

Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología**

**Modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp. en Baja
California.**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Pamela Ocampo Chavira

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Pamela Ocampo Chavira

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. María Clara Arteaga Uribe

Dr. Alejandro Hinojosa Corona

Dr. Raúl Cuauhtémoc Baptista Rosas



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la vida.

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Pamela Ocampo Chavira © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Pamela Ocampo Chavira** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp. en Baja California.

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director de tesis

La coccidioidomycosis, también conocida como la fiebre del valle de San Joaquín, es una micosis pulmonar, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años en las áreas endémicas de California y Arizona donde su registro epidemiológico es obligatorio. Esta enfermedad es causada por especies fúngicas pertenecientes al género *Coccidioides* y afecta a mamíferos incluyendo al humano. La detección del hongo a partir de muestras ambientales resulta una tarea difícil en parte, porque no se cuenta con suficiente información respecto a su nicho ecológico para poder llevar a cabo muestreos dirigidos. Se ha sugerido a los roedores como posibles reservorios, sin embargo su distribución no se ha tomado en cuenta para modelar la distribución potencial del hongo. En este trabajo se propone modelar la distribución potencial de *Coccidioides* spp. en los estados de Baja California, en México, y Arizona y California, en Estados Unidos, mediante modelos de nicho ecológico y sistemas de información geográfica, tomando en cuenta la distribución potencial de *Chaetodipus fallax* (ratón de abazones de San Diego), *Dipodomys simulans* (rata canguro de dulzura), *Neotoma lepida* (rata cambalachera desértica) y *Peromyscus maniculatus* (ratón ciervo), así como variables bioclimáticas y de suelo. Se utilizó el algoritmo *Maxent* para modelar la distribución potencial de *Coccidioides* spp. y se incorporó la distribución potencial de roedores siguiendo dos metodologías diferentes. Los resultados indican que la distribución potencial de al menos las cuatro especies de roedores no tiene mayor efecto sobre la distribución del hongo y sugieren que no existe una relación biológica específica entre especies. En comparación con un modelo de distribución potencial obtenido anteriormente utilizando el algoritmo *GARP*, el modelo generado en este trabajo propone áreas idóneas de presencia de *Coccidioides* spp. más restringidas. Esto supondría una gran ventaja ya que reduciría el área de estudio para llevar a cabo muestreos dirigidos.

Palabras clave: *Coccidioides* spp., *Chaetodipus fallax*, *Dipodomys simulans*, *Neotoma lepida*, *Peromyscus maniculatus*, modelación de nicho ecológico, variables biológicas, *Maxent*.

Abstract of the thesis presented by **Pamela Ocampo Chavira** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Microbiology.

Potential distribution models of *Coccidioides* spp. in Baja California.

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

Valley Fever is a mycosis, whose incidence has increased in the last years in the endemic regions of California and Arizona. The disease is caused by *Coccidioides* spp. and it affects mainly mammals, including humans. The detection of *Coccidioides* spp. from soil samples has been challenging, mostly because we lack information about its ecological niche, which makes it very difficult to perform directed sampling. It has been suggested that rodents act as reservoirs for the fungus; yet, rodent distribution has not been taken into account in previous models of the potential distribution of *Coccidioides*. Hence the main goal of this work was to include the potential distribution of *Chaetodipus fallax* (San Diego pocket mouse), *Dipodomys simulans* (Dulzura kangaroo rat), *Neotoma lepida* (Desert woodrat) and *Peromyscus maniculatus* (Deer mouse), as well as bioclimatic and soil variables, to model using Maxent and GIS the potential distribution of *Coccidioides* in the endemic states of Baja California in Mexico, and California and Arizona in the United States. Results obtained when using only abiotic variables showed that, when overlapping a map for California and Arizona showing counties with reported cases of Valley Fever, a good match between high probability of habitat suitability predicted by the model and counties with the highest incidence of the disease was obtained. In comparison with GARP generated models, in the model generated here with Maxent, the habitat suitability regions appeared more delimited, thus minimizing the area to carry out directed soil sampling. No apparent differences were observed when both abiotic and biotic variables were used, suggesting that the four species of rodents do not have a great influence in restricting the geographic range of *Coccidioides* potential occurrence, and that those rodent species probably do not have a species-specific relationship with *Coccidioides*.

