



Variabilidad cromosómica intraespecífica en hongos patógenos de humanos, especialmente en *Histoplasma capsulatum*

Rafael Romero-Martínez¹, Cristina Canteros² y Maria Lucia Taylor¹

¹Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México y ²Departamento Micología, INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», Buenos Aires, Argentina

Resumen

En este trabajo se revisaron los aspectos de ploidía, cariotipo y polimorfismo en la longitud de los cromosomas (CLP) de hongos patógenos de humanos con énfasis en el agente de la histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*. Diferentes sistemas de electroforesis en gel se emplean actualmente para la determinación de electrocariotipos (EKs). Ensayos con cinética de reasociación y reconstrucción genómica han determinado tamaños estimados de 23 y 32 Mb de sus genomas en dos cepas de *H. capsulatum*, G-186AS y Downs, respectivamente. Se ha propuesto un estado haploide para ambas cepas, aunque se planteó una probable aneuploidía para la cepa Downs. Mediante electroforesis en gel de campo ortogonal (CHEF) y de campo invertido (FIGE) e hibridación con diferentes sondas, de seis a siete cromosomas han sido considerados en la cepa Downs (baja virulencia) y cuatro en la cepa G-186B (virulenta). La aplicación de estos métodos en las tres cepas de referencia de *H. capsulatum* más utilizadas (G-217B y Downs de EE.UU., G-186B de Panamá) evidenció cromosomas entre 0,5 a 5,7 Mb, con un CLP asociado tanto al tamaño como a la movilidad de los cromosomas. Recientemente, usando CHEF, en 19 aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de Latinoamérica y la cepa G-186B, se encontraron de cinco a siete cromosomas con tamaños moleculares entre 1,1 y 11,2 Mb, confirmando el CLP en *H. capsulatum*. El polimorfismo en los EK de *H. capsulatum* requiere de otros estudios que ayuden a esclarecer su relación con el fenotipo de los aislamientos y determinar los mecanismos que pueden conducir a la variabilidad en su ploidía.

Palabras clave

Cromosomas, Hongos, Patógenos humanos, *Histoplasma capsulatum*

Dirección para correspondencia:

Dra. Maria Lucia Taylor
Laboratorio de Inmunología de Hongos
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM
Ciudad Universitaria, CP 04510
México DF, México.
Tel./Fax: +525 5623 2462
Correo electrónico: emello@servidor.unam.mx

Aceptado para publicación el 20 de septiembre de 2004

Intraspecific chromosomal variability in human pathogenic fungi, especially in *Histoplasma capsulatum*

Summary

The ploidy, karyotype, and chromosome length polymorphism (CLP) of human pathogenic fungi were revised with emphasis on *Histoplasma capsulatum*, the causative agent of the systemic mycosis, histoplasmosis. Currently, different systems of gel electrophoresis are being used to determine fungal electrokaryotypes (EK). By renaturation kinetic and genomic reconstruction in *H. capsulatum* strains (G-186AS and Downs), estimated genome sizes of 23 and 32 Mb were determined for both strains, respectively. The haploid state was proposed for both strains, although aneuploidy was suggested for the Downs strain. Contour-clamped homogeneous electric field (CHEF), field inversion gel electrophoresis (FIGE), and Southern blot using different probes showed the presence of six to seven chromosomes in the Downs strain (low virulence), whereas four chromosomes were identified in the G-186B strain (high virulence). The use of these methods in the three major *H. capsulatum* reference strains (G-217B and Downs from the United States of America, G-186B from Panama) revealed distinct chromosome sizes, from 0.5 to 5.7 Mb, with CLP associated with chromosomes size and mobility. Recently, by CHEF, using 19 *H. capsulatum* isolates from Latin-America and the G-186B strain, five to seven chromosomes with 1.1 to 11.2 Mb molecular sizes were revealed, which again suggested CLP in *H. capsulatum*. However, to elucidate the EKs' polymorphism in *H. capsulatum* and its relationship with the isolate's phenotype more studies are needed to understand the mechanisms controlling ploidy variability.

Key words

Chromosomes, Fungi, Human pathogens, *Histoplasma capsulatum*

La estabilidad en el genoma, así como el apropiado establecimiento y mantenimiento de controles en la transcripción génica, son esenciales para la función normal y la viabilidad de los organismos vivos [69]. El término ploidía se refiere al conjunto de cromosomas que se encuentran en una célula. La haploidía y la diploidía son los estadios cromosomales más comunes en la naturaleza [79]. Organismos eucariontes con ciclo sexual duplican su ploidía a consecuencia de la fertilización y la reducen a la mitad durante la meiosis [35].

En plantas se ha demostrado que la inestabilidad genómica puede estar asociada al cambio en el número cromosómico ya sea por la multiplicación del genoma completo formando un múltiplo mayor de dos del genoma haploide (poliploidía) o por la pérdida o ganancia de cromosomas individuales que no son múltiplos exactos del genoma haploide (aneuploidía) [69]. La inestabilidad intrínseca de los nuevos genomas poliploides o aneuploides formados en los organismos tiene una fuerte relevancia para la evolución de los mismos [81], proporcionan genes redundantes que pueden divergir en sus funciones y aceleran el cambio genómico [69].

La poliploidía resultante de la replicación del genoma completo, se ha observado con mayor frecuencia en plantas, se estima que hasta un 70 % de las plantas con flores tienen poliploidía en sus linajes [59,68]. La aneuploidía también es común en plantas y, en humanos, es la más frecuente anomalía asociada al número cromosómico [40]. Una característica distintiva de la evolución y especiación de las plantas con flores es la aloploidía, que es la combinación de genomas nucleares diploides diferentes genéticamente de dos o más especies o géneros distintos [59]. En hongos fitopatógenos la presencia de híbridos está asociada a posibles estadios aloploidios [10].

En plantas y en hongos, un tipo diferente de ploidía estaría representado por la presencia de un cromosoma que contenga genes únicos no presentes en todos los representantes de la especie; a este cromosoma se le denomina cromosoma supernumerario o dispensable (CD) [22,47]. Los CDs pueden contener genes funcionales y en algunos

individuos de una especie pueden proporcionar ventajas importantes en las interacciones con nuevos ambientes y, en particular, en la relación huésped-parásito [22].

Tradicionalmente para estudiar los cromosomas se utiliza la citogenética, que tiene dificultades cuando es aplicada a los cromosomas de ciertos organismos. El análisis del cariotipo por el método citogenético clásico se fundamenta en la observación y clasificación de los cromosomas durante el estadio de metafase de los ciclos de división celular y por la disposición del centrómero.

