



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
Facultad de Medicina**

**Interacción entre el hongo patógeno de mamíferos
Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* y
artrópodos de su hábitat en cavernas: estudios
asociados a la biología de la interacción y la
diversidad genética del hongo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

C. a Dr. DANIEL ALFONSO ESTRADA BÁRCENAS

Tutor de Tesis: Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Comité Tutorial: Dra. Concepción Toriello Nájera

Dr. José Guadalupe Palacios Vargas

MÉXICO. D.F.

Agosto 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 17 de mayo de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ESTRADA BARCENAS DANIEL ALFONSO** con número de cuenta **95599993** con la tesis titulada: **"INTERACCIÓN ENTRE EL HONGO PATOGENO DE MAMÍFEROS HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. CAPSULATUM Y ARTRÓPODOS DE SU HÁBITAT EN CAVERNAS: ESTUDIOS ASOCIADOS A LA BIOLOGÍA DE LA INTERACCIÓN Y LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL HONGO"**.

Realizada bajo la dirección del **DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO:**

Presidente:	DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Vocal:	DR. JOSÉ GUADALUPE PALACIOS VARGAS
Vocal:	DRA. MARIA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal:	DRA. EDITH GUADALUPE ESTRADA VENEGAS
Secretario:	DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO
Suplente:	DRA. JUAN BIBIANO MORALES MALACARA
Suplente	DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 01 de julio de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a las siguientes instituciones: El Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme terminar satisfactoriamente en tiempo y forma el Doctorado en Ciencias; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número 9218, en el periodo 2007-2010.

El proyecto de tesis fue parcialmente financiado por DGAPA/PAPIIT/UNAM ref. IN-203407-3.

Mis agradecimientos al comité Tutorial: Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello (tutora), Dra. Concepción Toriello Nájera y Dr. José G. Palacios Vargas.

Extiendo mis agradecimientos al jurado para el examen de grado: Dr. Armando Pérez Torres, Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, Dra. Edith Guadalupe Estrada Venegas y el Dr. Juan Bibiano Morales Malacara.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Inicialmente quiere agradecer a mi nueva familia por la compañía y comprensión en el desarrollo final de esta tesis, mi amada esposa Claudia Ferrand y mi hijo Daniel Aldebarán.

Mi estima por el apoyo a lo largo de mi carrera de biólogo a mis padres Alfonso Estrada y Laura Bárcenas, a mis hermanos Damaris y David por los gratos momentos. Incluyendo a mi abuelita Concepción Orta por el amor desinteresado.

A la gente que compartió sus conocimientos en el Laboratorio de Inmunología de Hongos, incluyendo su apoyo como Gabriela Rodríguez, Antonio González, Tania Vitte, Raúl , Eugenia Flores, Jorge Sahaza, Roberto Suárez. Personas que además me brindaron su amistad como Antonio Ramírez, Lorena Hernández, Mónica Miranda, Mónica Monzón, Laura Carreto y otros del exprograma NUCE.

La gente del departamento de micología como la Dra. Rocío Reyes, la Dra Laura Castañón y personas como Esperanza, Amelia, Hortensia, Montserrat, Guadalupe, Blanca, Laura y Carolina.

A la Facultad de Ciencias, el laboratorio de microartrópodos y similares, como la Dra. Gabriela Castaño, el Dr. Zenón Cano, la Dra. Blanca Mejía, el Dr. Leopoldo Cutz, los maestros Rodolfo Salas, Saúl Aguilar, Ricardo Iglesias, Carmen Vargas, Arturo García, Jorge Moreno, Rafael Gaviño, Patricia Hernández, Laura Castillo, y alumnos como Miguel, Nidia Inclán, Fernando, Alejandra, Daniela, Eliud y Fernando.

A mis compañeros de generación Leonor Ceballos, Catalina Gómez, Iván Reyes, Héctor Merino, María Colín, Iván Castellanos Arellano Santos, y otras biólogas como , Adriana Espino, Christina Jiménez, Mariana y Miriam Reyna.

A toda la familia Bárcenas por su apoyo incluyendo mis primos, Ricardo y Pablo Vertti, todos mis tíos Ana, Bernabe, Magdalena y Pablo. Otros primos Omar, Iván, Pablo, Antonio, Asmara, Israel, Alma, Paola y el pequeño Eder.

A la familia Alcaráz por adoptarme a ser parte de ella, con principal mención a Isabel Alcaraz y su incasable hijo y amigo Paris Ferrand.

A mis amigos Izcallinos Julio Nieto, Alberto Pérez, Jorge Salas, Pablo Morales, Oscar, Rosario y Serafín Martínez, Juan Prado, Iván Arriaga, Aníbal Torres, Fernando Andrade, José Luis Huerta y Eduardo Jaime.

Finalmente a mi equipo de ultimate de la UNAM, con Cheko, Manu, Rafa, Majo, Olga, Raúl, Rodrigo, Fabián, Camila, Luis, David, Ulises, Judah, Bart, Esteban, Safa, José, Marco, Cinthia, Mario, Alex, GAP y todos los que jugaron con nosotros.

“

“En biología nada tiene sentido, si no es a la luz de la evolución”

Theodosius Dobzhansky

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
Planteamiento del problema	13
Hipótesis	14
Objetivo general	14
Objetivos particulares	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Sitios de muestreo	15
Colecta de guano	15
Obtención de microartrópodos	16
Ratones	17
Evidencia de <i>H. capsulatum</i> en guano	17
1) Por aislamiento en medios de cultivo	17
2) Por inoculación en ratones.	18
3) Por detección molecular	18
Diversidad genética de <i>H. capsulatum</i> asociada al marcador <i>Hcp100</i>	20
Cultivo de microartrópodos	21
Estudio de la interacción biológica entre hongos patógenos y microartrópodos presentes en guano	21
1) Por evidencia de actividad micofágica y forética de microartrópodos en contacto con colonias fúngicas	21
2) Por observación en microscopía electrónica	22
RESULTADOS	24
Parámetros ambientales de los sitios de muestreo	24
Colecta de guano de <i>T. brasiliensis</i>	24
Colecta y diversidad de microartrópodos	25
Evidencia de <i>H. capsulatum</i> en guano	30

1) Aislamiento en medios de cultivo	30
2) Inoculación en ratones	30
3) Detección molecular	33
Diversidad genética de <i>H. capsulatum</i> asociada al marcador <i>Hcp100</i>	36
Interacción biológica entre hongos patógenos y microartrópodos presentes en guano	39
1) Actividad micofágica y forética de microartrópodos en contacto con colonias fúngicas	39
2) Por observación en microcopia electrónica	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Taxa de microartrópodos detectadas en el guano de las cuevas estudiadas	26
Tabla 2. Datos de forosis entre <i>S. ca. sphaerogaster</i> y las especies fúngicas estudiadas	44
Figura 1. Biodiversidad de los microartrópodos detectados en el guano de la cueva de “La Boca”	29
Figura 2. Biodiversidad de los microartrópodos detectados en el guano de la cueva del “Salitre”	29
Figura 3. Amplificación del fragmento del gen <i>Hcp100</i> del DNA de un aislado fúngico obtenido del guano de la cueva de “La Boca”	31
Figura 4. ELISA de los sueros de ratones inoculados con guano de la primera colecta de la cueva de “La Boca”	32
Figura 5. DNA obtenido de cada muestra de guano de la cueva de “La Boca”	34
Figura 6. Amplificación del fragmento del gen <i>Hcp100</i> de los DNA de muestras de guano de la primera colecta de la cueva de “La Boca”	34
Figura 7. Amplificación del fragmento del gen <i>Hcp100</i> de los DNA de muestras de guano de la segunda colecta de la cueva de “La Boca”	35
Figura 8. Alineación de secuencias del fragmento génico <i>Hcp100</i> , obtenidas de distintas fuentes en la cueva de “La Boca”	37
Figura 9. Árbol consenso de NJ de los fragmentos génicos de <i>Hcp100</i> estudiados	38
Figura 10. Estadios ontogénicos de ácaros desarrollados en cajas de cultivos con hongos	41
Figura 11. Cambios macromorfológicos en colonias de <i>H. capsulatum</i> infestadas con <i>S. ca. Sphaerogaster</i>	42
Figura 12. Abundancia de <i>S. ca. sphaerogaster</i> en los diferentes cultivos de hongos	42
Figura 13. Macromorfología de <i>H. capsulatum</i> en cultivo sembrado con ácaros alimentados con el hongo	44
Figura 14. Observación microscópica de la actividad micofágica de <i>S. ca. sphaerogaster</i> para <i>H. capsulatum</i>	45
Figura 15. Micrografías electrónicas de un corte de intestino de <i>Sancassania ca. sphaerogater</i> alimentado con <i>H. capsulatum</i>	45

RESUMEN

Los ácaros y el hongo patógeno de mamíferos *Histoplasma capsulatum* son los principales componentes de la microbiota del guano de murciélago. La presencia del hongo en el guano del murciélago de cola libre mexicano *Tadarida brasiliensis* fue evaluada por tres diferentes métodos: aislamiento fúngico en medios de cultivo; inoculación de guano en ratones susceptibles seguido de una ELISA para detectar la infección; y el uso de una PCR-anidada para un fragmento de 210 bp del gen *Hcp100*, marcador molecular único de *H. capsulatum*. Las interacciones entre ácaros e *H. capsulatum* fueron evaluadas bajo condiciones de laboratorio. Las muestras de guano fueron colectadas en tres diferentes refugios: las cuevas de “La Boca” y del “Salitre” en México y el dique Escaba en Argentina. Una alta diversidad de microartrópodos fue encontrada en la cueva de “La Boca” con 1,387 ejemplares agrupados en 21 taxa, con un índice de diversidad $H' = 1.54$ y una diversidad máxima $H_{max} = 3.04$. En contraste, en la cueva del “Salitre” 109 microartrópodos se agruparon en 10 taxa y se registró un $H' = 1.53$ para una $H_{max} = 2.40$. *Sancassania* sp. fue el microartrópodo más abundante en las muestras de guano y, con base en su morfología, fue similar a la especie cosmopolita *Sancassania sphaerogaster*. Aunque el aislamiento fúngico constituye el estándar de oro, fue el método menos efectivo para revelar *H. capsulatum* en las muestras de guano, mientras que las inoculaciones en ratones y el uso del marcador *Hcp100* resultaron más eficientes. El hongo fue detectado sólo en las muestras de la cueva de “La Boca”, tanto por ELISA con suero de ratones inoculados con tres muestras de guano como por ensayos moleculares que amplificaron el marcador *Hcp100* en cuatro de los cinco sitios muestreados, tres de los cuales ya habían resultado positivos por ELISA. Se obtuvo un aislamiento fúngico que fue confirmado como *H. capsulatum* por la amplificación del marcador *Hcp100*, a partir del DNA extraído de su fase micelial. Estos datos apoyan la utilidad del marcador *Hcp100* para rastrear la presencia de *H. capsulatum* en distintas muestras tanto de huéspedes infectados como de la naturaleza. El análisis de neighbour-joining de las secuencias correspondientes a la banda de 210 bp generadas por la reacción anidada, reveló una alta similitud en sus haplotipos, destacando una importante homología genética en todas las secuencias de *H. capsulatum* evidenciadas en el guano de la cueva de “La Boca”. Esta identidad genética fue también compartida con

seis secuencias del marcador *Hcp100* obtenidas de *T. brasiliensis* capturados en el mismo refugio, de las cuales cinco procedieron del DNA obtenido de pulmones de estos murciélagos naturalmente infectados y la otra de un aislamiento de *H. capsulatum* recuperado del pulmón de un murciélago de la misma colonia. Sin embargo, el alineamiento de estas secuencias reveló una mutación puntual común, con base en la secuencia de la cepa de referencia G-217B de Estados Unidos. Aunque el marcador *Hcp100* es poco polimórfico y no recomendable para análisis filogenético, el patrón mutacional asociado a todas las secuencias de la cueva de “La Boca” podría ser utilizado para rastrear la distribución de *H. capsulatum* en otras localidades que han sido incluidas en la ruta migratoria de *T. brasiliensis*. La actividad micófaga y forética de *S. ca. sphaerogaster* fue probada para *H. capsulatum* y otras dos especies fúngicas: *Sporothrix schenckii* (patógena) y *Aspergillus sclerotiorum* (no patógena). *S. ca. sphaerogaster* fue capaz de reproducirse en cultivos de fase micelial de *H. capsulatum* y *S. schenckii*, generando un gran número de individuos bajo condiciones controladas de laboratorio. Las colonias de *H. capsulatum* fueron completamente destruidas a los 14 días después de la interacción con los ácaros. En contraste, *S. ca. sphaerogaster* no se reprodujo en cultivos de *A. sclerotiorum*. La microscopía electrónica de transmisión confirmó que *S. ca. sphaerogaster* se alimenta de estructuras morfológicas de *H. capsulatum*. Asimismo, *S. ca. sphaerogaster* fue capaz de transportar a *H. capsulatum* probablemente en su cutícula y a *S. schenckii* en el contenido de su tracto digestivo. Este estudio es el primer reporte en el mundo sobre las interacciones entre *S. ca. sphaerogaster* e *H. capsulatum*, considerando que ambos organismos son miembros de una misma cadena trófica, ya que comparten un nicho ecológico especial, como es el guano de *T. brasiliensis*.

ABSTRACT

Mites and the mammal pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* are the major components of bat guano microbiota. The fungal presence in the guano of the free-tailed Mexican bat *Tadarida brasiliensis* was evaluated by three different methods: fungal isolation in culture media, guano inoculation in susceptible mice followed by ELISA to detect the infection, and the use of nested-PCR for a molecular marker unique of *H. capsulatum*, a 210 bp fragment of the *Hcp100* gene. Interactions between mites and *H. capsulatum* were evaluated under laboratory conditions. The guano samples were collected in three different places: “La Boca” and “Salitre” caves in Mexico and the Escaba dike in Argentina. A high microarthropods diversity was found in “La Boca” cave with 1,387 specimens clumped in 21 taxa, with a diversity index of $H' = 1.54$ and a maximum diversity $H_{max} = 3.04$. In contrast, in the “Salitre” cave, 109 microarthropods were clumped in 10 taxa with a $H' = 1.53$ and a $H_{max} = 2.40$ was registered. *Sancassania* sp. was the most abundant microarthropod in the sampled guano and, based on its morphology, it was similar to the cosmopolitan species *Sancassania sphaerogaster*. Although considered as the gold standard, fungal isolation was the less effective method to reveal *H. capsulatum* in guano samples, whereas mice inoculation and the use of the *Hcp100* marker resulted more efficient. The fungus was detected only in the “La Boca” cave samples, either by ELISA with serum of inoculated mice from three guano samples or by molecular assays that amplified the *Hcp100* marker in four out of five sampled sites, where three of them had previously positive reaction for ELISA. A fungal culture was isolated and confirmed as *H. capsulatum* by the amplification of the *Hcp100* marker, using DNA extracted from its mycelium-phase. These data support the usefulness of the *Hcp100* marker to monitor the presence of *H. capsulatum* in distinct samples either from infected hosts or environmental samples. Neighbour-joining analysis of the sequences from each 210 bp band generated by the nested reaction, revealed a high haplotype similarity, emphasizing an important genetic homology in all sequences of *H. capsulatum* evidenced in the guano of the “La Boca” cave. This genetic identity was also shared by six sequences of the *Hcp100* marker from *T. brasiliensis* captured in the same place, where five came from lung DNA of naturally

infected bats and the other from an isolate of *H. capsulatum* of the lung from a bat captured in the same colony. However, the alignment of these sequences revealed a common point mutation in relation to the sequence of the G-217B reference strain from United States. Although the *Hcp100* marker presents a low polymorphism and considering that it is not recommendable for phylogenetic analysis, the mutational pattern associated with all sequences from “La Boca” cave could be used to monitor *H. capsulatum* distribution in other places that have been included in the migratory route of *T. brasiliensis*. The mycophagous and vectoring activities of *S. ca. sphaerogaster* were tested for *H. capsulatum* and two other fungal species: *Sporothrix schenckii* (pathogenic) and *Aspergillus sclerotiorum* (non-pathogenic). *S. ca. sphaerogaster* was able to reproduce in *H. capsulatum* and *S. schenckii* fungal mycelial-phase cultures, producing a great number of individuals under laboratory controlled conditions. *H. capsulatum* colonies were completely destroyed after 14 days of *in vitro* interaction with mites. In contrast, *S. ca. sphaerogaster* did not reproduce in *A. sclerotiorum* cultures. Transmission electronic microscopic confirmed that *S. ca. sphaerogaster* feeds on *H. capsulatum* morphological structures. In addition, *S. ca. sphaerogaster* was found vectoring *H. capsulatum* on the cuticle and *S. schenckii* on the contents of the digestive tract. This study is the first report in the world about *S. ca. sphaerogaster* and *H. capsulatum* interactions, taking into account that both organisms are members of the same trophic chain, since they share a special ecological niche, such as the *T. brasiliensis* guano.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes cavernícolas representan un campo de investigación muy interesante para el área de la Biología debido a las interacciones que surgen entre la flora y fauna de este medio tan particular. Los parámetros físicos como temperatura, humedad relativa e intensidad de luz (poca luminosidad) son constantes que permiten el establecimiento de organismos que han sufrido modificaciones y transformaciones estructurales y fisiológicas a través del tiempo evolutivo (Reddell, 1981).