Keywords: *Coccidioides* spp., *Chaetodipus fallax*, *Dipodomys simulans*, *Neotoma lepida*, *Peromyscus maniculatus*, ecological niche modeling, biological variables, Maxent.

Dedicatoria

A mis dos grandes amores, mis Rodrigos

Agradecimientos

Agradezco a CICESE y al Posgrado de Ciencias de la Vida por darme la oportunidad de iniciar y concluir mis estudios de posgrado, así como el apoyo financiero en estos últimos meses. A CONACyT por otorgarme una beca de manutención (#340010) por 2 años.

Gracias a la Dra. María Clara Arteaga, Dr. Alejandro Hinojosa y Dr. Raúl Baptista por su valiosa contribución a este proyecto y por dedicar un espacio para escuchar avances y revisar mi trabajo.

A la Dra. Meritxell Riquelme, por darme la oportunidad de seguir con este interesante tema de investigación. Es admirable y se aprecia el tiempo que nos dedica a cada uno de sus estudiantes a pesar de tener una agenda apretada.

A mis compañeros de campo Raquel y Guillermo, mil gracias!, me quedan asoleadas y momentos que recordar, algunos buenos y otros no tanto... toda una aventura! Raquelina, también gracias por ser mi revisora de redacción.

Anayatzin, Adria, Lluvia, Leo, Raquel, Mari, Arianne, Fausto, Iván y Hector, por tantos momentos de risas, comida, chismes y por convertirse en mi segunda familia estos 2 años, Gracias!!!

Gracias Ernesto Ortiz por darme un tiempito y ayudarme con matlab. También a Melissa Corral y Adriana Mejía por su apoyo en trámites, recolección de firmas y demás.

NADia! mi querida NADia!, gracias infinitas por tu tiempo, por tus consejos y por tu amistad.

Mis amigas del alma Naty, Erika, Elizabeth y Fer, las amo!

A mis papás, mis grandes ejemplos a seguir. Gracias Ma, por siempre buscar la manera de ayudarme en todo y Pa, que estando aquí o en el otro lado del mundo siempre buscas la manera de estar siempre pendiente. Bonnie y Paco los adoro! A todos gracias por todo su apoyo y amor incondicional.

A mis Rodrigos, gracias infinitas por su amor, apoyo y comprensión. Aprovecho para disculparme por las ocasiones en que llegaba a casa como la estudiante, con pendientes y mil cosas en la cabeza en lugar de la esposa y madre. Gracias amor por los momentos de felicidad y aliento.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Ciclo biológico de <i>Coccidioides</i> spp.....	1
1.2 Incidencia y aislados clínicos vs ambientales.....	2
1.3 Factores bióticos y abióticos que influyen en el desarrollo de <i>Coccidioides</i> spp.	4
1.4 Modelos de nicho ecológico (MNE) como herramienta para conocer la distribución potencial de una especie.....	4
1.5 Características topográficas y su influencia en microclimas	6
Capítulo 2. Antecedentes.....	7
2.1 Modelo de nicho ecológico de <i>Coccidioides</i> spp.	7
2.2 <i>Coccidioides</i> spp. y roedores	7
Capítulo 3. Justificación	9
Capítulo 4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos particulares.....	10
Capítulo 5. Hipótesis.....	11
Capítulo 6. Metodología	12
6.1 Recopilación y procesamiento de datos de entrada	12
6.1.2 Variables ambientales.....	12
6.1.3 Puntos de ocurrencia	14
6.2 Selección de variables.....	14
6.3 Modelos de distribución potencial	16