Con la aplicación de metodologías moleculares que favorecen la separación de grandes moléculas de ADN [94], se introdujeron varios sistemas de cariotipificación por electroforesis o electrocariotipo (*electrophoretic karyotype*, EK) que además permitieron identificar el polimorfismo en la longitud de los cromosomas (*chromosome length polymorphism*, CLP), que en la práctica representa la diversidad de los cromosomas y es sinónimo del término «polimorfismo cromosómico».

En el presente trabajo se ha revisado la ploidía, el EK y el CLP, además de la existencia de CDs en hongos patógenos de humanos, con un enfoque especial en el modelo fúngico *Histoplasma capsulatum*.

Métodos utilizados para el estudio de los cromosomas

Aunque la citogenética ha sido empleada en la determinación de la ploidía y caracterización de cromosomas, su utilidad en los hongos ha sido limitada por el tamaño reducido de sus cromosomas [32]. Uno de los métodos más utilizados para evaluar el contenido de ADN nuclear, es la citometría de flujo que proporciona información sobre la actividad proliferativa de las células y permite clasificarlas con base en su ploidía. Estudios realizados en cepas diploides de *Saccharomyces cerevisiae* sugirieron que este método ha sido útil para determinar ploidía en hongos [43]. La aplicación de este método sigue vigente en patógenos fúngicos de importancia médica, aunque otros métodos como la cinética de reasociación del

ADN y la reconstrucción genómica también son utilizados para determinar ploidía en hongos, pero la excesiva laboriosidad de estos últimos, constituye un impedimento para analizar un número grande de organismos.

La aplicación de la electroforesis, en un método analítico denominado electroforesis en gel de campos pulsados (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE), ha aportado un instrumento importante para el estudio de cromosomas de hongos que favorecía la resolución de cromosomas intactos de tamaño pequeño revelando, con más exactitud que los métodos clásicos, valores de EKs en un gran número de especies de hongos [26,70]. A partir del PFGE se han desarrollado varias adaptaciones metodológicas que han derivado en diferentes sistemas de determinación de EKs. En estos sistemas, las células enteras, tanto de procariontes como de hongos y plantas, son incluidas en bloques de agarosa y tratadas con proteasas, además de enzimas que degradan paredes celulares. Las células incluidas en estos bloques son colocadas en geles de agarosa al que se le aplican campos eléctricos de corriente directa, con cambios periódicos de dirección y/o intensidad. Los intervalos de tiempo (cambios periódicos), durante los que el campo eléctrico está en una u otra dirección, son el factor más importante para determinar la movilidad y resolución de las moléculas de ADN cromosómico, en relación con su tamaño molecular [26].

El diseño de diferentes sistemas para la aplicación de PFGE ha permitido la determinación de la movilidad electroforética de cromosomas de diferentes tamaños en los hongos, separando moléculas de 0,5 Mb hasta 12 Mb [70]. El empleo de PFGE recibe diferentes acrónimos de acuerdo con el sistema de electroforesis utilizado, que adoptan distintas orientaciones de los campos eléctricos: el PFGGE (*pulsed field gradient gel electrophoresis*); el CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*); el OFAGE (*orthogonal field alternation gel electrophoresis*); y el FIGE (*field inversion gel electrophoresis*).

El sistema más utilizado actualmente en el estudio del genoma fúngico es el CHEF ya que posee la ventaja de separar un gran número de muestras en línea recta, además de ser sencillo en su manejo y diseño [9].

La combinación de PFGE con la hibridación por medio de sondas específicas, ha servido para revelar la presencia de cromosomas individuales, además de determinar la ubicación de genes dentro del cromosoma, mientras que la combinación de PFGE con enzimas de restricción de corte infrecuente (*restriction enzymes analysis of genomic DNA*, REAG) ha permitido realizar mapas de restricción.

Ploidías y cromosomas supernumerarios

La ploidía dentro de las especies del reino Fungi no es estable, por lo que es frecuente encontrar variabilidad en los estadios haploides o diploides según la especie analizada, incluyendo la forma dicarionte propia del ciclo parasexual de algunas especies. Los hongos pueden ser considerados organismos con alta flexibilidad para modificar su ploidía y generan estadios poliploides, incluso por transmisión horizontal de cromosomas. De esta manera, en aislamientos de diferentes especies, se puede observar un número haploide o diploide durante la mayor parte de su ciclo biológico, aún en aquellos que tienen una forma parasitaria.

Las ploidías de hongos, como *Neurospora crassa*, *Coprinus cinereus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* entre otros, han sido analizadas por técnicas genéticas clásicas. Sin embargo, estos estudios

fueron limitados en su época por el hecho de que muchos de ellos no presentaban estado sexual conocido [120].

En los hongos, a diferencia de las plantas, el estado poliploide en la naturaleza no ha sido determinado con frecuencia. La poliploidía referida para algunos especímenes, se ha generado por manipulación genética bajo condiciones experimentales, lo que ha permitido plantear algunas explicaciones sobre la biología de estos organismos.

En levaduras hemiascomicetes como *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces servazzii*, *Candida glabrata* y *S. cerevisiae*, la comparación del orden de los genes en los cromosomas mostró que la poliploidía ha sido un mecanismo involucrado en la evolución de estos microorganismos [118], apoyando los estudios de Ohno [81].

La diferencia en el número de cromosomas no necesariamente significa que el genoma estándar de una especie esté dividido en un número variable de unidades cromosómicas y, en varios casos, se ha demostrado la presencia de material genético sólo en algunos individuos dentro de la especie (cromosomas supernumerarios) [22]. CD por definición significa ADN cromosómico que no está presente en todos los aislamientos de la especie y la ausencia de este ADN extra no es indispensable para el crecimiento del hongo [22,47]. En algunos individuos de una especie pueden proporcionar ventajas importantes en las interacciones con nuevos ambientes [22].

La mayoría de los CDs son de tamaño inferior a 2 Mb, hecho que motivó equívocamente que se los denominara minicromosomas [22]. Sin embargo, no es el tamaño de la molécula lo que define un CD sino que se demuestre su ausencia en otros individuos de la especie y no se encuentre translocado en otro sitio del genoma.

En ciertos hongos fitopatógenos se ha observado que los CDs llevan genes asociados a factores de patogenicidad que confieren virulencia al organismo. En el hongo fitopatógeno *Nectria haematococca* se mostró que los genes de virulencia que determinan su patogenicidad a plantas se encuentran agrupados en un CD de 1,6 Mb que contiene genes que codifican para toxinas [39].