Estas características se pueden acentuar en individuos de talla pequeña, ya que su nicho ecológico es reducido debido a su poco desplazamiento, por lo que las interacciones entre sus poblaciones son más estrechas y peculiares (presiones ambientales muy dirigidas). Un nicho particular es el guano de los murciélagos debido a las condiciones físicas y nutricionales que permiten el establecimiento de ciertos organismos (Del Castillo, 1996), como los presentes en la microbiota representada por una diversidad de bacterias, hongos y microartrópodos.

Entre los hongos que se han reportados en este ambiente se encuentran distintas especies de micromicetos y destacan los patógenos de humano de los géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Histoplasma* (Lappe *et al.*, 1998; Ulloa *et al.*, 2006). Existen además de estos hongos, otros que son parásitos de artrópodos como los del Orden Laboulbeniales que atacan principalmente a insectos, diplópodos y ácaros (Balazuc, 1998).

Entre las especies fúngicas que habitan ecosistemas de cavernas, destaca *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, el agente etiológico de la enfermedad conocida como histoplasmosis. Varias especies de mamíferos, incluido humano, pueden sufrir infecciones leves o una enfermedad grave que puede llevar a la muerte. Estos individuos están expuestos al agente, en distintas fuentes de infección en la naturaleza, como por ejemplo el guano acumulado de murciélagos y aves (Vargas-Yañez *et al.*, 1998). *Histoplasma capsulatum* es capaz de desarrollarse en diferentes condiciones ambientales, incluyendo varios tipos de suelos con una microbiota abundante.

La histoplasmosis es una de las micosis sistémicas más importantes en América. *Histoplasma capsulatum* es un hongo dimorfo de amplia distribución mundial que existe en una forma filamentosa multicelular saprobio-geofílica (fase micelial infectiva). Esta se

desarrolla entre los 25 y 28 °C, formando colonias albinas o de color pardo, con crecimiento lento en medio de cultivos artificiales. La micromorfología de estas colonias revela la presencia de hifas septadas entre 1.2 y 1.5 µm de diámetro, con dos tipos de conidios solitarios redondos, piriformes o clavados que son sésiles o unidos a pequeños conidióforos, microconidios (1-4 x 2-6 µm diam.) y macroconidios (8-14 µm diam.), estos últimos con o sin proyecciones digitiformes. La forma parasitaria (fase levaduriforme virulenta) es intracelular facultativa en huéspedes mamíferos susceptibles o se desarrolla en condiciones artificiales de cultivo a 37 °C formando colonias opacas y húmedas de aspecto cremoso con color variable del beige a pardo oscuro, adherentes o no al medio y superficie rugosa o lisa. La micromorfología de estas colonias revela levaduras ovaladas por lo general de 1.3-2 x 2- 4 µm de diámetro (Rodríguez-Arellanes *et al.*, 1998; Tewari *et al.*, 1998). El hongo es un ascomiceto de la familia Ajellomycetaceae (Index Fungorum, 2010) y posee un estado sexual o teleomorfo representado por la especie heterotálica *Ajellomyces capsulatus*, con grupos de complementación sexual (+) o (a) y (-) o (b) (Kwon-Chung, 1972a; 1972b; McGinnis y Katz, 1979), además de un estado anamorfo o asexual que está constituido por la especie haploide *H. capsulatum*. *Histoplasma* y *Ajellomyces* son el mismo hongo holomorfo, terminología asignada a los hongos con esporulación teleomorfa (sexual) junto con todos sus estados anamorfos (asexual).

Aunque *H. capsulatum* ha sido uno de los patógenos más estudiado por diferentes métodos, su diversidad genética no ha conducido a una tipificación consistente y la necesidad de conocer los cambios y las relaciones fenotípicas y genotípicas de sus aislamientos sigue vigente. La existencia de diversidad intraespecífica fue demostrada con anterioridad en este hongo. Sin embargo, aún se ignora si determinados fenotipos y/o genotipos están asociados a cepas más virulentas para el humano que frecuentan su nicho ecológico (Taylor *et al.*, 1997; 2000a; 2000b; Reyes-Montes *et al.*, 2000; Romero-Martínez *et al.*, 2004).

Kasuga *et al.* (1999) ha propuesto agrupar a *H. capsulatum* con base en su relación filogenética, incluyendo representantes de las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farcinosum*, procedentes de diferentes áreas geográficas en el mundo. Esta relación fue obtenida mediante el análisis de las secuencias parciales del DNA de cuatro genes (*arf*, *H-anti*, *ole1* y *tub1*) que codifican para las proteínas, factor de ribosilación del ADP, precursor de un antígeno del hongo denominado H, desaturasa Δ-9 de ácido graso y alfa tubulina,

respectivamente. Este trabajo agrupó seis poblaciones genéticas (clados) distintas. Con la colaboración de varios grupos de investigación en el mundo que estudian *H. capsulatum*, incluyendo los de Latinoamérica, [Kasuga et al. \(2003\)](#), actualizaron la clasificación filogeográfica del hongo al estudiar 137 aislamientos de 25 países, la cual está formada por ocho clados bien definidos a la fecha: Norteamericano 1 (Nam 1), Norteamericano 2 (Nam 2), Latinoamericano A (Lam A) que incluye los aislamientos de México, Latinoamericano B (Lam B) que incluye principalmente una población clonal de Argentina, Australiano, Holandés-Indonesio, Africano y Eurasiano. En estos clados están consideradas siete especies filogenéticas, con la excepción del clado Eurasiano. Los estudios de [Kasuga et al. \(1999; 2003\)](#) incluyen las tres variedades taxonómicas del hongo y además sugieren que la radiación de *H. capsulatum* fue rápida entre 3.2-13 millones de años y asociada a su diversidad genética que ha sido propuesta haber empezado en el clado Lam A, durante el Plioceno y el Mioceno.

La gran diversidad genotípica, además de la fenotípica, apoya el concepto de que *H. capsulatum* es una especie críptica o un “complejo de especies” y cada especie podría ser un clado que puede agrupar aislamientos con diferencias biológicas.

La distribución geográfica de *H. capsulatum* fue recientemente reconsiderada entre los paralelos 54° 05' Norte ([Anderson et al., 2006](#)) y 38° 55' Sur ([Canteros et al., 2005](#)). La dispersión de *H. capsulatum* está posiblemente más asociada a mamíferos pequeños que a la infección de humanos. Otros mecanismos como el desplazamiento de propágulos fúngicos por vientos y foresis por animales de menor porte (artrópodos entre otros) también han sido considerados. Las barreras geográficas aunque pueden limitar esta dispersión, no la impiden totalmente, debido a la existencia de animales como los murciélagos y aves migratorias que son capaces de sobrepasarlas al migrar cortas y largas distancias.

Para entender la dispersión de este patógeno en la naturaleza se han realizado estudios moleculares utilizando, en particular, aislamientos de animales silvestres ([Chávez-Tapia et al., 1998](#); [Taylor et al., 2000a; 2000b; 2005a; 2009](#)). Los aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos infectados revelan distintas poblaciones geográficas u otras posibles especies filogenéticas, cercana al clado de Lam A ([Taylor et al., 2009](#); [D. A. Estrada-Bárceñas, L. Hernández-García, R. Salas-Lizana, M. L. Taylor, com. pers.](#)).

En el guano de murciélagos de refugios cavernícolas vive una fauna característica, integrada por un número indefinido de especies, representadas en cantidades considerables. Estos guanobios pueden ser o no verdaderos cavernícolas ya que su biotopo real es el guano. Por otro lado, las poblaciones guanófilas comprenden formas que se alimentan de guano y otras que depredan a los microartrópodos presentes en éste (Decu, 1986). Entre las especies de artrópodos más abundantes que cohabitan este biotopo se encuentran los ácaros y los colémbolos, ya que utilizan este recurso como alimento.

Los microartrópodos de estos sistemas están asociados a la materia orgánica transportada por organismos como los murciélagos y los insectos o por corrientes de agua y aire. La fuente alimenticia principal depositada en el piso es el guano, sobre el que crecen hongos que sirven de alimento a numerosos artrópodos, los que a su vez son presas de depredadores de mayor tamaño. Esto nos sugiere la existencia de una compleja red trófica modulada por las características del ambiente cavernícola y la aportación de animales que traen el sustento exterior (Estrada-Bárceñas, 2005).

Los organismos cavernícolas pueden interactuar de distintas maneras y con distintos grados de influencia, dependiendo del contacto entre ellas. Las categorías de las interacciones, generalmente, han sido distinguidas con base en los signos de los efectos directos entre las especies que interactúan y la complejidad de los efectos individuales de cada una de ellas.

Para establecer el origen y las consecuencias de las interacciones, hay que entender que éstas tienen múltiples efectos sobre las especies involucradas, dependiendo de la abundancia, de las condiciones de diferentes patrones biológicos (fisiológico, reproductivo, etc.), de requerimientos nutricionales y otros más (Schowalter, 2006).

Los tipos de interacciones entre especies de acuerdo con Schowalter (2006) son:

1) Competencia: Es el esfuerzo (lucha) por el uso compartido de recursos limitados. Los recursos pueden ser limitados por varias razones (ej: el agua) y varios recursos nutricionales pueden ser poco disponibles, en ciertos hábitat, donde sólo sustentan poblaciones pequeñas y/o pocas especies.

La lucha por los recursos limitados ha sido el fundamento principal de la teoría evolucionista, debido a la competencia inter-específica que puede ser operada a distintos grados de intensidad, además de considerar la partición del nicho ecológico.

En condiciones de competencia, una de las especies sufre reducción en fecundidad, crecimiento y/o sobrevivencia como resultado de la interferencia de individuos de la otra especie interactuante (Begon *et al.*, 2006). Por lo tanto, la estabilidad de un ecosistema podría depender del número de interacciones competitivas que se establecen en él.

2) Depredación: Esta ha sido definida de distintas maneras. En general, es el proceso de alimentarse de organismos (presas) o más específicamente, de matar y alimentarse de la presa. La depredación puede ser considerada como la captura relativa y oportunista de múltiples presas, durante el periodo de vida del depredador.

La depredación ha sido considerada ampliamente como un mecanismo para el control de la densidad de la población de presas. Esto mantiene el vigor de la población y robustece la estructura genética de las presas por la selección de individuos más aptos (depredación selectiva), eliminándose los viejos, enfermos y/o heridos. La importancia de muchos artrópodos como depredadores de insectos ha sido demostrada en programas de control biológico y en estudios experimentales.

La co-evolución entre depredador-presa ha producido diversas variedades de estrategias defensivas de la presa contra las estrategias de forrajeo del depredador; asimismo, la co-evolución entre especies depredadoras ha favorecido la partición de nichos ecológicos para alcanzar mayor eficiencia de los recursos disponibles.

Los depredadores pueden ser oportunistas con respecto al tipo de presa, en contraste con los parásitos que frecuentemente seleccionan sus presas (huéspedes) y consumen los componentes de un huésped viviente. Ambas interacciones, depredación y parasitismo, tienen efectos positivos para el depredador o parásito pero negativos para la presa o huésped.

3) Simbiosis: Involucra la asociación íntima entre dos especies no relacionadas y puede ser de tipo ecto- o endosimbiótica. Tres tipos de interrelaciones son consideradas como simbióticas: El parasitismo (que algunos autores la incluyen en la depredación) comprende la interacción en la que un simbiote obtiene un beneficio a expensas del huésped, semejante a un depredador; el comensalismo que ocurre cuando un simbiote obtiene beneficio sin que afecte significativamente al organismo con que interactúa; el mutualismo que implica beneficio mutuo entre ambos participantes involucrados en la interacción.

Los ácaros, principalmente de los órdenes Astigmata y Prostigmata, han sido reportados como plagas para cultivos de hongos micromicetes como *Rizoglyphus* (syn: *Tyroglyphus*) y *Tarsonemus* sp. (Smith y Onions, 1994). Algunas especies de la familia Acaridae se han especializado en comer hongos micromicetes (Noble y Poe, 1973; Okabe, 1993; 1999; Okabe y OConnor, 2001; Price, 1976; Rivard, 1961), aunque también se ha encontrado que pueden causar graves problemas económicos en cultivos de hongos comestibles de importancia comercial, como *Flamulina velutipes*, *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* (Kheradmand *et al.*, 2007; Klimov y OConnor, 2003; Okabe y OConnor, 2001). Otros ácaros son importantes como vectores de esporas de hongos, tales como *Hypocrea nigricans* y *Sarocladium oryzae* (Cabrera *et al.*, 2005; Okabe, 1999). Este tipo de comportamiento está asociado a las interacciones mencionadas anteriormente.

Los ácaros y los hongos constituyen eslabones esenciales en las cadenas de alimentación de muchas comunidades de los ecosistemas. Los ácaros son tanto consumidores (micófagos) como distribuidores importantes de muchas especies de hongos (foresis), un aspecto relevante aunque especulativo, en el caso de *H. capsulatum* (Hoffmann, 1998).

Planteamiento del problema

Se ha propuesto el papel dispersor y de reservorio que tienen algunos murciélagos para *H. capsulatum*, principalmente asociado a su infección. Adicionalmente, se ha demostrado una importante diversidad genética del hongo aislado de murciélagos naturalmente infectados y capturados al azar en Latinoamérica (Taylor *et al.*, 2000a; 2005a; 2009), pero no se ha establecido si este patógeno tiene una relación con otros organismos, en especial con los que cohabita en el guano, como algunos artrópodos que pueden tener un tipo de interacción biológica con el hongo, destacando la micofagia y la foresis.

El presente trabajo plantea conocer las relaciones ecológicas prevalentes entre el hongo patógeno de mamíferos *H. capsulatum* y ácaros de guano de murciélagos, en un nicho particular (cuevas) en México.

Hipótesis

El hongo patógeno *H. capsulatum* presenta una interacción con los microartrópodos asociados a su hábitat. Esta interacción puede ser monitoreada a través de marcadores moleculares del hongo y por ensayos biológicos *in vitro*.