6.3.1 Evaluación de modelos	16
6.4 Traslape de Modelos de distribución potencial	18
6.5 MNE de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando la distribución potencial de roedores como variables bióticas	19
6.6 Aspectos topográficos en las zonas idóneas para <i>Coccidioides</i>	19
6.7 Sitios de muestreo	20
6.7.1 Muestreo	22
6.8 Extracción y purificación de DNA a partir de muestras de suelo	23
6.9 Detección molecular de <i>Coccidioides</i> por PCR anidada	23
7. Resultados	25
7.1 Procesamiento de las variables ambientales y puntos de ocurrencia.....	25
7.2 Modelos de distribución potencial utilizando variables abióticas	28
7.2.1 <i>Coccidioides</i> spp.	28
7.2.2 <i>Chaetodipus fallax</i> (Ratón de abazones de San Diego).....	31
7.2.3 <i>Dipodomys simulans</i> (Rata canguro de dulzura)	32
7.2.4 <i>Neotoma lepida</i> (Rata cambalachera desértica)	34
7.2.5 <i>Peromyscus maniculatus</i> (Ratón ciervo)	35
7.3 Traslape de modelos de distribución potencial	37
7.4 Modelo de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando la distribución potencial de roedores como variables bióticas.....	38
7.5 Topografía en las zonas idóneas para <i>Coccidioides</i> spp.....	41
7.6 Detección molecular de <i>Coccidioides</i> spp.	43
7.6.1 Extracción y purificación de DNA genómico.....	43
7.6.2 Amplificación de las regiones ITS e ITS1 del rDNA	44
Capítulo 8. Discusión	46
8.1 Criterios de selección de variables ambientales iniciales y puntos de ocurrencia.....	46
8.2 AUC en modelos de distribución potencial	47
8.3 Comparación de modelos de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp.	47
8.4 Traslape de modelos de distribución potencial	49
8.5 Comparación de MNE utilizando GARP y Maxent	51
8.6 Topografía	54
8.7 Detección molecular	54

Capítulo 9. Conclusiones.....	56
Literatura citada	57
Anexos.....	61

Lista de figuras

Figura 1. Zonas endémicas de coccidioidomicosis.....	1
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Coccidioides</i> spp.	2
Figura 3. Interpretación de la curva ROC.	17
Figura 4. Sitios de muestreo seleccionados	21
Figura 5. Acercamiento al mapa de sitios de muestreo.....	22
Figura 6. Recolección de muestras.....	23
Figura 7. Procesamiento de variables ambientales.....	25
Figura 8. Puntos de ocurrencia de <i>Coccidioides</i> spp.....	26
Figura 9. Puntos de ocurrencia de <i>C. fallax</i>	26
Figura 10. Puntos de ocurrencia de <i>D. simulans</i>	27
Figura 11. Puntos de ocurrencia de <i>N. lepida</i>	27
Figura 12. Puntos de ocurrencia de <i>P. maniculatus</i>	28
Figura 13. Modelo de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando variables abióticas.....	29
Figura 14. Acercamiento a la región Noroeste de BC. del modelo de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando variables abióticas.....	30
Figura 15. Evaluación del modelo de distribución potencial para <i>Coccidioides</i> spp. utilizando variables abióticas.....	30
Figura 16. Modelo de distribución potencial de <i>C. fallax</i> , utilizando variables abióticas.....	31
Figura 17. Evaluación del modelo de distribución potencial para <i>C. fallax</i> utilizando variables abióticas.....	32
Figura 18. Modelo de distribución potencial de <i>D. simulans</i> , utilizando variables abióticas.....	33
Figura 19. Evaluación del modelo de distribución potencial para <i>D. simulans</i> utilizando variables abióticas.	33
Figura 20. Modelo de distribución potencial de <i>N. lepida</i> , utilizando variables abióticas.....	34
Figura 21. Evaluación del modelo de distribución potencial para <i>N. lepida</i> utilizando variables abióticas.....	35
Figura 22. Modelo de distribución potencial de <i>P. maniculatus</i> , utilizando variables abióticas.....	36

