitúa en el Reino Fungi, Phylum Ascomycota, dentro de la Clase Eurotiomycetes, Subclase Eurotiomycetidae, Orden Onygenales, Familia Onygenaceae y/o Ajellomycetaceae (James *et al.* 2006; Hibett *et al.* 2007; *Index Fungorum* 2011).

Características morfológicas y ecológicas de *H. capsulatum*

Histoplasma capsulatum, es un hongo heterotálico que tiene dos tipos haploides de compatibilidad sexual denominados (a/+) y (α/-), también llamados “major” o “minor”. El teleomorfo, resultante del apareamiento de estos haplotipos, presenta cuerpos fructíferos cerrados denominados cleistotecios que contienen ascas subesféricas evanescentes, donde se forman ascosporas de 1.2-1.5 μm de diámetro (Kwon-Chung & Bennett 1992).

El hongo es saprobio-geofílico en su fase micelial (M) infectiva que crece en un rango de temperatura óptima de 25-28 °C y desarrolla filamentos (hifas) multicelulares. En el laboratorio, *H. capsulatum* es uno de los pocos hongos que presenta crecimiento lento en medios de cultivo. Desarrolla colonias albinas (A) o pigmentadas (B, del inglés “brown”) (Kwon-Chung & Bennett 1992; Tewari *et al.* 1998), cuyo color varía de pardo claro a oscuro por la presencia de melanina en las paredes de hifas y conidios (Nosanchuck *et al.* 2002). Comúnmente, se registran colonias B que conforme se resiembran en medios de cultivo cambian a

A (Taylor *et al.* 1999c) y, ocasionalmente, presentan un pigmento rojo difusible en el medio que no está asociado a las estructuras celulares del hongo y que aun no ha sido caracterizado (Morris *et al.* 1986; Taylor *et al.* 2008). Microscópicamente, las hifas miden de 1.2-1.5 μm de diámetro y forman microconidios y macroconidios. Los microconidios son redondos, piriformes o claviformes de 1-4 x 2-6 μm , sésiles o unidos a conidióforos. Los macroconidios tuberculados o digitiformes típicos de la especie son de paredes gruesas, redondos o clavados de 8-14 μm de diámetro que presentan proyecciones de diferentes tamaños que simulan dedos (digitiformes) (Taylor *et al.* 2008). Sin embargo, algunas veces se observan macroconidios atípicos sin proyecciones. Por lo general, los macroconidios se encuentran adheridos a las hifas a través de conidióforos cortos que suelen formar ángulos de aproximadamente 90°.

El hongo presenta una fase levaduriforme (L) unicelular, la cual es parasitaria-virulenta y se desarrolla preferencialmente dentro de macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas, células epiteliales y endoteliales de huéspedes susceptibles, así como a 37 °C tanto en medios de cultivo complejos o sintéticos adicionados con suplementos, especialmente glucosa y cisteína. Las colonias de la fase L tienen aspecto cremoso con color variable del beige claro a oscuro, pueden ser adherentes o no al medio y presentan superficie rugosa (colonias R) o lisa (colonias S), esta última asociada a células avirulentas sin α -(1,3)-glucana en la pared celular (Eissenberg *et al.* 1996). La micromorfología de las levaduras está representada por células ovaladas que varían de 1.3-2 x 2-6 μm de diámetro, uninucleadas y unigermantes con brotes de base estrecha (Taylor *et al.* 2008). Las levaduras también presentan melanina asociada a la pared celular (Nosanchuck *et al.* 2002).

En el ambiente, el hongo crece favorablemente en guano de murciélagos y aves o en alimento balanceado para ganado (gallinazas o pollinazas), debido a la presencia de altas concentraciones de nitrógeno, fósforo y oligoelementos que conforman los factores bióticos necesarios (nutrientes) para el desarrollo de este microorganismo. Los factores abióticos, representados por las condiciones físicas como poca luz (que favorece la esporulación), temperaturas óptimas (de ambiente y de suelo) entre 25-30 °C y humedad relativa > 60%, aunados a los bióticos conforman el nicho ecológico ideal de *H. capsulatum* (Kwon-Chung & Bennett

1992; Tewari *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1999a; 1999c; 2000b). Taylor *et al.* (1994) han aislado el hongo de guano colectado de diferentes profundidades y evidencias indirectas, por ensayos de ELISA para determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum* en ratones inoculados con sobrenadantes de guano, han demostrado la presencia del patógeno en muestras de hasta 22.5 cm de profundidad. Actualmente, la presencia del hongo en material clínico y biológico de diferentes procedencias se detecta por métodos moleculares, los cuales son más rápidos y sensibles que los inmunológicos y más aún que los micológicos (Bialek *et al.* 2002; Bracca *et al.* 2003; Taylor *et al.* 2005b; Estrada-Bárceñas *et al.* 2007; Espinosa-Avilés *et al.* 2008; Reyes-Montes *et al.* 2009). Se han realizado, por distintos investigadores, estudios sobre la micobiota asociada al nicho ecológico de *H. capsulatum*. Particularmente en México, Ulloa *et al.* (1998; 2006) han descrito algunas especies de hongos filamentosos no patógenos como *Acremonium* sp., *Aspergillus terreus*, *A. versicolor*, *Gymnascella citrina*, *Gymnoascus dankaliensis*, *Malbranchea aurantiaca*, *Penicillium* spp., *Aphanoascus fulvescens*, *Chaetomidium fimeti*, *Phoma* sp. Asimismo, Lappe *et al.* (1998) refieren levaduras como *Candida catenulata*, *C. ciferrii*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula* spp. en guano de murciélagos y aves. Esta micobiota asociada es parte de la cadena trófica propia del nicho ecológico de *H. capsulatum*. Ácaros micófagos que se alimentan de hongos del guano de murciélago también pueden estar asociados al nicho ecológico de *H. capsulatum* y, posiblemente, desempeñan un papel de dispersión del hongo a través de un mecanismo forético, según lo sugerido por Hoffmann (1998) y demostrado por Estrada-Bárceñas *et al.* (2010).

En México, *H. capsulatum* se encuentra en lugares especiales que pueden ser definidos como sitios de alto riesgo de infección y que se asocian a la forma epidémica de la enfermedad, en particular, ambientes cerrados como cavernas, cuevas, minas, bocaminas, túneles, puentes, criptas de iglesias y construcciones abandonadas, donde se acumulan guano de murciélagos. *Histoplasma* también se encuentra disperso en los denominados sitios de bajo riesgo de infección asociados a la forma endémica de la enfermedad, en general, ambientes abiertos como patios caseros o bajo el follaje de los árboles en parques y paseos públicos donde se depositan excretas de aves y murciélagos (Taylor *et al.* 2000b).

Antecedentes genéticos y filogeográficos de *H. capsulatum*

Histoplasma capsulatum representa un complejo de especies y es considerado una especie críptica (Kasuga *et al.* 1999). Con base en las secuencias parciales de cuatro genes, factor de ribosilación del ADP (*ARF*), precursor del antígeno H (*H-ANTI*), desaturasa Δ -9 de ácido graso (*OLE1*) y α -tubulina (*TUB1*), Kasuga *et al.* (2003) han propuesto una clasificación filogenética de la especie *H. capsulatum* que incluye ocho clados: Norte América clase 1 (NAm 1); Norte América clase 2 (NAm 2); Latinoamérica grupo A (LAm A); Latinoamérica grupo B (LAm B); Australiano; Holandés; Eurasiano; y Africano. De estos ocho clados siete representan especies filogenéticas, con excepción del clado Eurasiano. El estudio filogeográfico de Kasuga *et al.* (2003), se realizó con 137 aislados de *H. capsulatum* procedentes de 25 países, siendo que la mayoría de los aislados estudiados fueron de origen clínico. Taylor *et al.* (2005a), utilizando los mismos marcadores y 14 aislados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* obtenidos de murciélagos naturalmente infectados, capturados en México y con distintos hábitos migratorios (*Artibeus hirsutus*- no migratorios y *Leptonycteris nivalis*, *L. curasoae*, *Tadarida brasiliensis mexicana*- migratorios), sugieren la existencia de una nueva población genética de *H. capsulatum*.

Distintas estructuras de poblaciones (clonales y recombinantes) de aislados de *H. capsulatum* han sido referidas por diversos autores (Carter *et al.* 1996; 1997; 2001; Kasuga *et al.* 1999; Taylor *et al.* 1999b). Particularmente, Carter *et al.* (1996; 1997; 2001), generaron varios marcadores moleculares para determinar tanto la estructura de población como el polimorfismo genético de aislados de Estados Unidos y Colombia, con base en diferentes métodos, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-convencional (Polymerase Chain Reaction), AP-PCR/RAPD (Arbitrarily Primed-PCR/Random Amplification of Polymorphic DNA), SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Estos autores reportaron un marcado polimorfismo genético asociado a patrones genotípicos multilocus generados por RFLP, AP-PCR y SSCP en treinta aislados clínicos procedentes de Indianápolis, Estados Unidos, y asimismo refieren para este grupo de aislados una estructura de población recombinante (Carter *et al.* 1996). Posteriormente, realizaron análisis de

poblaciones genéticas con 11 de los marcadores bialélicos previamente utilizados y tres nuevos marcadores multialélicos (microsatélites), éstos últimos caracterizados por tener motivos repetitivos hipervariables y ser altamente polimórficos. Los tres loci microsatélites, CA(T)_n, (CA)_n y (TC)_n, este último también denominado HSP-TC o (GA)_n, permitieron distinguir aislados individuales de Indianápolis y discriminar poblaciones de *H. capsulatum* de Estados Unidos y de otra procedencia geográfica (Colombia) (Carter *et al.* 1997). Por tal motivo, estos autores han propuesto el uso de varios microsatélites para distinguir aislados a nivel individual, y asimismo, para llevar a cabo estudios epidemiológicos y de tiempos evolutivos (Carter *et al.* 1997). Finalmente, Carter *et al.* (2001) realizaron un estudio multilocus utilizando la información del polimorfismo de 11 marcadores SNPs y el microsatélite (GA)_n para identificar los niveles de diferenciación genética de poblaciones de *H. capsulatum* de Norte y Sudamérica, considerando un total de 69 aislados fúngicos, de los cuales 16 procedieron de Colombia. Una significativa diversidad genética fue encontrada entre aislados procedentes de distintas regiones de Estados Unidos y, asimismo, para las poblaciones del hongo de Norte América y de Sudamérica (Colombia) lo que apoya la probable existencia de diferentes especies filogenéticas de *H. capsulatum*.

Nuevos datos fueron obtenidos con las secuencias parciales de los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1* y *TUB1* (Taylor *et al.* 2005a) y del microsatélite (GA)_n (Taylor *et al.* 2011), en muestras de aislados de *H. capsulatum* recuperados de murciélagos con hábitat cavernícola. Un análisis posterior, utilizando estos cinco marcadores moleculares procesados de manera concatenada, detectó la separación de un grupo de aislados obtenidos del murciélago migratorio *T. brasiliensis mexicana* que está siendo propuesto como un nuevo clado, posiblemente más asociado a los clados hermanos de Norte América (Taylor *et al.* 2009).

Con base en los antecedentes filogeográficos del hongo, el estudio multigénico de aislados fúngicos de murciélagos y de casos clínicos humanos utilizando varios marcadores moleculares analizados de forma independiente o concatenada permitirá discriminar ecotipos geográficos de *H. capsulatum* asociados a su gran diversidad genética intraespecífica y monitorear la distribución geográfica de este patógeno en algunos países de América, lo cual generará información útil para

ampliar el conocimiento sobre la asociación ecológica, evolutiva y posible dispersión del patógeno en diferentes regiones geográficas, contribuyendo así a la epidemiología de la histoplasmosis.

JUSTIFICACIÓN

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se han seleccionado algunos marcadores bien estudiados en *H. capsulatum* y que cuentan con suficientes sitios informativos para arrojar, en un análisis multigénico más amplio, resultados importantes que permitan distinguir diferencias genéticas intraespecíficas del hongo asociado a distintas distribuciones geográficas y a un huésped silvestre con actividad de dispersión del patógeno, como son los murciélagos. Entre los marcadores propuestos, se utilizaron los fragmentos génicos de los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1* y *TUB1*, además del marcador (GA)_n que tiene un alto poder discriminatorio y es altamente polimórfico, tanto en el largo del microsatélite como en sus regiones flanqueantes, lo que le ha permitido distinguir aislados individuales y poblaciones de éstos de diferentes orígenes geográficos.

HIPÓTESIS

El análisis multigénico a través de marcadores moleculares con muchos sitios informativos permitirá conocer con más robustez la diversidad genética intraespecífica de aislados de *Histoplasma capsulatum* obtenidos de murciélagos y humanos, el cual podrá aportar nuevos datos a la filogeografía de este patógeno.

OBJETIVOS

- **General**

Contribuir al conocimiento de la filogeografía del patógeno *H. capsulatum* por medio de un análisis multigénico.

- **Particulares**

- 1) Evidenciar mayor diversidad genética entre aislados de *H. capsulatum* a través del uso de marcadores moleculares muy informativos.
- 2) Correlacionar los resultados de los análisis genéticos con la procedencia geográfica de los aislados fúngicos.
- 3) Proponer patrones filogenéticos para los grupos de aislados fúngicos estudiados, de acuerdo con su distribución geográfica y el huésped asociado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados fúngicos

Se utilizaron 30 aislados de *H. capsulatum* provenientes de murciélagos naturalmente infectados y capturados al azar en México (Estados de: Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca y Puebla) y Brasil (Municipios de Jundiá y Mogi Mirim, São Paulo) y, asimismo, cinco aislados clínicos de pacientes con histoplasmosis procedentes de México y Colombia. Se estudiaron simultáneamente tres cepas de referencia del ATCC, G-217B y Downs de Estados Unidos y G-186B (Panamá). Los datos generales de cada aislado y/o cepa estudiados están referidos en la tabla 1. Todos los aislados del estudio están depositados en la Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina, UNAM (Taylor *et al.* 1999c). Esta colección se encuentra registrada en la base de datos de la Word Data Centre on Microorganisms (WDCM) de la Word Federation for Culture Collection (WFCC) con el No. LIH-UNAM WDCM817, con acceso electrónico: <http://wdcm.nig.ac.jp/CCINFO/CCINFO.xmlk?817>.

Procedimientos de bioseguridad

Debido a que *H. capsulatum* es clasificado como un patógeno de riesgo biológico nivel 3, su manejo se realizó en una área restringida de la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Esta área se adaptó para funcionar bajo condiciones adecuadas de bioseguridad y cuenta con campanas de bioseguridad tipo II con filtros HEPA en las cuales se efectuó el manejo de la fase micelial (infectiva) del patógeno. Asimismo, dentro de la misma área se cuenta con espacios adaptados *ex profeso* para los diferentes procedimientos de biología molecular. El acceso a cualquiera de los espacios de trabajo de riesgo biológico y molecular está limitado al personal de la Unidad de Micología y bajo un reglamento específico. En esta área sólo se trabaja bajo condiciones de bioseguridad acordadas previamente por la

comunidad de la Unidad de Micología y los desechos de todo el material biológico y molecular se manejan de acuerdo con lo establecido por la Comisión de Manejo de Residuos Biológicos y Químicos de la Facultad de Medicina, UNAM.

Cultivo de micelio de *H. capsulatum* y extracción del DNA

Los aislados de *H. capsulatum* se cultivaron en medio GYE-líquido (glucosa 2% y extracto de levadura 1%) a 26 °C, durante 3-4 semanas. La biomasa micelial se cosechó por filtración en un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 1 ó por centrifugación a 6000 rpm durante 30 min. Se lavó dos veces con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0) y agua Milli-Q estéril. Se secó la biomasa micelial con papel filtro estéril y se almacenó a -20 °C. La pureza del cultivo micelial con crecimiento en medio líquido, se comprobó por medio de la prueba de exoantígenos específicos en IDG con el filtrado concentrado de éste y sólo los cultivos cuyos filtrados desarrollaron reacción de precipitación con el suero testigo positivo se utilizaron para la extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó en campana de bioseguridad, depositando de 5-7 g de micelio seco en un tubo de centrifuga Falcon estéril de 50 mL y agregando suficiente amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl a pH 7.1, 50 mM EDTA a pH 8.0, 3% SDS, 1% β -mercaptoethanol) para cubrirlo. Posteriormente, se trituró el micelio en condiciones estrictas de seguridad, utilizando un sistema de aspas estériles adaptadas a un homogeneizador ULTRA-TURRAX T8 (IKA® Works, Inc., Wilmington, NC), dando tres pulsos de 1 min cada uno. El triturado se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron a 14000 rpm, 4 °C, 15 min y se transfirieron 0.5 mL del sobrenadante de cada tubo a nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 5 μ L de RNasa (100 mg/mL) a cada tubo, se agitaron en vórtex y se incubaron a 37 °C por 2 h o bien toda la noche. Enseguida, se agregaron 10 μ L de proteinasa K (concentración final 200 μ g/mL) a cada tubo, se agitaron en vórtex y se incubaron a 60 °C, durante 1 h. Posteriormente, a cada tubo se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló por inversión (60 veces) hasta obtener una solución homogénea, la cual se centrifugó a 14000 rpm, durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL. Una vez más, se agregó un volumen de fenol-

cloroformo-isoamílico y se repitió el procedimiento anterior. A la fase acuosa final recuperada se le añadió acetato de sodio 3 M (1/40 del volumen obtenido) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, agitando suavemente para precipitar el DNA o se dejó toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, se centrifugó a 14000 rpm, durante 2 min, se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm, durante 1 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol del precipitado final. Finalmente, el DNA se resuspendió en 100 µL de agua Milli-Q y se almacenó a -20 °C hasta su uso. En todos los procedimientos se utilizaron tubos y puntas de baja retención de ácidos nucleicos (Axygen Scientific, Inc., Union City, CA) para evitar la pérdida de éstos por adherencia al plástico y en consecuencia aumentar su rendimiento.

Determinación de la concentración y pureza del DNA

Ambas características se determinaron por electroforesis (100-120 V, 50 min) en gel de agarosa al 0.8% preparado en amortiguador TBE 0.5 X, pH 8.0 (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (10 µg/mL). Se tomaron 2 µL de cada muestra de DNA que se mezclaron con 2 µL de solución indicadora de carga 10X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 25% y Ficoll-400 25%) antes de aplicarla en el gel en sus respectivos carriles. Los carriles extremos se reservaron para la aplicación de 2 µL de las diluciones de 10 y 20 ng/µL de una muestra del fago Lambda (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) utilizada como estándar de tamaño molecular para estimar la concentración de DNA de las muestras. El gel se visualizó en un transiluminador UV MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP Inc., Upland, CA) cuya imagen se fotodocumentó en archivos digitales formato TIFF empleando el software VisionWorksLS versión 6.1.1 (UVP). Finalmente, las muestras de DNA se ajustaron a la concentración deseada y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los marcadores moleculares utilizados para los análisis filogenéticos de *H. capsulatum*

Amplificación de los genes: *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1* y *TUB1*

A partir de las secuencias parciales de cuatro genes que codifican proteínas se diseñaron los oligonucleótidos según Kasuga *et al.* (1999; 2003), a saber: para el gen *ARF* (factor de ribosilación del ADP) los oligonucleótidos *arf1* (5'-AGAATATGGGGCAAAAAGGA-3') y *arf2* (5'-CGCAATTCATCTTCGTTGAG-3'); para el gen *H-ANTI* (molécula precursora del antígeno H) *H-anti3* (5'-CGCAGTCACCTCCATACTATC-3') y *H-anti4* (5'-GCGCCGACATTAACCC-3'); para el gen *OLE1* (desaturasa delta-9 de ácido graso) *ole3* (5'-TTTAAACGAAGCCCCCACGG-3') y *ole4* (5'-CACACCTCCAACAGCAGCA-3'); y para el gen *TUB1* (alfa-tubulina) *tub1* (5'-GGTGGCCAAATCGCAAACCTC-3') y *tub2* (5'-GGCAGCTTTCCGTTCCCTCAGT-3') (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones: se usaron 10 ng de DNA genómico en una mezcla de reacción de 25 μ L conteniendo 0.2 μ M de cada oligonucleótido probado, 1 U de *Taq*-DNA polimerasa (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA), 1 X del amortiguador comercial B10X de la *Taq*, 2.5 mM MgCl₂ y 200 μ M de cada dNTP (Applied Biosystems) en un termociclador MAXYGENE Thermal Cycler (Axygen) con el siguiente programa de ciclado: un ciclo a 94 °C-5 min, seguido de 32 ciclos a 94 °C-15 s, a 65 °C-30 s y a 72 °C-1 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C-5 min. La temperatura inicial de alineación de 65 °C fue paulatinamente reducida en 0.7 °C por ciclo, durante los primeros 12 ciclos. Posteriormente, la PCR siguió a una temperatura de alineación de 56 °C para los 20 ciclos restantes.