Objetivo general

Conocer las interacciones biológicas entre *H. capsulatum* y algunos artrópodos de su hábitat e identificar una posible relación genética del hongo asociado al guano.

Objetivos particulares

Reconocer los taxa de artrópodos más abundantes que cohabitan con *H. capsulatum* en el guano.

Establecer las posibles especies fungívoras que pueden tener como recurso alimenticio a *H. capsulatum* en el guano (artrópodos micófagos).

Determinar si existe un posible mecanismo forético, de algunos ácaros u otros artrópodos, que puedan transportar al hongo sin destruirlo.

Determinar si el marcador genético utilizado para monitorear el hongo se asocia a la evidencia del patógeno en el ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Se establecieron sitios de muestreos en dos refugios de murciélagos en México: uno al norte, la cueva de “La Boca” en el municipio de Santiago, Nuevo León (la primera colecta en agosto de 2006 y la segunda en mayo de 2007); otro en el centro de la república, la cueva del “Salitre” en Meztitlán, Hidalgo (la primera colecta en noviembre de 2006 y la segunda en agosto de 2007). Adicionalmente, se obtuvieron muestras de guano de un refugio localizado en Tucumán, Argentina, conocido como dique Escaba, las cuales fueron utilizadas como testigo geográfico de otra latitud (colecta en abril de 2007). Las muestras procedieron de un sólo tipo de guano, del murciélago de cola libre también llamado guanero, *Tadarida brasiliensis*. Se registraron los parámetros físicos de cada microhábitat.

Colecta de guano

De los dos refugios de *T. brasiliensis* seleccionados en México, se realizaron cinco muestreos, por cada viaje de campo, en diferentes sitios de la cueva, logrando un total de 20 muestras (10 por refugio). Los sitios seleccionados fueron considerados de acuerdo con la abundancia de guano y registrando las distintas distancias desde la entrada de cueva. Estos sitios fueron señalizados para posterior colecta.

Como testigo, se utilizaron cuatro muestras de guano de *T. brasiliensis* (dos por cada sitio) obtenidas del dique Escaba, Argentina, que fueron empleadas para cotejar la presencia de *H. capsulatum* en la micobiota de áreas geográficas distantes.

Las muestras fueron colectadas hasta 20 cm de profundidad, en frascos estériles de 11 cm³ con tapa hermética (Taylor *et al.*, 1994), y fueron transportadas en refrigeración al laboratorio para su procesamiento. Todos los procedimientos de manejo de guano, se realizaron en áreas especiales para manejo de patógenos nivel 3.

Cada muestra de guano fue dividida en tres partes. La primera se utilizó para evidenciar la presencia de *H. capsulatum* por aislamiento, inmunodetección y biología molecular, por lo

que se preservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de glicerol al 10% para garantizar reaislamientos y/o procesamientos posteriores. La segunda se empleó para la obtención y posterior identificación de microartrópodos de guano. La última parte sirvió para mantener vivos a los microartrópodos, según la demanda de los ensayos.

Obtención de microartrópodos

Las muestras de guano (200 g aprox.) para la obtención de microartrópodos, se procesaron según el método de Berlese-Tullgren que consiste en la utilización de un embudo de metal con un tamiz, una fuente de luz y calor en la parte superior del embudo, además de un recipiente colector en la parte inferior adaptado para recoger los microartrópodos. La distancia entre la fuente de luz y la muestra colocada en el embudo debe ser de 15 cm. Aprovechando los tactismos de los microartrópodos (termodinámico, hidrofílico y fototrópico) que caen en el recipiente colector al tratar de escapar a los cambios adversos que se generan en la muestra. Se prepararon dos tipos de recipientes colectores: uno se utilizó con alcohol 75% para preservar los ejemplares que posteriormente fueron montados en líquido de Hoyer; el otro para mantener los microartrópodos vivos en una mezcla de yeso y carbón activado. Los organismos vivos fueron transferidos con ayuda de un microscopio estereoscópico Olympus SD30 (Olympus American Inc., FL) a cajas de Petri con la misma mezcla adicionada de levadura comercial. Finalmente, las cajas fueron incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el cultivo de los microartrópodos en los tiempos y condiciones de ensayos necesarios ([Palacios-Vargas y Mejía-Recamier, 2007](#)).

Los géneros y estadios ontogénicos de los microartrópodos (adultos, ninfas y larvas) fueron determinados en el laboratorio, por quetotaxia y otros caracteres morfológicos. La identificación de especies de la familia Acaridae fue realizada por el Dr. Pavel Klimov (Museo de Zoología, Universidad de Michigan, MI, Estados Unidos).

Se obtuvieron los índices de diversidad morfológica para establecer las especies más abundantes por refugio, donde persistieron organismos vivos. Estos índices son la forma más sencilla de medir la biodiversidad de microartrópodos, además proporcionan una medida aproximada del número de especies, cuando cada especie es ponderada por su abundancia relativa ([Moreno, 2001](#)).

Ratones

Para los ensayos de evidencia de *H. capsulatum* por detección inmunológica, histopatológica y por aislamiento fúngico, se utilizaron ratones singénicos machos BALB/c de cuatro semanas de edad, los cuales fueron manejados de acuerdo con las recomendaciones de la Guía Oficial (NOM 062-ZOO-1999) de Cuidado, Uso y Manejo de Animales de la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM.

Evidencia de *H. capsulatum* en guano

1) Por aislamiento en medios de cultivo

A partir de las muestras separadas para evidenciar el hongo en guano se preparó, individualmente, una suspensión concentrada (1 g de la muestra en 10 ml de PBS 0.1 M, pH 7.2, suplementado con gentamicina 100 µg/ml). Después de mezclar esta suspensión, se dejó sedimentar 15 min y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron diluciones seriadas (1:100, 1:1000 y 1:10000) de cada sobrenadante y se sembraron 100 µl de cada dilución en cajas con medio especial para hongos patógenos de crecimiento lento (agar-micobiótico y/o suplementado con rosa de Bengala al 0.02% y guano estéril al 1%). Se incubaron las cajas a 26 °C, hasta la aparición de colonias sospechosas.

Las colonias sospechosas se clonaron por medio de diluciones seriadas y estrías cruzadas. En seguida, se identificaron por criterios morfológicos (macro y microscópicos) y por producción de exoantígenos. A partir de la colonia aislada e identificada se realizó un cultivo madre del cual se efectuaron posteriores diluciones seriadas, para lograr el reaislamiento fúngico y separar inóculos para la preservación del aislado en diferentes medios (agua destilada y agar-micobiótico adicionado de aceite mineral). Asimismo, para confirmar el aislamiento fúngico se realizó una PCR-anidada con el marcador específico para *H. capsulatum*, el fragmento del gen *Hcp100*, según lo descrito por [Bialek et al. \(2002\)](#) y siguiendo las modificaciones de [Taylor et al. \(2005b\)](#) para la obtención de DNA del aislado y desarrollo de la PCR. Los detalles del procedimiento molecular (PCR-anidada) vienen descritos más adelante.

2) Por inoculación en ratones

Grupos de tres ratones BALB/c fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de cada suspensión concentrada y/o 0.5 ml de la dilución 1:100 de cada muestra de guano obtenida (ver inciso anterior). Se utilizaron seis ratones inyectados con solución salina y gentamicina, como control de no infección.

Los ratones fueron mantenidos en observación diaria hasta su sacrificio a los 10-12 días post-inoculación. Los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación y de inmediato se tomaron muestras sanguíneas para la separación de sueros inmunes, los cuales fueron utilizados en tres diferentes diluciones para la determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum* por medio de ELISA, según [Voller et al. \(1979\)](#). Los sueros concentrados y sus diluciones fueron colocados individualmente en microplacas de 96 pozos cubiertas con histoplasmina (antígeno soluble de *H. capsulatum*) siguiendo los procedimientos descritos por [Toriello et al. \(1991\)](#). Se utilizó como testigo positivo suero inmune de ratón inoculado con la cepa de referencia EH-53 de *H. capsulatum*, obtenida de un caso clínico mexicano. Para el revelado se utilizó el conjugado polivalente anti-gammaglobulina de ratón unido a peroxidasa y el sustrato correspondiente ([Toriello et al., 1991](#)). La lectura de cada reacción se realizó por colorimetría en un microlector Multiskan (Labsystems MS, Helsinki, Finlandia) a 492 nm, expresando cada lectura en densidad óptica (DO) ajustada con el valor obtenido para el suero normal de ratón utilizado como testigo negativo. De inmediato al sacrificio de los animales se tomaron muestras de órganos para aislamiento del hongo en los medios convencionales antes mencionados.

3) Por detección molecular

Se extrajo DNA total de 500 mg de guano / muestra, con el kit FastDNA® SPIN para suelos (MP Biomedicals, Solon, OH). El DNA obtenido fue procesado para amplificar un marcador molecular considerado único de *H. capsulatum*, mediante una PCR-anidada para un fragmento del gen que codifica para una proteína co-activadora denominada *Hcp100*. La pureza y la cuantificación del DNA obtenido fueron determinadas en geles de agarosa al 0.8% preparados en amortiguador TBE 0.5 X, pH 8.0 (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La electroforesis se realizó a 90 V /

60 min. Se utilizó el fago lambda (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) como marcador de tamaño molecular. El ensayo se desarrolló según lo descrito por [Bialek et al. \(2002\)](#) con modificaciones menores de [Taylor et al. \(2005b\)](#). Dos juegos de oligonucleótidos fueron utilizados: el juego externo formado por Hc I (5'-GCGTTCCGAGCCTTCCACCTCAAC-3') y Hc II (5'-ATGTCCCATCGGGCGCCGTGTAGT-3') que delimita una secuencia de 391 bp; y el juego interno con los oligonucleótidos Hc III (5'-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3') y Hc IV (5'-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3') que delimita una secuencia única de *H. capsulatum* de 210 bp. Los oligonucleótidos fueron surtidos por Operon Technologies Inc. (Alameda, CA). La amplificación del DNA se realizó en un termociclador Perkin-Elmer Cetus (Emeryville, CA) y la primera PCR fue llevada a cabo en una mezcla de reacción de 25 µL, conteniendo 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 2 mM MgCl₂, 100 pM de cada oligonucleótido externo, 1 U *Taq*-DNA polimerasa (Applied Biosystems), 1 X del amortiguador comercial B10X de la *Taq*-DNA polimerasa y 2 µL de diferentes concentraciones del templado de DNA obtenido de guano. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo a 94 °C-5 min; 35 ciclos a 94 °C-30 s, 50 °C-30 s y 72 °C-1 min; y un ciclo final a 72 °C-5 min. Para la segunda PCR (anidada), la mezcla de reacción de 25 µL consistió de 200 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 100 pM de cada oligonucleótido interno, 1 U *Taq*-DNA polimerasa y 1 µL del producto de la primera reacción (templado). Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo a 94 °C-5 min; 30 ciclos a 94 °C-30 s, 65 °C-30 s 72 °C-1 min; y un ciclo final a 72 °C-5 min. Los productos amplificados de ambas reacciones fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 1.5% en las mismas condiciones descritas para la determinación de la pureza y cuantificación de DNA. Se utilizó como marcador de tamaño molecular el 100 bp o 123 bp DNA Ladder (Gibco). Las bandas fueron visualizadas debido al marcaje con bromuro de etidio en un transiluminador-UV MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP Inc., Upland, CA) y las imágenes fueron capturadas en formato TIFF, utilizando el programa VisionWorksLS vers. 6.1.1 (UVP Inc.). El producto final de 210 bp de cada PCR-anidada fue purificado con el kit de extracción "Montage® PCR Centrifugal Filter Devices" (Millipore Corporation, Bedford, MA) y enviado al Instituto de Fisiología Celular (UNAM-México) para la

secuenciación de las dos hebras en un aparato ABI-automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

El DNA de la cepa de referencia (EH-53), fue utilizado como testigo positivo, mientras que agua milli-Q funcionó como testigo negativo. Como testigo de referencia de uno de los sitios de muestreos, se incluyó el DNA de un aislado de *H. capsulatum* (EH-696P) obtenido del murciélago *T. brasiliensis* naturalmente infectado y capturado en uno de los sitios de colecta de guano de la cueva de “La Boca”.

Diversidad genética de *H. capsulatum* asociada al marcador *Hcp100*

Las secuencias obtenidas a partir de muestras de guano fueron alineadas en ClustalW ver.1.83 (National Center for Biotechnology Information-NCBI-Databases). Para el alineamiento y los subsecuentes análisis genéticos, se consideró una sola hebra de los fragmentos génicos más cortos compartidos por todas las secuencias obtenidas. Se utilizaron para comparación otras secuencias del marcador de *Hcp100*, una de un aislado de *H. capsulatum* (EH-696P) recuperado del pulmón de *T. brasiliensis* y cinco secuencias amplificadas del DNA de muestras de pulmón de *T. brasiliensis* naturalmente infectado (M-469P, M-470P, M-479P, M-482P y M-485P), todos los murciélagos habían sido previamente capturados en la cueva de “La Boca”. Asimismo, la secuencia del fragmento génico *Hcp100* de la cepa G-217B de Louisiana, Estados Unidos (GenBank, número de acceso AJ005963), fue utilizada como secuencia de referencia para la alineación.

Se realizó un análisis filogenético utilizando el programa MEGA vers. 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) de acuerdo con Tamura *et al.* (2007). Se construyeron los árboles filogenéticos: 1- de distancia genética con el algoritmo neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) a través del modelo 2-Parámetro de Kimura (Kimura, 1980); 2- de parsimonia con el método de Máxima Parsimonia (MP) realizando un procedimiento de búsqueda heurística con adición de secuencias al azar. Ambos métodos se procesaron con 1000 réplicas y la confiabilidad estadística de los árboles inferidos a partir de las secuencias, fue evaluada por el método de bootstrap (Efron, 1982). Finalmente, se generaron para el marcador analizado los árboles consenso de NJ y MP. La secuencia de la cepa G-217B fue utilizada como grupo externo.

Cultivo de microartrópodos

La especie de microartrópodo seleccionada por su abundancia en las muestras de guano, fue mantenida viva en cajas de Petri conteniendo yeso y carbón activado. Para ciertos tipos de ensayos cada ácaro seleccionado fue cultivado adicionando levadura comercial a las cajas de yeso-carbón, lo que facilita su desarrollo en mayor cantidad, necesaria para ensayos de interacción biológica con hongos.

Estudio de la interacción biológica entre hongos patógenos y microartrópodos presentes en guano

1) Por evidencia de actividad micofágica y forética de microartrópodos en contacto con colonias fúngicas

Los hongos utilizados como modelo para discriminar las interacciones biológicas en este estudio fueron: *H. capsulatum* (el principal patógeno fúngico descrito en guano); *Sporothrix schenckii* (aunque la especie no está descrita en guano, el género ha sido referido en este substrato por [Lappe et al. \(1998\)](#) y [Ulloa et al. \(2006\)](#); y *Aspergillus sclerotiorum* (hongo no patógeno aislado de guano, durante el presente estudio).

La actividad micofágica de los microartrópodos más abundantes en guano fue monitoreada por adición de las especies mantenidas vivas (dos hembras y un macho/especie) a cultivos puros de cada hongo, en agar-micobiótico, agar-papa y agar-agua (testigo). Para comprobar que el microartrópodo no se alimentaba del medio de cultivo, se utilizaron cajas de los mismos medios libres de colonias. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado. Se observaron los cultivos diariamente, anotando cambios en la macromorfología del hongo. Se establecieron los tiempos de desarrollo del ciclo biológico de los microartrópodos seleccionados, en presencia de cada cultivo fúngico. Simultáneamente, se realizaron grabaciones en video de la interacción del microartrópodo más abundante con *H. capsulatum*, utilizando una videocámara digital Sony (Sony Handycam DCR-PC109, China) adaptada a un microscopio estereoscópico Zeiss (Zeiss Stemi SV6 MC 80 DX, Oberkochen, Germany) con un filtro 80 A y una lámpara de fibra óptica.