En el fitopatógeno *Alternaria alternata* los genes *AKT* codifican para enzimas involucradas en la síntesis de una toxina relacionada con su patogenicidad, estos genes se encuentran codificados en un CD de 1,05 Mb. Cepas mutantes que carecen de este cromosoma pierden su patogenicidad y conservan la habilidad de subsistir en la naturaleza [41].

La búsqueda, la identificación y la caracterización de CDs en hongos patógenos de humanos, podría llevar al conocimiento de mecanismos utilizados por algunos de estos organismos en la interacción huésped-parásito. La determinación de CDs en hongos causantes de micosis en los humanos es escasa. Hasta el momento sólo en *Candida albicans* se ha referido la presencia de cromosomas supernumerarios, aunque se desconoce su relevancia en la patología de este hongo.

Polimorfismo cromosómico de los patógenos fúngicos asociados a las micosis sistémicas y subcutáneas más importantes

Entre diferentes aislamientos de la naturaleza, la ocurrencia de variaciones importantes en el tamaño de los cromosomas es frecuente en los hongos que carecen de un ciclo sexual. Apoyados en esta premisa, Kistler y Miao [54] plantearon la hipótesis de que los hongos asexuales son más propensos a mostrar un mayor polimorfismo en el

tamaño y número cromosómico debido a la ausencia de meiosis, llevándolos al mantenimiento de estas alteraciones. En muchos casos, esta diferencia en tamaño se debe a rearrreglos del ADN que involucran grandes fragmentos de los cromosomas que son translocados, duplicados o eliminados por diferentes procesos. Sin embargo, el hecho de observar CLP intra-especie en hongos con reproducción asexual y sexual, compromete este fenómeno tanto en procesos mitóticos como meióticos y pone en evidencia que los mecanismos involucrados en él no están completamente esclarecidos [32,120].

Los distintos sistemas de PFGE permitieron observar la diversidad de EKs entre hongos de la misma especie, que se refleja en un CLP intra-especie, y que además resultó ser muy común en hongos, particularmente en el número y en el tamaño de cromosomas [32,120]. En varios hongos patógenos de humanos, incluyendo algunas especies dimorfas, se ha encontrado la existencia de CLPs [5,32,76,77,83,104,120].

El CLP ha sido demostrado en las especies del género *Candida* en el que se incluyen levaduras relevantes por su amplia gama de patologías [50,62,65,74,75,111]. Doi et al. [27], mediante diferentes sistemas de PFGE, detectaron CLP en ocho de las especies de *Candida* más comúnmente aisladas de infecciones en humanos. En *C. albicans*, se reportó inicialmente por OFAGE de cuatro a siete cromosomas y un tamaño genómico de 14 Mb [24]. Posteriormente, en esta levadura diploide [82,116] se ha referido un tamaño genómico haploide estimado por CHEF entre 16 y 17 Mb [20,63], la variabilidad en su cariotipo parece estar asociada a su transición fenotípica y a ciertos aspectos de su fisiología [63,91]. Además, en esta especie, el genoma haploide parece estar formado por ocho cromosomas [45,117], con tamaños de 0,42 a 3 Mb [45]. Sin embargo, aunque se refirieron el mismo número de cromosomas en varios aislamientos, éstos no fueron idénticos entre sí, debido a que revelaron un CLP atribuido posiblemente a deleciones y translocaciones [61,63]. En algunas cepas de *C. albicans*, se ha detectado la presencia de un cromosoma supernumerario [61,63]. El análisis de los EKs revelados por PFGE de 17 aislamientos de *C. albicans* y 33 de *C. glabrata* demostró patrones diferentes en los aislamientos de cada especie [50,74]. Al parecer, estas levaduras presentan una amplia diversidad en sus CLPs, como se infiere del trabajo de Asakura et al. [3], quienes refieren de 6 a 13 cromosomas de 1,1 a 2,9 Mb para *C. albicans* y de 6 a 12 cromosomas de 0,4 a 2,4 Mb para *C. glabrata*. Estos autores observaron mucha variabilidad en los distintos patrones de EKs procedentes de 78 aislamientos clínicos de *C. albicans* y 21 de *C. glabrata*, por lo que no se logró clasificar los aislamientos estudiados con los patrones obtenidos. Un estudio reciente en 55 aislamientos clínicos de *C. parapsilosis*, a través de la determinación del EK y del CLP asociado a patrones de restricción por PFGE-REAG con endonucleasas de corte infrecuente, reveló en todos los aislamientos estudiados un EK de 12 bandas cromosómicas y cinco grupos polimórficos por PFGE-REAG con la endonucleasa *Sfi*I [85]. Sin embargo, una alta variabilidad cromosómica intra-especie en esta levadura ya había sido reportada por Shin et al. [95], que describieron 25 EKs en un total de 48 aislamientos clínicos estudiados.

Datos con PFGE en una levadura considerada patógeno emergente, *Hansenula anomala* (anamorfo cuya fase teleomórfica es *Candida pelliculosa*), revelaron cinco EKs en 19 cepas estudiadas y posiblemente un número haploide de nueve cromosomas [80].

Coccidioides immitis, hongo diploide tanto en su forma saprobia (micelio) como en la parasitaria (esférula)

[83], es el agente causal de una de las micosis respiratorias con curso más severo. El hongo se distribuye en las regiones desérticas del norte de México y del valle de San Joaquín en EE.UU., además de las zonas áridas cercanas al sur de la cordillera andina. Al utilizar CHEF para la separación de cromosomas de esferoplastos preparados de la fase micelial del hongo, se observaron diferencias en su número entre los especímenes fúngicos estudiados, lo que sugiere la existencia de CLP en *C. immitis*. La mayoría de los 12 aislamientos del hongo mostró cuatro cromosomas que variaron de 3,2 a 11,5 Mb en su tamaño molecular y sólo tres de los aislamientos presentaron tres cromosomas. El tamaño genómico diploide, determinado por microespectrometría para un aislamiento del hongo, fue de 28,2 Mb [83].