Amplificación del microsatélite (GA)_n (HSP-TC)

Para su amplificación se utilizaron los oligonucleótidos: *HSP-TC/L* (5'-GAAGCCCTGGAGGTAGACGA-3') y *HSP-TC/U* (5'-GACCACGAGTGGTTCCCGAA-3') (Invitrogen) como fueron descritos por Carter *et al.* (1997, 2001) y Taylor *et al.* (2011).

La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: se usaron 20 ng de DNA genómico en una mezcla de reacción de 25 μ L, conteniendo 100 pmoles/mL de cada oligonucleótido, 1 U de *Taq*-DNA polimerasa (Applied Biosystems), 1 X del amortiguador comercial B10X de la *Taq*, 2.0 mM MgCl₂, y 200 μ M de cada dNTP (Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MAXYGENE Thermal Cycler (Axygen) con el siguiente programa: un ciclo a 94 °C-5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C-1 min, a 60 °C-1 min y a 72 °C-1 min; y un ciclo final de extensión a 72 °C-5 min.

En todas las amplificaciones se utilizó, como testigo positivo el DNA del aislado EH-53, obtenido de un caso clínico de histoplasmosis diseminada; y como testigo negativo agua Milli-Q.

Secuenciación de los marcadores

Los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% bajo las mismas condiciones de corrida mencionadas para la cuantificación de DNA. Se utilizó como marcador de tamaño molecular el 100-pb DNA Ladder (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Los geles se visualizaron con el transiluminador MultiDoc-It System (UVP Inc) y las imágenes se capturaron en extensión TIFF.

La purificación de los productos se realizó con los kits Montage[®] PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Bedford, MA) y/o QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) que optimiza la recuperación del producto según su tamaño molecular. El DNA amplificado se envió a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para la secuenciación de ambas hebras (sentido y antisentido) en un aparato ABI-automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Se generó una secuencia consenso para cada aislado.

Las secuencias obtenidas para cada marcador están en proceso de depósito en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>).

Análisis genéticos

Alineamientos

Las secuencias de los cinco marcadores de cada aislado y/o cepa estudiados así como de las cepas de referencia fueron alineadas con MEGA versión 5.0 (MEGA5) (<http://www.kumarlab.net/publications>) y editadas visualmente. Para llevar a cabo la alineación de cada marcador se consideraron los siguientes fragmentos génicos: 450 nucleótidos (nt) del 415 al 865 nt para *ARF*; 391 nt del 394 al 785 nt para *H-ANTI*; 414 nt del 37 al 450 nt para *OLE1*; 271 nt del 590 al 860 nt para *TUB1*; y 240 nt del 1971 al 2210 nt para el microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes.

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron con el mismo programa en forma independiente para cada marcador y concatenada para los cinco marcadores (análisis multigénico). Las relaciones filogenéticas entre los aislados fueron evaluadas 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 deleciones de pares de bases (gaps/missing data) y las tasas de mutación uniformes entre los sitios analizados; y 2) el método de máxima parsimonia (MP) (Eck & Dayhoff 1966), empleando el algoritmo del vecino más cercano (close-neighbor-interchange) (Nei & Kumar 2000) y los “gaps” fueron utilizados como quinto carácter. La prueba de bootstrap (BT) (Felsenstein 1985) con 1000 réplicas fue realizada tanto para NJ como para MP y se consideraron los BT $\geq 70\%$. Para cada análisis se utilizó la cepa G-217B como grupo externo, las secuencias de ésta para cada marcador se obtuvieron de la base de datos del GenBank (números de acceso: L25117.1, U20346, X85962.1, M28358.1 y L11390.2 para *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1*, *TUB1* y (GA)_n respectivamente).

Diversidad nucleotídica

Se estimó la diversidad nucleotídica (π) para todos los aislados de *H. capsulatum* muestreados entre grupos y subgrupos de éstos, para cada marcador analizado individualmente o en forma concatenada, usando los datos generados por los análisis de MP con el programa para Windows DnaSP ver. 5.10 (Librado & Rozas 2009).

Redes haplotípicas

Las redes de haplotipos asociadas con las secuencias de cada uno de los marcadores moleculares procesados fueron representadas gráficamente, especificando cada distancia genética por nodos generados por el programa TCS ver. 2.0 (Clement *et al.* 2000).

RESULTADOS

Aislados de *H. capsulatum* estudiados

Los datos de tipo de huésped, material de aislamiento, fecha y lugar de colecta y procedencia geográfica de los aislados y/o cepas están referidos en la tabla 1. La mayoría de los aislados estudiados procedió de murciélagos con diferentes hábitos alimenticios y migratorios capturados en México y Brasil. Los datos de los murciélagos de México con aislamiento de *H. capsulatum* son: uno de *Mormoops megalophylla* (insectívoro, migratorio) de Guerrero; siete de *Artibeus hirsutus* (frugívoro, no migratorio) de Morelos, siete de *Leptonycteris nivalis* (polinívoro-nectarívoro, migratorio), siendo cinco de Morelos y dos de Puebla; dos de *L. curasoae* (polinívoro-nectarívoro, migratorio) de Oaxaca; uno de *Desmodus rotundus* (hematófago, no migratorio) de Morelos; 10 de *Tadarida brasiliensis* (insectívoro, migratorio), siendo cuatro de Chiapas, dos de Michoacán, dos de Hidalgo uno de Nuevo León y dos de Oaxaca. Los datos de los murciélagos de Brasil con aislamiento de *H. capsulatum* son: uno de *Molossus molossus* y otro de *M. rufus* (ambos insectívoros, no migratorios) procedentes de São Paulo. Los aislados restantes procedieron de humanos, dos de México (Hidalgo y Morelos) y tres de Colombia. Las cepas de referencia seleccionadas para este estudio fueron de casos clínicos de humano, la G-217B (también utilizada como grupo externo en los análisis filogenéticos) y la Downs de Estados Unidos, además de la cepa G-186B de Panamá.

Extracción, amplificación y purificación del DNA

Después de la extracción de DNA de cada uno de los aislados y o cepas incluidas en el estudio, la pureza y concentración de éstos fue monitoreada por electroforesis en gel de agarosa y visualizada en un transiluminador como se describió en materiales y métodos. Sólo los DNAs con bandas bien definidas, sin evidencias de degradación y contaminación con proteínas o RNA fueron ajustados a una concentración aproximada de 10 ng/µl para su manejo óptimo en las reacciones de PCR.

Análisis genéticos

Análisis de los alineamientos de las secuencias obtenidas

Las secuencias de los marcadores obtenidas para cada aislado fueron analizadas después de ser alineadas y editadas. Este análisis se realizó en forma individual para cada marcador a fin de identificar los cambios genéticos ocurridos con relación a las secuencias de la cepa de referencia G-217B depositadas en la base de datos del GenBank. El número de sitios informativos de cada marcador y de los cinco analizados en forma concatenada se muestra en la tabla 2, donde se evidencia que el marcador más informativo fue *TUB1* con 90 sitios, seguido del microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes con 65 sitios. Los marcadores con menos sitios informativos fueron *H-ANTI*, *OLE1* y *ARF* con 42, 35 y 32 mutaciones, respectivamente. Asimismo, en el análisis de los cinco marcadores en forma concatenada se consideró un total de 264 sitios informativos (Tabla 2). Las sustituciones, inserciones y deleciones se detallan, para cada marcador, en las figuras 1-5.

Para *ARF* se encontraron 26 sustituciones (13 transversiones y 13 transiciones), cuatro inserciones y dos deleciones (Fig. 1).

De los cambios referidos para *ARF*, dos transversiones diferentes ocurrieron en los nucleótidos 568, 581 y 641 según los aislados estudiados. En el nucleótido 568, la sustitución G/T ocurrió en 21 aislados mexicanos y tres colombianos, mientras que G/C sólo ocurrió en un aislado brasileño (154-04). En el nucleótido 581, la sustitución T/G ocurrió en las cepas de referencia Downs de Estados Unidos y G-186B de Panamá, en ocho (EH-384I, EH-384P, EH-655P, EH-658H, EH-670B, EH-670H, EH-671P y EH-672B) de los 10 aislados mexicanos obtenidos del murciélago *T. brasiliensis* además del aislado del murciélago *M. megalophylla* (EH-315), así como en los dos aislados de murciélagos de Brasil (154-04 y 190-03); mientras que una sustitución T/A ocurrió en 21 aislados mexicanos y en los tres aislados colombianos estudiados. En el nucleótido 641, una sustitución T/G se registró en la mayoría de los aislados estudiados a excepción de una sustitución T/A que se encontró sólo en aislados del murciélago no migratorio *A. hirsutus* capturados en el mismo refugio y en la misma fecha (ver detalles en tabla 1). Una

transversión A/C ocurrió en el nucleótido 440 para los aislados EH-437 (*D. rotundus*) y EH-449I (*L. nivalis*) ambos capturados en fechas distintas en el mismo refugio de Morelos, México. En el nucleótido 525 una transversión G/C ocurrió en un gran número de los aislados mexicanos, exceptuando la mayoría de los aislados de *T. brasiliensis* y el aislado EH-315 de *M. megalophylla*, siendo que esta misma mutación ocurrió en los aislados colombianos y estuvo ausente en los aislados de Brasil. Asimismo, en el nucleótido 623 ocurrió una transversión C/A en seis de los 10 aislados procedentes de *T. brasiliensis* y en el aislado EH-315 (*M. megalophylla*).

Una transición A/G se presentó para *ARF* en el nucleótido 617 en los dos aislados procedentes de Brasil. Dos transiciones A/G y T/C, ocurrieron en los nucleótidos 539 y 556, respectivamente, registrándose en la mayoría de los aislados mexicanos y en todos los colombianos. Además, en el nucleótido 648 se presentó una transición G/A en los aislados de *A. hirsutus* capturados en el mismo refugio y en el aislado de Brasil 190-03.

Finalmente, se observó una deleción en el sitio nucleotídico 612 (A) en 22 aislados mexicanos y tres colombianos.

Mutaciones comunes en todos los aislados y/o cepas estudiados se presentaron, como transversiones en los nucleótidos 578 (C/A), 592 (T/A), 620 (A/C), 703 (G/C) y como inserciones en los sitios nucleotídicos 532 (A), 533 (A) y 534 (C).

Sustituciones puntuales ocurrieron en cinco aislados (tres de México y dos de Brasil) y en las dos cepas de referencia (Downs y G-186B) en diferentes nucleótidos y, en algunos casos, ocurrió más de una mutación en la misma secuencia. Entre estas sustituciones se presentaron transversiones en los nucleótidos 564 (C/A), 621 (A/C), 635 (G/C) y transiciones en los nucleótidos 421 (T/C), 528 (T/C), 537 (T/C), 561(A/G), 600 (T/C), 636 (C/T), 642 (C/T), 697 (G/A) y 712 (G/A).

Por último, se registró una inserción en el sitio nucleotídico 671 (T) para el aislados 154-04 de Brasil y una deleción en el sitio nucleotídico 592 (T) para el aislado EH-437 de México.

Para *H-ANTI* se encontraron 40 sustituciones (14 transversiones y 26 transiciones), una inserción y una deleción (Fig. 2).

De los cambios referidos para *H-ANTI*, dos transversiones diferentes ocurrieron en los nucleótidos 557 y 560 según los aislados estudiados. En el nucleótido 557, una sustitución C/G ocurrió sólo en la cepa Downs y una C/A ocurrió sólo en los aislados brasileños. En el nucleótido 560, una sustitución G/C ocurrió en la mayoría de los aislados y/o cepas estudiados y una G/T se observó en todos los aislados obtenidos del murciélago *T. brasiliensis*. Mientras que, en el nucleótido 748, una transversión T/A ocurrió en el aislado AP de Colombia y una transición T/C se presentó en el resto de los aislados y las cepas de referencia Downs y G-186B.

En el nucleótido 735 ocurrió una sustitución A/T en la mayoría de los aislados de *T. brasiliensis* y en el único aislado de *M. megalophylla*. En 19 de los aislados mexicanos y en los tres aislados colombianos ocurrieron, una transversión en el nucleótido 518 (A/T) y cinco transiciones T/C, C/T, T/C, G/A y C/T en los nucleótidos 503, 510, 519, 534 y 543, respectivamente, siendo que la transición encontrada en el nucleótido 543 también se presentó en el único aislado de Nuevo León EH-696P de *T. brasiliensis*, en los dos aislados de murciélagos de Brasil y en las cepas de referencia Downs y G-186B. En los nucleótidos 628 y 643 ocurrieron las transiciones G/A y A/G, respectivamente, en los aislados brasileños, colombianos y en todos los aislados mexicanos excluyendo los obtenidos de los murciélagos *T. brasiliensis* y *M. megalophylla*.

Se registró una inserción en el sitio nucleotídico 405 (C) en cinco aislados mexicanos y una delección en el nucleótido 600 en todos los aislados estudiados, a excepción de los de *T. brasiliensis*, *M. megalophylla* y las cepas de referencia Downs y G-186B.

Mutaciones comunes en todos los aislados y/o cepas estudiados se presentaron, como transversión en el nucleótido 566 (T/A) y como transiciones en los nucleótidos 670 (C/T), 694 (G/A), 726 (T/C) y 734 (A/G).

Sustituciones puntuales ocurrieron en ocho aislados (tres de México, dos de Brasil y tres de Colombia) y en las dos cepas de referencia (Downs y G-186B) en diferentes nucleótidos y, en algunos casos, ocurrió más de una mutación en la misma secuencia. Estas sustituciones se presentaron como transversiones en los nucleótidos 454 (T/G), 532 (A/T), 571 (G/C), 579 (A/T), 622 (C/A) y 749 (G/T) y como transiciones en los nucleótidos 416 (C/T), 431 (G/A), 437 (C/T), 446 (A/G),

479 (G/A), 548 (G/A), 552 (A/G), 573 (T/C), 575 (C/T), 584 (C/T), 585 (T/C), 600 (G/T), 652 (C/T), 716 (A/G) y 765 (T/C).

Para *OLE1* se encontraron 34 sustituciones (siete transversiones y 27 transiciones), una inserción y ninguna delección (Fig. 3).

De los cambios referidos para *OLE1*, transiciones A/G, G/A y C/T ocurrieron en los nucleótidos 70, 249 y 384, respectivamente, en la mayoría de los aislados obtenidos del centro de México y además el aislado de *T. brasiliensis* de Nuevo León, con excepción de nueve aislados del murciélago *T. brasiliensis* y del aislado de *M. megalophylla*, así como de los aislados colombianos. Destaca que la transición G/A en el nucleótido 249 también se presentó en la cepa Downs. Las transiciones C/T, T/C y C/T en los nucleótidos 85, 400 y 412, respectivamente, se presentaron en cinco aislados obtenidos del murciélago *T. brasiliensis* y en el aislado de *M. megalophylla*. Asimismo, una transición A/G ocurrió en el nucleótido 67 en la mayoría de los aislados estudiados con excepción de la cepa de referencia Downs y el aislado mexicano EH-376 obtenido de *A. hirsutus*.

Mutaciones comunes en todos los aislados y/o cepas estudiados se presentaron, como transversión en el nucleótido 351 (C/G) y como transiciones en los nucleótidos 68 (C/T), 76 (A/G), 93 (T/C) y 188 (T/C).

Sustituciones puntuales ocurrieron en seis aislados (cuatro de México y dos de Colombia) y en la cepa de referencia Downs en diferentes nucleótidos y, en algunos casos, ocurrió más de una mutación en la misma secuencia. Entre estas sustituciones se presentaron transversiones en los nucleótidos 62 (C/A), 285 (T/G), 332 (G/C), 439 (A/T), 344 (G/T) y 159 (C/G) y transiciones en los nucleótidos 38 (C/T), 55 (G/A), 94 (C/T), 126 (G/A), 129 (G/A), 157 (G/A), 187(G/A), 198 (C/T), 213 (G/A), 216 (A/G), 219 (C/T), 231 (A/G), 313 (C/T), 315 (T/C), 320 (T/C) y 357 (A/G). Por último, se detectó una inserción en el sitio nucleotídico 346 (T) en el aislado clínico de México EH-53.

Para *TUB1* se encontraron 39 sustituciones (13 transversiones y 26 transiciones), ninguna inserción y 51 delecciones (Fig. 4).

De los cambios referidos para *TUB1*, una transversión G/C ocurrió en el nucleótido 612 en 17 aislados de México y los tres aislados de Colombia, mientras que una transversión T/A ocurrió en el nucleótido 694 en la mayoría de los aislados mexicanos, en los dos aislados de Brasil y en los tres de Colombia. Transiciones

en los nucleótidos 601 (A/G), 626 (C/T), 663 (T/C), 667 (G/A) y 799 (C/T) ocurrieron en un aislado clínico de México (EH-53), dos aislados obtenidos del murciélago de la especie *A. hirsutus* (EH-377 y EH-378) y en el único aislado obtenido del murciélago *D. rotundus* (EH-437). Asimismo, una transición T/C ocurrió en el nucleótido 690 para 17 aislados mexicanos y los tres de Colombia, con excepción de la mayoría de los aislados de *T. brasiliensis*, cuatro aislados de *A. hirsutus*, el único aislado de *D. rotundus* y los dos aislados de Brasil. Una transición C/T ocurrió en el nucleótido 720 para tres aislados de *T. brasiliensis* y el aislado de *M. megalophylla*. Además, una transición A/G ocurrió en el nucleótido 805 para la mayoría de los aislados estudiados con excepción de las cepas de referencia Downs y G-186B, los aislados fúngicos EH-384I, EH-384P y EH-672H obtenidos del murciélago *T. brasiliensis* y el aislado EH-315 de *M. megalophylla*. Asimismo, otra transición A/G ocurrió en el nucleótido 755 para todos los aislados estudiados con excepción del aislado EH-315 de *M. megalophylla* y el aislado 154-04 de Brasil.

En todos los aislados estudiados y en la cepa de referencia G-186B ocurrieron deleciones en los nucleótidos 776 (T), 779 (T), 780 (C) y 781 (C), siendo la única excepción la cepa de referencia Downs.

Mutaciones comunes a todos los aislados y/o cepas estudiados se presentaron, como transversión en el nucleótido 608 (A/T), como transición en el nucleótido 651 (G/A) y como deleción en los nucleótidos 777 (A) y 778 (T).

Sustituciones puntuales ocurrieron en seis aislados (tres de México, dos de Brasil y uno de Colombia) y en las cepas de referencia Downs y G-186B en diferentes nucleótidos y, en algunos casos, ocurrió más de una mutación en la misma secuencia. Entre estas sustituciones se presentaron transversiones en los nucleótidos 636 (T/G), 646 (C/G), 676 (G/T), 775 (C/A), 786 (G/C), 807 (A/T) y 838 (T/A) y transiciones en los nucleótidos 610 (C/T), 611 (G/A), 639 (A/G), 644 (A/G), 654 (A/G), 667 (G/A), 697 (T/C), 708 (T/C), 729 (A/G), 743 (G/A), 747 (G/A), 751(G/A), 762 (A/G), 774 (C/T), 788 (G/A), 792 (T/C) y 857(C/T). Por último, se detectaron una deleción en el nucleótido 625 (T) y la deleción de un fragmento de 50 nucleótidos (746 al 795 nt) en el aislado 154-04 de Brasil (Fig. 4).

Para (GA)_n se encontraron 35 sustituciones (12 transversiones y 23 transiciones), 11 inserciones y 19 deleciones, considerando el tamaño de las repeticiones de GA (microsatélite) y sus regiones flanqueantes (Fig. 5).