La actividad forética de los microartrópodos fue probada en las especies identificadas como micófagas y desarrolladas en cajas de cultivos de cada hongo ensayado. Se depositaron puntualmente sobre la superficie de un medio de cultivo de agar-micobiótico, libre de cultivo fúngicos, ejemplares previamente desarrollados en colonias fúngicas. Para este procedimiento el microartrópodo fue muerto por “decapitación”. Se realizaron dos tipos de ensayos, en el primero se depositó directamente el microartrópodo sobre el medio de cultivo y en el segundo el microartrópodo fue lavado sucesivamente con cloro 10%, alcohol 70% y agua destilada, 30 s cada lavado. Todo el manejo del microartrópodo se realizó bajo observación en un microscopio estereoscopio instalado en una campana de seguridad biológica, donde se realizó la manipulación del patógeno fúngico. Finalmente, los cultivos sembrados con el microartrópodo fueron incubados a 28 °C, con observación cada tercer día. Las colonias asociadas a los lugares de siembra de los microartrópodos fueron sometidas a identificación de la especie fúngica desarrollada por macro y micromorfología. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

2) Por observación en microscopia electrónica

La presencia de estructuras fúngicas (hifas y conidia) del hongo ubicadas extracorporalmente en las especies de microartrópodos colectadas directamente de guano, se rastreó por microscopia electrónica de barrido (MEB). Los microartrópodos colectados de guano por medio de método de Berlese-Tullgren, fueron depositados directamente en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.2-7.4) y posteriormente tratados otra semana con tetróxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador. Todo el procedimiento anterior se realizó a 4 °C. A partir del material fijado, se seleccionaron las muestras para microscopia de barrido. Las muestras de microartrópodos fueron deshidratadas en una serie de etanoles de graduación creciente hasta colocarlas en óxido de propileno. Posteriormente, las muestras fueron desecadas por punto crítico y en seguida cubiertas con oro ionizado y preparadas para observación en el microscopio electrónico de barrido DSM-30 (JEOL, Tokio, Japón).

Los microartrópodos desarrollados en cultivos de *H. capsulatum* fueron preparados para microscopia electrónica de transmisión (MET). Los ejemplares cosechados directamente del cultivo fueron transferidos a microtubos y procesados de la misma manera a la descrita

para la MEB, hasta óxido de propileno. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas e incluidas en resina epóxica-Araldita para obtener cortes semi-finos, finos y ultrafinos con una cuchilla de diamante. Los cortes semifinos (1mm de grosor) fueron teñidos en azul de toluidina para seleccionar los mejores y así proceder a la obtención de los cortes ultrafinos, los cuales fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo para posterior observación en el microscopio de transmisión Zeiss EM-10 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

RESULTADOS

Parámetros ambientales de los sitios de muestreo

Los tres refugios compartieron topografías de desarrollo horizontal, destacando los siguientes datos: 1) La cueva de “La Boca” (conocida como Agapito Treviño) y anteriormente parte de una mina de fosforita, se encuentra localizada en los 25° 25’ 55.51” N, 100° 06’ 49.19” W, a una altitud de 625 msnm, aproximadamente a 1.5 km de la cortina oeste de la presa “Rodrigo Gómez”. La vegetación que rodea la entrada de la cueva es selva baja caducifolia, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano; 2) La cueva del “Salitre” se ubica en los 20° 34’ 24.93” N, 98° 44’ 40.24” W, a 1350 msnm, a 2.8 km al sureste del pueblo de Meztitlán, dentro de la reserva de la Biosfera de Meztitlán. Se encuentra rodeada de matorral crasicale. El clima es seco con lluvias en verano; 3) El dique Escaba está ubicado a 127 km al sur de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Argentina, a 800 msnm. Los sitios de muestreos de cada refugio fueron seleccionados por la presencia de grandes cúmulos de guano y por guardar una humedad relativa superior al 60%.

Colecta de guano de *T. brasiliensis*

En la primera colecta de la cueva de “La Boca” se obtuvieron las muestras S-218, S-219, S-220, S-221 y S-222, correspondientes a cinco sitios inicialmente seleccionados. En la segunda colecta se lograron las muestras S-232, S-233, S-234, S-235 y S-236, en los mismos sitios.

En la primera colecta de la cueva del “Salitre” se obtuvieron las muestras S-223, S-224, S-225, S-226 y S-227 en sitios previamente seleccionados. En la segunda colecta se repitió el muestreo de los sitios, obteniendo las muestras S-237, S-238, S-239, S-240 y S-241.

Las cuatro muestras testigos del dique Escaba fueron colectadas en dos sitios distantes: S-228 y S-229 en el primer y S-230 y S-231 en el segundo sitio.

Colecta y diversidad de microartrópodos

De la colecta de “La Boca” se obtuvieron un total de 1,387 microartrópodos, los que se agruparon en 21 taxa (Tabla 1). La mayor abundancia de ejemplares fue del orden Sarcoptiformes (Astigmatina) con el 75.1%, seguido de Trombidiformes (Prostigmata) con el 17.7% (Figura 1). El género *Sancassania* sp., perteneciente al suborden Astigmatina fue el morfotipo más abundante (57%).

De la cueva del “Salitre”, se obtuvieron 109 microartrópodos, agrupados en 10 taxa (Tabla 1). El orden con mayor abundancia fue Sarcoptiformes (Astigmatina) con 50.5%, seguido de Mesostigmata (Monogynaspida) con 25.7% (Figura 2).

Con base en la abundancia de los ejemplares colectados en los refugios de México, para la cueva de “La Boca” se obtuvo un índice de diversidad morfológica con un valor de $H' = 1.54$ para una diversidad máxima de $H_{max} = 3.04$, contrastando con lo encontrado para la cueva del “Salitre” donde se registró una $H' = 1.53$ para una $H_{max} = 2.40$.

De la colecta del dique Escaba, Argentina, se obtuvo escasos microartrópodos, distinguiendo en las muestras solamente exoesqueletos de larvas de Diptera y Coleoptera, además de algunos ácaros Mesostigmata (Uropodidae).

Tabla 1. Taxa de microartrópodos detectadas en el guano de las cuevas estudiadas

Clase Arachnida	
Orden Pseudoscorpiones	
Suborden Iocheirata	
	Superfamilia Cheliferoidea
	Familia Chernetidae “SALITRE”
	<i>Illinichernes</i> “LA BOCA”
Subclase Acari	
Orden Ixodida	
	Superfamilia Ixodoidea
	Familia Argasidae “LA BOCA”
Orden Mesostigamata	
Suborden Monogynaspida	
Cohorte Uropodina	
Subcohorta Uropodiae “LA BOCA”, “SALITRE”	
Orden Trombidiformes	
	Suborden Prostigmata “LA BOCA”
	Superfamilia Bdelloidea
	Familia Bdellidae
	<i>Bdella</i> “LA BOCA”
	Familia Cunaxidae “LA BOCA”
	Superfamilia Cheyletoidea
	Familia Cheyletidae “LA BOCA”
	Suborden Endeostigmata
	Familia Nanorchestidae “LA BOCA”
Orden Sarcoptiformes	
Suborden Oribatida	
Cohorte Nothrina	
	Superfamilia Crotonioidea

	Familia Malaconothridae	“LA BOCA”
	Cohorte Brachypylina	“SALITRE”
	Superfamilia Oppioidea	
	Familia Oppiidae	“LA BOCA”
	Superfamilia Oripodoidea	
	Familia Scheloribatidae	
	<i>Scheloribates</i>	“LA BOCA”
	Cohorte Astigmatina	
	Superfamilia Acaroidea	
	Familia Acaridae	“SALITRE”
	<i>Rizoglyphus</i>	“LA BOCA”
	<i>Sancassania</i>	“LA BOCA”
	Superfamilia Histiostomatoidea	
	Familia Guanolichidae	
	<i>Neoguanolichus</i>	“LA BOCA”
Clase Collembola		
	Orden Poduromorpha	
	Superfamilia Hypogastruroidea	
	Familia Hypogastruridae	
	<i>Acherontides</i>	“LA BOCA”
	Orden Entomobryomorpha	“SALITRE”
	Superfamilia Isotomoidea	
	Familia Isotomidae	
	<i>Ballistrura excavata</i>	“LA BOCA”
	<i>Proisotoma</i>	“LA BOCA”
	Superfamilia Entomobryoidea	
	Familia Entomobryidae	
	<i>Pseudosinella</i>	“LA BOCA”
	Orden Neelipleona	
	Familia Neelidae	“LA BOCA”
Clase Insecta		

Orden Zygentoma	“SALITRE”
Orden Diptera	“LA BOCA”
Orden Coleoptera	“LA BOCA”, “SALITRE”
Orden Homoptera	“SALITRE”
Orden Psocoptera	“SALITRE”
Orden Thysanoptera	“SALITRE”

Los microartrópodos fueron obtenidos por el método de Berlese-Tullgren (ver detalles en Materiales y Métodos).

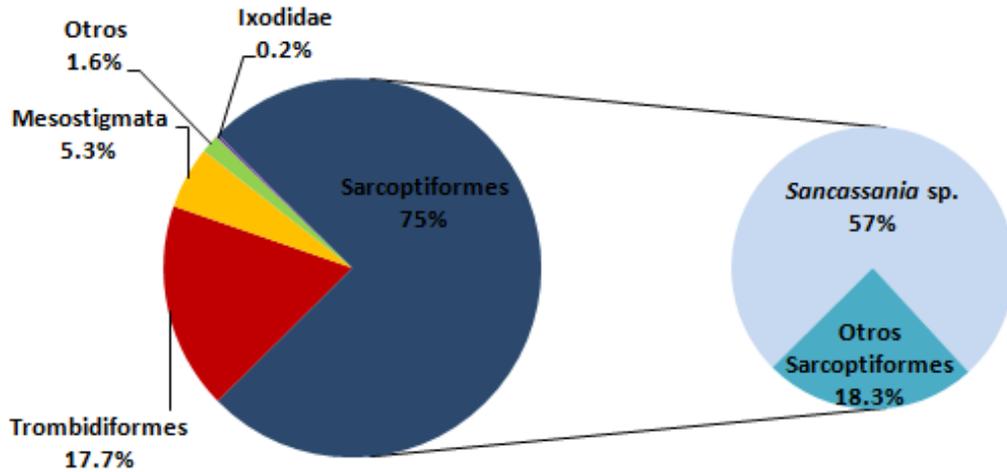


Figura 1. Biodiversidad de los microartrópodos detectados en el guano de la cueva de “La Boca”. Los microartrópodos fueron obtenidos por el método de Berlese-Tullgren y contados bajo observación en un microscopio estereoscópico.

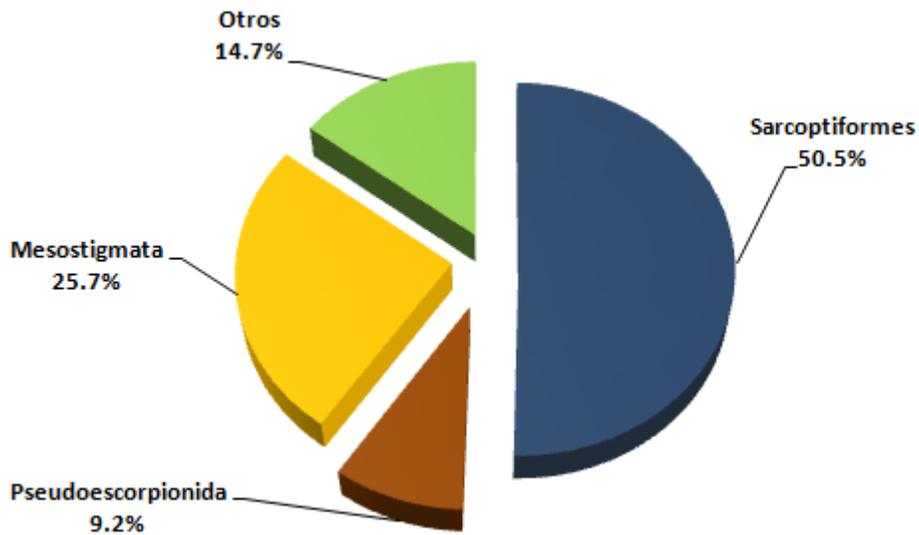


Figura 2. Biodiversidad de los microartrópodos detectados en el guano de la cueva del “Salitre”. Los microartrópodos fueron obtenidos por embudo de Berlese-Tullgren y contados bajo observación en un microscopio estereoscópico.

Evidencia de *H. capsulatum* en guano

1) Aislamiento en medios de cultivo

Se obtuvieron cinco colonias con macromorfología sugestiva de *H. capsulatum* en la primera colecta de la cueva de “La Boca”: dos de la muestra S-218 y una de cada muestra S-219, S-220 y S-221. De estas colonias, ninguna desarrolló conidiación típica del hongo ni dio prueba positiva de exoantígenos para la confirmación de la especie.

No se observaron colonias con características morfológicas compatibles con *H. capsulatum* en los cultivos de las muestras de la cueva del “Salitre” y del dique Escaba.

Los ensayos de aislamientos del hongo se repitieron invariablemente para aquellas muestras que resultaron positivas en alguna de las metodologías sugeridas para demostrar evidencia del patógeno en guano (inoculación en ratones y detección molecular). Se cuenta con una colonia procedente de la muestra S-218 (primera colecta de “La Boca”) que tiene la macromorfología compatible y crecimiento colonial lento, características fenotípicas de *H. capsulatum*. A la microscopia se observan hifas delgadas, hialinas, aún sin conidiación. El ensayo molecular de esta colonia, con el marcador *Hcp100*, reveló un producto amplificado de 210 bp considerado como marcador único para *H. capsulatum* (Figura 3).

2) Inoculación en ratones

No se logró el aislamiento de *H. capsulatum* por cultivo en agar-micobiótico, en ninguno de los órganos procesados (pulmón, bazo e hígado).

Con respecto a los resultados alcanzados en la prueba de ELISA de los sueros asociados al guano de la primera colecta de la cueva de “La Boca”, destaca una reacción inmunoespecífica (positiva) en la muestra S-221 (DO > 0.3) y, asimismo, los resultados revelaron que las muestras S-219, S-220 y S-222 fueron débilmente positivas. Las demás muestras de suero de la primera colecta resultaron negativas.

En los sueros de los ratones inoculados con las muestras de la segunda colecta de la cueva de “La Boca”, así como de las muestras de la cueva del “Salitre” y del dique Escaba, no se detectaron reacciones positivas ya que los valores de DO fueron sistemáticamente muy bajos o negativos (Figura 4).

