

Diversidad genética de *Histoplasma capsulatum* asociada a murciélagos cavernícolas.

Maria Lucia Taylor, Daniel A. Estrada-Bárceñas y Lorena Hernández García

Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Introducción

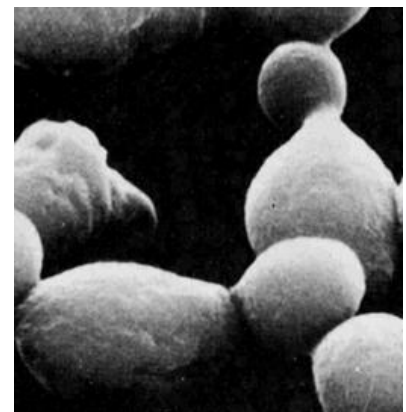
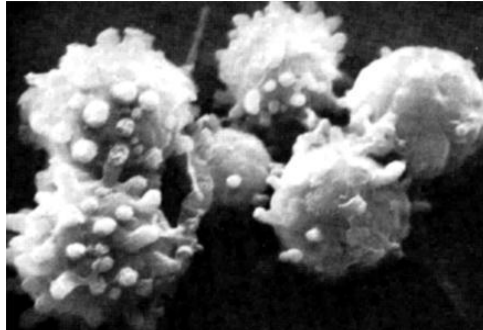
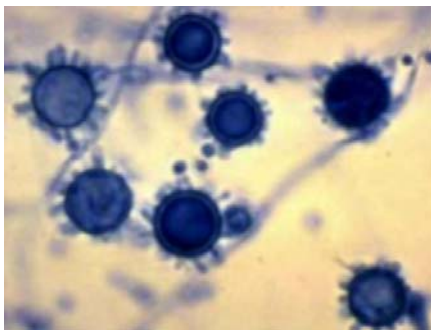
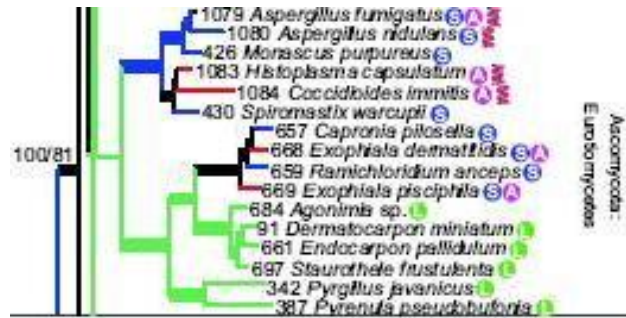
Histoplasma capsulatum, Darling 1906 es un hongo saprobio-geofílico y pertenece al phylum Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Onygenales, familia Ajellomycetaceae (Index Fungorum 2007). La especie *H. capsulatum* tiene un estado teleomorfo (sexual) representado por el género *Ajellomyces* el cual tiene una sola especie “*capsulatus*”. El estado anamorfo (asexual) comprende tres variedades taxonómicas (*H. c. var. capsulatum*, *H. c. var. duboisii* y *H. c. var. farciminosum*) que son identificadas por su micromorfología, distribución geográfica, asociación con el huésped y formas clínicas de la enfermedad. Las tres variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum* son dimórficas y agentes etiológicos de la histoplasmosis capsulati, histoplasmosis duboisii e histoplasmosis farciminosi, respectivamente. *H. capsulatum* es un patógeno intracelular preferencial del sistema fagocítico mononuclear de mamíferos. Este hongo crece favorablemente en los cúmulos de guano de murciélagos y aves. Es posible aislarlo en ambientes cavernícolas como cuevas y grutas donde habitan murciélagos y otros mamíferos cavernícolas. Se ha detectado el hongo en distintos tipos de guano de murciélagos: insectívoros, frugívoros, polínvoros, nectarívoros, hematófagos, etcétera, lo que indica que la dieta de los quirópteros no influye en las condiciones de crecimiento de este patógeno.