Paracoccidioides brasiliensis es el agente causal de una de las micosis sistémicas más frecuentes en América del Sur. El genoma de este hongo fue estudiado por primera vez por Montoya et al. [77], quienes de ocho aislamientos de origen clínico, por medio de CHEF, observaron tres diferentes EKs con 4-5 bandas cromosómicas, cuyos tamaños moleculares variaron de 3,2 a 10 Mb, lo cual sugiere la existencia de CLP. Además, los autores estimaron el tamaño del genoma haploide en 30 Mb. En otro estudio, publicado por Cano et al. [13], se identificaron cuatro bandas cromosómicas de 2 a 10 Mb por PFGE. Asimismo estos autores, por microscopía confocal, estimaron un tamaño genómico de 45,7 a 60,9 Mb en dos aislamientos del hongo. Este tamaño genómico representó el doble del valor obtenido por la suma de los tamaños moleculares de las cuatro bandas reveladas en el EK, sugiriendo que la cepa era diploide. Posteriormente, Montoya et al. [76], usando el sistema de CHEF, describieron un EK de cinco bandas en 12 aislamientos del ambiente de *P. brasiliensis*, confirmando en aislamientos de la naturaleza el tamaño molecular de las bandas, de 3,2 a 10 Mb, previamente descritas en aislamientos clínicos y un tamaño genómico de 29,7 a 31,3 Mb. Feitosa et al. [31], describieron variabilidad intraespecífica en 12 aislamientos clínicos y ambientales de *P. brasiliensis* procedentes de diversas áreas geográficas de Sudamérica, en estos aislamientos se observaron de cuatro a cinco bandas cromosomales entre 2,5 a 9,5 Mb y los tamaños genómicos variaron de 25,8 a 73,6 Mb, lo que revela distintos EKs y CLP que sugieren la posible existencia de aislamientos haploides, diploides o aneuploides en esta especie.

Aspergillus fumigatus, es un hongo oportunista que ha cobrado importancia con el incremento de pacientes inmunosuprimidos. Sin embargo, el análisis genómico de este hongo aún es incipiente. Tobin et al. [112], con sólo un aislamiento clínico, encontraron por CHEF cinco bandas cromosómicas entre 1,7 y 4,8 Mb con tamaño estimado del genoma de 15,8 Mb; mientras que Amaar y Moore [1], con dos cepas, observaron un EK con cuatro bandas resueltas por PFGE. Aunque hasta el momento no se han realizado estudios de electrocariotipificación en un amplio número de cepas, las diferencias en número de bandas cromosómicas referidas por ambos grupos de investigación [1,112], sugieren la existencia de CLP en *A. fumigatus*.

En *Sporothrix schenckii*, agente causal de la micosis subcutánea más frecuente en México, se ha descrito por CHEF la presencia de seis a ocho cromosomas y un tamaño estimado del genoma de 28 Mb en ocho aislamientos del hongo provenientes de casos clínicos japoneses [104]. Aunque los autores destacan que los EKs encontrados fueron muy homogéneos, pequeñas variaciones permitieron separarlos en tres diferentes grupos según sus CLP [104]. *S. schenckii* es posiblemente diploide

en sus fases dimorfas. La diploidía de los conidios fue inicialmente sugerida por Arenas-López [2], con base en la dificultad para obtener mutantes albinas del hongo por irradiación con rayos ultravioleta. La diploidía de conidios y levaduras de este hongo fue posteriormente propuesta por Torres-Guerrero [113], quien de acuerdo con la sobrevida a la luz ultravioleta y al ácido nitroso, además de la dificultad para obtener mutantes auxótrofos, sólo factible por doble tratamiento mutagénico, propone también la diploidía de *S. schenckii*. Asimismo, en este trabajo se estimó el tamaño genómico del hongo en 45 Mb [113].

En el género *Pneumocystis* se encuentran agrupados parásitos obligados y especie-específicos de mamíferos [25,71]. Fue inicialmente considerado un protozoo; sin embargo, debido a estudios de ultraestructura celular [114] y de secuenciación del ARN ribosómico [101], las especies de este género fueron reubicadas entre los hongos ascomicetos. El genoma ha sido referido como haploide y probablemente diploide. Muestran heterogeneidad cromosómica, particularmente en el EK determinado para cada especie del género [100]. En *P. carinii* f. sp. *muris* se observaron EKs de 13 a 15 cromosomas, de 0,3 a 0,7 Mb y un tamaño genómico aproximado de 8 Mb [96,100]. Hong et al. [42] en 1990, informaron de *P. carinii* derivado de humanos (posiblemente *P. jirovecii*) que presentaba poca variabilidad cromosómica, encontrando un EK de 10 a 12 bandas con cromosomas de 0,37 a 0,81 Mb y un genoma de aproximadamente 8,4 Mb [42,96].

El análisis cariotípico de *Cryptococcus neoformans*, un hongo oportunista de amplia distribución mundial, comenzó con dos trabajos pioneros, el de Perfect et al. [84] y el de Polacheck y Lebens [86], quienes además demuestran CLP en este basidiomiceto. Perfect et al. [84] reportaron, en siete cepas de *C. neoformans* representativas de los serotipos A, B, C y D, de 10 a 12 cromosomas con tamaños genómicos de 15 a 17 Mb. Por otro lado, Polacheck y Lebens [86], encontraron diferentes EKs para cepas del serotipo D y refieren ocho cromosomas para *C. neoformans* var. *neoformans* y nueve cromosomas para *C. neoformans* var. *gattii*, ambas variedades con cromosomas entre 0,58 y 1,6 Mb. El análisis de los EK de 51 aislamientos clínicos y del ambiente de *C. neoformans* evidenció la presencia de 14 perfiles de EK con un número de 10 a 13 cromosomas [33]. Por otro lado, con el sistema CHEF, los cariotipos de 40 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* (teleomorfo *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*) mostraron 18 perfiles de EK, mientras que en 11 aislamientos de *C. neoformans* var. *gattii* (teleomorfo *F. neoformans* var. *bacillispora*) los perfiles de EK revelados fueron tres [11], lo que confirma el CLP en ambas variedades de este hongo. Un polimorfismo cromosómico ligado a la sexualidad ha sido referido en *C. neoformans* que presenta complementación sexual entre cepas haploides heterotálicas formando una fase temporal diploide, ocasionalmente se han obtenido aislamientos que se autofertilizan, y bajo estas circunstancias son considerados como diploides o aneuploides [21,60].

Un hallazgo interesante es el posible cambio genómico del hongo, observado en los EKs de cepas de *C. neoformans* durante la infección experimental en el modelo murino, revelado por los sistemas de PFGE [34]. Hechos similares fueron reportados por otros autores, como por ejemplo, que aislamientos de un mismo paciente obtenidos en distintos estadios de la infección presentaron diferencias en los EKs de hasta tres bandas cromosómicas. Aunque estos cambios puedan deberse a mecanismos de reordenamiento genómico, no se descarta una posible infección mixta con clones relacionados [55,102].