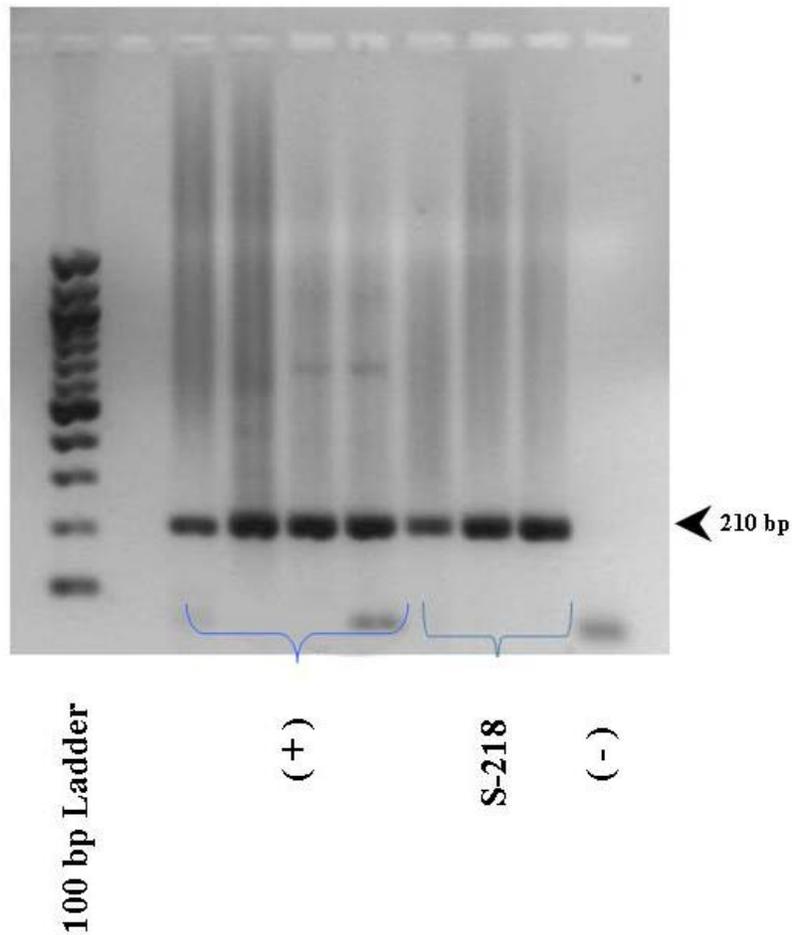


Figura 3. Amplificación del fragmento del gen *Hcp100* del DNA de un aislado fúngico obtenido del guano de la cueva de “La Boca”. A partir del micelio cultivado del aislado obtenido de la muestra de guano S-218 se obtuvo el DNA con que se realizó la PCR anidada. La segunda PCR (anidada) fue resuelta por electroforesis en agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio (ver detalles en Materiales y Métodos). La flecha indica la posición de las bandas de los fragmentos amplificados de 210 bp. Se utilizó el 100 bp Ladder como indicador de tamaño molecular. Testigo (+) = Cepa EH-53; testigo (-) = agua milli-Q

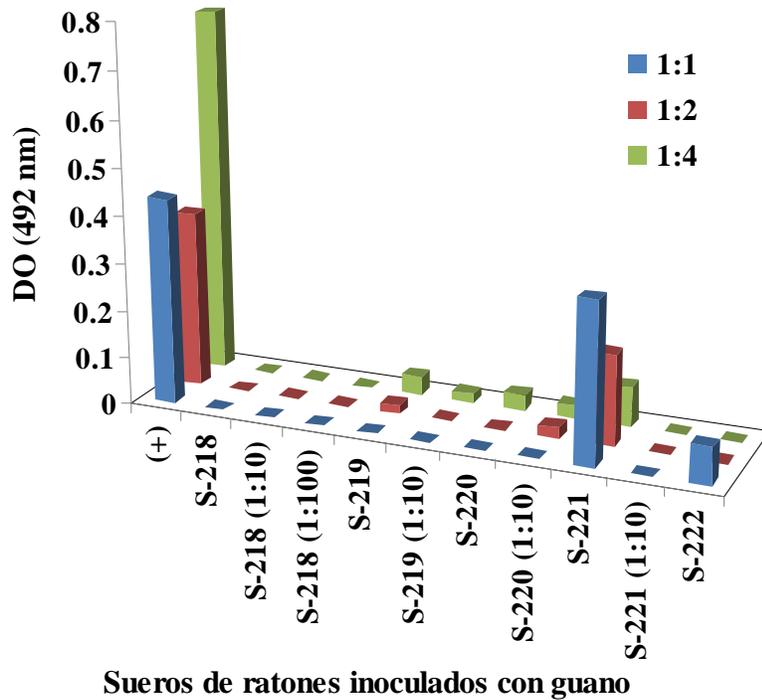


Figura 4. ELISA de los sueros de ratones inoculados con guano de la primera colecta de la cueva de “La Boca”. Las muestras inoculadas fueron preparadas con 5 g guano/4.5 mL de solución salina, suplementada con gentamicina 100 µg/mL. Para detalles de los procedimientos ver Materiales y Métodos. Las lecturas de cada DO fueron graficadas después de ajustar sus valores tomando en cuenta el testigo negativo. Los colores de las barras representan tres diluciones seriadas del suero en estudio. (+) = Testigo positivo utilizando suero de ratón inoculado con la cepa EH-53 de *H. capsulatum*.

3) Detección molecular

Para la cueva de “La Boca”, se obtuvieron DNA de seis muestras correspondientes a cuatro sitios de colecta: en la primera colecta se extrajo DNA de las muestras S-218, S-219, S-220 y S-221, resultando negativa la muestra S-222. En la segunda colecta se repitieron los resultados de extracción de DNA sólo en dos muestras, S-234 y S-235, que corresponden a los mismos sitios donde fueron colectadas las muestras S-220 y S-221, respectivamente (Figura 5). Aunque las muestras S-232 y S-233 no revelaron DNA en la segunda colecta, en los sitios correspondientes de estas muestras ya se había logrado extracción de DNA en la primera colecta. Sólo un sitio de colecta de la cueva de “La Boca” resultó sistemáticamente negativo para obtención de DNA, tanto en la primera (muestra S-222) como en la segunda (muestra S-236) colecta (Figura 5).

De las muestras de guano de la cueva del “Salitre” y del dique Escaba, no se logró obtener DNA en ensayos repetitivos. Por tal motivo, el ensayo de PCR-anidada para el marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* sólo se realizó con DNA de las muestras de la cueva de “La Boca”. La primera reacción de PCR de las muestras de guano S-218, S-219, S-220, S-221 y S-222 de la cueva de “La Boca” reveló la banda de 391 bp l sólo en el testigo positivo; sin embargo, la reacción anidada (segunda PCR), amplificó la banda de 210 bp característica del marcador en la mayoría de las muestras, a excepción de la S-222 (Figura 6).

Los DNA de las muestras S-234 y S-235 de la segunda colecta de “La Boca” también amplificaron la banda de 210 bp del marcador *Hcp100* (Figura 7).

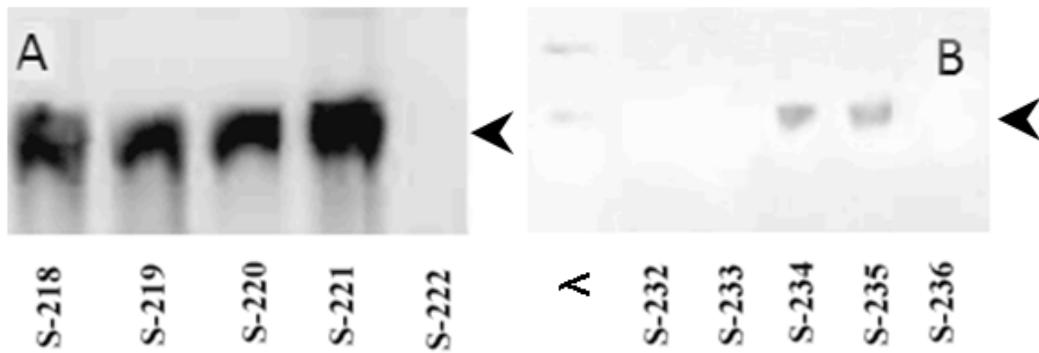


Figura 5. DNA obtenido de cada muestra de guano de la cueva de “La Boca”. (A) Primera colecta y (B) segunda colecta. La extracción de DNA se realizó con un kit comercial utilizado especialmente para suelo. La pureza y concentración de cada DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (ver detalles en Materiales y Métodos). Las cabezas de flechas indican la posición de las bandas de DNA en los diferentes carriles. λ = Fago lambda (10 ng) como marcador de tamaño molecular.

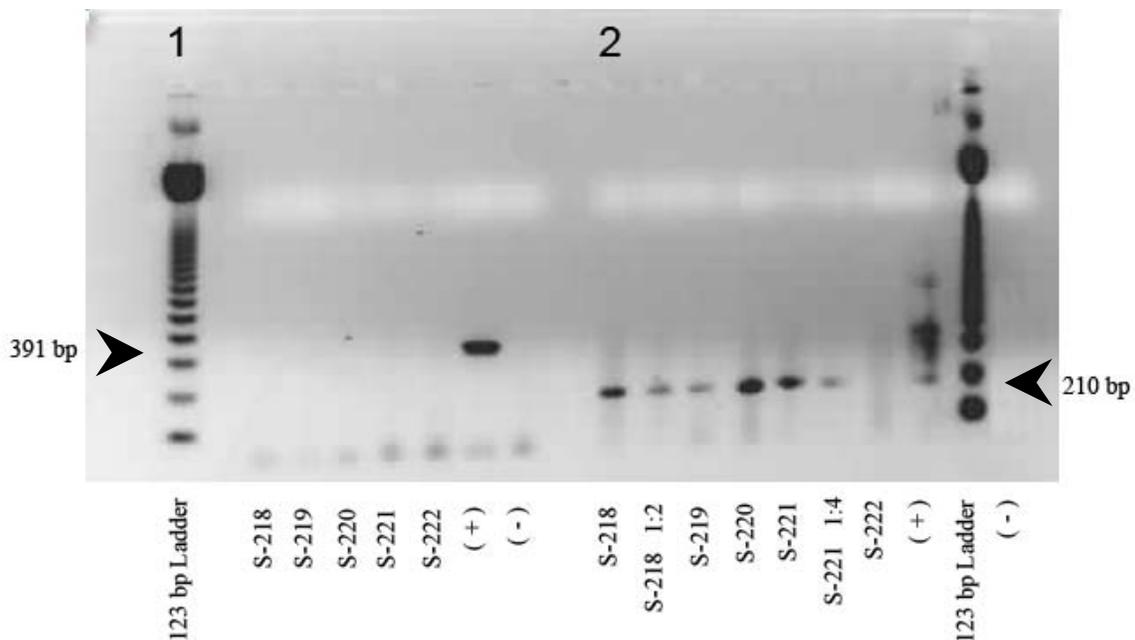


Figura 6. Amplificación del fragmento del gen *Hcp100* de los DNA de muestras de guano de la primera colecta de la cueva de “La Boca”. La primera (1) y segunda (2) reacciones de PCR fueron resueltas por electroforesis en agarosa al 1.5% conteniendo

bromuro de etidio (ver detalles en Materiales y Métodos). Las cabezas de flechas indican la posición de las bandas de los fragmentos amplificados de 391 y 210 bp, respectivamente. Se utilizó el 123 bp Ladder como indicador de tamaños moleculares. Testigo (+) = Cepa EH-53; testigo (-) = agua milli-Q.

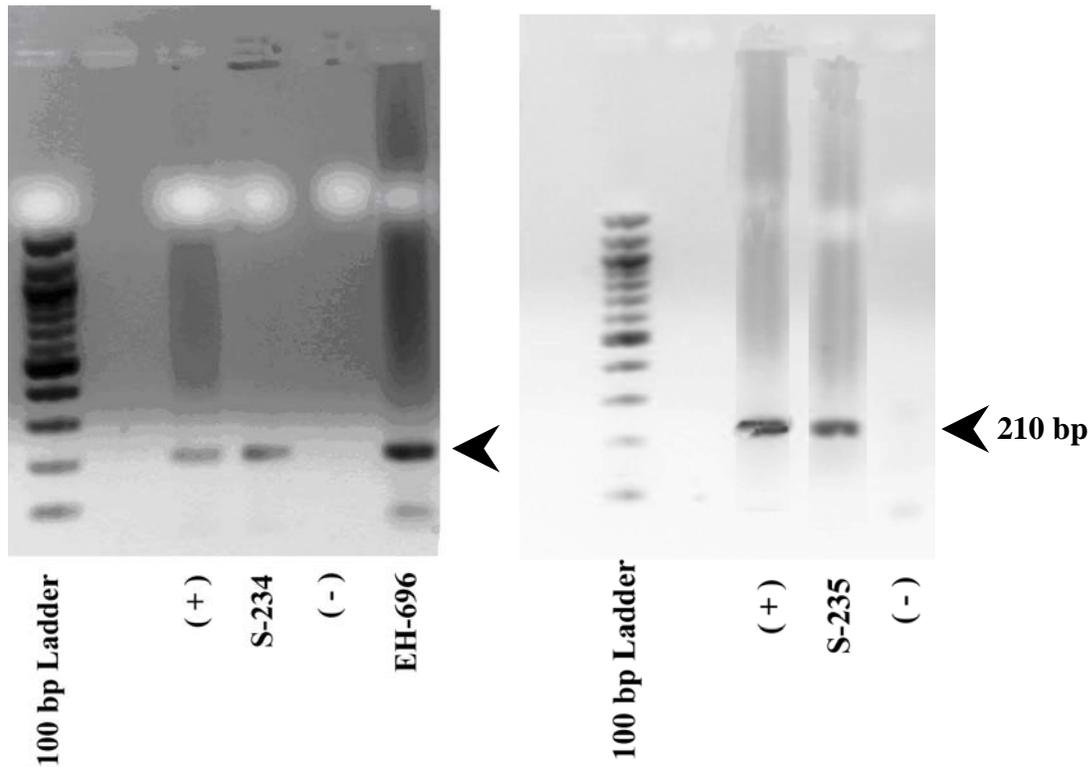


Figura 7. Amplificación del fragmento del gen *Hcp100* de los DNA de muestras de guano de la segunda colecta de la cueva de “La Boca”. La reacción anidada (segunda PCR) fue resuelta por electroforesis en agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio (ver detalles en Materiales y Métodos). La flecha indica la posición de las bandas de los fragmentos amplificados de 210 bp. Se utilizó el 100 bp Ladder como indicador de tamaño molecular. Como testigo de referencia del sitio de muestreo, se amplificó el DNA de un aislado de *H. capsulatum* (EH-696P) obtenido del murciélago *T. brasiliensis*. Testigo (+) = Cepa EH-53; testigo (-) = agua milli-Q.

Diversidad genética de *H. capsulatum* asociada al marcador *Hcp100*

Se purificaron y secuenciaron cinco fragmentos génicos (amplicones) de la reacción anidada del marcador *Hcp100* de las muestras de guano S-218, S-219, S-221, S-234 y S-235 de la cueva de “La Boca”. La muestra S-220 aunque se amplificó, no fue purificada en cantidades necesarias para su secuenciación.

El alineamiento se llevó a cabo a partir de una sola hebra de las cinco secuencias obtenidas, considerando el fragmento génico generado a partir del nucleótido 2345 hasta el 2501, con respecto a la cepa de referencia G-217B. Se encontró un único cambio genético, una sustitución de una timina (cepa G-217B) por una citosina en la posición 2437 que se repite en todas las secuencias de las muestras de guano y en las secuencias comparativas procedentes de un aislado de murciélago y de pulmón de murciélagos infectados (EH-696P, M-469P, M-470P, M-479P, M-482P y M-485P) (Figura 8).

El análisis de NJ de las secuencias alineadas no reveló diversidad genética entre los distintos fragmentos génicos ensayados, destacando una alta similitud entre las secuencias alineadas incluyendo el grupo externo (G-217B), considerando un valor de bootstrap >70% (Figura 9). Con respecto al método de MP no se encontraron suficientes sitios informativos para realizar el análisis de parsimonia.