De los cambios referidos para (GA)_n, tres mutaciones diferentes ocurrieron en los nucleótidos 2035, 2036 y 2037 según los aislados estudiados. En el nucleótido 2035 una transversión G/C ocurrió en ocho aislados mexicanos, una transición G/A en el aislado EH-696P obtenido de *T. brasiliensis* (Nuevo León, México) y una deleción en 11 aislados mexicanos y los dos brasileños, por otro lado en el nucleótido 2036 ocurrió una transición A/G y una deleción en los mismos aislados, mientras que en el nucleótido 2037, una transversión G/T ocurrió en dos aislados obtenidos de *T. brasiliensis* procedentes de Hidalgo, una transición G/A ocurrió en el aislado EH-696P de Nuevo León y una deleción se presentó en 20 aislados mexicanos y en los dos aislados brasileños. Dos mutaciones diferentes ocurrieron en los nucleótidos 2031, 2032, 2196, 2197, 2198 y 2207, según los aislados estudiados. En el nucleótido 2031, ocurrió una transversión G/C en la mayoría de los aislados estudiados, mientras que una deleción se registró en un aislado mexicano y en los dos aislados brasileños. En los nucleótidos 2196 y 2197 ocurrieron las transversiones A/T y G/T, respectivamente, en todos los aislados de *T. brasiliensis* y en el aislado de *M. megalophylla*, mientras que en estos mismos nucleótidos, se registraron deleciones en el resto de los aislados estudiados. En el nucleótido 2198 ocurrió una transversión G/T en el aislado de *M. megalophylla*, mientras que en el resto de los aislados se registró una deleción. En el nucleótido 2032 se registró una transición A/G en la mayoría de los aislados, mientras que en un aislado mexicano (EH-394P) y en los dos aislados de Brasil ocurrió una deleción. Finalmente, en el nucleótido 2207 se presentó una transición C/T en 18 aislados mexicanos, mientras que una deleción se registró para los aislados de Brasil. Las transversiones G/C, C/G y una transición T/C ocurrieron en los nucleótidos 2191, 2210 y 2209, respectivamente, en la mayoría de los aislados de *T. brasiliensis*, excluyendo el aislado EH-696P y destacando que la transversión C/G del nucleótido 2207 se registró también en el aislado de *M. megalophylla* (EH-315).

Dos transiciones T/C y C/T en los nucleótidos 2008 y 2206, respectivamente, ocurrieron en 19 de los aislados mexicanos, no se presentaron en los aislados de

T. brasiliensis y el aislado de *M. megalophylla*, mientras que en los aislados de Brasil sólo se presentó el cambio en el nucleótido 2206. En los nucleótidos 2025 y 2063 ocurrieron las transiciones G/A y G/A, respectivamente, en 11 aislados mexicanos. En el nucleótido 2070 se registró una transición A/G para la mayoría de los aislados de *T. brasiliensis*, un aislado clínico de México y un aislado de Brasil. Una transición A/G ocurrió en ocho aislados mexicanos. Finalmente, una transición G/A ocurrió en el nucleótido 2101, para nueve aislados mexicanos.

En los sitios nucleotídicos 2113 y 2114 se registraron las inserciones de una A y una G, respectivamente, para la mayoría de los aislados mexicanos y los dos aislados de Brasil. En 11 aislados mexicanos y los dos aislados brasileños ocurrieron deleciones en los sitios nucleotídicos 2033 (G), 2034 (A), 2039 (G) y 2040 (A), mientras que una deleción en el sitio nucleotídico 2038 (A) ocurrió en 10 aislados mexicanos y en los dos de Brasil. Una deleción en el nucleótido 2184 (A) se registró en 21 aislados mexicanos. Deleciones comunes ocurrieron en todos los aislados mexicanos en los nucleótidos 2018 (T) y 2019 (A).

Mutaciones comunes en todos los aislados estudiados se presentaron, como transversiones en los nucleótidos 2084 (A/C), 20194 (G/T) y 2201 (G/T), como transiciones en los nucleótidos 2104 (T/C), 2111 (G/A), 2166 (C/T) y 2168 (G/A) y como deleciones en los nucleótidos 2041 (G) y 2042 (A).

Sustituciones puntuales ocurrieron en cinco aislados (tres de México y dos de Brasil) en diferentes nucleótidos y, en algunos casos, ocurrió más de una mutación en la misma secuencia. Estas sustituciones se presentaron como transversiones en los nucleótidos 2043 (G/C) y 2044 (G/C), como transiciones en los nucleótidos 1991 (C/T), 2009 (A/G), 2075 (C/T), 2091 (G/A) y 2176 (A/G). Por último, se detectaron una inserción en el nucleótido 2185 (A) y la inserción de un fragmento de ocho nucleótidos (2147 al 2154 nt) en el aislado EH-696P del murciélago *T. brasiliensis* de Nuevo León. Debido a que el DNA donado de los aislados clínicos de Colombia así como de las cepas de referencia Downs y G-186B fue totalmente consumido, no se dispuso de material suficiente para procesar el marcador (GA)_n.

Análisis filogenéticos

Para el análisis de similitud y/o diversidad genética entre aislados, se obtuvieron árboles filogenéticos por NJ y MP, para los cinco marcadores en forma individual y concatenada (Figs. 6-12), utilizando en todos la cepa G-217B (Estados Unidos) como grupo externo.

- *ARF* (Fig. 6).

El análisis de NJ generó un árbol con tres grupos: el grupo I con un BT= 95%, formó a su vez dos subgrupos: el Ia (BT= 85%) que incluyó todos los aislados clínicos de México y Colombia, todos los aislados obtenidos de los murciélagos del género *Leptonycteris*, un aislado de *A. hirsutus* (EH-374) capturado en la Cueva El Salitre, Morelos, el único aislado de la especie *D. rotundus*, y dos aislados obtenidos del murciélago *T. brasiliensis*, el EH-672H de Hidalgo y el EH-696P procedente de la Cueva de la Boca, Nuevo León; y el subgrupo Ib (BT= 86%) formado por la mayoría de los aislados de *A. hirsutus* capturados en la misma fecha en la Cueva El Salitre, Morelos. El grupo II con un BT<70% formado por ocho de los 10 aislados de *T. brasiliensis*, el único aislado de *M. megalophylla* y las cepas de referencia Downs y G-186B. El grupo III con un BT= 85%, formado por los dos aislados de Brasil.

El análisis de MP generó de igual modo un árbol con la misma topología de NJ, con tres grupos, conservando la misma distribución de los aislados variando únicamente los valores de BT. El grupo I con un BT 99%, los subgrupos Ia con un BT <70% y Ib con un BT= 87%, el grupo II con BT <70% y el grupo III con un BT= 97%.

- *H-ANTI* (Fig. 7).

El árbol NJ generado para este marcador mostró dos grupos. El grupo I con un BT= 81% formó tres subgrupos: el Ia (BT= 99%) que incluyó todos los aislados obtenidos de los murciélagos del género *Leptonycteris*, de la especie *A. hirsutus* y el único aislado de la especie *D. rotundus*, así como los aislados clínicos de México y Colombia; el Ib (BT= 97%) que se formó con los dos aislados de Brasil; y el Ic (BT<70%) que incluyó las cepas de referencia Downs de Estados Unidos y G-186B de Panamá además del único aislado obtenido del murciélago *T. brasiliensis* (EH-696P) de la Cueva de la Boca, Nuevo León. El grupo II con un BT <70%

incluyó la mayoría de los aislados obtenidos de murciélagos de la especie *T. brasiliensis* y el aislado de *M. megalophylla* (EH-315).

El análisis de MP generó de igual modo un árbol con la misma topología de NJ, con dos grupos, conservando la misma distribución de los aislados variando únicamente el valor de BT para el subgrupo la con un BT= 100%.

- *OLE1* (Fig. 8).

Los análisis de NJ generó un árbol con cinco grupos: el grupo I con un BT= 83% formado por todos los aislados obtenidos de los murciélagos del género *Leptonycteris* y la mayoría de los aislados de la especie *A. hirsutus*, así como los aislados clínicos de México y Colombia; el grupo II con un BT= 99% formado por dos aislados del murciélago *T. brasiliensis* (EH-672B y EH-672H) y las dos secuencias de Brasil; el grupo III con un BT= 95% incluyó cinco aislados de *T. brasiliensis* y el único aislado obtenido de *M. megalophylla*; el grupo IV con un BT= 85% incluyó la cepa de referencia G-186B y el único aislado obtenido del murciélago *T. brasiliensis* (EH-696P) de la Cueva de la Boca, Nuevo León; y finalmente el grupo V con un BT <70% se formó con la cepa de referencia Downs de Panamá y el aislado EH-376 obtenido del murciélago *A. hirsutus* de la Cueva el Salitre, Morelos.

El análisis de MP generó un árbol con tres grupos: el grupo I con un BT <70% formó a su vez tres subgrupos, el la (BT= 75%) incluyó todos los aislados obtenidos de los murciélagos del género *Leptonycteris* y la mayoría de los aislados de la especie *A. hirsutus*, así como los aislados clínicos de México y Colombia; el subgrupo Ib (BT= 99%) formado por dos aislados del murciélago *T. brasiliensis* (EH-672B y EH-672H) y las dos secuencias de Brasil; y el subgrupo Ic (BT <70%) incluyó la cepa de referencia G-186B y el único aislado obtenido del murciélago *T. brasiliensis* (EH-696P) de la Cueva de la Boca, Nuevo León. El grupo II con un BT= 96% incluyó cinco aislados de *T. brasiliensis* y el único aislado obtenido de *M. megalophylla*. El grupo III con un BT= 90% se formó con la cepa de referencia Downs de Panamá y el aislado EH-376 obtenido del murciélago *A. hirsutus* de la Cueva el Salitre, Morelos.

- *TUB1* (Fig. 9).

El análisis de NJ para este marcador generó un árbol con cinco grupos. El grupo I con un BT= 87% incluyó algunos de los aislados de *A. hirsutus*, todos los aislados

del género *Leptonycteris*, seis aislados de *T. brasiliensis* y cuatro aislados clínicos, uno de México y los tres de Colombia. El grupo II con un BT= 99% se formó con el la mayoría de los aislados de *A. hirsutus*, el único aislado de la especie *D. rotundus* y el aislado clínico EH-53. El grupo III con un BT= 76% formado con los dos aislados de Brasil. El grupo IV con un BT= 71 formado con los dos aislado obtenidos de *T. brasiliensis* (EH-384I y EH-384P) procedentes de Oaxaca. El grupo V con un BT <70% que incluyó tres aislados obtenidos de *T. brasiliensis*, el único aislado obtenido del murciélago *M. megalophylla* (EH-315) y las cepas de referencia.

El árbol generado por el análisis de MP formó un árbol con cinco grupos: El grupo I con un BT= 90% formó dos subgrupos, el la (BT <70%) incluyó algunos de los aislados de *A. hirsutus*, la mayoría de los aislados del género *Leptonycteris*, seis aislados de *T. brasiliensis* y cuatro aislados clínicos, uno de México y los tres de Colombia; y el subgrupo Ib formado con dos aislados obtenidos de *L. nivalis* (EH-383I y EH-383P) de Morelos. El grupo II con un BT= 99% se formó con el la mayoría de los aislados de *A. hirsutus*, el único aislado de la especie *D. rotundus* y el aislado clínico EH-53. El grupo III con un BT= 80% formado con los dos aislados de Brasil. El grupo IV con un BT= 75% formado con los dos aislado obtenidos de *T. brasiliensis* (EH-384I y EH-384P) procedentes de Oaxaca. El grupo V con un BT <70% que incluyó tres aislados obtenidos de *T. brasiliensis*, el único aislado obtenido del murciélago *M. megalophylla* (EH-315) y las cepas de referencia.

- (GA)n (Fig. 10).

El análisis de NJ generó un árbol con tres grupos. El grupo I con un BT= 79% formó dos subgrupos: el la (BT= 80%) con la mayoría de los aislados obtenidos de *A. hirsutus*, la mayoría de los aislados del género *Leptonycteris*, el único aislado obtenido del murciélago de la especie *D. rotundus* y el aislado clínico de México EH- 53 de Hidalgo; el subgrupo Ib (BT= 90%) con el resto de los aislados de los géneros *Artibeus* y *Leptonycteris* y el aislado clínico EH-317 de Morelos. El grupo II con un BT= 97% incluyó nueve de los 10 aislados de *T. brasiliensis* y el único aislado de *M. megalophylla* (EH-315). El grupo III con un BT<70% los dos aislados de Brasil y el único aislado obtenido del murciélago *T. brasiliensis* (EH-696P) de la Cueva de la Boca, Nuevo León.

El análisis de MP generó un árbol con cuatro grupos. El grupo I con un BT<70% formó dos subgrupos: el Ia (BT= 87%) con la mayoría de los aislados obtenidos de *A. hirsutus*, la mayoría de los aislados del género *Leptonycteris*, el único aislado obtenido del murciélago de la especie *D. rotundus* y el aislado clínico de México EH- 53 de Hidalgo; el subgrupo Ib (BT= 96%) con el resto de los aislados de los géneros *Artibeus* y *Leptonycteris* y el aislado clínico EH-317 de Morelos. El grupo II con un BT= 96% incluyó nueve de los 10 aislados de *T. brasiliensis* y el único aislado de *M. megalophylla* (EH-315). El grupo III con un BT<70% incluyó el único aislado obtenido del murciélago *T. brasiliensis* (EH-696P) de la Cueva de la Boca, Nuevo León. El grupo IV con un BT<70% formado con los dos aislados de Brasil. En NJ y MP de (GA)n no se incluyeron las secuencias de las dos cepas de referencia Downs y G-186B, ni los aislados clínicos de Colombia.

- Cinco marcadores concatenados

El árbol de NJ (Fig.11) discriminó dos grandes grupos. El grupo I con un BT <70% separó todos los aislados de *T. brasiliensis*, el aislado de *M. megalophylla* (EH-315) y los dos aislados de Brasil. Este grupo formó tres subgrupos: el Ia (BT= 77%) se formó con aislados de *T. brasiliensis*, dos de Oaxaca y tres de Chiapas y el aislado de *M. megalophylla* (EH-315); el Ib (BT <70%) incluyó los demás aislados de *T. brasiliensis* (uno de Chiapas, tres de Michoacán y el único aislado obtenido del murciélago de la Cueva de la Boca, Nuevo León); el Ic (BT= 100%) incluyó los dos aislados de Brasil. El grupo II con un BT= 100% agrupó el resto de los aislados, discriminando cuatro subgrupos: el IIa (BT=75%) agrupó aislados del género *Leptonycteris*, un aislado de *A. hirsutus* y un aislado clínico, la mayoría de Morelos y dos de Puebla; el IIb (BT= 84%) incluyó cuatro aislados de *A. hirsutus* de Morelos uno de *D. rotundus* de Morelos y un aislado clínico de Hidalgo; el grupo IIc (BT<70%) incluyó un único aislado de *A. hirsutus* de Morelos; y el II d (BT= 88%) incluyó cuatro aislados de Morelos (uno de *A. hirsutus* y tres del género *Leptonycteris*) y un aislado de *L. curasoae* de Oaxaca.

El análisis de MP (Fig.12) también generó un árbol con dos grandes grupos. El grupo I con un BT <70% separó todos los aislados de *T. brasiliensis*, el único aislado de *M. megalophylla* y los dos aislados de murciélagos de Brasil. Este grupo formó tres subgrupos: el Ia (BT= 82%) que incluyó tres aislados fúngicos obtenidos de *T. brasiliensis* capturados en Chiapas en la misma cueva pero con

fechas de colecta diferentes (tabla 1); el Ib (BT= 77%) que agrupó el aislado de *M. megalophylla* y dos aislados de *T. brasiliensis* de Oaxaca; el Ic (BT <70%) donde se incluyeron tres aislados de *T. brasiliensis*, dos de Hidalgo y uno de Nuevo León; el Id (BT= 79%) formado por dos aislados de *T. brasiliensis*, uno de Michoacán y uno de Chiapas; y el grupo Ie (BT= 99%) con los dos aislados de Brasil. El grupo II con un BT= 99% agrupó todos los aislados fúngicos obtenidos de murciélagos de otras especies del centro de México y los aislados clínicos. Este grupo formó tres subgrupos: el IIa (BT= 71%) agrupó la mayoría de los aislados del hongo obtenidos del murciélago *A. hirsutus*, el aislado EH- 437 del murciélago *D. rotundus*, el cual fue capturado en el mismo sitio de colecta que los *A. hirsutus* en diferente fecha y el aislado clínico EH-53 de Hidalgo; el IIb (BT <70%) incluyó el resto de los aislados de murciélagos de *A. hirsutus*, del género *Leptonycteris* y el aislado clínico EH-317 de Morelos. En los árboles de NJ y MP de los cinco marcadores analizados en forma concatenada no se incluyeron las secuencias de las dos cepas de referencia Downs y G-186B así como los aislados clínicos de Colombia.

Diversidad nucleotídica

Se determinó la diversidad nucleotídica (π) para identificar la similitud entre los aislados fúngicos de cada grupo y subgrupo *per se* y, asimismo, entre grupos y subgrupos de aislados, considerando los datos generados por los análisis de MP para cada marcador en forma individual y los cinco marcadores analizados en forma concatenada. Los valores de π en general apoyan la gran similitud entre los aislados estudiados ya que éstos distan de la unidad, como se muestra en la tabla 3.

Con base en la diversidad de las secuencias del marcador *ARF*, la mayor similitud de los aislados de *H. capsulatum* intragrupo fue para el subgrupo Ia ($\pi= 0.00146$) que incluyó todos los aislados de murciélagos capturados en el centro de México, el aislado EH-696P obtenido del murciélago *T. brasiliensis* y los cinco aislados clínicos estudiados. Mientras que el grupo III ($\pi= 0.00445$) con aislados de murciélagos de Brasil fue más disímil. Por otro lado, la diversidad nucleotídica

entre los grupos y subgrupos del marcador *ARF*, refiere que entre los subgrupos la y Ib ($\pi= 0.00290$) hay una mayor similitud que entre los grupos Ib y II ($\pi= 0.01031$) y I y II (0.00854). Asimismo, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B (Estados Unidos) y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con el subgrupo Ia ($\pi= 0.00359$) y fue más disímil de los aislados del grupo II ($\pi= 0.01644$) (Tabla 3).

Con base en la diversidad de las secuencias del marcador *H-ANTI*, la mayor similitud de los aislados de *H. capsulatum* intragrupo fue para el grupo Ib ($\pi= 0.00000$) que incluyó los dos aislados obtenidos de murciélagos del género *Molossus* procedentes de Brasil. Mientras que el subgrupo Ic ($\pi= 0.02564$), formado con las dos cepas de referencia Downs y G-186B y el aislado EH-696P obtenido de *T. brasiliensis* fue el más disímil. Por otro lado, la diversidad nucleotídica entre los grupos y subgrupos del marcador *H-ANTI* refiere que entre la y Ib ($\pi= 0.00512$) hay una mayor similitud que entre los grupos Ib y Ic ($\pi= 0.012159$) y que entre los grupos I y II ($\pi= 0.01587$). Asimismo, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B (Estados Unidos) y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con el subgrupo Ia ($\pi= 0.00434$) y fue más disímil de los aislados del grupo Ic (Tabla 3).

Con base en la diversidad de las secuencias del marcador *OLE1*, la mayor similitud de los aislados de *H. capsulatum* intragrupo fue para el grupo III ($\pi= 0.00000$) que incluyó la cepa de referencia Downs de Estados Unidos y el aislado del murciélago *A. hirsutus* (EH-376) y el subgrupo Ib ($\pi= 0.00000$) que incluyó dos aislados de *T. brasiliensis* y los dos aislados obtenidos de murciélagos de Brasil. Mientras que el subgrupo Ic ($\pi= 0.02663$) con la cepa de referencia G-186B y el aislado EH-696P obtenido del murciélago *T. brasiliensis* fue el más disímil. Asimismo, la diversidad nucleotídica entre los grupos y subgrupos del marcador *OLE1*, refiere que entre Ia y III ($\pi= 0.00207$) hay una mayor similitud que entre los subgrupos Ib y Ic ($\pi= 0.01977$). Finalmente, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con el subgrupo Ia ($\pi= 0.00243$) y fue más disímil del subgrupos Ic con $\pi= 0.02906$.