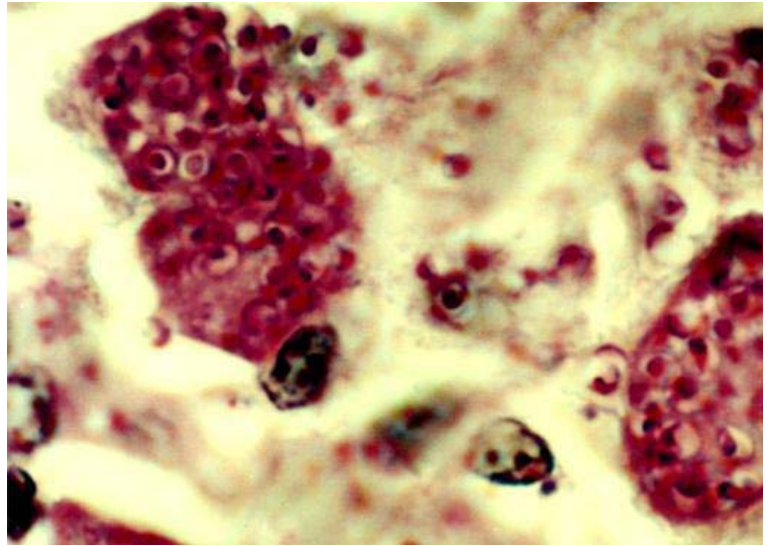


Photograph by José L. Gómez de Francisco
© 2005 National Geographic Society. All rights reserved.

Visions of Earth
National Geographic magazine, March 2005

En la actualidad, *H. capsulatum* es considerada una especie críptica y comprende un complejo de especies. Kasuga *et al.* (2003) realizó un estudio filogeográfico con 137 aislados de *H. capsulatum* procedentes de 25 países en el cual incluyó las tres variedades taxonómicas (la mayoría fueron aislados clínicos de la variedad *capsulatum*). 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*), estos autores han propuesto una clasificación filogenética de la especie *H. capsulatum* que incluye ocho clados (población genética): 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 los ocho clados siete representan especies filogenéticas, con excepción del clado Eurasiano. Taylor *et al.* (2005), utilizando los mismos marcadores en 14 aislados del hongo obtenidos de murciélagos naturalmente infectados, capturados en México y con distintos hábitos migratorios (*Artibeus hirsutus*- no migradores y *Leptonycteris nivalis*, *L. curasoae*, *Tadarida brasiliensis mexicana*- migradores), sugieren la existencia de una nueva población genética de *H. capsulatum*.





A partir de aportaciones sobre nuevos aislados del hongo de murciélagos cavernícolas obtenidas con los cuatro marcadores referidos en los estudios mencionados y de resultados recientes con el microsátelite $(GA)_n$ ubicado en el gen *HSP60* que codifica una proteína de choque térmico, se analizaron los cinco marcadores moleculares en una muestra de 22 aislados del hongo y los resultados resaltan la separación de un grupo de aislados obtenidos del murciélagu migratorio *T. brasiliensis mexicana*.

Material y métodos

Muestras

Se utilizaron 110 secuencias de 22 aislados de *H. capsulatum* de murciélagos infectados naturalmente y capturados al azar en ocho cuevas de seis distintos estados de México (MX): Guerrero (GR); Morelos (MS); Oaxaca (OC); Puebla (PL); Chiapas (CS); y Nuevo León (NL) (Tabla 1). Además, se analizaron 10 secuencias de dos aislados clínicos, EH-53 de Hidalgo (HG/ MX) y G-217B de Louisiana (LA), Estados Unidos (US) como grupo comparativo y externo, respectivamente. Las secuencias analizadas proceden del Banco de Secuencias de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>).