	2345		2396
G-217B	TACGGAGAAACGACCGTGAAGCGAAAAAAGCCGACGTCGTTTACATCGACTA		
EH-696P		
S-218		
S-219		
S-221		
S-234		
S-235		
M-469P		
M-470P		
M-479P		
M-482P		
M-485P		
	2397		2449
G-217B	CGGCAACTCCGAAACCGTTCCGTGGACCCGCTCCGGCCTCTCACGCAGCCG		
EH-696P	C
S-218	C
S-219	C
S-221	C
S-234	C
S-235	C
M-469P	C
M-470P	C
M-479P	C
M-482P	C
M-485P	C
	2450		2501
G-217B	CAGTTTTCCGTGCAGAAAATTCGACCCCAAGCCACCGATAACAGTTCTCTCCT		
EH-696P		
S-218		
S-219		
S-221		
S-234		
S-235		
M-469P		
M-470P		
M-479P		
M-482P		
M-485P		

Figura 8. Alineación de secuencias del fragmento génico *Hcp100*, obtenidas de distintas fuentes en la cueva de “La Boca”. Se utilizaron para comparación secuencias

obtenidas de diferentes muestras de DNA procedentes de distintas fuentes: cinco secuencias (S-218, S-219, S-221, S-234 y S-236) amplificadas de guano de *T. brasiliensis*; una secuencia de un aislado de *H. capsulatum* (EH-696P) obtenido del murciélago *T. brasiliensis*; y cinco secuencias amplificadas de pulmones de *T. brasiliensis* naturalmente infectados con *H. capsulatum* y capturados al azar (M-469P, M-470P, M-479P, M-482P y M-485P). La secuencia de la cepa G-217B de Estados Unidos, fue utilizada como referencia para la alineación y se consideró un fragmento génico de 156 nucleótidos. Las mutaciones encontradas están resaltadas en gris.



Figura 9. Árbol consenso de NJ de los fragmentos génicos de *Hcp100* estudiados. El árbol fue construido con cinco secuencias obtenidas de las muestras de guano de *T. brasiliensis* de la cueva de “La Boca” (S-218, S-219, S-221, S-234 y S-236), asimismo, con la secuencia de un aislado de *H. capsulatum* (EH-696P) obtenido de *T. brasiliensis* y cinco secuencias amplificadas de muestras de pulmón de *T. brasiliensis* naturalmente infectado (M-469P, M-470P, M-479P, M-482P y M-485P). La secuencia de la cepa G-217B fue utilizada como grupo externo. El análisis de NJ se efectuó a través del modelo 2-Parámetro de Kimura, realizado con 1000 réplicas y con un bootstrap >70%.

Interacción biológica entre hongos patógenos y microartrópodos presentes en guano

Los microartrópodos encontrados vivos en el guano de cada uno de los sitios de muestreo procesados fueron mantenidos en yeso y carbón activado para posterior cultivo con levadura comercial, con el fin de aumentar la abundancia de éstos en los ensayos subsecuentes de actividad micofágica y forética.

De la cueva de “La Boca” se recuperaron 10 ejemplares vivos pertenecientes a dos órdenes, Mesostigmata y Sarcoptiformes (Acari), que fueron mantenidos en el laboratorio. Dos especies de Mesostigmata (uno y dos ejemplares de cada especie) correspondientes a la familia Uropodidae y dos especies de Sarcoptiformes, de las cuales una especie es de la cohorte Brachypylina (con un sólo ejemplar) correspondiente a la familia Oppidae y la otra especie es de la cohorte Astigmatina (con seis ejemplares de *Sancassania* sp.) correspondiente a la familia Acaridae. Todas las especies fueron procesadas para el estudio de las interacciones biológicas con hongos, a través de los ensayos *in vitro*.

En la cueva del “Salitre” se recuperaron siete ejemplares vivos, pertenecientes a tres órdenes: Coleoptera (Insecta), Mesostigmata y Sarcoptiformes (Acari), sin embargo ninguno se desarrolló en las condiciones del laboratorio. Estos ejemplares fueron: una especie de Coleoptera (con cuatro larvas); una especie de Mesostigmata (con un ejemplar), y una especie de Sarcoptiformes, cohorte Astigmatina (con dos ejemplares).

Las muestras del dique Escaba no aportaron microartrópodos vivos, razón por la cual no se realizaron los ensayos de interacción biológica pertinentes.

1) Actividad micofágica y forética de microartrópodos en contacto con colonias fúngicas

El desarrollo de los ácaros en las colonias de *H. capsulatum* o de *S. schenckii* fue monitoreado por 25 días. La presencia de adultos, ninfas y larvas sólo fue detectada en las cajas que contenían a *Sancassania* sp. (Astigmatina), sugiriendo que la reproducción del ácaro se llevó a cabo. Las Figuras 10 a-c muestran el desarrollo de *Sancassania* sp. sobre cultivos de *H. capsulatum* y las Figuras 10 d-f sobre cultivos de *S. schenckii*. Aunque los Mesostigmata y los Brachypylina sobrevivieron un corto tiempo sobre cultivos de *H. capsulatum*, no se reprodujeron y eventualmente murieron. Los ácaros colocados sobre los

cultivos de *A. sclerotiorum* sobrevivieron 10 días y no desarrollaron estadios ontogénicos (datos no mostrados).

La especie de *Sancassania* que se encontró asociada al guano de murciélago y que se reprodujo en las colonias de *H. capsulatum* o de *S. schenckii* es morfológicamente similar a la especie cosmopolita *Sancassania sphaerogaster* (*S. ca. sphaerogaster*) (Astigmatina: Acari: Acaridae), según la identificación realizada por el Dr. Klimov.

La actividad micofágica *in vitro* de *S. ca. sphaerogaster* fue bien documentada, como se observa en las secuencias fotográficas y por filmación videográfica donde se destaca la presencia de machos y hembras ingiriendo hifas del micelio del hongo (ver disco compacto). La destrucción completa de la colonia de *H. capsulatum* fue alcanzada después de su infestación con *S. ca. sphaerogaster*. Las alteraciones de la macromorfología colonial fueron visiblemente notorias. Entre 3-10 días después de la infestación con los ácaros, los bordes de las colonias fúngicas presentaron cambios notables con una destrucción progresiva (Figura 11). Después de 14 días, las colonias fueron totalmente destruidas por la actividad micofágica del ácaro. La destrucción de las colonias de *S. schenckii* por los ácaros fue menos evidente. En contraste, fue notoria la ausencia de reproducción del ácaro en los otros ensayos utilizando colonias de *A. sclerotiorum* y medios testigos sin cultivo (agar-micobiótico, agar-agua y agar-papa) (Figuras 11 y 12).

El máximo número de ácaros registrado fue de 80 por ensayo entre los días 12 y 13 después de la infestación en cultivos de *H. capsulatum*; seguido por 40 y 30 ácaros en colonias de *S. schenckii* en agar-micobiótico y agar-papa, respectivamente.

La cinética de la abundancia de los ácaros, según el tiempo de incubación con distintos cultivos fúngicos probados se observa en la Figura 12. La medias de tres ensayos muestran que la mayor abundancia de ácaros fue encontrada entre los días 12-13 en cultivos de *H. capsulatum*, seguido por el decimoctavo día en cultivos de *S. schenckii*. En cambio, en los cultivos de *A. sclerotiorum*, así como en los cultivos testigos de agar-micobiótico sin hongo, los ácaros depositados no se reprodujeron y murieron al quinto día.

La abundancia de *Sancassania* sp. en cultivos de *H. capsulatum* y *S. schenckii* se acompañó por la presencia de los diferentes estadios del ciclo biológico del ácaro.



Figura 10. Estadios ontogénicos de ácaros desarrollados en cajas de cultivos con hongos. (a-c) *Sancassania* sp. alimentada en cultivos de *H. capsulatum*: a = ninfas; b = hembra; c = larvas y hembras. (d-f) *Sancassania* sp. alimentada en cultivos de *S. schenckii*: d = macho; e = hembra; f = adultos. a = 50X; b = 40X; c = 20X; d = 50X; e = 50X; f = 1X.



Figura 11. Cambios macromorfológicos en colonias de *H. capsulatum* infestadas con *S. ca. sphaerogaster*. (a) T0 = inmediatamente después de la infestación; (b) T3 = 3 días después; (c) T10 = 10 días después.

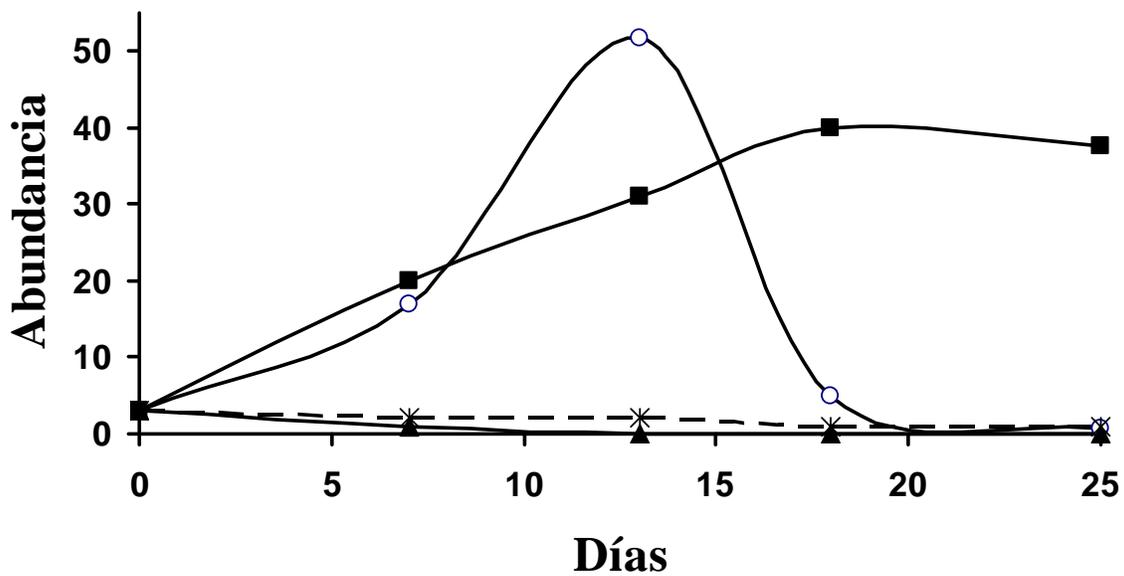


Figura 12. Abundancia de *S. ca. sphaerogaster* en los diferentes cultivos de hongos. Se determinó el número de ácaros vivos colocados en cajas de Petri conteniendo distintas especies de hongos, cultivados en cajas con agar-micobiótico. Los ácaros fueron contados cada tercer día. Se graficaron las medias aritméticas de un ensayo realizado por triplicado, hasta el día 25 (ver detalles en Materiales y Métodos).—○— = *H. capsulatum*; —■— = *S. schenckii*; —▲— = *A. sclerotiorum*; --X-- = agar-micobiótico sin cultivo fúngico (testigo negativo).

La demostración de una interacción de tipo forética entre *Sancassania* sp. y las especies fúngicas estudiadas se realizó en ensayos por duplicado. De los ocho ejemplares de *S. ca. sphaerogaster* desarrollados en los cultivos de *H. capsulatum* y sembrados sin lavar en medios limpios con agar-micobiótico, sólo uno desarrolló una colonia fúngica, la cual presentó una macromorfología compatible con *H. capsulatum*. Después de clonarla en medio fresco, la micromorfología del hongo fue observada y los conidios típicos de *H. capsulatum* fueron identificados. La obtención de cinco colonias de *S. schenckii* a partir de ácaros muertos lavados apoya el mecanismo forético de hongos por *Sancassania* sp. (Figura 13). Adicionalmente, en muchos casos, las cajas presentaron contaminaciones bacterianas.

La incidencia de ambos patógenos asociada al mecanismo forético se detalla en la Tabla 2.

2) Por observación en microscopía electrónica

La observación de los microartrópodos procesados para MEB no reveló estructuras fúngicas en la superficie del exoesqueleto de los artrópodos colectados directamente de guano de la cueva de “La Boca” y de la cueva del “Salitre”. Sin embargo, la observación por microscopía de luz en cortes semifinos de ácaros desarrollados en colonias de *H. capsulatum*, previo al procedimiento de MET, muestra algunas estructuras similares a macroconidios en el idiosoma del ácaro (Figura 14).

La observación por MET reveló algunas estructuras fúngicas íntegras y las imágenes obtenidas son compatibles con hifas septadas en el tracto digestivo de *S. ca. sphaerogaster* (Figura 15).

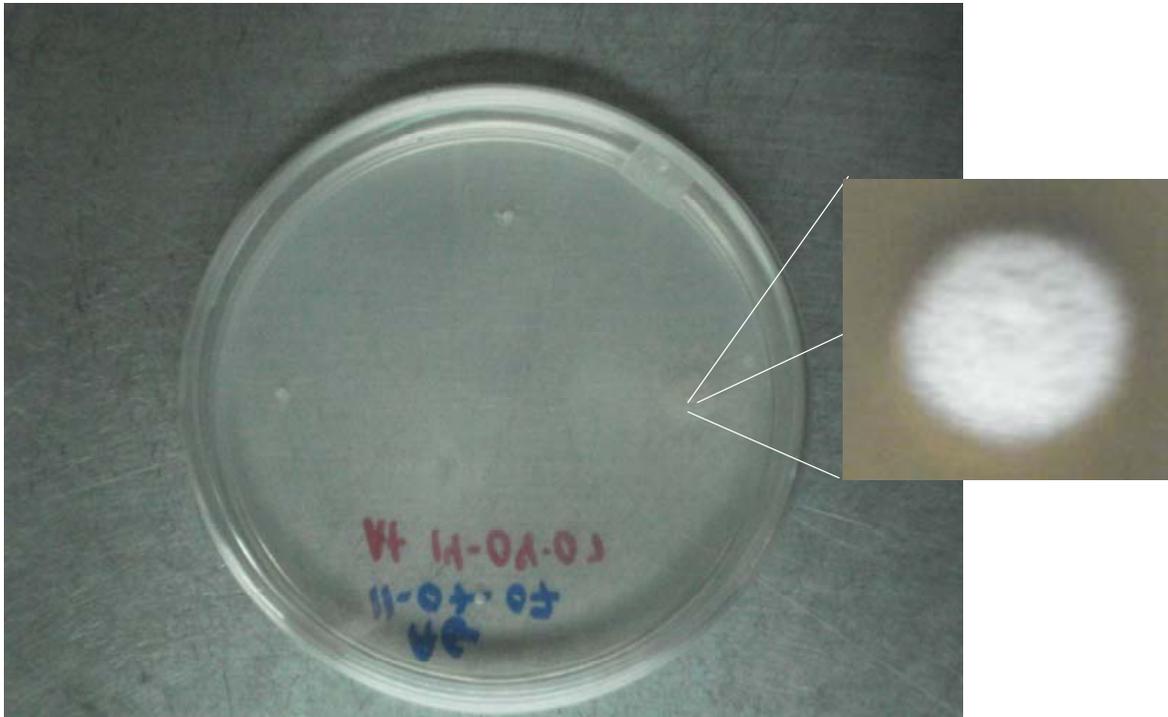


Figura 13. Macromorfología de *H. capsulatum* en cultivo sembrado con ácaros alimentados con el hongo. La colonia fúngica se desarrolló en una caja de agar-micobiótico donde se depositaron ácaros alimentados previamente en un cultivo de la misma especie fúngica y posteriormente transportados muertos y depositados en cuatro puntos cardinales de la caja. La fotografía de la derecha representa el acercamiento de una colonia en crecimiento, la cual fue posteriormente identificada como *H. capsulatum*.