Con base en la diversidad de las secuencias del marcador *TUB1*, la mayor similitud de los aislados de *H. capsulatum* intragrupo fue para los grupos II ($\pi= 0.00000$) que incluyó la mayoría de los aislados de *A. hirsutus* y el aislado clínico EH-53 de Hidalgo, el subgrupo Ib ($\pi= 0.00000$) que incluyó dos aislados de *L. nivalis* de Morelos (EH-383I y EH-383P) y III ($\pi= 0.00000$) que se formó con los dos aislados de Brasil. Mientras que el grupo V ($\pi= 0.03535$) con aislados de *T. brasiliensis*, el aislado de *M. megalophylla* y las cepas de referencia Downs y G-186B, fue el más disímil. Por otro lado, la diversidad nucleotídica entre los grupos y subgrupos del marcador *TUB1*, refiere que entre Ia y Ib ($\pi= 0.00177$) hay una mayor similitud que entre Ib y V ($\pi= 0.03259$). Asimismo, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B (Estados Unidos) y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con el grupo I ($\pi= 0.00403$) y fue más disímil de los aislados del grupo Ib ($\pi= 0.02020$) (Tabla 3).

Con base en la diversidad de las secuencias para el microsatélite (GA)_n y sus regiones flanqueantes, la mayor similitud de los aislados de *H. capsulatum* intragrupo fue para el subgrupo Ib ($\pi= 0.00000$) que incluyó la mayoría de los aislados de Morelos, México. Mientras que el grupo IV ($\pi= 0.01395$), con los dos aislados de Brasil fue el más disímil. Por otro lado, la diversidad nucleotídica entre los grupos y subgrupos del marcador (GA)_n refiere que entre Ia y III ($\pi= 0.00632$) hay una mayor similitud que entre los grupos I y II ($\pi= 0.02491$). Asimismo, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B (Estados Unidos) y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con Ia ($\pi= 0.01027$) y fue más disímil de los aislados del grupo III ($\pi= 0.05909$) (Tabla 3).

Finalmente, con base en la diversidad de las secuencias de los cinco marcadores, analizadas en forma concatenada para todos los aislados de *H. capsulatum*, la mayor similitud intragrupo fue para el grupo II ($\pi= 0.00480$) donde se incluyeron todos los aislados de murciélagos del centro de México y los aislados clínicos estudiados. Mientras que el grupo I ($\pi= 0.01177$) donde se incluyeron los aislados obtenidos del murciélago *T. brasiliensis*, el aislado de *M. megalophylla* y los aislados obtenidos de murciélagos de Brasil fue más disímil. Entre los subgrupos

formados en los grupos I y II, destaca la mayor similitud entre los aislados que conforman el subgrupo Ib ($\pi=0.00038$) que incluyó los aislados del murciélago *T. brasiliensis* procedentes de Oaxaca y el aislado de *M. megalophylla*. Mientras que, el subgrupo más disímil fue el Id ($\pi= 0.01303$) que agrupó dos aislados de *T. brasiliensis*, uno de Chiapas y uno de Michoacán (Tabla 4).

Por otro lado, la diversidad nucleotídica entre los grupos y subgrupos de aislados de *H. capsulatum* formados por análisis de los cinco marcadores concatenados, refiere que entre los subgrupos Ib y Ie ($\pi= 0.00288$) se encontró una mayor similitud en contraste con la disimilitud registrada entre el grupo I y el subgrupo IIa ($\pi= 0.01579$). Asimismo, la diversidad nucleotídica entre la cepa de referencia G-217B (Estados Unidos) y los grupos y subgrupos formados con todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, mostró mayor similitud con el subgrupo IIb ($\pi= 0.00686$) y fue más disímil de los aislados del subgrupo Id ($\pi= 0.02200$) (Tabla 4).

Redes haplotípicas

La dispersión de los haplotipos asociados a las secuencias de todos los aislados de *H. capsulatum* estudiados, obtenidos con cada uno de los marcadores, se representó en forma de redes haplotípicas, donde las distancias genéticas están señaladas por nodos (Figs. 13-17). En cada red, se muestra el probable flujo de los marcadores estudiados considerando las distancias genéticas entre los aislados de México, los de Brasil y las cepas de referencia utilizadas (Estados Unidos y/o Panamá).

DISCUSIÓN

A pesar del avance en el conocimiento de la diversidad genética de *H. capsulatum*, aun persisten muchas limitantes en este campo de estudio, asociadas: 1) al manejo de un bajo número de aislados disponibles; 2) al lento crecimiento del hongo; y 3) al sesgo en el muestreo de los aislados generado por diferencias en la procedencia geográfica, en el tipo de huéspedes y en las fuentes de aislamiento. Por lo anterior, y con base en los antecedentes de marcadores filogenéticos del hongo que discriminan ecotipos de *H. capsulatum* asociados a su diversidad genética intraespecífica, se planteó un estudio multigénico con estos marcadores utilizando aislados fúngicos de murciélagos (principalmente) y de pacientes (casos clínicos), analizándolos en forma independiente y/o concatenada. El desarrollo de la epidemiología molecular ha revelado nuevas zonas endémicas y epidémicas asociadas al cambio climático, particularmente en el continente americano, así como ha aportado nuevos conocimientos en el binomio paciente-fuente de infección, con lo cual ha sido posible determinar relaciones genotípicas entre aislados tanto de humanos como de animales silvestres de diferentes procedencias geográficas y, además, agrupar aislados según sus características filogeográficas.

En el presente estudio se utilizó la cladística o sistemática filogenética como método taxonómico para separar poblaciones genéticas de aislados y/o cepas de *H. capsulatum* con base en las secuencias de cinco locus (filogenia molecular). Como la procedencia geográfica de los aislados y/o cepas estaba asociada a distintas regiones de América, se buscó inferir patrones filogeográficos del hongo. Aunque no se realizaron todos los análisis estadísticos necesarios para discriminar una filogeografía de *H. capsulatum* en sentido estricto, los resultados aportaron datos sobre la distribución del hongo que podrán contribuir a un estudio filogeográfico más amplio para América, utilizando particularmente un mayor número de aislados de la naturaleza. Estas consideraciones están planteadas entendiendo a la filogeografía como la disciplina que tiene como finalidad establecer los procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos o poblaciones genéticas, especialmente aquellos que ocurren entre especies estrechamente relacionadas, es decir, la filogeografía se enfoca

explícitamente en los componentes históricos o filogenéticos de la estructura de las poblaciones, incluyendo, cómo éstas pueden ser influenciadas por diferentes fuerzas evolutivas tales como deriva génica, flujo génico o selección natural (Avisé 2000; 2009).

Los primeros estudios filogeográficos en animales, refieren patrones poblacionales con tamaños de muestra y número de marcadores moleculares semejantes a los utilizados en este estudio (Avisé 2000). Por lo tanto, los resultados alcanzados con un número limitado de aislados de *H. capsulatum* (sesgo que no pudimos evadir por las características ya mencionadas del patógeno), no minimizan la importante contribución del presente estudio al panorama de la distribución de los haplotipos del hongo y sus asociaciones con murciélagos. Así, los análisis de diversidad genética y de redes de haplotipos de aislados de *H. capsulatum* de distintas procedencias geográficas fueron lo suficientemente informativos para detectar patrones filogeográficos a nivel del continente americano y, asimismo, a escala regional en México.

Diferentes clasificaciones de *H. capsulatum* han surgido con base en distintos métodos moleculares, como: hibridación del DNA con sondas específicas, caracterización del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del DNA, amplificación al azar del DNA polimórfico por PCR (RAPD-PCR), PCR de regiones espaciadoras internas transcritas (ITS), secuencias polimórficas de genes y microsatélites. Sin embargo, las secuencias de fragmentos polimórficos de algunos genes son considerados los métodos más robustos para apoyar la taxonomía molecular.

En este trabajo, los genes seleccionados fueron: *ARF* que codifica para el factor de ribosilación del ADP, el cual forma parte de la familia de las GTPasas y se considera que emergió muy temprano en la evolución de los eucariotes; *H-ANTI* que codifica para el precursor del antígeno H que es un antígeno específico de *H. capsulatum* muy útil para el diagnóstico serológico de casos clínicos de histoplasmosis activa y que ha resultado ser un buen marcador para discriminar aislados de *H. capsulatum* según los datos de Kasuga *et al.* (2003) y Taylor *et al.* (2005a); *OLE1* que codifica para la desaturasa Δ -9 de ácido graso que está asociada a cambios de fluidez de la membrana celular del hongo; *TUB1* que codifica para la α -tubulina que es una proteína muy conservada en los eucariotes;

y el microsatélite HSP-TC que contiene unidades repetitivas de (GA)_n analizadas junto con sus regiones flanqueantes. Este último marcador se ubica en la dirección 5' (corriente arriba) del exón 3 del gen que codifica para la proteína de choque térmico *HSP60*.

Con base en los resultados obtenidos, los fragmentos génicos más informativos para formar grupos y subgrupos de aislados de *H. capsulatum* fueron *ARF*, *H-ANTI* y el microsatélite (GA)_n con sus regiones flanqueantes, siendo este último el más polimórfico de los tres. Mientras que *OLE1* y *TUB1*, a pesar de tener muchos sitios informativos, no arrojaron datos sólidos que permitieran una buena discriminación para formar grupos y subgrupos de aislados relacionados a la diversidad genética de *H. capsulatum*, por lo que estos dos marcadores utilizados de forma independiente no son los más recomendables para realizar estudios genéticos intraespecíficos para este hongo. Sin embargo, al considerarlos en un análisis concatenado con los demás marcadores que sí formaron grupos y subgrupos de aislados de *H. capsulatum* más relacionados aportaron mayor robustez a los resultados.

Los alineamientos de las secuencias de cada marcador de todos los aislados estudiados destacaron los sitios de mutación para cada uno y, de un modo general, todos los marcadores presentaron cambios compartidos por la mayoría de las secuencias de los aislados como se discriminan en las figuras 1-5. Sobresale en estos análisis que la mayoría de los aislados procedentes de *T. brasiliensis* junto con el único aislado de *M. megalophylla* comparten importantes cambios mutacionales y que, asimismo, algunos aislados de *A. hirsutus* capturados en el mismo refugio y en la misma fecha también presentan mutaciones compartidas entre ellos. Estas observaciones de ciertos cambios mutacionales en grupos afines de aislados de *H. capsulatum*, aunados a los resultados posteriores de análisis filogenéticos, diversidad nucleotídica y redes de haplotipos apoyan la sugerencia de que, en estos grupos, existen poblaciones muy similares de *H. capsulatum* que podrían tener posibles orígenes clonales. Esto se refleja, particularmente, en los aislados de murciélagos procedentes de la región centro de México, donde se detectó una alta similitud entre aislados respaldada por un valor de $\pi = 0.00480$ (Tabla 4). Por otro lado, es posible que hayan surgido poblaciones recombinantes más recientes como las asociadas al

murciélago *T. brasiliensis* y *M. megalophylla* que mostraron un valor más alto de $\pi = 0.01177$ (Tabla 4) y que, posiblemente, aun mantienen flujo genético entre ellas. Sin embargo, tal sugerencia no tiene como base un análisis de estructura de población y sino la robustez de la asociación de los aislados dada por NJ y MP, con un alto valor de BT.

La consecuencia de los cambios mutacionales en la función de las proteínas codificadas por cada marcador no fue considerada en la presente etapa del trabajo, aunque en la continuidad de éste se procederá a un análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas hipotéticas para obtener datos de identidad de los productos de cada gen analizado, en los diferentes aislados estudiados.

Los resultados de los análisis de NJ y MP para los aislados del hongo con los cinco marcadores tanto en forma individual como concatenada, a excepción de los árboles generados para *TUB1*, destacan en general dos grandes grupos. El primero, representado por los aislados fúngicos de murciélagos de la especie *T. brasiliensis* que se agruparon siempre con el único aislado de *M. megalophylla*, lo cual apoya la sugerencia de que los aislados del hongo asociados a estas especies de murciélago forman un posible nuevo clado de *H. capsulatum*, como ha sido propuesto inicialmente por Taylor *et al.* (2005) y que está siendo considerado en un análisis multigénico más amplio con base en 148 aislados de *H. capsulatum* (datos no publicados). Resultados preliminares de proyectos colaterales con otros marcadores moleculares, como es el caso de la región ITS1-5.8S-ITS2 confirman la tendencia de agrupación de estos aislados (De la Torre *et al.* 2011).

La mayoría de los aislados de *H. capsulatum* obtenidos del murciélago migratorio *T. brasiliensis* compartieron haplotipos particulares de cada marcador, independientemente de la procedencia geográfica de su huésped. Estos hallazgos sugieren además que estos haplotipos podrían tener otros orígenes geográficos, considerando que *T. brasiliensis* comparte refugios con otras especies de murciélago a lo largo de su ruta migratoria. El murciélago de cola libre *T. brasiliensis* es una de las especies más abundantes en el hemisferio occidental, formando colonias de decenas de millones de individuos (McCracken *et al.* 1994). Es encontrado en Centro y Sur América y en Norte América desde la costa del

Atlántico hasta la costa del Pacífico en los 40° N (Hall 1981). En Norte América la subespecie *T. brasiliensis mexicana* se encuentra en México y gran parte de la región sureste y oeste de Estados Unidos. Colonias en el suroeste de Estados Unidos y noreste de México son migratorias, con murciélagos que migran durante el invierno a la región central de México (Russell *et al.* 2005). Datos recientes reportados por López-Vidal *et al.* (2008) y López-González *et al.* (2010) quienes aportaron nuevos conocimientos acerca del comportamiento migratorio de *T. brasiliensis* enfatizan que diferentes grupos migratorios de esta especie comparten los mismos refugios mexicanos, por lo menos parte del año, lo cual coincide con los hallazgos de este trabajo.

Actualmente, se plantea la existencia de por lo menos dos poblaciones de murciélagos que siguen rutas migratorias distintas y que en algún punto de sus rutas estas poblaciones coinciden en los refugios del norte de México, en ciertas épocas del año (López-González *et al.* 2010). Esto podría explicar la existencia de haplotipos diferentes sólo asociados al aislado EH-696P de *T. brasiliensis*, capturado en la Cueva de la Boca, Nuevo León.

Entre los resultados encontrados, hay que destacar que los subgrupos *ARF* Ib, *H-ANTI* Ia, *OLE1* Ia, *TUB1* Ib y (GA)_n Ib de aislados del hongo recuperados del murciélago residente *A. hirsutus*, generados por el análisis de similitud genética para cada marcador y los cinco procesados en forma concatenada, forman una posible población clonal debido a que son genéticamente idénticos y presentan un valor de $\pi =$ cero, para todos los marcadores estudiados. Mientras que los aislados clínicos se distribuyeron de manera indiscriminada en todos los análisis de NJ y MP, independientemente de la procedencia geográfica del paciente, lo cual sugiere que la información de los aislados de casos clínicos debe ser tomada con reserva, debido a que no siempre se puede definir con exactitud la fuente y el sitio preciso de infección del paciente.

Los datos de diversidad nucleotídica de cada marcador y de los cinco procesados en forma concatenada arrojaron resultados interesantes que apoyan tanto la posible existencia de poblaciones recombinantes como clonales, según lo referido anteriormente. Asimismo, los valores de π encontrados, apoyan la inferencia de que algunos aislados estudiados pudieran ser considerados dentro del clado LAm

A (especie filogenética) inicialmente descrito por Kasuga *et al.* (2003). Esto se fundamenta en el hallazgo de que el aislado clínico de Hidalgo, EH-53, previamente clasificado por Kasuga *et al.* (2003) en el clado LAm A, se encuentra incluido en el subgrupo Ila del análisis concatenado ($\pi= 0.00254$) lo que sugiere que todos los aislados de *H. capsulatum* de este subgrupo estarían genéticamente asociados con este clado. De acuerdo con el alto valor de diversidad nucleotídica del grupo I, formado por el análisis de MP de los cinco marcadores concatenados, es el más disímil y en él están incluidos todos los aislados del murciélago *T. brasiliensis*. Estos datos permiten hacer inferencias sobre una posible interacción coevolutiva del tipo huésped-parásito, ya que los genes de los aislados de *H. capsulatum* asociados a *T. brasiliensis* han estado sometidos por más tiempo a procesos de especiación. Existen datos que indican que ambos organismos han coexistido desde el Pleistoceno, del 1.8 al 0.01 millones de años (Ma). Según lo reportado por Morgan (1985), el primer fósil para esta especie de murciélago procede del Pleistoceno tardío, mientras que los primeros fósiles del género *Tadarida* datan del Plioceno tardío (3.6-1.8 Ma) (Morgan y Ridgway, 1987). Por otro lado, la radiación de *Histoplasma* inició hace 13-3.2 Ma (Mioceno al Plioceno Temprano) en Latinoamérica (Kasuga *et al.* 2003), lo que coincide con la aparición de *Tadarida* sp. Estos hallazgos son congruentes con los datos alcanzados en nuestros análisis y dan mayor robustez los resultados del presente estudio.

Las redes de haplotipos construidas con las secuencias de cada uno de los marcadores trabajados, mostraron que los aislados de México, Brasil y las cepas de referencia están diferenciados entre si y separados por distancias genéticas. Sin embargo, con la mayoría de los marcadores hubo una tendencia a relacionar las cepas de referencia de Estados Unidos y Panamá con los aislados de *T. brasiliensis* y el aislado de *M. megalophylla*, así como con los dos aislados de Brasil. Asimismo, los aislados de la zona central de México se agruparon por distancias genéticas menores y tendieron a formar grupos independientes, compartiendo un posible ancestro común. Por el análisis de las redes haplotípicas, los aislados de los grupos *ARF* I, *H-ANTI* I, *OLE1* I, *TUB1* I, *TUB1* II y (GA)_n I, no mostraron flujo genético sugiriendo que hay una tendencia a la fijación de haplotipos (alelos), hecho que coincide con la clonalidad de esta región de México también reportada por Kasuga *et al.* (2003). Mientras que un flujo genético puede

estar asociado a poblaciones de aislados de *T. brasiliensis* y *M. megalophylla* en conjunto con los aislados de Estados Unidos y Brasil, donde por lo menos en la población de *T. brasiliensis* se ha sugerido un evento recombinante por los altos valores de π , de ahí que es posible que aun no haya ocurrido fijación de haplotipos.

Un resultado interesante a discutir compromete al aislado EH-696P de *T. brasiliensis* de la Cueva de la Boca, Nuevo León, que dista genéticamente de los demás aislados obtenidos de esta especie de murciélago, debido a que posiblemente el flujo genético entre las poblaciones del hongo presentes en la Cueva de la Boca, represente diferencias asociadas a los aislados de *H. capsulatum* distribuidos a lo largo de las distintas rutas migratorias de *T. brasiliensis* y que utilizan esta cueva como refugio temporal. Sin embargo, tal inferencia no tiene aún apoyo sustentable dado que a la fecha, únicamente se cuenta con un aislado de *T. brasiliensis* de este refugio.

Las redes de haplotipos generadas para los marcadores H-anti y (GA)_n sugieren la existencia de recombinación intragénica, debido a la presencia de “loops”. Éstos son conexiones alternativas entre haplotipos y son considerados como indicadores de homoplasia y pueden o no ser consecuencia de procesos de recombinación. Las redes de los demás marcadores no presentaron “loops”, lo que sugiere que no existieron eventos recombinantes.

Los patrones genéticos de las secuencias de tres de los cinco fragmentos génicos estudiados [*ARF*, *H-ANTI* y (GA)_n] podrían ser propuestas como marcadores biogeográficos y/o ecotípicos para *H. capsulatum*, de acuerdo con la distribución de sus haplotipos fúngicos.

Finalmente, considerando la alta frecuencia y el riesgo de los murciélagos a infectarse de forma natural con *H. capsulatum* en ambientes cerrados y la plasticidad migratoria de algunos murciélagos para sobrepasar barreras geográficas (Chávez-Tapia et al. 1998; Taylor et al. 1999a), diferentes especialistas podrían emplear los patrones polimórficos del DNA de aislados del hongo obtenidos de murciélagos naturalmente infectados para: 1) inferir patrones filogeográficos de *H. capsulatum*; 2) actualizar el conocimiento epidemiológico de la histoplasmosis por la redefinición de áreas de riesgo para infecciones humanas;

y 3) para monitorear el movimiento y las rutas migratorias de los murciélagos, lo cual ha sido una tarea difícil (Russell *et al.* 2005).