Polimorfismo cromosómico en *H. capsulatum*

Histoplasma capsulatum es un patógeno dimorfo de amplia distribución mundial, existe en una forma filamentosamente multicelular (fase micelial infectante) saprobica en el suelo o en forma de una levadura unicelular uninucleada (fase levaduriforme virulenta y parasitaria) en un huésped mamífero susceptible. El hongo es un ascomiceto de la familia *Onygenaceae* y posee una forma teleomorfa o sexual representada por la especie heterotálica, *Ajellomyces capsulatus*, con grupos de complementación sexual (+) o (a) y (-) o (b) [57,58,72], además de una forma anamorfa o asexual, representada por la especie *H. capsulatum* con tres variedades taxonómicas (var. *capsulatum*, var. *duboisii* y var. *farciminosum*). Actualmente, las variedades taxonómicas están distribuidas en ocho clados, de los cuales siete son considerados especies filogenéticas, según los estudios de la filogeografía de *Histoplasma* realizados por Kasuga et al. [48,49] con base en el polimorfismo de la secuencia de fragmentos parciales de cuatro genes, el factor de ribosilación del ADP (*arf*), el precursor del antígeno H (*H-anti*), la delta-9-desaturasa de ácido graso (*ole1*) y la alfa-tubulina (*tub1*).

A pesar de los avances en el diseño de herramientas moleculares para el estudio de diferentes organismos, aún son pocos los datos obtenidos en *H. capsulatum* que permitan un mejor entendimiento de su variabilidad genómica. La determinación de la composición en moles por ciento de guanina-citosina (G+C), en el ADN nuclear del micelio y levadura de cinco cepas del hongo, fue de 45,6 a 49,8 y 45,4 a 49,8 %, respectivamente. No obstante, la similitud en el contenido de G+C de ambas fases del hongo no indica que la especie *H. capsulatum* sea genéticamente homogénea [4].

Steele et al. [99] fueron los primeros en demostrar, mediante los sistemas de FIGE, CHEF y la hibridación con sondas específicas, el polimorfismo cromosómico de las cepas más utilizadas como prototipos de referencia de *H. capsulatum* (Downs y G-217B de EE.UU., G-186B de Panamá). Los autores describieron, en estas cepas, cromosomas de 0,5 hasta 5,7 Mb. En la cepa Downs, considerada de baja virulencia, se determinó la presencia de siete cromosomas mientras que en las cepas virulentas G-186B y G-217B se encontraron cuatro y tres cromosomas respectivamente, con la característica de que en la cepa G-186B uno de éstos era de 0,5 Mb, un tamaño cromosómico muy pequeño [99]. Posteriormente Carr y Shearer [15], determinaron el tamaño genómico de la cepa G-186AS (mutante derivada de la G-186B), que fue de un valor estimado de 21,8 por análisis de cinética de reasociación, 22 por citometría de flujo y 24 Mb por reconstrucción genómica. Para la cepa Downs, los autores encontraron un tamaño genómico de 32 Mb, 40 % mayor que el de la mutante G-186AS, además sugirieron inicialmente, con base en los índices de ADN calculados para la Downs y la G-186AS, el estadio haploide de ambas cepas. Sin embargo, por reconstrucción genómica y por hibridación con las sondas de α y β tubulina, Carr y Shearer [15] encontraron una copia duplicada de ambos genes en la cepa Downs, lo que les permitió proponer una segunda consideración sobre la ploidía de esta cepa sugiriendo una posible diploidía parcial o una aneuploidía, aunque los autores consideran más factible la aneuploidía. Por otro lado, en las cepas G-186AS y G-217B sólo se determinó la presencia de una copia de cada gen, por lo que fueron consideradas como haploides. La propuesta de aneuploidía en la cepa Downs de *H. capsulatum* por Carr y Shearer [15] se apoya en la presencia de dos copias de los genes de α - y β -tubulina; sin embargo esto no es una buena evidencia para

demostrar que cada copia de los genes se encuentre en cromosomas homólogos, por lo que la diploidía parcial o aneuploidía sugerida podrían ser cuestionadas.

Recientemente, por CHEF, aplicado a 19 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* procedentes de Argentina, México y Guatemala, así como a la cepa de referencia G-186B, se observó variabilidad en el polimorfismo del EK de este hongo, lográndose la resolución de cinco a siete bandas con tamaños moleculares en el intervalo de 1,1 a 11,2 Mb y tamaños genómicos de 22,8 a 38,7 Mb [14]. Asimismo, determinaron en la cepa G-186B un tamaño genómico de 22,8 Mb y la presencia de cinco cromosomas en un intervalo de 1,1 a 10,1 Mb. Tres aislamientos de México presentaron los cromosomas de mayor tamaño, de 11,1 y 11,2 Mb, y otros tres de pacientes argentinos con inmunosupresión revelaron siete bandas cromosómicas a semejanza de la cepa Downs; sin embargo, los autores sugieren estudios complementarios para confirmar el fenotipo Downs en los aislamientos con siete cromosomas [14].

Aunque los valores en número y tamaño de los cromosomas encontrados por Steele et al. [99] difieren de los reportados por Canteros et al. [14], estas discrepancias pueden ser explicadas por las distintas condiciones experimentales utilizadas. Tanto Steele et al. [99] como Carr y Shearer [15], establecieron que hay una importante variabilidad genómica en *H. capsulatum*, aunque se debe considerar que el número de cepas estudiadas por ambos grupos de investigación fue limitado a tres o cinco y que entre éstas estaban la cepas de referencia (Downs, G-217B y G-186B) más manipuladas a nivel experimental en todos los laboratorios de investigación que trabajan el modelo *H. capsulatum*. Mientras que Canteros et al. [14], confirman el CLP en *H. capsulatum* en un número considerable de aislamientos clínicos. Un hallazgo interesante en *H. capsulatum*, revelado tanto en el trabajo de Steele et al. [99] como en el de Canteros et al. [14], fue la presencia de pequeños cromosomas en el cariotipo de *H. capsulatum*. En el trabajo de Canteros et al. [14], éstos fueron detectados en el aislamiento de México EH-325 (1,3 Mb) además de la cepa virulenta G-186B (1,1 Mb), previamente reportado por Steele et al. [99]. Como la presencia de pequeños cromosomas está relacionada con cepas virulentas de diferentes especies de fitopatógenos [39,41], una asociación similar podría ser investigada en *H. capsulatum*.

La especie taxonómica *H. capsulatum* var. *capsulatum* agrupa especímenes con diversidad morfológica y fisiológica [6-8,12,23,28-30,36-38,51,56,73,78,89,92,108-110,119], así como con elevado polimorfismo genético, determinado por técnicas de biología molecular [16-19,46,48,52,53,87-89,93,97,98,103,105-107,115].

Esta gran diversidad fenotípica y genotípica apoya el concepto de que *H. capsulatum* es una especie críptica o un «complejo de especies» y cada especie es un clado que puede agrupar cepas con diferencias biológicas [105]. Sin embargo, aún queda por entender el origen de la diversidad observada en los diferentes clados propuestos para *H. capsulatum* y si estos clados se asocian a un EK específico.