Tabla 2. Datos de foresis entre *S. ca. sphaerogaster* y las especies fúngicas estudiadas

Procesamiento del ácaro*	Colonia fúngica / Ácaros sembrados	
	<i>H. capsulatum</i>	<i>S. schenckii</i>
Sin lavar	1/8	0/8
Lavados	ND	5/8

*Ver los procesos de lavado descritos en Materiales y Métodos. ND= no determinado.

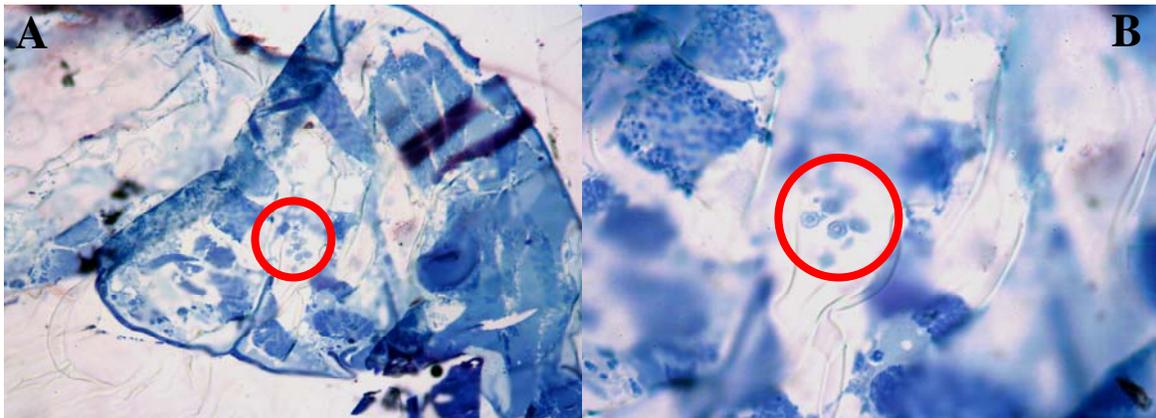


Figura 14. Observación microscópica de la actividad micofágica de *S. ca. sphaerogaster* para *H. capsulatum*. Los cortes semifinos procedieron de ácaros alimentados por 10 días con el hongo. Los ácaros fueron incluidos en resina epóxica-Araldita, previo procesamiento para MET. Los círculos destacan posibles estructuras fúngicas en la parte interior del idiosoma. A = 100X; B= 400X.

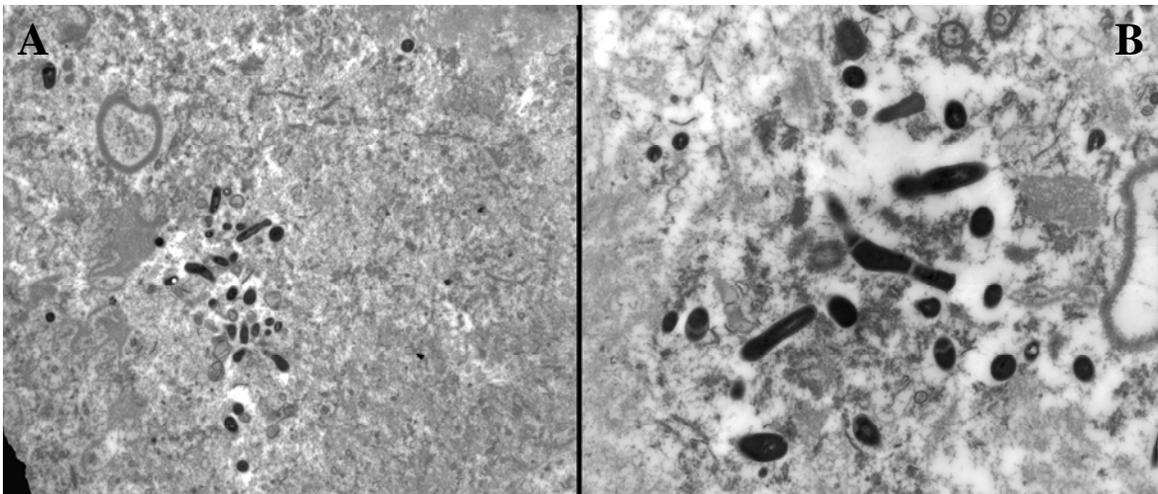


Figura 15. Micrografías electrónicas de un corte de intestino de *Sancassania ca. sphaerogaster* alimentado con *H. capsulatum*. Los cortes ultrafinos proceden de ácaros alimentados por 10 días con el hongo y procesados para MET (ver detalles en Materiales y Métodos). La observación se realizó con un microscopio de transmisión Zeiss EM-10. A = 4000X; B = 8000X.

DISCUSIÓN

Las cuevas de “La Boca” y del “Salitre” presentan un desarrollo predominantemente horizontal, lo que propicia cúmulos de guano. Ambas son refugios de murciélagos con hábitos cavernícolas, en particular, abrigan grandes colonias del murciélago de cola libre *T. brasiliensis*, característica que es compartida con el dique Escaba. Debido a su comportamiento migratorio, el número de individuos que forman las colonias de *T. brasiliensis* en estos ecosistemas es variable, según la época del año, registrando una mayor abundancia en verano (López-Damián, 2009). Se ha estimado que la cueva de “La Boca” tiene una población entre dos y cinco millones (López-Damián, 2009; Moreno, 1996), la del “Salitre” alrededor de veinte mil y ciento diez mil individuos (López-Damián, 2009) y el dique Escaba una población de doce millones (Barquez y Díaz, 2001).

Se puede considerar que los parámetros ambientales predominantes en cada sitio de colecta pueden influir en el éxito del aislamiento del patógeno fúngico a partir de guano. En el caso de la cueva de “La Boca”, las condiciones ambientales fueron favorables para la detección de *H. capsulatum* tomando en cuenta los grandes cúmulos de guano en un clima subhúmedo. La obtención de un aislado fúngico de una de las muestras de guano (S-218) que resultó positiva por PCR-anidada con el marcador específico para *H. capsulatum*, reveló que el aislamiento correspondía a la especie *H. capsulatum* con base en la amplificación del marcador *Hcp100*, aunque la micromorfología de este aislado carecía de conidiación y la producción de exoantígeno fue negativa. En la cueva del “Salitre” se encontró menor cantidad de guano acumulado debido a que la colonia de *T. brasiliensis* era menor; aunado a lo anterior un ambiente seco y la poca porosidad del suelo, factores que posiblemente no facilitaron el crecimiento del patógeno o bien la detección de éste por los métodos empleados. Por otro lado, la ausencia de aislamientos fúngicos de las muestras de guano del dique Escaba pudo estar asociada a diferentes circunstancias, destacando en particular el largo tiempo entre la colecta y procesamiento de las muestras (más de una semana). Asimismo, hay que considerar que a pesar de que las muestras estuvieron todo el tiempo en refrigeración, la imposibilidad de utilizar un preservador que inhibiera otros organismos coexistentes en el guano contribuyó a la falta de éxito para el aislamiento de *H.*

capsulatum. Hay que tomar en cuenta que este hongo es de crecimiento lento y que fácilmente puede ser enmascarado y/o inhibido por una microbiota competidora.

Con relación a la colecta de microartrópodos, el método de Berlese-Tullgren fue muy eficiente para capturar un gran número de ejemplares, lo que permitió la determinación de su diversidad en los sitios estudiados. La eficiencia de este método ha sido evaluada en estudios cualitativos y cuantitativos de microartrópodos en muestras de suelo, hojarasca, musgo, líquenes, madera en descomposición y otros substratos edáficos (Vannier, 1970). Esta diversidad fue mayor en la cueva de “La Boca” (21 taxa) que en la cueva del “Salitre” (10 taxa), sustentada por una diversidad máxima (Hmax) de 3.04 y por una gran abundancia y riqueza de microartrópodos, lo que garantiza una rica fuente de alimentos para los organismos que están involucrados en la cadena alimentaria existente en la comunidad de la cueva de “La Boca”. No se pudo determinar la diversidad de microartrópodos en las muestras de Argentina utilizando el método de Berlese-Tullgren, ya que éstas no presentaban organismos vivos debido al largo tiempo transcurrido entre la colecta y el procesamiento de las mismas.

El hallazgo de *S. ca. sphaerogaster* como el ácaro predominante en el guano de *T. brasiliensis* de la cueva de “La Boca”, constituyendo el 57% de todos los microartrópodos encontrados, puede estar asociado a su hábito micófago, demostrado en el presente trabajo. Por lo tanto, se puede sugerir que la persistencia de ciertos hongos micromicetos, como es el caso de *H. capsulatum*, genera la mayor abundancia de *S. ca. sphaerogaster* y posiblemente de otros microartrópodos depredadores, lo que contribuye a una mayor complejidad de la comunidad guanobia.

El aislamiento de *H. capsulatum* por cultivo directo de las muestras de guano o por inoculación de guano en animales fue sistemáticamente negativo. Es probable que el crecimiento rápido de contaminantes ambientales enmascare el crecimiento lento del *H. capsulatum* y, en el caso de aislamiento de órganos, puede darse con frecuencia la contaminación de éstos al manipular los animales. A pesar de que se obtuvo una colonia con macromorfología compatible de *H. capsulatum*, las clonaciones de la colonia fúngica no fueron eficientes para separarla en estado puro y, a la fecha, aún no ha sido bien caracterizada. Aunque el aislamiento fúngico es el estándar de oro para indicar la presencia del hongo, no siempre es el método más indicado por las dificultades inherentes al

procesamiento de muestras de la naturaleza que llevan *per se* muchos contaminantes y por el crecimiento tardío de *H. capsulatum*.

El método inmunológico logró evidenciar la presencia de *H. capsulatum* en por lo menos tres de los cinco sitios muestreados de la cueva de “La Boca”, aunque con valores bajos de densidad óptica. Los resultados de ELISA obtenidos con la muestra S-221 fueron más altos en las tres diluciones probadas lo que representa posiblemente una mayor carga fúngica presente en la muestra. Aunque este método es reproducible, tiene desventajas asociadas a su baja sensibilidad y al tiempo de espera para generar una óptima respuesta inmune del animal inoculado y desarrollar niveles de anticuerpos detectables. Posiblemente estas desventajas influyeron en los resultados negativos encontrados para la cueva del “Salitre” y el dique Escaba.

El método molecular resultó ser el más eficiente para revelar evidencia de *H. capsulatum* en muestras de guano, ya que cuatro de los cinco sitios muestreados de la cueva de “La Boca” amplificaron el marcador molecular utilizado. La prueba molecular con el marcador de 210 bp, único de *H. capsulatum*, confirmó indudablemente la presencia del patógeno en tres de los sitios que previamente habían revelado *H. capsulatum* con el método inmunológico. La gran ventaja de utilizar este marcador molecular de *H. capsulatum* es su conocida especificidad, alta sensibilidad (Bialek *et al.*, 2002), reproducibilidad (detectó el hongo en diferentes colectas del mismo sitio como lo muestra la Figura 5) y rapidez para alcanzar el resultado. Indiscutiblemente, el marcador *Hcp100* constituye una excelente herramienta para rastrear *H. capsulatum* en distintas muestras tanto clínicas como de la naturaleza. Sin embargo, su desventaja reside en el mayor costo del material utilizado.

Aunque este método fue excelente para demostrar la presencia del patógeno en el guano de la cueva de “La Boca”, no funcionó de la misma manera para las muestras procedentes de la cueva del “Salitre” y del dique Escaba. Una posible explicación para este hecho, se relaciona con la baja humedad y poca porosidad del material asociado al guano colectado de ambos sitios, características físicas que podrían haber influido en el buen funcionamiento del kit de extracción de DNA.

Finalmente, habría que considerar la viabilidad del patógeno en las condiciones ambientales de los sitios muestreados. Los métodos de aislamiento fúngico e inmunológico

pueden apoyar la viabilidad del hongo *in situ* sin embargo los resultados negativos no necesariamente indican muerte o ausencia del patógeno. Como se refirió anteriormente la negatividad de estos ensayos puede estar asociada a una baja carga fúngica de las muestras. Sin embargo, el método molecular seleccionado en este estudio detecta específicamente DNA del patógeno en condiciones de no degradación. Por lo tanto, para que el marcador *Hcp100* funcione debe haber hongo viable en las muestras positivas y posiblemente ausencia o degradación del mismo en las muestras negativas.

El análisis de NJ de las secuencias de todas las bandas de 210 bp del marcador *Hcp100*, generadas por la reacción anidada, reveló una alta similitud en sus haplotipos, destacando una importante homología genética en todas las secuencias de *H. capsulatum* evidenciadas en el guano de la cueva de “La Boca”. Esta identidad genética fue también compartida con seis secuencias del marcador *Hcp100* obtenidas de *T. brasiliensis* capturados en el mismo refugio, de las cuales cinco procedieron del DNA de órganos (pulmones) de estos murciélagos naturalmente infectados y la otra de un aislamiento de *H. capsulatum* recuperado del pulmón de otro murciélago infectado. Sin embargo, el alineamiento de estas secuencias reveló una mutación puntual común, en relación con la secuencia de la cepa de referencia G-217B de Estados Unidos. Aunque el marcador *Hcp100* es poco polimórfico y no recomendable para análisis filogenético, el patrón mutacional asociado a todas las secuencias de la cueva de “La Boca” podría ser utilizado para rastrear la distribución de *H. capsulatum* en otras localidades que han sido incluidos en la ruta migratoria de *T. brasiliensis*.

Con relación a la interacción biológica entre hongos patógenos y microartrópodos presentes en el guano, *Sancassania* sp. fue el único microartrópodo que desarrolló su ciclo biológico en las colonias del *H. capsulatum* y *S. schenckii*, a pesar de que no se reprodujo en *A. sclerotiorum*. Este Astigmatina fue identificado como *S. ca. sphaerogaster*. *Sancassania* plantea desafíos serios para su identificación, debido a la alta variabilidad morfológica y a la carencia de una revisión exhaustiva de sus especies. Por lo que, para asegurar su clasificación definitiva como *Sancassania sphaerogaster*, es recomendable obtener las secuencias del gen mitocondrial para la citocromo oxidasa I y del gen nuclear ribosomal 28S D9-10. Por tal motivo, se enviaron varios ejemplares al Dr. Pavel Klimov de la Universidad de Michigan, quien es experto en el tema.

Algunas especies de este género se han especializado en alimentarse de basidiomicetes (Klimov y OConnor, 2003; Okabe y OConnor, 2001), mientras que otras son generalistas y pueden alimentarse de una variedad de sustratos, incluyendo hongos (Kheradmand *et al.*, 2007). Ciertas especies de la familia Acaridae son micófagas y destructoras de cultivos de macromicetes (Okabe 1993; 1999) y algunas como *Acarus siro*, *Histiogaster* sp., *Rizoglyphus robini*, *R. echinopus*, *Schwiebea* sp. y *Tyrophagus putrescentiae* han sido reportadas como parásitos de micromicetes (Noble y Poe, 1973; Okabe 1993; 1999; Okabe y OConnor, 2001; Price, 1976; Rivard, 1961; Smith y Onions, 1994; Yamada, 1974).

En el ambiente de “La Boca”, la microbiota asociada al guano de murciélago puede favorecer el desarrollo de *Sancassania* ya que provee el alimento necesario para su sobrevivencia; sin embargo, no hay datos que demuestren que su dieta esté restringida exclusivamente a los hongos. Lo más probable es que *Sancassania* sea un generalista en términos de sus preferencias alimenticias.

S. ca. sphaerogaster desarrolló todo su ciclo biológico preferentemente en los cultivos de *H. capsulatum* mostrando un máximo de población a los 15 días después de su infestación en el cultivo del hongo, causando la completa destrucción de las colonias de *H. capsulatum* en 2-3 semanas. Esto sugiere que la fase micelial de *H. capsulatum* suministra los requerimientos óptimos para el desarrollo de *S. ca. sphaerogaster*.