CONCLUSIONES

En la mayoría de los análisis realizados, los aislados de *H. capsulatum* obtenidos del murciélago *T. brasiliensis* tendieron a formar un grupo uniforme junto con el aislado de *M. megalophylla*

El marcador menos informativo y que no permitió agrupaciones de aislados de *H. capsulatum* con patrones definidos fue *TUB1*, que no discriminó la asociación del hongo con áreas geográficas ni con huéspedes. Sin embargo resultó útil para dar mayor robustez a los análisis realizados con los cinco marcadores concatenados.

Al ser (GA)n un marcador altamente polimórfico, fue posible discriminar los grupos y subgrupos de aislados de *H. capsulatum* de acuerdo con el largo del microsatélite así como con el número de mutaciones que se presentaron en sus regiones flanqueantes, tomando en cuenta la procedencia geográfica de los aislados y su asociación con el huésped.

Los análisis de NJ y MP de los cinco marcadores concatenados, proporcionaron resultados más robustos, discriminando significativamente los aislados de *H. capsulatum* estudiados según su asociación con el huésped.

Los valores π obtenidos en este estudio sugieren que la selección de los marcadores utilizados fue lo suficientemente informativa para agrupar aislados afines de *H. capsulatum*. Asimismo, evidenciaron la posible existencia de poblaciones de origen clonal y otras de origen recombinante. Este planteamiento destaca la necesidad de realizar análisis precisos para determinar la estructura de población de *H. capsulatum* en áreas definidas y asociadas a diferentes huéspedes.

La representación gráfica de cada marcador en todas las redes de haplotipos obtenidas sugiere una distribución geográfica y los ecotipos asociados a los aislados mexicanos obtenidos de *T. brasiliensis* y *M. megalophylla* están muy relacionados y posiblemente cercanos a ciertas regiones de América, debido a sus

cortas distancias genéticas. Asimismo, robustece la propuesta de que existe un flujo genético entre los haplotipos encontrados para los aislados de *H. capsulatum* de México y que se separa de los haplotipos referidos para los aislados de Brasil.

Los aislados que proporcionaron información más fidedigna sobre la distribución geográfica de *H. capsulatum* fueron los obtenidos de la naturaleza, particularmente de los murciélagos, debido a que se pueden inferir distribuciones más precisas del hongo asociadas al comportamiento de estos animales.

REFERENCIAS

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

Avise J. 2000. *Phylogeography: The history and formation of the species*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Avise J. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr* 36: 3-15.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 40: 1644-1647.

Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amogot SL, Gómez C, Serra E. 2003. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 41: 1753-1755.

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. *J Clin Microbiol* 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 Genet Biol* 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. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 11: 187-191.

Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657-1660.

De la Torre R, Estrada-Barcenas DA, Ramírez JA, Vite-Garín TM, Taylor ML. 2011. Identificación intraespecífica de *Histoplasma capsulatum* por PCR de las regiones ribosomales ITS1-5.8S-ITS2. En: Memorias VII Congreso Latinoamericano de Micología, publicación en disco compacto. Asociación Latinoamericana de Micología (ALM) y Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 18-21 de julio, pg. 24-25.

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

Eissenberg LG, Poirier S, Goldman WE. 1996. Phenotypic variation and persistence of *Histoplasma capsulatum* yeasts in host cells. *Infect Immun* 64: 5310-5314.

Espinosa-Avilés D, Taylor ML, Reyes-Montes MR, Pérez-Torres A. 2008. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). *J Zoo Wildl Med* 39: 450-454.

Estrada-Bárcenas DA, Palacios-Vargas JG, Estrada-Venegas E, Klimov PB, Martínez-Mena A, Taylor ML. 2010. Biological activity of the mite *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae) from bat guano associated with the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 127-131.

Estrada-Bárceñas DA, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML. 2007. Comparación de los métodos micológicos, inmunológicos y moleculares, para la detección de *Histoplasma capsulatum* en guano. IV Reunión Nacional de Micología Médica, Asociación Mexicana de Micología Médica, A.C., Monterrey, Nuevo León, México. Resumen TL-13.

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

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 YC, 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. *Myc Res* 111: 509-547.

Hoffmann A. 1998. Los ácaros asociados a hongos, su papel en la naturaleza. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 11: 183-186.

Index Fungorum, Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI) 2011. (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?RecordID=102749>), 15/08/2011.

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, Rossman 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 Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.

Kasuga T, Taylor JW, White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* 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*. *Mol Ecol* 12: 3383-3401.

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

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. Histoplasmosis. En: *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, pg. 305-341.

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. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 11: 162-172.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

López-González C, Rascón J, Hernández-Velázquez D. 2010. Population structure of migratory Mexican free-tailed bats *Tadarida brasiliensis mexicana* (Chiroptera) in Chihuahua Desert roost. *Chiropt Neotrop* 16: 557-566.

López-Vidal JC, Elizalde-Arellano C, Arrollo Cabrales J, Medellín RA. 2008. Observaciones sobre movimientos y comportamiento de *Tadarida brasiliensis mexicana* en la cueva El Salitre, Meztitlán, Hidalgo, México. En: Lorenzo C, Espinoza E, Ortega J (eds). *Avances en el estudio de los mamíferos de México*, Publicaciones Especiales, Vol. II, Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C., México DF, pg. 615-634.

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

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. *Papers in Florida Paleontology* 1: 1-22.

Morris PR, Terreni AA, DiSalvo F. 1986. Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. *J Med Vet Mycol* 24: 231-233.

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

Nosanchuck JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancopé-Oliveira RM, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. 2002. *Histoplasma capsulatum*

synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. *Infect Immun* 70: 5124-5131.

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. *Rev Arg Microbiol* 41: 102-104.

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

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. (<http://www.kumarlab.net/publications>) 02-08-2011.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol* 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 Immunol Med Microbiol* 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 infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg 61: 914-919.

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

Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999b. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 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, Hernández-García L, Estrada-Bárceñas DA, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García de la Cruz S, Galvão-Dias MA, Curiel-Quesada E, Canteros CE, Bojórquez-Torres G, Bogard-Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. 2011. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. Fungal Biol (enviado a publicación).

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

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. 1999c. *Catálogo de Cepas de "Histoplasma capsulatum"*. Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Ramírez JA. 2008. *Histoplasma capsulatum* y epidemiología de la histoplasmosis. En: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F (eds.). *Actualidades en Micología Médica, Contenido Temático del VII Diplomado en Micología Médica "Dr. Amado González Mendoza"*. 5a. Ed. Facultad de Medicina, UNAM, México DF, pg. 211-219.

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 YA, Romero-Martínez R, Sahaza-Carmona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. 2005b. Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol* 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. *Rev Mex Mic* 10: 49-62.

Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis. *In*: Ajello L, Hay RJ (eds.). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology*, vol. 4. Arnold and Oxford University Press Inc., New York, pp. 373-407.

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. *Rev Mex Biodiver* 77: 153-168.

TABLAS

Tabla 1. Datos de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados

	Aislado y/o cepa	Huésped	Material de aislamiento	Fecha y lugar de colecta	Procedencia geográfica
1	*G-217B	Humano	ND	ND/ND	LA, EU
2	*Downs	Humano	Mucosa vaginal	ND /ND	IL, EU
3	*G-186B	Humano	ND	ND/ND	PA, PA
4	EH-53	Humano	Sangre	10-01-1985/Hospital	HG, MX
5	EH-315	<i>Mormoops megalophylla</i>	Intestino	08-03-93/Cueva de Coapala	GR, MX
6	EH-317	Humano	Sangre	05-12-1992/Hospital	MS, MX
7	EH-372	<i>Artibeus hirsutus</i>	Intestino	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
8	EH-373	<i>A. hirsutus</i>	Pulmón	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
9	EH-374	<i>A. hirsutus</i>	Bazo	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
10	EH-375	<i>A. hirsutus</i>	Pulmón	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
11	EH-376	<i>A. hirsutus</i>	Pulmón	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
12	EH-377	<i>A. hirsutus</i>	Pulmón	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
13	EH-378	<i>A. hirsutus</i>	Pulmón	23-11-1996/Cueva El Salitre	MS, MX
14	EH-383I	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Intestino	23-02-1997/Cueva del Diablo	MS, MX
15	EH-383P	<i>L. nivalis</i>	Pulmón	23-02-1997/Cueva del Diablo	MS, MX
16	EH-384I	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Intestino	30-08-1997/Cueva Chica	OC, MX
17	EH-384P	<i>T. brasiliensis</i>	Pulmón	30-08-1997/Cueva Chica	OC, MX
18	EH-391	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Hígado	23-02-1997/Cueva del Diablo	MS, MX
19	EH-393	<i>L. curasoae</i>	Bazo	19-11-1997/Cueva La Claraboya	OC, MX
20	EH-394P	<i>L. curasoae</i>	Pulmón	19-11-1997/Cueva La Claraboya	OC, MX
21	EH-408H	<i>L. nivalis</i>	Hígado	02-04-1998/Cueva Zinacanostoc	PL, MX
22	EH-408P	<i>L. nivalis</i>	Pulmón	02-04-1998/Cueva Zinacanostoc	PL, MX
23	EH-437	<i>Desmodus rotundus</i>	Pulmón	01-03-2000/Cueva El Salitre	MS, MX
24	EH-449B	<i>L. nivalis</i>	Bazo	06-07-2000/Cueva El Salitre	MS, MX
25	EH-449I	<i>L. nivalis</i>	Intestino	06-07-2000/Cueva El Salitre	MS, MX
26	EH-655P	<i>T. brasiliensis</i>	Pulmón	20-12-2004/Cueva de la Trinitaria	CS, MX
27	EH-658H	<i>T. brasiliensis</i>	Hígado	20-12-2004/Cueva de la Trinitaria	CS, MX
28	EH-670B	<i>T. brasiliensis</i>	Bazo	26-01-2005/Cueva de la Trinitaria	CS, MX
29	EH-670H	<i>T. brasiliensis</i>	Hígado	26-01-2005/Cueva de la Trinitaria	CS, MX
30	EH-671P	<i>T. brasiliensis</i>	Pulmón	01-10-2005/Isla Janitzio	MN, MX
31	EH-672B	<i>T. brasiliensis</i>	Bazo	14-04-2006/Isla Janitzio	MN, MX
32	EH-672H	<i>T. brasiliensis</i>	Hígado	14-04-2006/Isla Janitzio	MN, MX
33	EH-696P	<i>T. brasiliensis</i>	Pulmón	29-08-2006/Cueva de la Boca	NL, MX
34	154/04	<i>Molossus molossus</i>	ND	ND/Jundiá	SP, BR
35	190/03	<i>M. rufus</i>	ND	ND/ Mogi Mirim	SP, BR
36	WCh	Humano	Esputo	ND /Hospital	ND/CO
37	AP	Humano	Líquido cefaloraquídeo	ND /Hospital	ND/CO
38	GeM	Humano	ND	ND/Hospital	ND/CO

*Cepas de referencia. GR= Guerrero; MS= Morelos; OC= Oaxaca; PL= Puebla; CS= Chiapas; MN= Michoacán; NL= Nuevo León; HG=Hidalgo; MX= México; SP= São Paulo; BR= Brasil; CO= Colombia; EU= Estados Unidos; LA=Louisiana; IL=Illinois; PA= Panamá.

Tabla 2. Número de sitios informativos de los marcadores procesados en los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados

Marcador (Número de aislados)	Sustituciones		Indels		Total de mutaciones
	Transversiones	Transiciones	Inserciones	Delecciones	
<i>ARF</i> (n=38)	13	13	4	2	32
<i>H-ANTI</i> (n=38)	14	26	1	1	42
<i>OLE1</i> (n=38)	7	27	1	0	35
<i>TUB1</i> (n=38)	13	26	0	51	90
(GA)n (n=33)	12	23	11	19	65
5 marcadores concatenados (n= 33)	59	115	17	73	264

Se estimó el número de sitios informativos por la suma de las sustituciones e indels.

Tabla 3. Valores de diversidad nucleotídica (π), considerando los cinco marcadores analizados en forma individual, para los grupos y subgrupos de aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados

ARF(π)								
Grupo	I	II	III	Ia	Ib			G-217B**
I (0.00285)*	NA	0.00854	0.00516	NA	NA			0.00442
II (0.00356)*	0.00854	NA	0.00584	0.00812	0.01031			0.00569
III (0.00445)*	0.00516	0.00584	NA	0.00459	0.00925			0.01644
Ia (0.00146)*	NA	0.00812	0.00459	NA	0.00290			0.00359
Ib (0.00000)*	NA	0.01031	0.00925	0.00290	NA			0.00706
H-ANT(π)								
Grupo	I	II	Ia	Ib	Ic			G-217B**
I (0.01071)*	NA	0.01587	NA	NA	NA			0.01272
II (0.00103)*	0.01587	NA	0.01231	0.00650	0.00947			0.00462
Ia (0.00051)*	NA	0.01231	NA	0.00512	0.00839			0.00434
Ib (0.00000)*	NA	0.00650	0.00512	NA	0.02159			0.02228
Ic (0.02564)*	NA	0.00947	0.00839	0.02159	NA			0.02949
OLE1(π)								
Grupo	I	II	III	Ia	Ib	Ic		G-217B**
I (0.00719)*	NA	0.01015	0.00793	NA	NA	NA		0.00839
II (0.00161)*	0.01015	NA	0.00745	0.00580	0.01268	0.01205		0.00763
III (0.00000)*	0.00793	0.00754	NA	0.00207	0.01168	0.01977		0.01130
Ia (0.00063)*	NA	0.00580	0.00207	NA	0.00502	0.00346		0.00243
Ib (0.00000)*	NA	0.01268	0.01168	0.00502	NA	0.01541		0.01168
Ic (0.02663)*	NA	0.01205	0.01977	0.00346	0.01541	NA		0.02906
TUB1(π)								
Grupo	I	II	III	IV	V	Ia	Ib	G-217B**
I (0.00177)*	NA	0.01064	0.00442	0.00257	0.01265	NA	NA	0.00403
II (0.00000)*	0.01064	NA	0.01364	0.01461	0.02950	0.01068	0.01299	0.01082
III (0.00000)*	0.00442	0.01364	NA	0.01818	0.02740	0.00398	0.01515	0.01818
IV (0.00000)*	0.00527	0.01461	0.01818	NA	0.02933	0.00505	0.01768	0.01263
V (0.03535)*	0.01265	0.02950	0.02740	0.02933	NA	0.01298	0.03259	0.03368
Ia (0.01120)*	NA	0.01068	0.00398	0.00505	0.01298	NA	0.00177	0.00371
Ib (0.00000)*	NA	0.01299	0.01515	0.01768	0.03259	0.00177	NA	0.02020
(GA)n(π)								
Grupo	I	II	III	IV	Ia	Ib		G-217B**
I (0.01265)*	NA	0.02491	0.01497	0.01415	NA	NA		0.01734
II (0.00319)*	0.02491	NA	0.00993	0.01228	0.02354	0.02452		0.01485
III (NA)*	0.01497	0.00993	NA	0.01896	0.00632	0.00917		0.05909
IV (0.01395)*	0.01415	0.01228	0.01896	NA	0.01004	0.01116		0.03443
Ia (0.00169)*	NA	0.02354	0.00632	0.01004	NA	0.01307		0.01027
Ib (0.00000)*	NA	0.02452	0.00917	0.01116	0.01307	NA		0.01631

Los valores de π fueron estimados en forma individual para los cinco marcadores, utilizando los datos generados por el análisis de MP con el programa DnaSP ver. 5.10. * Valores de π calculados para cada grupo. ** Cepa de referencia G-217B (grupo externo). Para mayores detalles ver Materiales y Métodos. NA= No Aplica.

Tabla 4. Valores de diversidad nucleotídica (π), considerando los cinco marcadores analizados en forma concatenada, para los grupos y subgrupos de aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados

Grupos y subgrupos	I	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	II	IIa	IIb	G-217B**
I (0.01177)*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.01364	0.01579	0.01346	0.01333
Ia (0.00476)*	NA	NA	0.01252	0.01406	0.01538	0.01330	0.00789	0.01198	0.00734	0.02186
Ib (0.00038)*	NA	0.01252	NA	0.00369	0.01008	0.00288	0.00839	0.01251	0.00764	0.01355
Ic (0.00306)*	NA	0.01406	0.00369	NA	0.01080	0.00553	0.00925	0.01357	0.00902	0.01464
Id (0.01303)*	NA	0.01538	0.01008	0.01080	NA	0.01046	0.00891	0.01344	0.00867	0.02200
Ie (0.00115)*	NA	0.01330	0.00288	0.00553	0.01046	NA	0.00697	0.00961	0.00595	0.01805
II (0.00480)*	0.01364	0.00789	0.00839	0.00925	0.00891	0.00697	NA	NA	NA	0.00748
IIa (0.00254)*	0.01579	0.01198	0.01251	0.01357	0.01344	0.00961	NA	NA	0.00485	0.01141
IIb (0.00282)*	0.01346	0.00734	0.00764	0.00902	0.00867	0.00595	NA	0.00485	NA	0.00686

Los valores de π fueron estimados en forma concatenada para los cinco marcadores, utilizando los datos generados por el análisis de MP con el programa DnaSP ver. 5.10. * Valores de π calculados para cada grupo. ** Cepa de referencia G-217B (grupo externo). Para mayores detalles ver Materiales y Métodos. NA= No Aplica.

FIGURAS

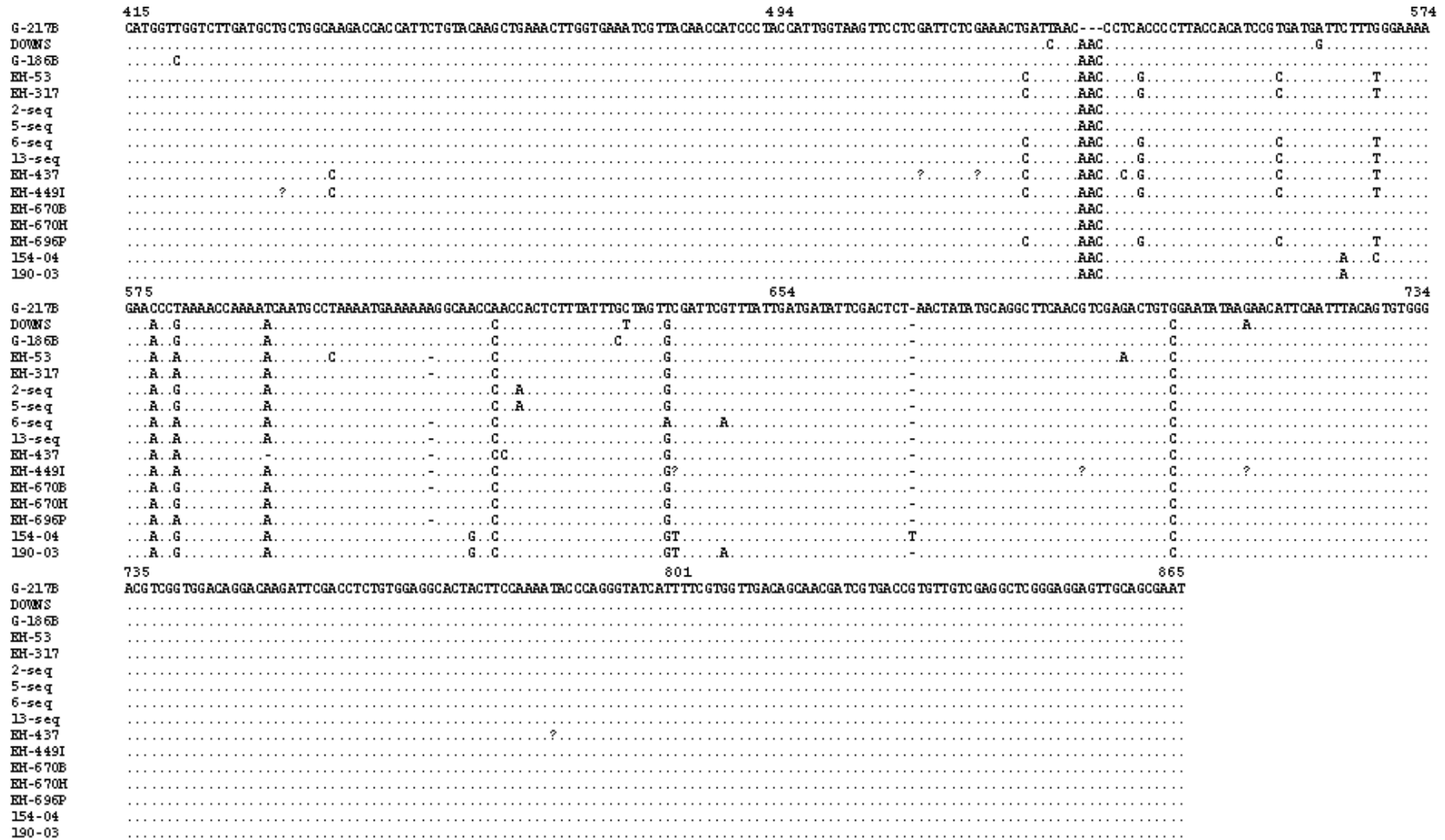


Figura 1. Alineamiento de las secuencias del marcador *ARF* para 38 aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Para el alineamiento se consideraron 450 nt, del 415 al 865 nt. Se utilizó el programa MEGA5. Se tomó como referencia la secuencia de la cepa G-217B depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso L25117.1). Las sustituciones, inserciones y deleciones fueron referidas por abreviaciones de los nucleótidos en los sitios nucleotídicos correspondientes. 2-seq = EH-384P, EH-384I; 5-seq = EH-655P, EH-658H, EH-671P, EH-672B, EH-315; 6-seq = EH-372, EH-373, EH-375, EH-376, EH-377, EH-378; 12-seq = EH-374, EH-383I, EH-383P, EH-391, EH-393, EH-394P, EH-672H, WCh, AP, GeM, EH-408H, EH-408P, EH-449B.