Tabla 1. Aislados de *H. capsulatum* estudiados

Procedentes de murciélagos naturalmente infectados

No. Aislado	Especie	Muestra	Origen*
EH-315	<i>Mormoops megalophylla</i>	Juxtlahuaca, Coapala, Olinalá	GR/MX
EH-372	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-373	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-374	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-375	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-376	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-377	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX
EH-378	<i>Artibeus hirsutus</i>	El Salitre, Santa Rosa, Tlaltizapán	MS/MX

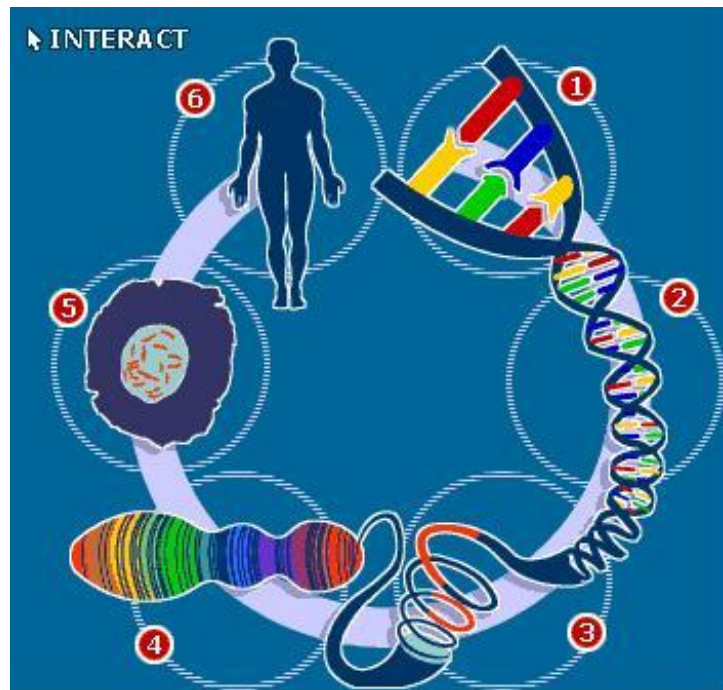
EH-383I	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Del Diablo, Santo Domingo Ocotitlán , Tepoztlán	MS/MX
EH-383P	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Del Diablo, Santo Domingo Ocotitlán , Tepoztlán	MS/MX
EH-384I	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Chica, Rio Seco	OC/MX
EH-384P	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Chica, Rio Seco	OC/MX
EH-391	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Del Diablo, Santo Domingo Ocotitlán , Tepoztlán	MS/MX
EH-393	<i>Leptonycteris curasoae</i>	La Claraboya, Cuicotlán	OC/MX
EH-394B	<i>Leptonycteris curasoae</i>	La Claraboya, Cuicotlán	OC/MX
EH-408H	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Zinacanostoc	PL/MX
EH-408P	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Zinacanostoc	PL/MX
EH-655P	<i>Tadarida brasiliensis</i>	De la Trinitaria, Trinitaria	CS/MX
EH-658H	<i>Tadarida brasiliensis</i>	De la Trinitaria, Trinitaria	CS/MX
EH-658P	<i>Tadarida brasiliensis</i>	De la Trinitaria, Trinitaria	CS/MX
EH-670B	<i>Tadarida brasiliensis</i>	De la Trinitaria, Trinitaria	CS/MX
EH-672B	<i>Tadarida brasiliensis</i>	La Boca, Santiaguito	NL/MX

Procedentes de casos clínicos humanos

EH-53	<i>Homo sapiens</i>	Caso clínico	HG/MX
G-217B	<i>Homo sapiens</i>	Caso clínico	LA/US