Figura 23. Evaluación del modelo de distribución potencial de <i>P. maniculatus</i>	36
Figura 24. Traslape de modelos de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp., <i>C. fallax</i> , <i>D. simulans</i> , <i>N. lepida</i> , y <i>P. maniculatus</i>	37
Figura 25. Acercamiento a la región Noroeste de BC del traslape de modelos de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp., <i>C. fallax</i> , <i>D. simulans</i> , <i>N. lepida</i> , y <i>P. maniculatus</i>	38
Figura 26. Modelo de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando variables bióticas y abióticas.	39
Figura 27. Acercamiento del modelo de distribución potencial de <i>Coccidioides</i> spp. utilizando variables bióticas y abióticas.....	40
Figura 28. Evaluación del MNE de <i>Coccidioides</i> spp. que incluye variables bióticas.....	40
Figura 29. Mapa de la orientación de pendientes del terreno dentro de las zonas predichas como idóneas para <i>Coccidioides</i> spp. según el MNE que incluye variables abióticas.....	41
Figura 30. Histograma de pendientes dentro de zonas idóneas para <i>Coccidioides</i> spp.	42
Figura 31. Amplificación de la región ITS de rDNA.....	45
Figura 32. Amplificación de la región ITS1 de rDNA.	45
Figura 33. Comparación espacial de zonas idóneas para <i>Coccidioides</i> spp. según ambos MNE.....	48
Figura 34. Ocurrencia de roedores a nivel taxonómico de género.....	50
Figura 35. Mapa de traslape de MNE de <i>Coccidioides</i> spp. <i>C. fallax</i> , <i>D. simulans</i> , <i>N. lepida</i> , y <i>P. maniculatus</i>	51
Figura 36. Comparación visual de MNE generados por GARP y Maxent.	52
Figura 37. Condados con el mayor número promedio de casos reportados por cada 100,000 habitantes en los años 2008 – 2014).	53

Lista de tablas

Tabla 1. Variables bioclimáticas de <i>Worldclim</i>	12
Tabla 2. Características de suelo utilizadas para la elaboración de las capas de calidad de suelo.....	13
Tabla 3. Variables de mayor importancia para cada especie según la prueba Jackknife.....	15
Tabla 4. Variables ambientales utilizadas para la construcción de los MNE de <i>Coccidioides</i> spp., <i>C. fallax</i> , <i>D. simulans</i> , <i>N. lepida</i> , y <i>P. maniculatus</i>	15
Tabla 5. Índices cualitativos para la evaluación del AUC de la ROC.....	17
Tabla 6. Valor de umbral para la transformación de mapas continuos a binarios.	18
Tabla 7. Área de la zona idónea para <i>Coccidioides</i> spp. en función a su grado de inclinación.....	42
Tabla 8. Concentración de DNA total extraído a partir de muestras del sitio negativo Ojos Negros y los sitios positivos El Centinela y Sierra Cucapah.....	43
Tabla 9. Concentración de DNA total extraído a partir de muestras del sitio negativo Traslape – 0 y sitios positivos Traslape +1 y Traslape +2.....	44
Tabla 10. Áreas de las zonas de idoneidad.....	48
Tabla 11. Hotspots de <i>Coccidioides</i> incluyendo variables abióticas y una especie de roedor.....	49
Tabla 12. Casos de coccidioidomycosis por condado.....	53

Capítulo 1. Introducción

La coccidioidomicosis (CM), también conocida como fiebre del valle, es una enfermedad micótica endémica de zonas áridas y semi-áridas, exclusiva del continente americano (Figura 1) (Nguyen *et al.*, 2013). Aunque se han reportado casos de CM en Europa y Asia, la mayoría corresponden a viajeros que contrajeron la enfermedad en América (Kantarcioglu *et al.*, 2014; Chen, 1991). Esta micosis afecta a mamíferos incluyendo al humano y es causada por los hongos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*, que hasta el momento representan las únicas especies conocidas del género *Coccidioides* (Nguyen *et al.*, 2013).