La diversidad de este hongo se detecta tanto en el tamaño y número de cromosomas [14,15,99], como en la secuencia de algunos genes [49]. La explicación de la diversidad en el número cromosómico entre diferentes aislamientos de *H. capsulatum*, llevó a considerar a Carr y Shearer [15], que era poco probable que la cepa G-186AS hubiese perdido tres cromosomas para quedar con cuatro, ya que este evento podría haber sido letal para el hongo, por lo que estos autores consideraron más factible que la cepa Downs haya ganado cromosomas. La hibridación con sondas específicas no reveló secuencias redundantes en los siete cromosomas de la cepa Downs [99], por lo que esta

ausencia de copias podría sugerir que no hay cromosomas homólogos. Una explicación alternativa para justificar la diferencia en el número de cromosomas entre las cepas estudiadas por los distintos autores, sería la posible transferencia horizontal de genes (transposones), de segmentos cromosomales o de cromosomas completos entre especies fúngicas filogenéticamente cercanas y que cohabitan en el mismo ambiente, evento que ha sido descrito para otras especies fúngicas [66,90]. Otra explicación sería una probable reproducción de tipo sexual entre *H. capsulatum* y una especie filogenéticamente cercana que da origen a una cepa con las características de la Downs, cuya unión interespecífica resultaría en una posible alopoliploidía. Estos eventos han sido observados entre especies del género *Saccharomyces* [67].

Los estadios poliploide, aneuploide o alopoliploide en hongos, podrían modificar la regulación de genes causando alteración en la expresión de algunos de éstos, como sugiere Galitsky et al. [35]. Por lo que se sugiere que en la cepa Downs el mayor número de cromosomas podría perturbar la expresión de algunos genes, lo que explicaría su baja virulencia, termosensibilidad y prolongado tiempo de generación. Resulta interesante considerar que esta variabilidad genómica puede jugar un papel crítico en la evolución de esta especie.

Muchas de las interrogantes sobre la complejidad genómica de este hongo están en vías de ser esclarecidas, con el advenimiento de las nuevas estrategias genómicas. En la actualidad, en el Centro de Secuenciación del Genoma, en EE.UU., se puede consultar la información disponible sobre la secuenciación y mapeo genómico de *H. capsulatum* (<http://genome.wustl.edu/projects/hcapsulatum/index.php>). La secuencia completa del genoma de *H. capsulatum* se está determinando en la cepa G-217B, sin embargo, por la naturaleza compleja del genoma de este patógeno, se requiere que la secuencia de diferentes aislamientos sean comparados. En este sentido, la secuenciación parcial de la cepa G-186AR de virulencia diferente a la G-217B, está en proceso.

Adicional a la genómica estructural, el análisis de la genómica funcional de *H. capsulatum* también está en proceso. Mediante microarreglo, hasta la fecha se han obtenido al azar 10,000 fragmentos de ADN, de 0,5 a 2 Kb, amplificados por PCR. Estos fragmentos han sido utilizados para comparar los perfiles de expresión de genes de la fase micelial con los de la fase levaduriforme [44]. Además, estos fragmentos también han sido utilizados para analizar los perfiles de expresión de genes de las levaduras después de su fagocitosis por macrófagos no activados y asimismo, durante la respuesta de estrés al óxido nítrico [64].

Con base en esta gran diversidad genómica, resulta difícil comparar la virulencia entre las cepas de referencia del hongo con aislamientos de distintas procedencias, principalmente al considerar la asociación multifactorial de la virulencia, además de las características inherentes del huésped parasitado. Aunque la genómica de las cepas de referencia G-217B y G-186AR sean muy útiles, la constante búsqueda y comparación con nuevos aislamientos o con especies filogenéticas afines, debe ser el marco de referencia para agrupar especímenes de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Futuros estudios son necesarios para entender la relación entre EK, CLP y la patogenia del hongo.

Los estudios relacionados al genoma de las especies de hongos patógenos de humanos han empezado a arrojar información importante, aunque el número de aislamientos estudiados es pequeño. Un resumen de los hallazgos genómicos más trascendentes en los hongos revisados en este trabajo se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Datos genómicos de algunos hongos patógenos de humanos.

Hongos	Nº de aislamientos	Ploidía / Tamaño genómico (Mb)	No / Intervalo de tamaño de cromosomas (Mb)	Referencias
<i>Candida albicans</i>		ND / 14	4-7 / ND	[24]
	4	2n / ND		[82]
	16	2n / ND		[116]
	27	n / ND	8 / 0,42-3	[45,117]
	2	n / 16-17		[20,63]
	78	ND / ND	6-13 / 1,1-2,9	[3]
<i>Candida glabrata</i>	21	ND / ND	6-12 / 0,4-2,4	[3]
<i>Coccidioides immitis</i>	12	2n / 28,2	3-4 / 3,2-11,5	[83]
<i>Histoplasma capsulatum</i>	5	ND / ND	3-7 / 0,5-5,7	[99]
	3	ND / 24-32		[15]
	20	ND / 22,8-38,7	5-7 / 1,1-11,2	[14]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	8	n / 30	4-5 / 3,2-10	[77]
	12	ND / 29,7-31,3	5 / 3,2-10	[76]
	2	2n / 45,7-60,9	4 / 2-10	[13]
	12	n / 2n / 25,8-73,6	4-5 / 2,5-9,5	[31]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	ND / 15,8	5 / 1,7-4,8	[112]
	2	ND / ND	4 / ND	[1]
<i>Sporothrix schenckii</i>	8	ND / 28	6-8 / ND	[104]
	7	2n / 45		[2,113]
<i>Pneumocystis carinii</i>		n / 2n / 8	13-15 / 0,3-0,7	[96,100]
<i>Pneumocystis jirovecii</i>		n / 8,4	10-12 / 0,3-0,7	[42,96]
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	7	ND / 15-17	10-12 / ND	[84]
	11	ND / ND	8 / 0,58-1,6	[86]
	51	ND / ND	10-13 / ND	[33]
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	6	ND / ND	9 / 0,58-1,6	[86]

ND: no determinado.