Análisis Filogenético

Las secuencias de cada marcador para los aislados de *H. capsulatum* fueron alineadas con Clustal W, dentro del programa "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (MEGA) ver 4.0 (Tamura *et al.* 2007). Los análisis filogenéticos de las secuencias se realizaron a partir de los fragmentos más pequeños aceptados por el programa, según el marcador molecular (arf: 466 nt; H-anti: 417 nt; ole1: 415 nt; tub1: 289 nt; (GA)_n: 232 nt). Las relaciones entre los aislados fúngicos se establecieron por la distancia genética generada a través del algoritmo "Neighbor-Joining" (NJ) utilizando el parámetro-2 de Kimura (Saitou & Nei 1987), y por el método de Máxima Parsimonia (MP) (Eck & Dayoff 1996). Se generaron los árboles con 1000 réplicas y se consideraron sólo los bootstrap (BT) $\geq 50\%$. Se utilizó como grupo externo para cada análisis, las secuencias de la cepa G-217B de US (GenBank-Número de acceso L11390). Éstos se realizaron de forma independiente para cada marcador y de forma concatenada para lo cinco marcadores (1819 nucleótidos/aislado).



Resultados y Discusión



El análisis independiente de cada marcador molecular permitió identificar que todos los aislados de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos de la especie *T. brasiliensis mexicana* forman un grupo homogéneo junto con un aislado de *M. megalophylla* (EH-315), al utilizar los marcadores arf, H-anti y el microsatélite (GA)_n respaldado por los valores de BT de 94 en NJ y 70 en MP, 50 en NJ y 65 en MP, 82 en NJ y 62 en MP, respectivamente. Los árboles generados de los marcadores ole1 y tub1 separan algunos aislados de *T. brasiliensis mexicana* agrupándolos con los de murciélagos residentes. De los marcadores independientes, el (GA)_n fue el que mejor definió este grupo (datos no mostrados). Indiscutiblemente, el análisis más robusto con 1819 nt/aislado de los cinco marcadores concatenados realizado tanto por NJ como MP definió dos grandes grupos de aislados de *H. capsulatum*, en relación con el grupo externo. El primero que agrupa todos los aislados de *T. brasiliensis mexicana* junto con el aislado de *M. megalophylla* y el segundo formado por todos los aislados de los

demás murciélagos no migradores (*A. hirsutus*) y los migradores (*L. curasoae* y *L. nivalis*), además del aislado clínico EH-53 de HG (Figura 1). Estos datos confirman que los aislados fúngicos obtenidos de *T. brasiliensis mexicana* presentan diferencias genéticas con respecto a los demás aislados de murciélagos.