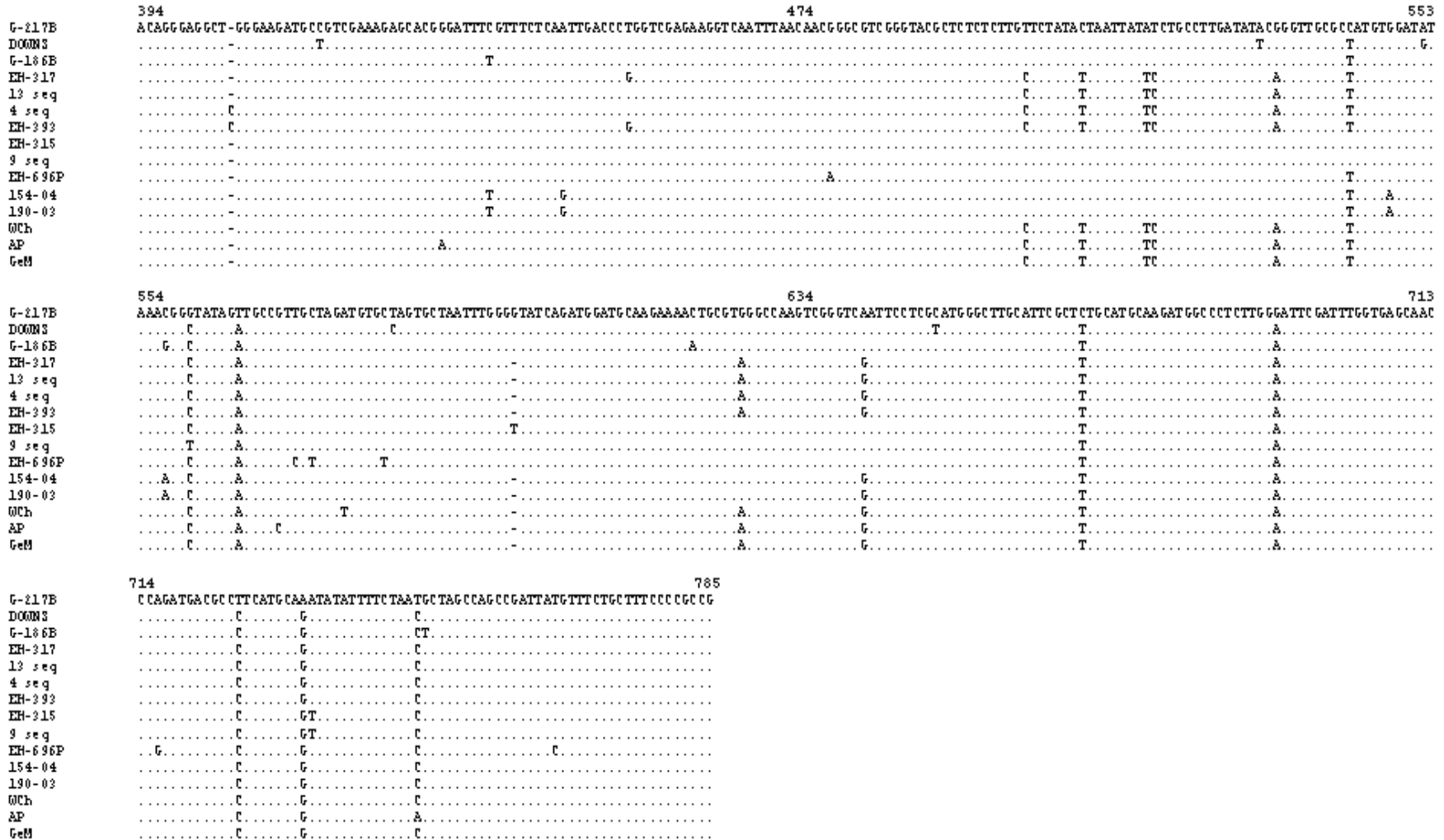


Figura 2. Alineamiento de las secuencias del marcador *H-ANTI* para 38 aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Para el alineamiento se consideraron 391 nt, del 394 al 785 nt. Se utilizó el programa MEGA5. Se tomó como referencia la secuencia de la cepa G-217B depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso U20346). Las sustituciones, inserciones y deleciones fueron referidas por abreviaciones de los nucleótidos en los sitios nucleotídicos correspondientes. 4-seq = EH-375, EH-376, EH-408H, EH-408P; 9-seq = EH-384I, EH-384I, EH-655P, EH-658H, EH 670B, EH-670H, EH-671P, EH-672B, EH-672H; 13-seq = EH-53, EH-372, EH-373, EH 374, EH-377, EH-378, EH-383I, EH-383P, EH-391, EH-394P, EH-437, EH-449I, EH 449P.

	37	117	196
G-217B	GCTGAGACAGC-TGCTGGAGGTAAGCCGTTACCACTGATCTGCACGTCCGCCCCAACTCCTGAGCCCAAGGAGGTTATATCAGATACGCCGATAACTCTGCGAAACTGCCATAGCATGTCAGCTGGCTCAACCTCATCTTCATCATCGTCAATCCC		
2-seqT.....G.....C.....	C.....
G-186BA.....GT.....G.....CT.....	A.....C.....
19-seqGT.....G.....C.....	C.....
EH-315	T.....GT.....G.....T.....C.....	C.....
4-seqGT.....G.....T.....C.....	C.....
EH-437GT.....G.....C.....	C.....
EH-658HGT.....G.....T.....C.....	C.....
3-seqGT.....G.....A.....C.....	C.....
EH-696PA.....GT.....G.....C.....	AC.....
154-04GT.....G.....A.....C.....	C.....
0ChGT.....G.....C.....	C.....
APGT.....G.....C.....	C.....
GEMGT.....G.....C.....A.....G.....	C.....
	197	277	356
G-217B	ATCTACGGCCTTGCCAGGCATACTGCGGTCCCCTTGCCCTCCAAAAGTGCCTGTGGGCTGGTGGTGTACATATTTATGACTGGACTGCGGTATCCACTGCGCGTACCGTAGCCCTGAAATCCCTTAAATCCCTGTTTATCGAATGGGTTTTTGT-GTGGCGACG		
2-seqA.....A.....G.....	G.....
G-186B	T.....A.....A.....	T.....G.....
19-seqA.....A.....	G.....
EH-315A.....A.....	G.....
4-seqA.....A.....	G.....
EH-437A.....A.....	G.....
EH-658HA.....A.....	G.....
3-seqG.....T.....A.....T.....C.....	G.....
EH-696PA.....A.....	G.....
154-04G.....T.....A.....T.....C.....	G.....
0ChA.....A.....	G.....
APA.....A.....	G.....
GEMA.....A.....C.....	G.....
	357	451	
G-217B	CATCTAATCGATTTGATATATGTGTCGACAGGATATCATCGTCTTTGGGCACACTGCTCATATTCGCCACATTGCCACTAATAATATATCT		
2-seqT.....		
G-186B	G.....		
19-seqT.....		
EH-315C.....T.....		
4-seqC.....T.....		
EH-437	T.....		
EH-658HC.....T.....		
3-seq		
EH-696PT.....		
154-04	--.....		
0ChT.....		
APT.....		
GEMT.....		

Figura 3. Alineamiento de las secuencias del marcador *OLE1* para 38 aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Para el alineamiento se consideraron 414 nt, del 37 al 450 nt. Se utilizó el programa MEGA5. Se tomó como referencia la secuencia de la cepa G-217B depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso X85962.1). Las sustituciones, inserciones y deleciones fueron referidas por abreviaciones de los nucleótidos en los sitios nucleotídicos correspondientes. 2-seq = Downs, EH-376; 3-seq = EH-672B, EH-672H, 190-03; 4-seq = EH-384I, EH-384P, EH-670B, EH-670H; 19-seq = EH-53, EH-317, EH-372, EH-373, EH-374, EH-375, EH-377, EH-378, EH-383I, EH-383P, EH-391, EH-393, EH-394P, EH-408H, EH-408P, EH-449B, EH-449I, EH-655P, EH-671P.

590

670

749

```

G-217B  AGGTATGACCTT&ATCCT&ACCGG&G&CT&TTG&TTTTTC&C&T&T&G&CTC&ATTA&CA&C&GC&G&AT&TA&G&ATTTCT&TTG&ATGCT&ATGG&CTTG&ATTA&CTTTTTT&T&G&TTG&T&TTG&CTTGG&AC&ATGG&ATTC&AGGT&A&T&T&AT&T&CTT&G&AC&CG&T
Downs      T.....G.....A.....A.....A.....T.....G.....A.....
G-186B     T.T.....G.....G.....A.....A.....
6-seq     G.....T.....T.....A.....C.....A.....A.....
EH-315    T.....A.....T.....
14-seq    T..C.....A.....C..A.....
EH-671P   T.....A.....A.....
EH-672B   T.....A.....
EH-672H   T.....A.....T.....
EH-696P   T.A.....A.G.....A.....C..
2-seq*    T..C.....A.....C.....C..A.....
2-seq**   T.....A.....T.....T.....
154-04    T.....G.....A.....A.....A.....
190-03    T.....G.....A.....A.....A.....A.....
WCh      T..C.....A.....C..A.....
AP       T..C.....A.....C..A.....
GeM     T..C.....A.....C..A.....

```

750

860

```

G-217B  CGATGAG&ATTC&ATGCGG&CCT&ATTC&CT&ATTTCC&CCTGCGG&CCT&A&CG&CA&CTCG&AG&ATTTG&AG&CC&A&ATTTG&ACT&A&CTGTTCCCTCC&TGG&AG&CCG&CGG&AT&CCTG
Downs   G.....T&A..-..A.....T.....A.....
G-186B   A..G.....-.....T.....
6-seq   G.....-.....T.....G.....
EH-315  -.....
14-seq  G.....G.....
EH-671P G.....G.....
EH-672B G.....G.....
EH-672H G.....G.....
EH-696P G.....G.....C.....T.....
2-seq*  G.....G.....
2-seq** G.....G.....
154-04  -.....G.....
190-03  G.....G.....
WCh     G.....G.....
AP      G.....C.....G.....
GeM    G.....G.....

```

Figura 4. Alineamiento de las secuencias del marcador *TUB1* para 38 aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Para el alineamiento se consideraron 271 nt, del 590 al 860 nt. Se utilizó el programa MEGA5. Se tomó como referencia la secuencia de la cepa G-217B depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso M28358.1). Las sustituciones, inserciones y deleciones fueron referidas por abreviaciones de los nucleótidos en los sitios nucleotídicos correspondientes. 2-seq* = EH-383I, EH-383P; 2-seq** = EH-384I, EH-384P; 6-seq = EH-53, EH-372, EH-373, EH-377, EH-378, EH-437; 15-seq = EH-317, EH-374, EH-375, EH-376, EH-391, EH-393, EH-394P, EH-408H, EH-408P, EH-449B, EH-449I, EH-655P, EH-658H, EH-670B, EH-670H.

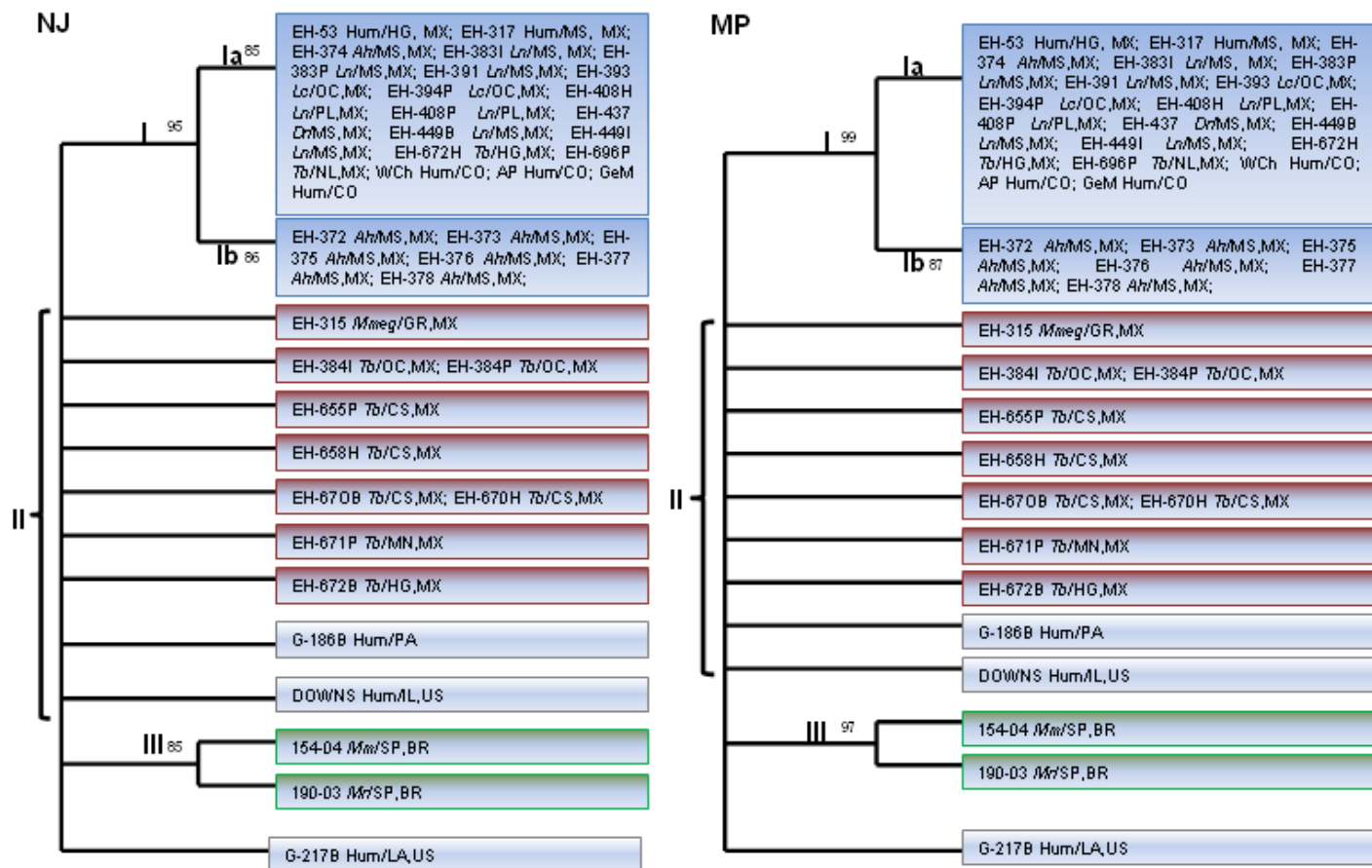


Figura 6. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando el marcador *ARF*. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 38 secuencias con 450 nt. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$, los grupos de datos de NJ/MP, con el modelo 2-parámetro de Kimura y una búsqueda heurística, respectivamente, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =610; LT =30; CI =0.937500; RI =0.988095; RCI= 0.955159; iRCI= 0.926339. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoe*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), EU (Estados Unidos).

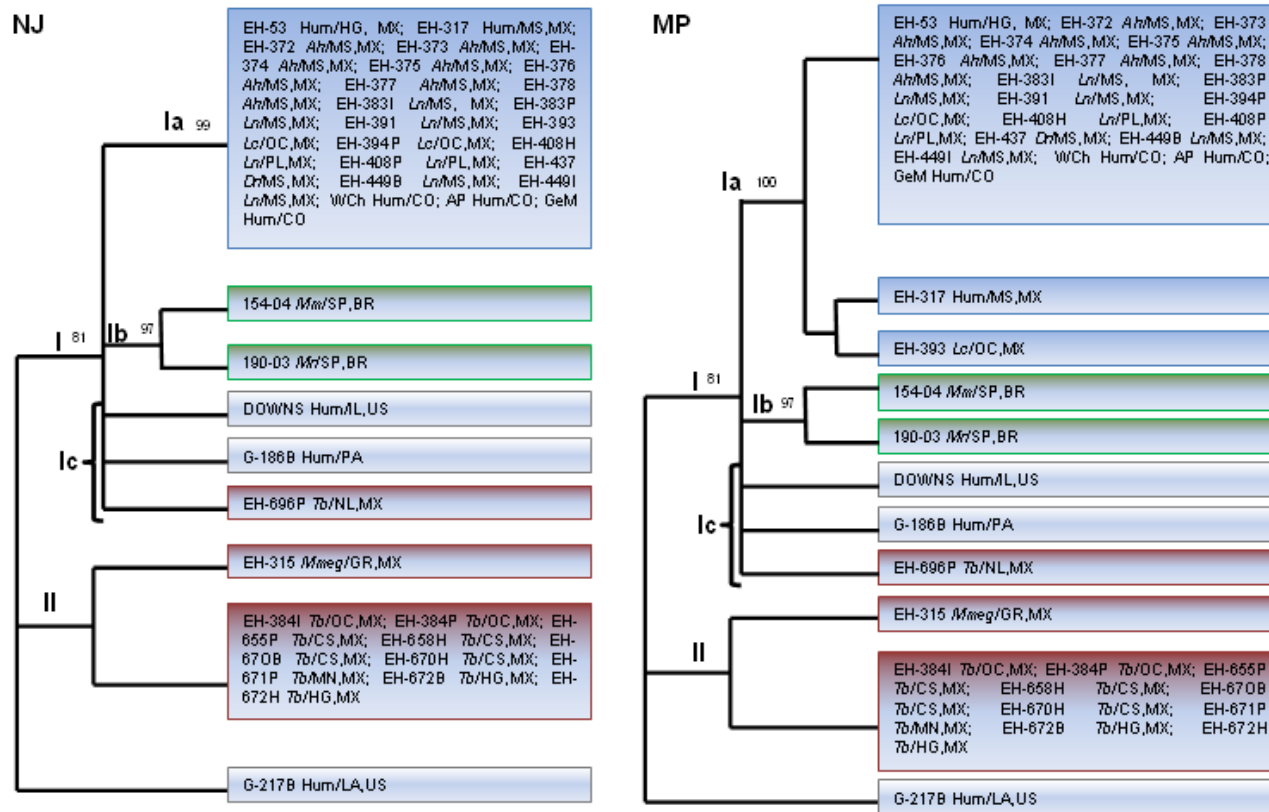


Figura 7. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando el marcador *H-ANTI*. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 38 secuencias con 391 nt. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$, los grupos de datos de NJ/MP, con el modelo 2-parámetro de Kimura y una búsqueda heurística, respectivamente, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =573; LT =42; CI =0.976190; RI =0.992647; RCI= 0.96901; iRCI= 0.937500. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), EU (Estados Unidos).