Bibliografía

- Amaar YG, Moore MM. Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 1998; 33: 206-215.
- Arenas-López A. Estudio biológico del dimorfismo de *Sporothrix schenckii*. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas (Micología). México DF, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.
- Asakura K, Iwaguchi S, Homma M, Suquia T, Higashide K, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 2531-2538.
- Bawdon RE, Garrison RG, Fina LR. Deoxyribonucleic acid base composition of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol* 1972; 11: 593-596.
- Beadle J, Wright M, McNeely L, Bennett JW. Electrophoretic karyotype analysis in fungi. *Adv Appl Microbiol* 2003; 53: 243-269.
- Berliner MD. Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*. I. Macro and micro morphology of the mycelial phase. *Sabouraudia* 1968; 6: 111-118.
- Berliner MD. *Histoplasma capsulatum*: vital staining for the differentiation of the albino and brown phenotypes *in vitro*. *Sabouraudia* 1973; 11: 271-273.
- Berliner MD, Biundo N Jr. Effects of continuous light and total darkness on cultures of *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia* 1973; 11: 48-51.
- Birren B, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide. San Diego, Academic Press, 1993.
- Brasier C. The rise of the hybrid fungi. *Nature* 2000; 405: 134-135.
- Calvo BM, Colombo AL, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera M, Telles F, Fukushima K, Nishimura K, Tanaka K, Myajy M, Moretti-Branchini ML. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2348-2350.
- Campbell CC, Berliner MD. Virulence differences in mice of type A and B *Histoplasma capsulatum* yeasts grown in continuous light and total darkness. *Infect Immun* 1973; 8: 677-678.
- Cano MIN, Cisalpino PS, Galindo I, Ramírez JL, Mortara RA, Franco da Silveira J. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 742-747.
- Canteros C, Zuiani MF, Perrotta D, Reyes-Montes MR, Granados J, Zuñiga G, Taylor ML, Davel G. Cariotipos electroforéticos de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum*. IV Congreso Virtual de Micología «Hongos Patógenos en América Latina». <http://congresomicologia.uvc.ve>, 2003.
- Carr J, Shearer G Jr. Genome size, complexity and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol* 1998; 180: 6697-6703.
- Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* 1997; 18: 1047-1053.
- Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombinant population structure. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2577-2584.
- Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genet Biol* 2001; 34: 37-48.
- Chávez-Tapia C, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 1998; 11: 187-191.
- Chu WS, Magee BB, Magee PT. Construction of an *SfiI* macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* 1993; 175: 6637-6651.
- Cogliati M, Esposito MC, Clarke DL, Wickes BL, Viviani MA. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3889-3894.
- Covert SF. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr Genet* 1998; 33: 311-319.
- Daniels LS, Berliner MD, Campbell CC. Varying virulence in rabbits infected with different filamentous types of *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol* 1968; 96: 1535-1539.

24. De Jonge P, de Jongh FC, Meijers R, Steensma HY, Scheffers WA. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. *Yeast* 1986; 2: 193-204.
25. Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, Guillot J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2126-2133.
26. Dewar K, Bernier L, Levesque RC. Electrophoretic karyotyping in fungi. En: Birren B, Lai E (Eds.). Non-mammalian genomic analysis. A practical guide. New York, Academic Press, 1996: 25-60.
27. Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanaka K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 2243-2251.
28. Domer JE. Monosaccharide and chitin content of the cell wall of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol* 1971; 107: 870-877.
29. Eissenberg LG, Goldman WE. The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. *Baillière's Clin Infect Dis* 1994; 1: 265-283.
30. Eissenberg LG, Poirier S, Goldman WE. Phenotypic variation and persistence of *Histoplasma capsulatum* yeasts in host cells. *Infect Immun* 1996; 64: 5310-5314.
31. Feitosa dos SL, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Morais FV, Puccia R, Franco da Silveira J, Camargo ZP. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 2003; 39: 60-69.
32. Fierro F, Martin JF. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 1-17.
33. Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, Casadevall A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2243-2251.
34. Fries BC, Chen F, Currie BP, Casadevall A. Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1531-1534.
35. Galitsky T, Saldanha AJ, Styles CA, Lander ES, Fink GR. Ploidy regulation of gene expression. *Science* 1999; 285: 251-254.
36. Gass M, Kobayashi GS. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch Dermatol* 1969; 100: 724-727.
37. Gaur PK, Lichtwardt RW, Hamrick JL. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Exp Mycol* 1981; 5: 69-77.
38. Hamrick JL, Lichtwardt RW, Lan C. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Trans Kans Acad Sci* 1986; 89: 49-56.
39. Han Y, Liu X, Benny U, Kistler HC, VanEtten HD. Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J* 2001; 25: 305-314.
40. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy: Incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 167-175.
41. Hatta R, Ito K, Hosaki Y, Tanaka T, Tanaka A, Yamamoto M, Akimitsu K, Tsuge T. A conditionally dispensable chromosome control host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 2002; 161: 59-70.
42. Hong ST, Steele PE, Cushion MT, Walzer PD, Stringer SL, Stringer JR. *Pneumocystis carinii* karyotypes. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1785-1795.
43. Hutter KJ, Eipel HE. Microbial determinations by flow cytometry. *J Gen Microbiol* 1979; 113: 369-375.
44. Hwang L, Hocking-Murray D, Bahrami AK, Andersson M, Rine J, Sil A. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2314-2326.
45. Iwaguchi S, Homma M, Tanaka K. Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 2433-2442.
46. Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, Lee C-H. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 241-245.
47. Jones RN, Rees H. B chromosomes. New York, Academic Press, 1982.
48. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 653-663.
49. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 2003; 12: 3383-3401.
50. Kaufmann CS, Merz WG. Electrophoretic karyotypes of *Torulopsis glabrata*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2165-2168.
51. Kaufman L, Blumer S. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J Bacteriol* 1966; 91: 1434-1439.
52. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2104-2107.
53. Kersulyte D, Wood JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol* 1992; 174: 7075-7079.
54. Kistler HC, Miao VPW. News modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* 1992; 30: 131-152.
55. Klepser ME, Pfaller MA. Variation in electrophoretic karyotype and antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a university-affiliated teaching hospital from 1987 to 1994. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3653-3656.
56. Kügler S, Sebghati TS, Eissenberg LG, Goldman WE. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *PNAS* 2000; 97: 8794-8798.
57. Kwon-Chung KJ. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 1972; 175: 326.
58. Kwon-Chung KJ. *Emmonsella capsulata*: perfect state of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 1972; 177: 368-369.
59. Leitch IJ, Bennett DM. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plants Sci* 1997; 2: 470-476.
60. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun* 2001; 69: 115-122.
61. Magee BB, Koltin Y, Gorman JA, Magee PT. Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4721-4726.
62. Magee BB, Magee PT. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J Gen Microbiol* 1987; 133: 425-430.
63. Magee PT. Variations in chromosome size and organization in *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *Trends Microbiol* 1993; 1: 338-342.
64. Magee PT, Gale C, Berman J, Davis D. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect Immun* 2003; 71: 2299-2309.
65. Mahrous M, Lott TJ, Meyer SA, Sawant AD, Ahearn DG. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 876-881.
66. Marinoni G, Manuel M, Petersen RF, Hvidtfeldt J, Sulo P, Piskur J. Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J Bacteriol* 1999; 181: 6488-6496.
67. Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, Dubourdieu D. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3887-3892.
68. Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 1994; 264: 421-424.
69. Matzke MA, Scheid-Mittelsten O, Matzke AJM. Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *BioEssays* 1999; 21: 761-767.
70. Maule J. Pulsed field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol* 1998; 9: 107-126.
71. Mazars E, Dei-Cas E. Epidemiological and taxonomic impact of *Pneumocystis* biodiversity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 75-80.
72. McGinnis MR, Katz B. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsella*. *Mycotaxon* 1979; 8: 157-164.
73. Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* 1986; 78: 1638-1647.
74. Merz WG, Connelly C, Hieter P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 842-845.
75. Monod M, Porchet S, Baudraz-Rosselet F, Frenk E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J Med Microbiol* 1990; 32: 123-129.
76. Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1999; 37: 219-222.
77. Montoya AE, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 1997; 21: 223-227.
78. Morris PR, Terreni AA, DiSalvo F. Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 231-233.
79. Muntzing A. Accessory chromosomes in *Poa alpina*. *Heredity* 1948; 2: 49-61.
80. Naumov GI, Naumova ES, Schnurer J. Genetic characterization of the nonconventional yeast *Hansenula anomala*. *Res Microbiol* 2001; 152: 551-562.