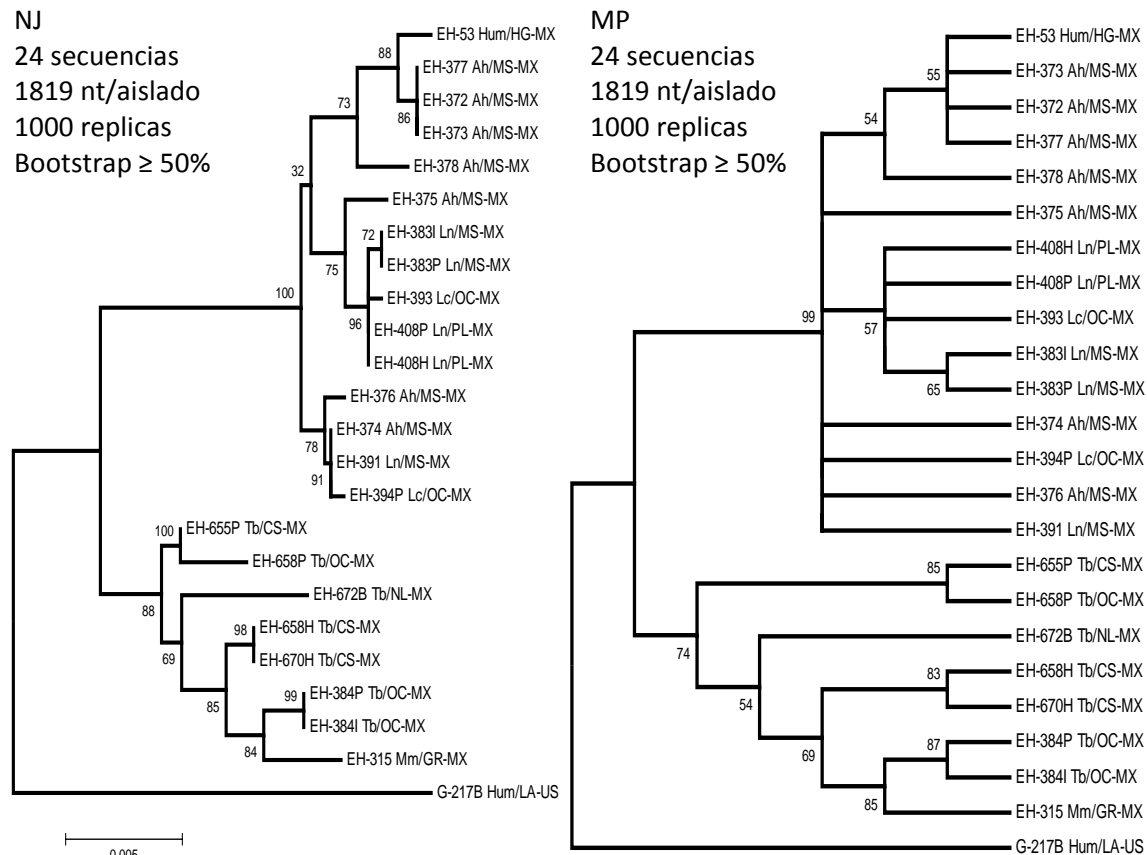
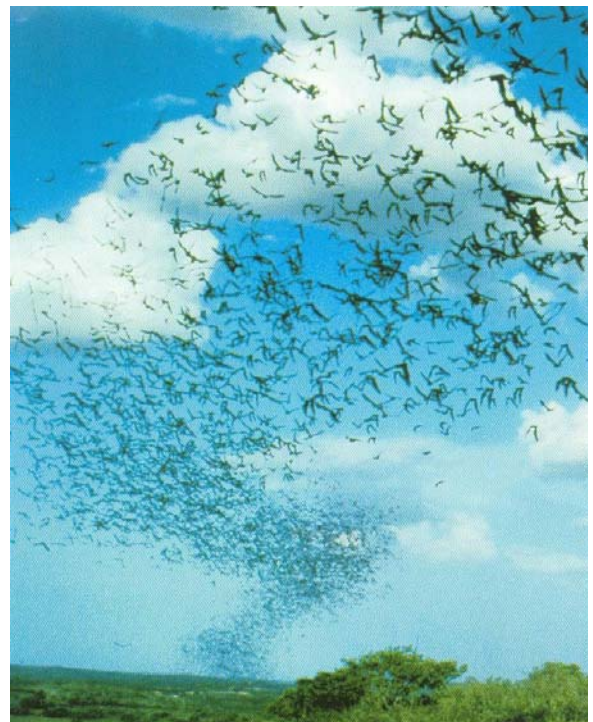
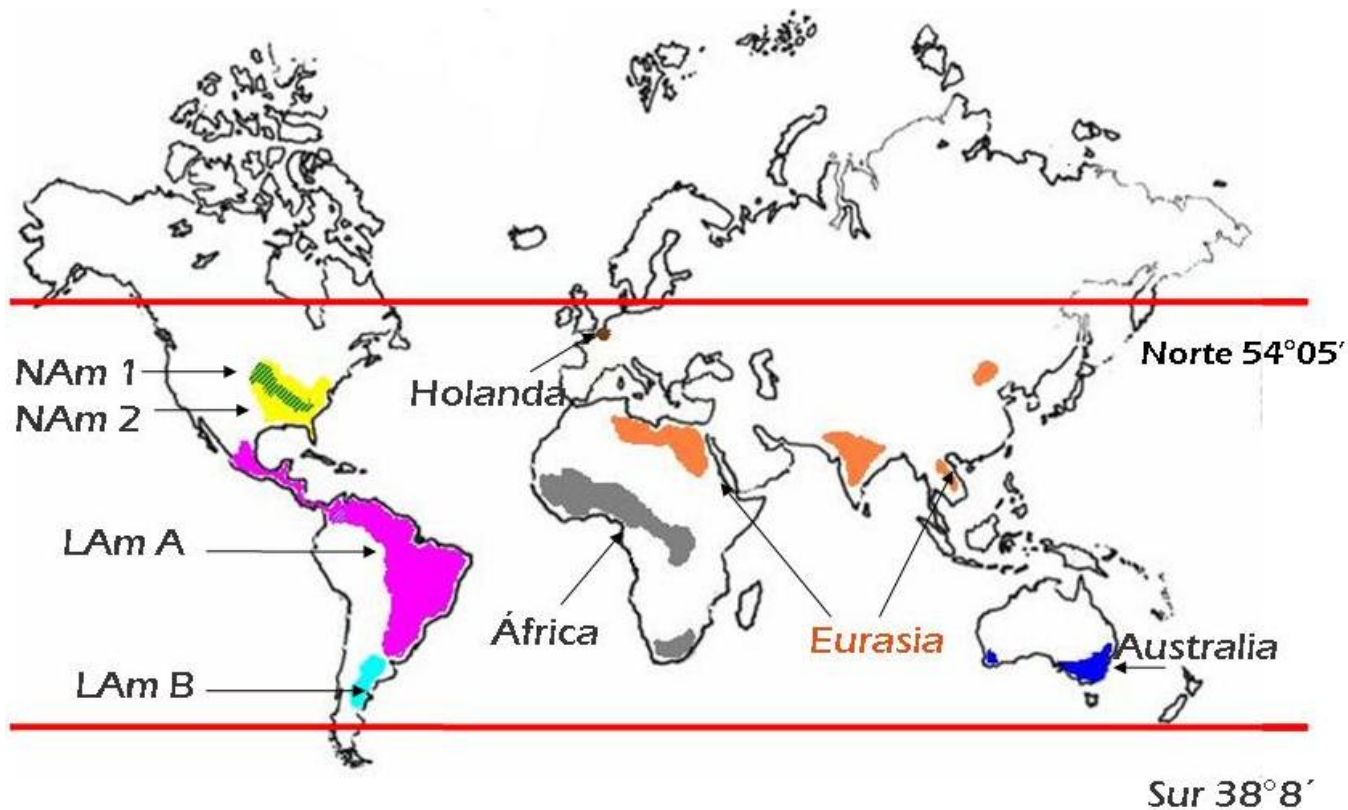