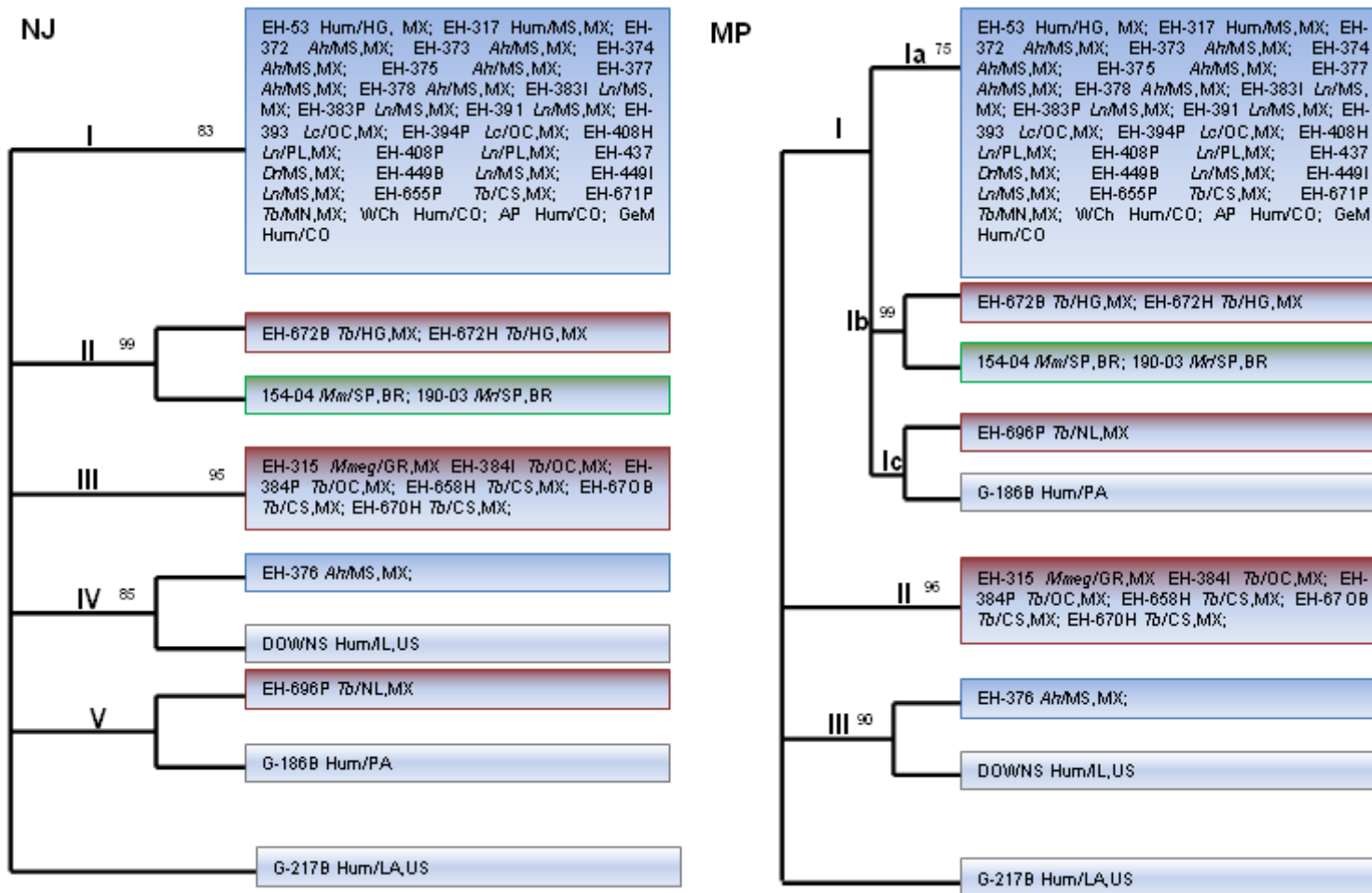


Figura 8. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando el marcador *OLE1*. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 38 secuencias con 415 nt. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$, los grupos de datos de NJ/MP, con el modelo 2-parámetro de Kimura y una búsqueda heurística, respectivamente, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =414; LT =35; CI =0.971429; RI =0.985075; RCI= 0.956930; iRCI= 0.914712. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), EU (Estados Unidos).

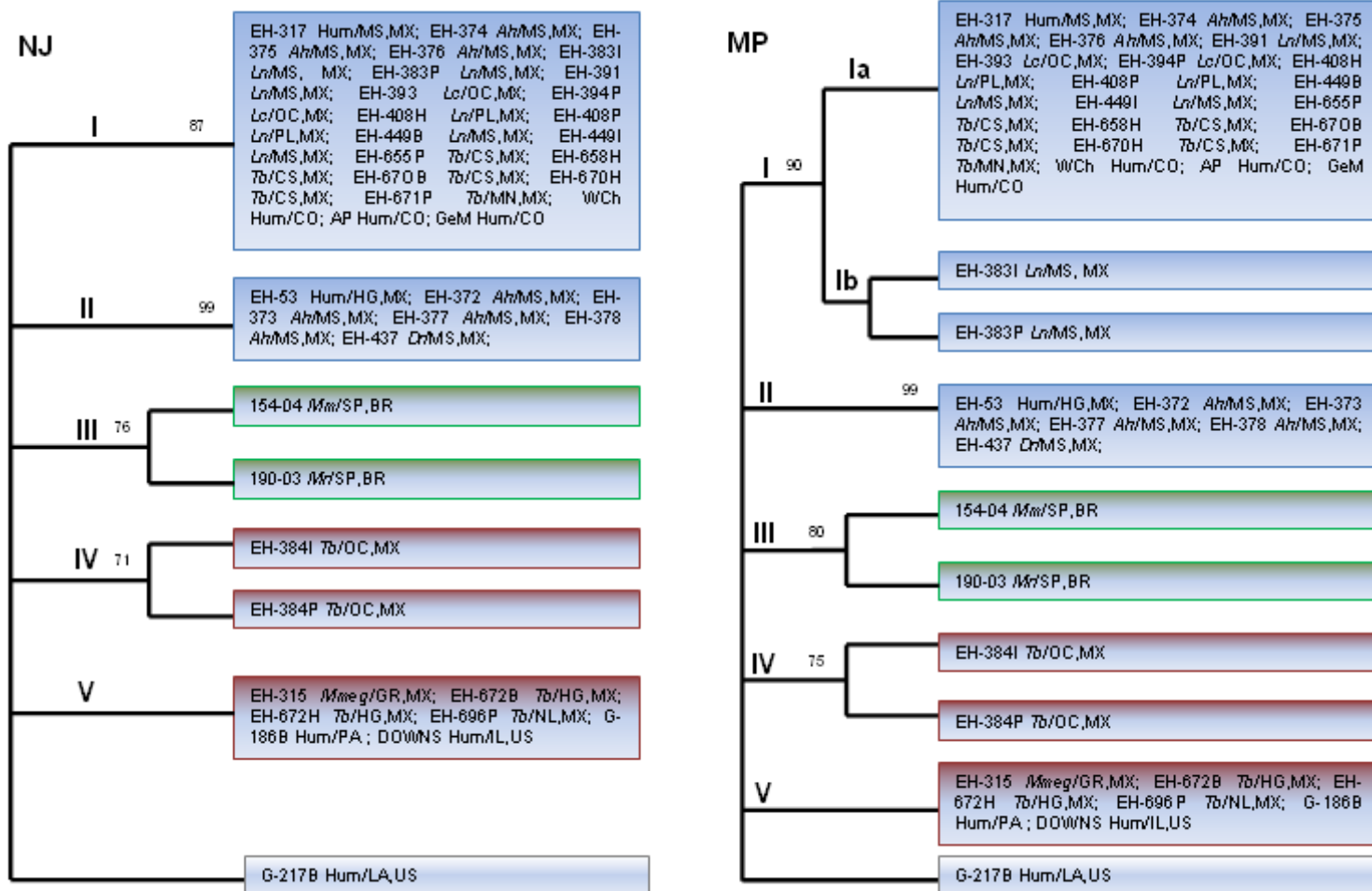


Figura 9. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando el marcador *TUB1* Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 38 secuencias con 270 nt. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$, los grupos de datos de NJ/MP, con el modelo 2-parámetro de Kimura y una búsqueda heurística, respectivamente, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =202; LT =42; CI =0.928571 RI =0.962025; RCI= 0.893309; iRCI= 0.801688. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), EU (Estados Unidos).

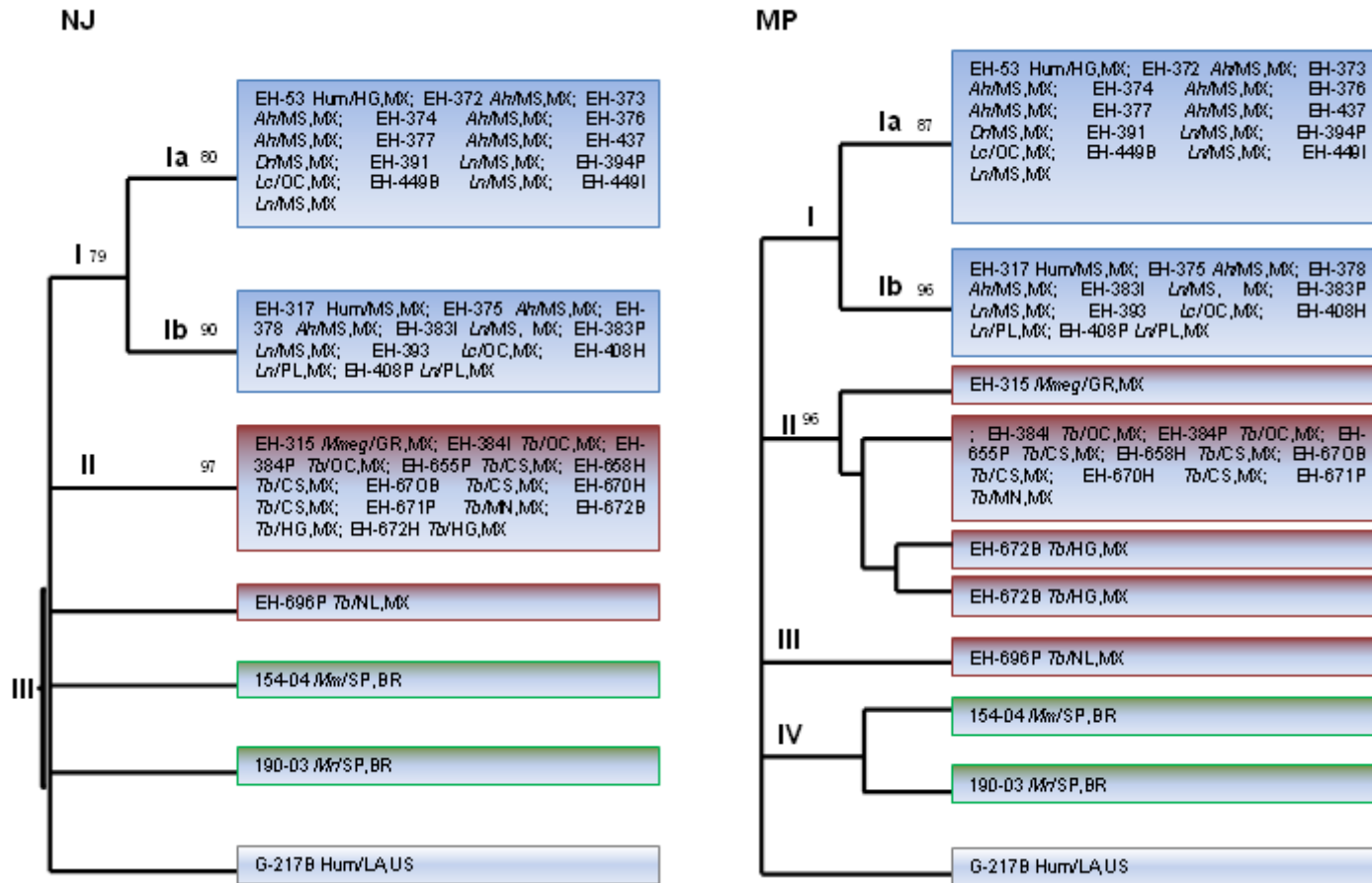


Figura 10. Árboles de NJ y MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando el marcador (GA)n. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 33 secuencias con 240 nt. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$, los grupos de datos de NJ/MP, con el modelo 2-parámetro de Kimura y una búsqueda heurística, respectivamente, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =367; LT =39; CI =0.897436 RI =0.968000; RCI= 0.868718; iRCI= 0.792000. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), LA (Louisiana), EU (Estados Unidos).

NJ

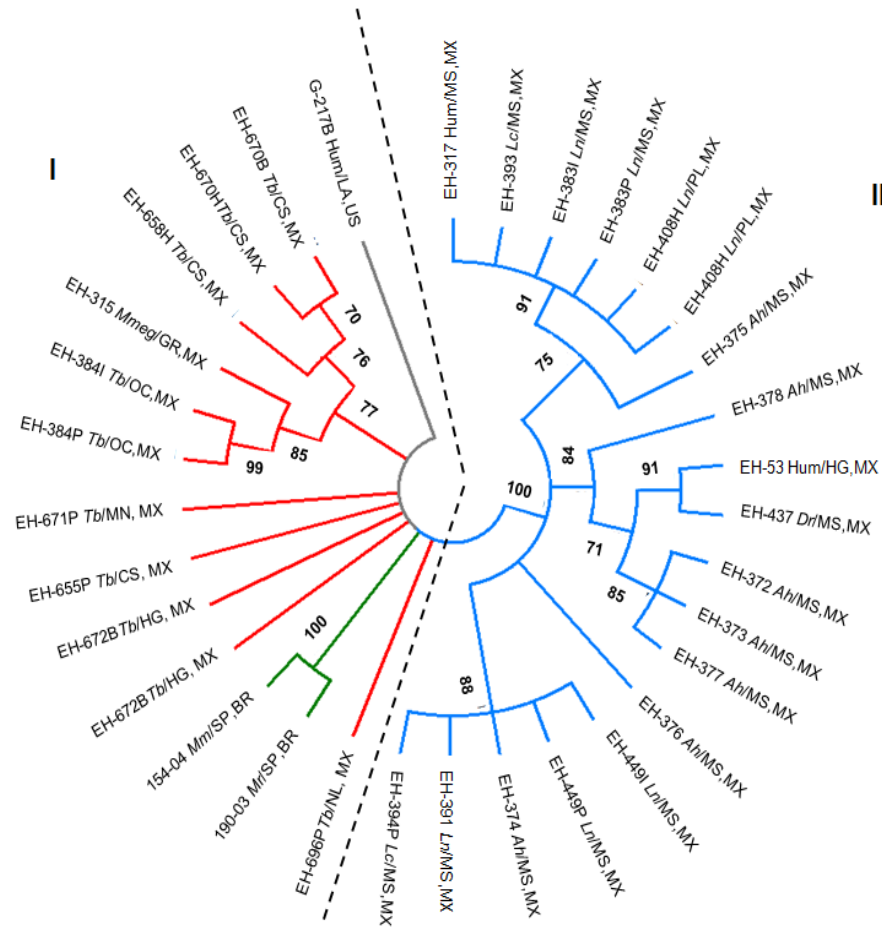


Figura 11. Árbol de NJ de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando los cinco marcadores analizados en forma concatenada. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 33 secuencias con 1766 sitios informativos de los cinco marcadores. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$ utilizando el grupos de datos de NJ con el modelo 2-parámetro de Kimura. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), BR (Brasil), EU (Estados Unidos).

MP

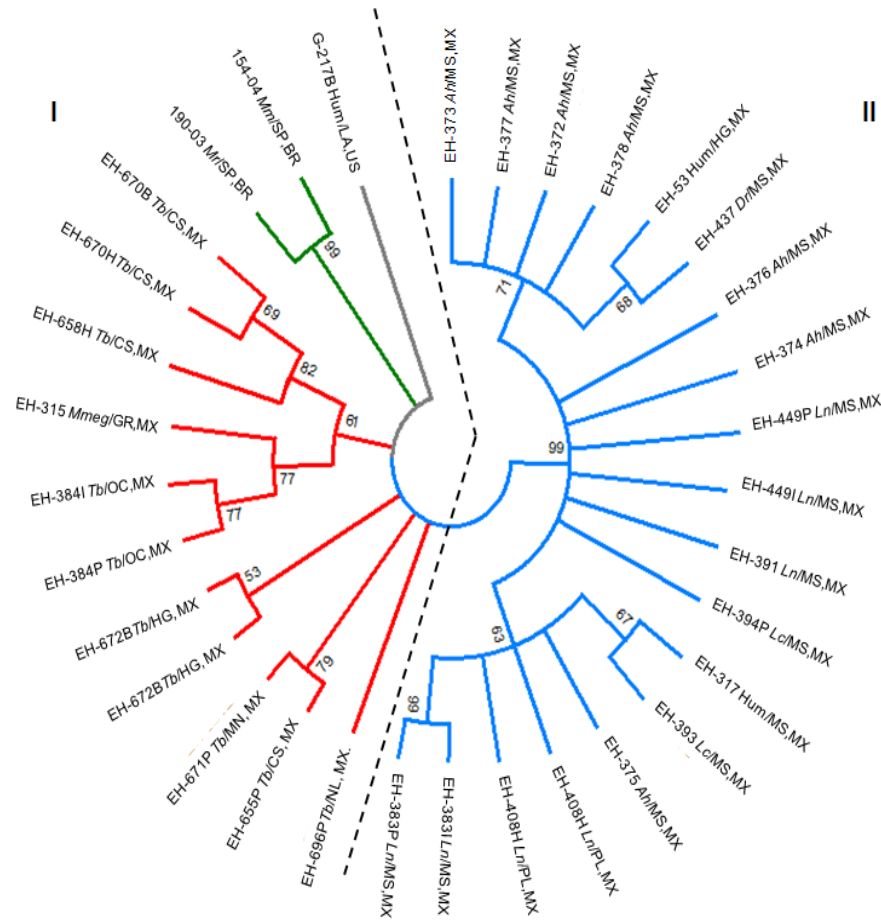


Figura 12. Árbol de MP de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados, utilizando los cinco marcadores analizados en forma concatenada. Los árboles fueron construidos con el programa MEGA5 considerando 33 secuencias con 1766 sitios informativos de los cinco marcadores. Las ramas fueron generadas por valores de bootstrap $\geq 70\%$ utilizando el grupo de datos de MP con una búsqueda heurística, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de parsimonia fueron los siguientes: MPT =99; LT =188; CI =0.584615; RI =0.881569. Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), BR (Brasil), EU (Estados Unidos).