81. Ohno S. Evolution by gene duplication. Heilderberg, Springer-Verlag, 1970.
82. Olaiya AF, Sogin SJ. Ploidy determination of *Candida albicans*. J Bacteriol 1979; 140: 1043-1049.
83. Pan S, Cole GT. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. Infect Immun 1992; 60: 4872-4880.
84. Perfect JR, Magee BB, Magee PT. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. Infect Immun 1989; 57: 2624-2627.
85. Perrotta D, Rodero L, Demkura H, Canteros C, Davel G. Cariotipos electroforéticos y análisis de fragmentos de restricción de ADN genómico: su utilidad como herramienta en estudios epidemiológicos de *Candida parapsilosis*. Rev Argent Microbiol 2002; 34: 29-39.
86. Polacheck I, Lebens GA. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. J Gen Microbiol 1989; 135: 65-71.
87. Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazaka K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. J Clin Microbiol 1998; 36: 3073-3076.
88. Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. Rev Inst Nat Enf Resp Mex 1998; 11: 195-201.
89. Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. J Clin Microbiol 1999; 37: 1404-1408.
90. Rosewich UL, Kistler HC. Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. Annu Rev Phytopathol 2000; 38: 325-363.
91. Rustchenko EP, Howard DH, Sherman F. Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. J Bacteriol 1994; 176: 3231-3241.
92. Sahaza J, Reyes-Montes MR, Canteros C, Taylor ML. Termosensibilidad y tiempo de generación como marcadores de fenotipificación de aislamientos de *Histoplasma capsulatum*. IV Congreso Virtual de Micología «Hongos Patógenos en América Latina». <http://congresomicologia.uvc.ve>, 2003.
93. Salas-Ríos MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML. Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Rev Inst Nat Enf Resp Méx 1998; 11: 202-207.
94. Schwartz W, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 1984; 37: 67-75.
95. Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. J Clin Microbiol 2001; 39: 1258-1263.
96. Smulian AG. *Pneumocystis carinii*: genetic diversity and cell biology. Fungal Genet Biol 2001; 34: 145-154.
97. Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Infect Dis 1990; 162: 258-261.
98. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 1989; 57: 1409-1412.
99. Steele PE, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. Mol Cel Biol 1989; 9: 983-987.
100. Stringer JR, Cushion MT. The genome of *Pneumocystis carinii*. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 22: 15-26.
101. Stringer SL, Hudson K, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT, Stringer JR. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. J Protozool 1989; 36: 14S-16S.
102. Sukroongreung S, Lim S, Santimavanich S, Eampokalap B, Carter D, Nilakul C, Kulkeratiyut S, Tansuphaswadiikul S. Phenotypic switching and genetic diversity of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 2001; 39: 2060-2064.
103. Tamura M, Kasuga T, Watanabe K, Katsu M, Mikami Y, Nishimura K. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS regions sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. Jpn J Med Mycol 2002; 43: 11-19.
104. Tateishi T, Murayama SY, Otsuka F, Yamaguchi H. Karyotyping by PFGE of clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 13: 147-154.
105. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetic underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 126-146.
106. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fungal Genet Biol 2000; 30: 207-212.
107. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. En: Mojan RM, Benedik M (Eds.) Research Advances in Microbiology. Kerala (India). Global Research Network, 2000; 29-35.
108. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. Ciencia y Desarrollo 1997; 23: 58-63.
109. Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. Catálogo de Cepas de «*Histoplasma capsulatum*». México DF, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
110. Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Romero-Martínez R. Diversidad de cepas de *Histoplasma capsulatum*. En: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F (Eds.) Actualidades de Micología Médica. IV Diplomado de Micología Médica. México DF, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002; 275-284.
111. Thrash-Bingham C, Gorman JA. DNA translocations contribute to chromosome length polymorphism in *Candida albicans*. Curr Genet 1992; 22: 93-100.
112. Tobin MB, Peery RB, Skatrud PL. An electrophoretic molecular karyotype of a clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* and localization of the MDR-like genes AfuMDR1 and AfuMDR2. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29: 67-71.
113. Torres-Guerrero H. Ploidy study in *Sporothrix schenckii*. Fungal Genet Biol 1999; 27: 49-54.
114. Ul Haque A, Plattner SB, Cook RT, Hart MN. *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as viewed by electron microscopy. Am J Clin Pathol 1987; 87: 504-510.
115. Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. J Bacteriol 1986; 165: 813-818.
116. Whelan WL, Magee PT. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. J Bacteriol 1981; 145: 896-903.
117. Wickes B, Staudinger J, Magee BB, Kwong-Chung KJ, Magee PT, Scherer S. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: Several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. Infect Immun 1991; 59: 2480-2484.
118. Wong S, Butler G, Wolfe KH. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. PNAS 2002; 99: 9272-9277.
119. Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics pathogenesis, and responsiveness to its environment. Fungal Genet Biol 2002; 35: 81-97.
120. Zolan ME. Chromosome-length polymorphism in fungi. Microbiol Rev 1995; 59: 686-698.