Figura 1: Árboles de Neighbor-Joining y de Máxima Parsimonia. Se utilizó el programa MEGA 4. Se analizaron las secuencias para los cinco marcadores arf, H-anti, ole1, tub1 y GA(n) en forma concatenada. El árbol fue arbitrariamente enraizado usando el aislado clínico G-217B de US, como grupo externo.

Conclusiones

En concordancia con lo descrito previamente por Taylor *et al.* (2005), en este nuevo análisis las secuencias derivadas de los aislados de *H. capsulatum* del murciélago migratorio *T. brasiliensis mexicana* volvieron a separarse de las demás y, como nuevo dato, se asociaron a un linaje independiente (EH-315) descrito por Kasuga *et al.* (2003). Este hallazgo sugiere que el grupo representado por los aislados del murciélago *T. brasiliensis mexicana* constituye un nuevo clado originario de Latinoamérica, lo que contribuye al conocimiento de la diversidad genética del hongo. Posiblemente, la especie *T. brasiliensis mexicana* ha compartido el nicho ecológico del hongo en un lapso importante del tiempo evolutivo, modulando los parámetros ambientales de su hábitat y favoreciendo cambios que permitieron una mejor adaptación y sobrevivencia del patógeno fúngico.





Referencias

Eck RV, Dayhoff MO. 1996. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Silver Springs: National Biomedical Research Foundation.

Index Fungorum 2007. <http://data.gbif.org/search/Histoplasma%20capsulatum>.

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.

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

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

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Zuñiga G. 2005. 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.