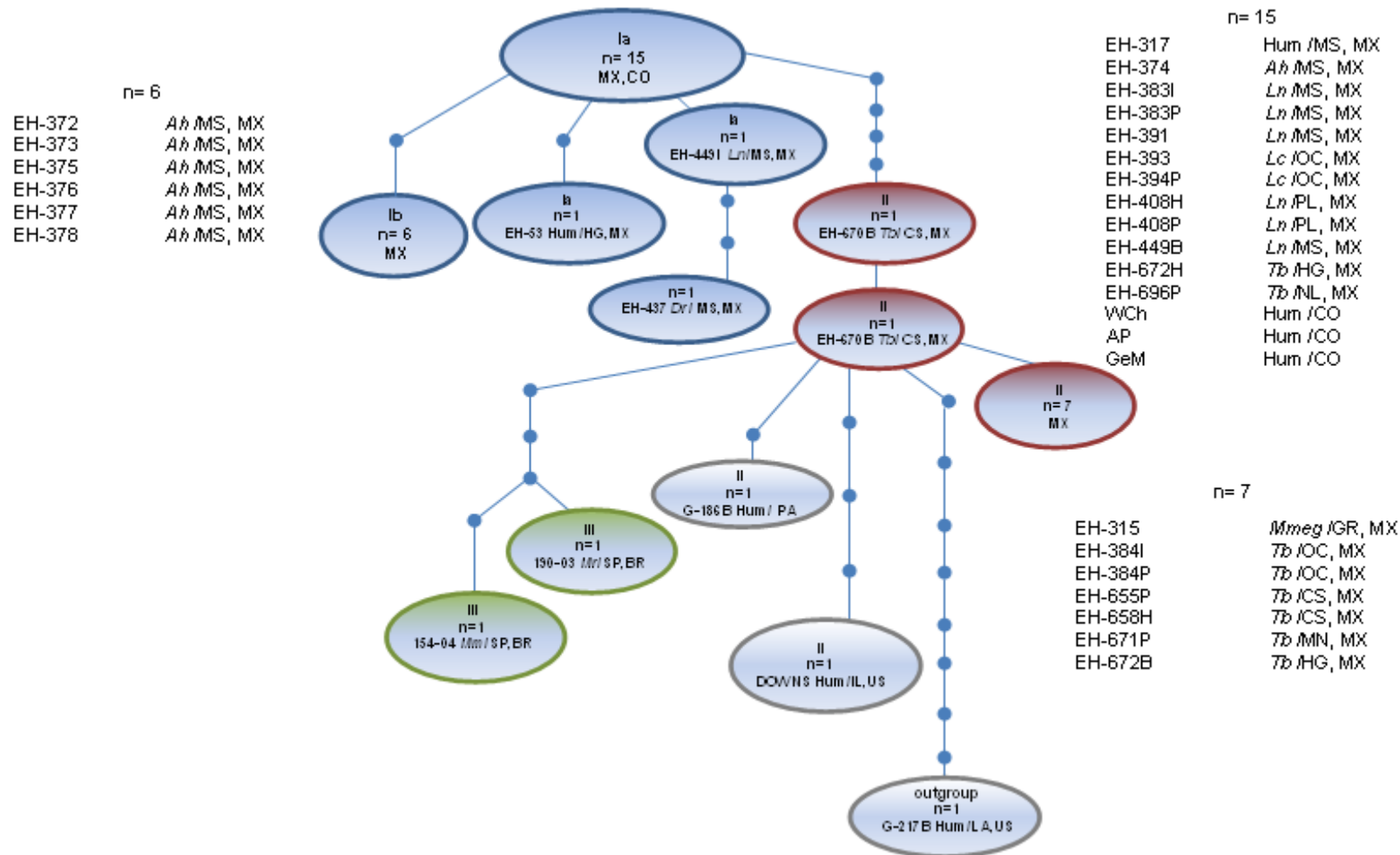


Figura 13. Red de haplotipos para el marcador *ARF*. Con base en las distancias genéticas del marcador, representadas en la figura por nodos, se construyó una red haplotípica de las secuencias parciales del gen *ARF* de 38 aislados de *H. capsulatum*, utilizando el programa TCS ver. 2.1 (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), US (Estados Unidos).

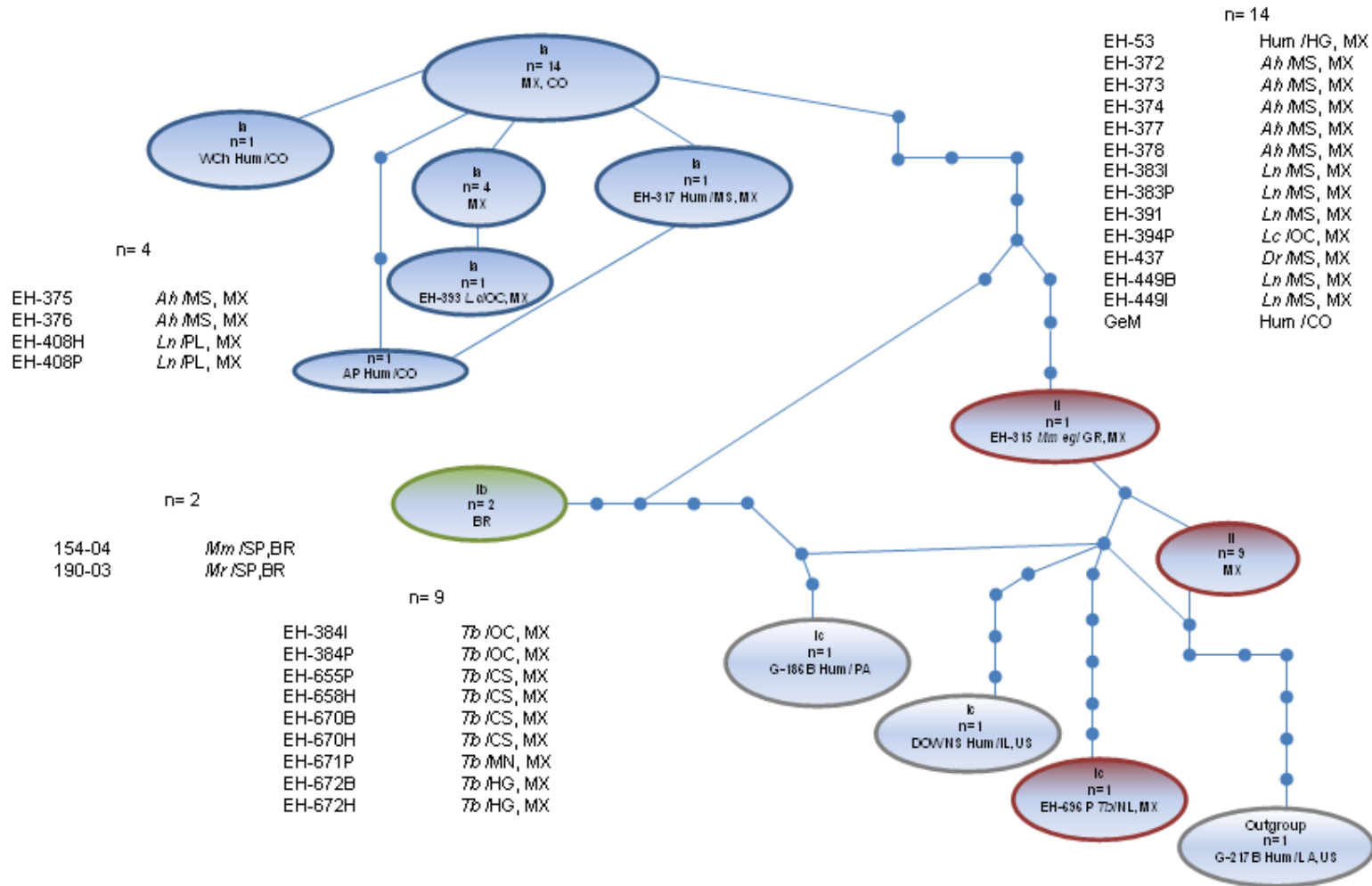


Figura 14. Red de haplotipos para el marcador *H-ANTI*. Con base en las distancias genéticas del marcador, representadas en la figura por nodos, se construyó una red haplotípica de las secuencias parciales del gen *H-ANTI* de 38 aislados de *H. capsulatum*, utilizando el programa TCS ver. 2.1 (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), US (Estados Unidos).

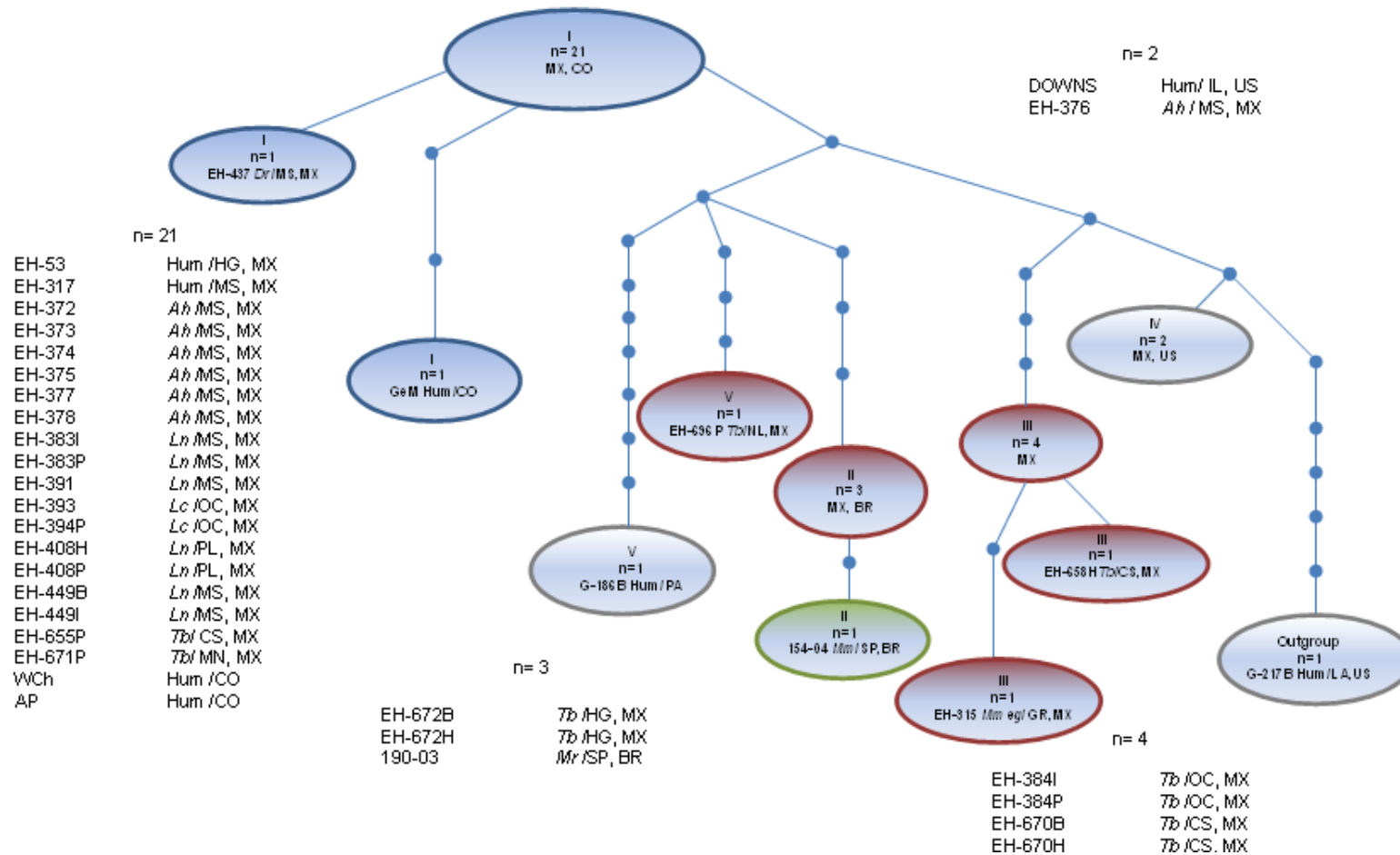


Figura 15. Red de haplotipos para el marcador *OLE1*. Con base en las distancias genéticas del marcador, representas en la figura por nodos, se construyó una red haplotípica de las secuencias parciales del gen *OLE1* de 38 aislados de *H. capsulatum*, utilizando el programa TCS ver. 2.1 (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), US (Estados Unidos).

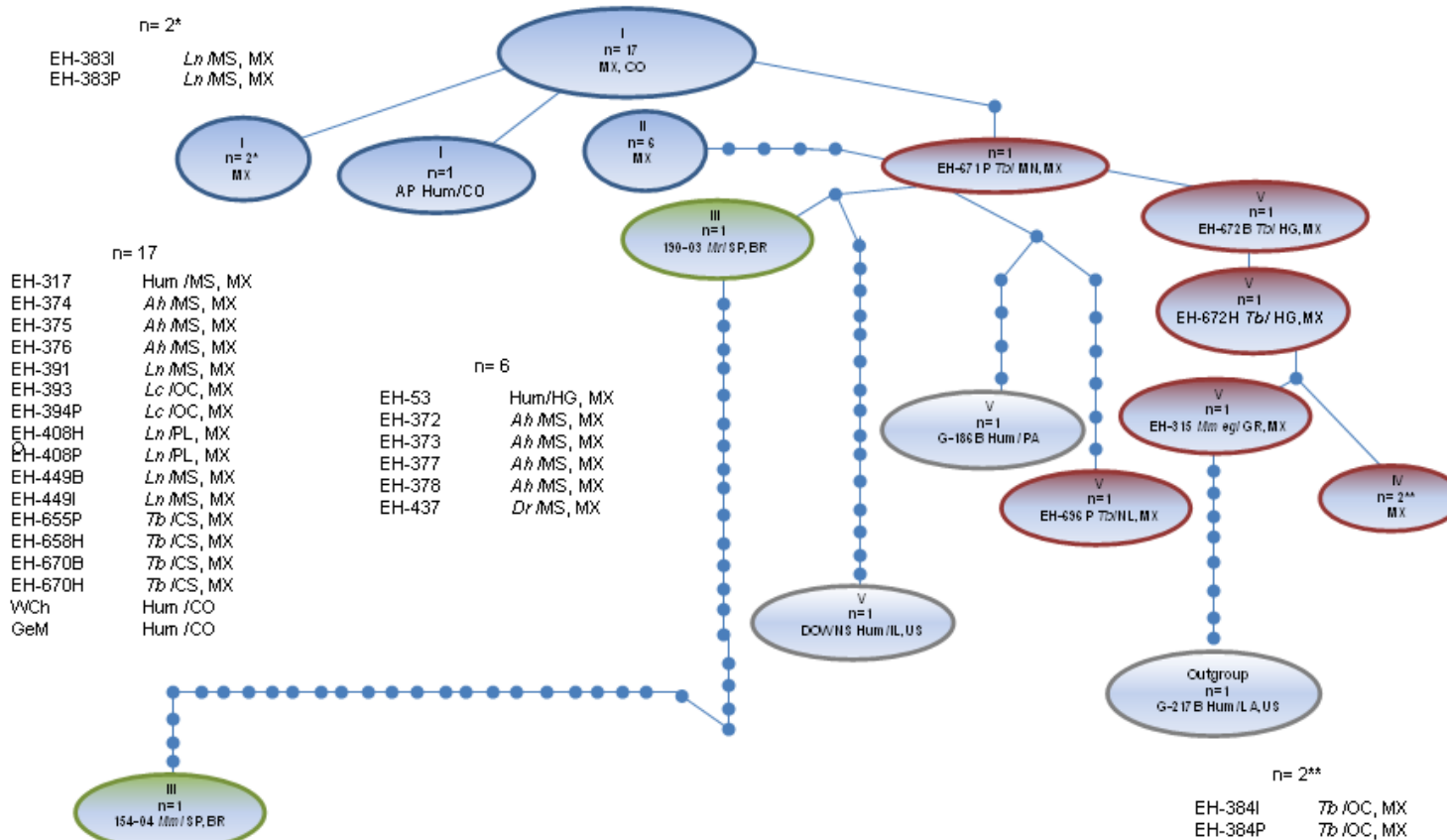


Figura 16. Red de haplotipos para el marcador *TUB1*. Con base en las distancias genéticas del marcador, representas en la figura por nodos, se construyó una red haplotípica de las secuencias parciales del gen *TUB1* de 38 aislados de *H. capsulatum*, utilizando el programa TCS ver. 2.1 (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoeae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), CO (Colombia), PA (Panamá), LA (Louisiana), IL (Illinois), US (Estados Unidos).

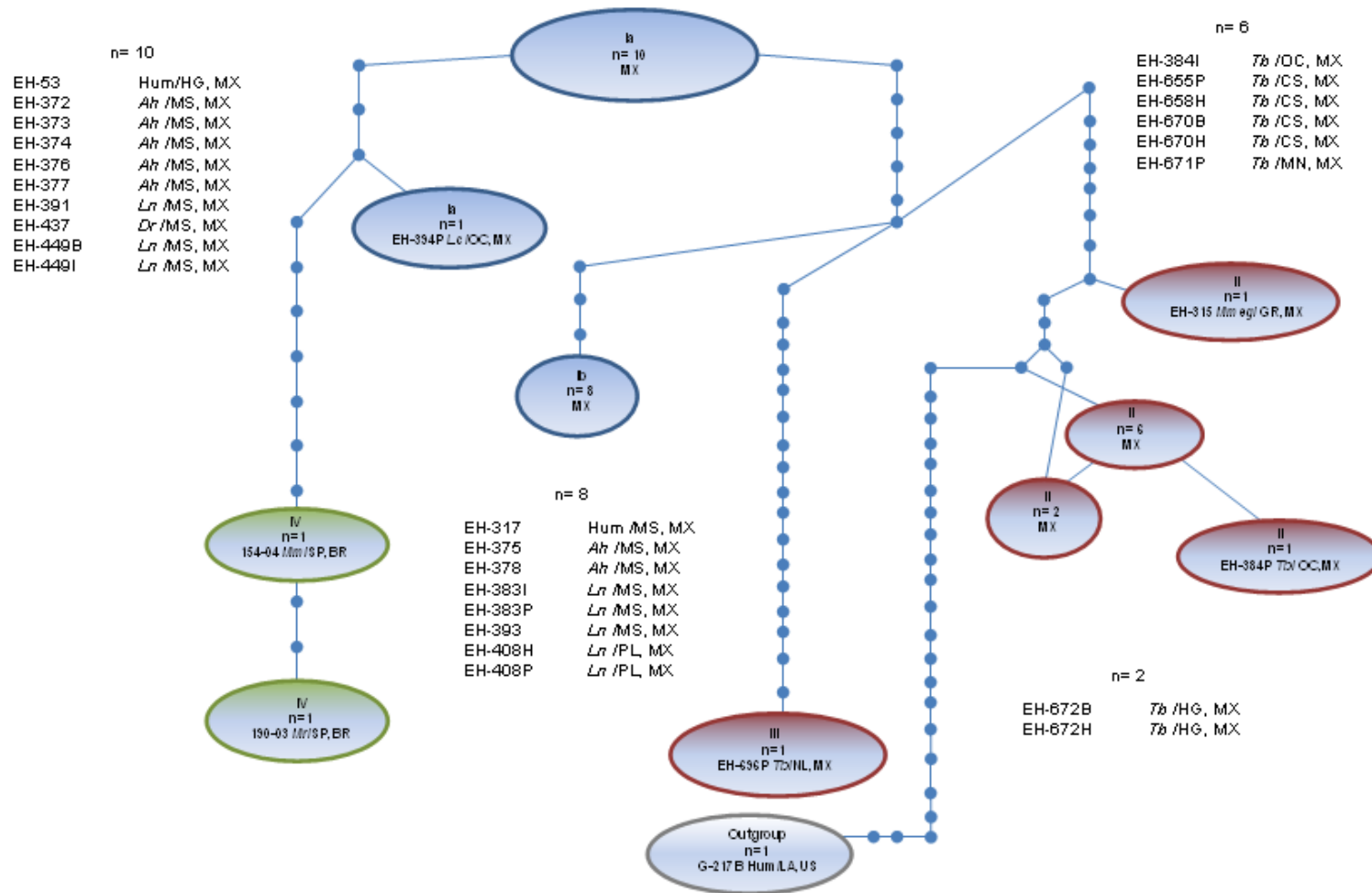


Figura 17. Red de haplotipos para el marcador (GA)_n. Con base en las distancias genéticas del marcador, representadas en la figura por nodos, se construyó una red haplotípica de las secuencias parciales del gen (GA)_n de 33 aislados de *H. capsulatum*, utilizando el programa TCS ver. 2.1 (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: Hum (Humano), *Tb* (*T. brasiliensis*), *Ah* (*A. hirsutus*), *Ln* (*L. nivalis*), *Lc* (*L. curasoae*), *Mmeg* (*M. megalophylla*), *Mm* (*M. molossus*), *Mr* (*M. rufus*); CS (Chiapas), OC (Oaxaca), MS (Morelos), NL, (Nuevo León), PL (Puebla), HG (Hidalgo), MX (México), SP (Sao Paulo), BR (Brasil), LA (Louisiana), US (Estados Unidos).