La habilidad de *S. ca. sphaerogaster* para alimentarse de *H. capsulatum* quedó categóricamente comprobada en la video grabación del disco compacto anexo a este trabajo, donde el espectador puede observar como el ácaro se alimenta de hifas que son parte del micelio aéreo del hongo, introduciéndolo con sus pedipalpos al gnatosoma.

La abundancia de *S. ca. sphaerogaster* en el guano de murciélago indica que esta especie de ácaro puede ser considerado como un consumidor primario en la cadena alimentaria del guano. Con base en los hallazgos de este estudio, *S. ca. sphaerogaster* podría ser un potencial control biológico para *H. capsulatum*, puesto que comparte el mismo microhábitat o nicho ecológico y destruye con eficacia el hongo en condiciones *in vitro*, lo que establece una interacción biológica de tipo negativa (micofágica) entre los dos organismos.

Los medios testigos sin cultivo fúngico no permitieron la reproducción de *S. ca. sphaerogaster*, sugiriendo que los distintos compuestos del medio en las condiciones utilizadas, no fueron parte de los requerimientos nutricionales del ácaro. La actividad micofágica de este ácaro no es específica para *H. capsulatum*, porque el ácaro también creció en los cultivos de *S. schenckii*. Sin embargo, los cambios en la macromorfología de las colonias de *S. schenckii* fueron menos marcados, aunque el número de ácaros fue constante durante un largo tiempo, sugiriendo que estos ácaros no consumieron este hongo de manera preferencial. Es difícil explicar porque *S. ca. sphaerogaster* no fue capaz de reproducirse en *A. sclerotiorum*, ni produjo daño alguno en la colonia. Esto puede ser debido a que esta especie fúngica no provee los requerimientos necesarios para la dieta del ácaro, o bien existe la posibilidad de la producción de micotoxinas, conocidas en el género *Aspergillus* (Lazo y Sierra, 2008), con un potencial efecto nocivo para el ácaro.

Una interacción tipo forética entre *S. ca. sphaerogaster* y los patógenos *H. capsulatum* y *S. schenckii* fue fehacientemente demostrada por ensayos *in vitro*.

Los ensayos *in vitro* de la actividad forética de *S. ca. sphaerogaster* asociada a *H. capsulatum*, apoyan que la cutícula del ácaro está involucrada en la foresis del hongo. El hongo se localizó probablemente sobre el exoesqueleto del ácaro, ya que sólo se logró recuperar colonias fúngicas de ácaros transferidos de cultivos de *H. capsulatum* sin previo lavado. Este hallazgo *in vitro* sugiere que esta actividad forética podría darse en nichos ecológicos compartidos por ambos organismos, comprometiendo a *S. ca. sphaerogaster* como un posible dispersor a corta distancia de *H. capsulatum*. Es importante considerar que los ácaros que fueron lavados y posteriormente triturados nunca desarrollaron crecimiento fúngico, sugiriendo que los lavados eliminaron estructuras fúngicas dispuestas sobre el exoesqueleto del ácaro y que las estructuras fúngicas ingeridas fueron posiblemente degradadas o alteradas en su viabilidad en el aparato digestivo de *S. ca. sphaerogaster*.

Por otro lado, los resultados de los ensayos *in vitro* de la actividad forética de *S. ca. sphaerogaster* asociados a *S. schenckii* revelaron discrepancias con lo encontrado para *H. capsulatum*. La ausencia de foresis de *S. schenckii* por *S. ca. sphaerogaster* sin previo lavado de éste, indica la inexistencia de estructuras fúngicas sobre la cutícula del ácaro. La posible incapacidad de adherencia de estructuras morfológicas de este hongo al exoesqueleto del ácaro podría estar relacionada con las características morfológicas de las

colonias de *S. schenckii*, como escaso micelio aéreo, humedad y fuerte adherencia al medio de cultivo que dificultaría la libre unión de las estructuras fúngicas sobre la superficie coriácea y arrugada del ácaro. Sin embargo, los hallazgos de recuperación de colonias de *S. schenckii* de ácaros que fueron lavados y posteriormente triturados, sugieren que las estructuras fúngicas ingeridas resistieron las condiciones existentes en el tracto digestivo de *S. ca. sphaerogaster*.

Aunque la microscopia electrónica de barrido no logró evidenciar una foresis natural a partir de microartrópodos colectados directamente de guano, la microscopia electrónica de transmisión confirmó que *S. ca. sphaerogaster* se alimenta de estructuras morfológicas de *H. capsulatum*, cuando estos ácaros se desarrollaron en colonias de cultivo del hongo. Las observaciones de los cortes de transmisión, sugieren que el hongo no invadió ningún órgano interno del ácaro y sólo se ubicó dentro del tracto digestivo donde se observan estructuras semejantes a hifas septadas, lo que confirma la micofagia y no una relación parasitaria.

Este estudio es el primer reporte en el mundo sobre las interacciones entre el ácaro *S. ca. sphaerogaster* y el hongo patógeno de mamíferos *H. capsulatum*, ambos miembros de una misma cadena trófica de un nicho ecológico especial, como es el guano de *T. brasiliensis*.

CONCLUSIONES

S. ca. sphaerogaster. fue el ácaro más abundante en el guano de *T. brasiliensis*.

S. ca. sphaerogaster desarrolló su ciclo biológico en las colonias de *H. capsulatum* y *S. schenckii* y no se reprodujo en *A. sclerotiorum*.

La destrucción del cultivo de *H. capsulatum* y la gran abundancia del ácaro en este cultivo, sugiere una interacción biológica de tipo negativa (micofágica) entre *S. ca. sphaerogaster* y *H. capsulatum*. Esta actividad también fue observada en cultivos de *S. schenckii*, aunque menos drástica.

La interacción micofágica podría darse en la naturaleza, ya que ambos organismos comparten el mismo nicho ecológico.

Se demostró, por ensayos *in vitro*, un mecanismo forético asociado a *S. ca. sphaerogaster* y los patógenos *H. capsulatum* y *S. schenckii*.

Debido a la gran similitud entre los fragmentos génicos del marcador *Hcp100* obtenidos de guano y los procedentes de murciélagos (pulmones y un aislamiento fúngico) capturados en la cueva de “La Boca”, se sugiere que en este sitio prevalece una población homogénea de *H. capsulatum*.

REFERENCIAS

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

Balazuc J. 1998. Fungi parasiti Laboulbenia. In: Juberthie C., V. Decu (eds.). *Encyclopædia Biospeologica II*. Moulis: Société de Biospéologie, pp: 1305-1309.

Barquez R. M., M. M. Díaz. 2001. Bats of the argentine Yungas: a systematic and distributional analysis. *Acta Zool. Mex. (n. s.)* 82: 29-81.

Begon M., C. Townsend, J. Harper. 2006. *Ecology from Individual to Ecosystems*. Oxford: Wiley-Blackwell.

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

Cabrera R. I., A. García, G. Otero-Colina, L. Almaguel, A. Ginarte. 2005. *Hirsutella nodulosa* y otros hongos asociados al ácaro tarsonémido del arroz *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en Cuba. *Folia Entomol. Mex.* 44: 115-121.

Canteros C. E., M. F. Zuiani, G. Davel, G. Schmidt, V. Ritacco, M. L. Taylor. 2005. Brote de histoplasmosis en la Patagonia: identidad genética de los aislamientos. *V Congreso Latino-Americano de Micología*, agosto 1-5. Brasilia: Sociedad Latinoamericana de Micología, Resumen pp. 284.

Chávez-Tapia C. B., R. Vargas-Yañez, G. Rodríguez-Arellanes, G. R. Peña-Sandoval, J. J. Flores-Estrada, M. R. Reyes-Montes, M. L. Taylor. 1998. 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. Mex.* 11: 187-191.

Decu V. 1986. Some considerations on the bat guano synusia. *Trav. Inst. Spéool.* 25: 41-51.

Del Castillo M. L. L. 1996. Estudio faunístico comparativo de dos comunidades guanobias en cavernas de Veracruz. Tesis de Licenciatura. México D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.

Efron B. 1982. The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, vol. 38. Philadelphia: Society for Industrial Applied Mathematics.

Estrada-Bárceñas D. A. 2005. Biodiversidad de microartrópodos en una cueva multienergética en Tabasco, México. Tesis de Maestría. México D. F.: Facultad de Ciencias, UNAM.

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

Index Fungorum. 2010.

<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=417609>.

Kasuga T., J. W. Taylor, T. J. White. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 37: 653-663.

Kasuga T., T. J. White, G. Koenig, J. McEwen, A. Restrepo, E. Castañeda, C. Da Silva-Lacaz, E. M. Heins-Vaccari, R. S. De Freitas, R. M. Zancopé-Oliveira, Q. Zhenyu, R. Negroni, D. A. Carter, Y. Mikami, M. Tamura, M. L. Taylor, G. F. Miller, N. Poonwan, J. W. Taylor. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* 12: 3383-3401.

Kheradmand K., K. Kamali, Y. Fathipour, E. M. Goltapeh, E. A. Ueckermann. 2007. Thermal requirement for development of *Sancassania rodionovi* (Acari: Acaridae) on mushrooms. *J. Econ. Entomol.* 100: 1098-1103.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of molecular sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 110-120.

Klimov P. B., B. M. OConnor. 2003. Phylogeny, historical ecology and systematics of some mushroom-associated mites of the genus *Sancassania* (Acari: Acaridae), with new generic synonymies. *Invert. System.* 17: 469-514.

Kwon-Chung K. J. 1972a. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 175: 326.

Kwon-Chung K. J. 1972b. *Emmonsella capsulata*: perfect state of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 177: 368-369.

Lappe P., M. Ulloa, S. Aguilar, A. Pérez-Mejía, C. Toriello, M. L. Taylor. 1998. Levaduras asociadas al hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 162-172.

Lazo R. F., G. Sierra. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 7-11.

López-Damián L. J. 2009. Dieta de *Tadarida brasiliensis mexicana* en el noreste y sur de México en el contexto de la fenología del maíz (*Zea mays*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, México D. F.: Instituto de Ecología-UNAM.

McGinnis M. R., B. Katz. 1979. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsella*. *Mycotaxon* 8: 157-164.

Moreno A. 1996. *Los Murciélagos de Nuevo León*. Monterrey: Grupo IMSA.

Moreno E. C. 2001. *Métodos para Medir la Biodiversidad. Manual y tesis*. Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa.

Noble W. E., S. L. Poe. 1973. Attractancy of several fungi and bacteria for bulb and soil mites frequenting diseased gladiolus corms. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 85: 401–404.

Okabe K. 1993. Population growth and dispersal behavior of *Histiogaster* sp. (Acari: Acaridae) on several economically important fungi. *Appl. Entmol. Zool.* 28: 11–18.

Okabe K. 1999. Vectoring of *Hypocrea nigricans* (Hypocreales: Hypocreaceae) by three fungivorous mite species (Acari: Acaridae). *Exp. Appl. Acarol.* 23: 653-658.

Okabe K., B. M. OConnor. 2001. A method for both mass and individual rearing of fungivorous mites (Acari). *Exp. Appl. Acarol.* 25: 493-504.

Palacios-Vargas J. G., B. E. Mejía-Recamier. 2007. *Técnicas de Colecta, Conservación y Montaje de Pequeños Artrópodos Edáficos*. México, D. F.: Publicaciones de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.

Price D. W. 1976. Passage of *Verticillium albo-atrum* propagules through the alimentary canal of the bulb mite. *Phytopathology* 66: 46–50.

Reddell J. R. 1981. *A Review of the Cavernicole Fauna of Mexico, Guatemala, and Belize*. Austin: Texas Memorial Museum.

Reyes-Montes M. R., M. L. Taylor, E. Curiel-Quesada, A. C. Mesa-Arango. 2000 Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: Una revisión de los hallazgos. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 121-126.

Rivard I. 1961. Influence of temperature and humidity on longevity, fecundity and rate of increase of the mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae) reared on mold cultures. *Can. J. Zool.* 39: 869–876.

Rodríguez-Arellanes G., A. Pérez-Mejía, E. Duarte-Escalante, M. L. Taylor. 1998. Organización de la colección de cepas de *Histoplasma capsulatum* del laboratorio de Inmunología de Hongos, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 243-246.

Romero-Martínez R., C. Canteros, M. L. Taylor. 2004. Variabilidad cromosómica intraespecífica en hongos patógenos de humanos, especialmente en *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 168-176.

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

Schowalter T. D. 2006. *Insect Ecology. An Ecosystem Approach*. London: Elsevier.

Smith D. A., H. S. Onions. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi. IMI Technical Handbooks No. 2*, 2nd ed., Wallingford: CAB International.

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

Taylor M. L., C. B. Chávez-Tapia, M. R. Reyes-Montes. 2000a: Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* 30: 207-212.

Taylor M. L., C. B. Chávez-Tapia, A. Rojas-Martínez, M. R. Reyes-Montes, M. Bobadilla Del Valle, G. Zúñiga. 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 M. L., D. A. Estrada-Bárceñas, L. Hernández-García. 2009. Diversidad genética de *Histoplasma capsulatum* asociada a murciélagos cavernícolas. *IX Congreso Nacional Mexicano de Espeleología*. enero-febrero. Villahermosa: Unión Mexicana de Asociaciones Espeleológicas (UMAE) y Sociedad Espeleológica de Tabasco, Resumen pp. 1-4.

Taylor M. L., M. R. Reyes-Montes, C. B. Chávez-Tapia, E. Curiel-Quesada, E. Duarte-Escalante, G. Rodríguez-Arellanes, G. R. Peña-Sandoval, F. Valenzuela-Tovar. 2000b. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. In: M. Benedik (ed.). *Research Advances in Microbiology*. Kerala: Global Research Network, pp. 29-35.

Taylor M. L., M. R. Reyes-Montes, M. A. Martínez-Rivera, G. Rodríguez-Arellanes, E. Duarte-Escalante, J. J. Flores-Estrada. 1997. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* 23: 58-63.

Taylor M. L., G. M. Ruíz-Palacios, M. R. Reyes-Montes, G. Rodríguez-Arellanes, L. E. Carreto-Binaghi, E. Duarte-Escalante, A. Hernández-Ramírez, A. Pérez, R. O. Suárez-Alvarez, Y. A. Roldán-Aragón, R. Romero-Martínez, J. H. Sahaza-Carmona, J. Sifuentes-Osornio, L. E. Soto-Ramírez, G. R. Peña-Sandoval. 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 M. L., C. Toriello, A. Pérez Mejía, M. A. Martínez, M. R. Reyes-Montes, L. Espinosa-Ávila, C. B. Chávez-Tapia. 1994. Histoplasmosis en el estado de Guerrero, México: enfoque biológico. *Rev. Mex. Micol.* 10: 49-62.

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

Toriello C., L. C. Arjona-Rosado, M. L. Díaz-Gómez, M. L. Taylor. 1991. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses* 34: 133-140.

Ulloa M., P. Lappe, S. Aguilar, H. Park, A. Pérez-Mejía, C. Toriello, M. L. Taylor. 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.

Vannier G. 1970. Techniques relatives a l'extraction des arthropodes du sol. *CNRS* 7: 261-319.

Vargas-Yañez R., G. R. Peña-Sandoval, C. B. Chávez-Tapia, M. L. Taylor. 1998. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 192-194.

Voller A, D. E. Bidwell, A. Bartlett. 1979. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), A Guide with Abstracts of Microplate Applications.* London: Dynatech Europe Laboratories Inc.

Yamada K. 1974. Role of the bulb mite on disease development of bulb rot of Tulip. *Kinki Chugoku Agr. Res.* 48: 77-81.