Con base en la alta prevalencia de CM, se consideran zonas endémicas de mayor importancia el sur de California y Arizona, en Estados Unidos, y los estados de Sonora, Nuevo León, Coahuila y Baja California, en México (Baptista-Rosas & Riquelme, 2007).

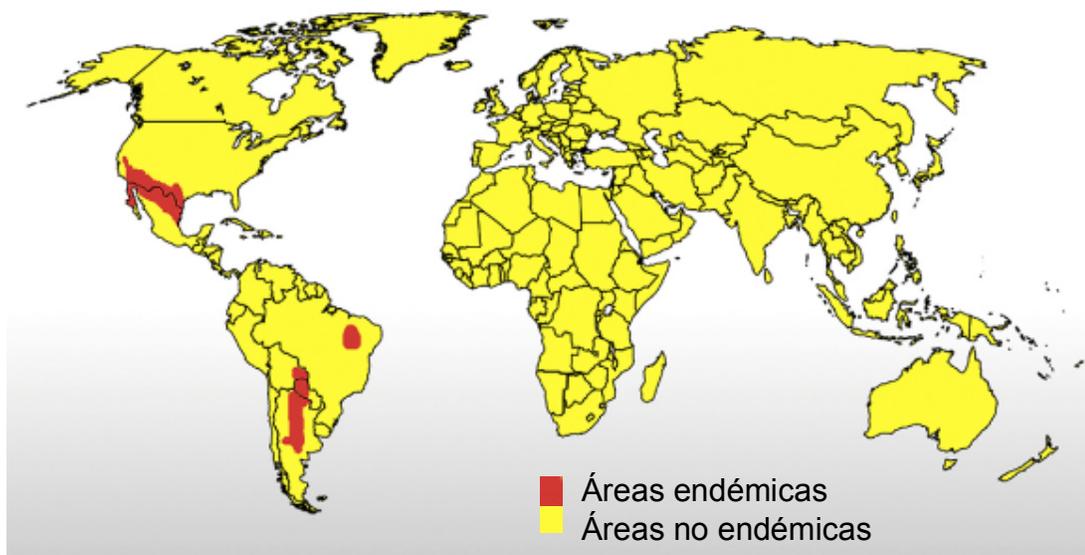


Figura 1. Zonas endémicas de coccidioidomicosis. Modificado de Hector & Laniado, 2005.

1.1 Ciclo biológico de *Coccidioides* spp.

Coccidioides es un hongo dimórfico, cuya fase saprobia se desarrolla en el suelo, donde presenta un crecimiento micelial y forma artroconidios; estas esporas representan la parte infectiva del ciclo, ya que son diseminadas por el viento, pudiendo ser inhaladas por un hospedero, y bajo condiciones

elevadas de CO₂ y temperatura de 37°C puede iniciar la fase parasítica dentro de los pulmones del hospedero (Figura 2). Allí, los arthroconidios se diferencian en esférulas, mismas que al madurar forman endosporas en su interior, y a su vez al romperse, cada endospora puede formar una esférula nueva (Cole & Sun, 1985). En una ruta alterna el hongo puede ser adquirido por roedores, los cuales no sufren la enfermedad a pesar de retener esférulas viables pero inactivas. Así, cuando el roedor envejece y muere, el hongo puede reactivarse y colonizar el ambiente dentro de la madriguera, ya que esta provee las condiciones favorables para su crecimiento, tales como humedad, temperatura relativamente estable, nutrientes en forma de residuos nitrogenados, heces y otras proteínas derivados del roedor (Nguyen *et al.*, 2013)

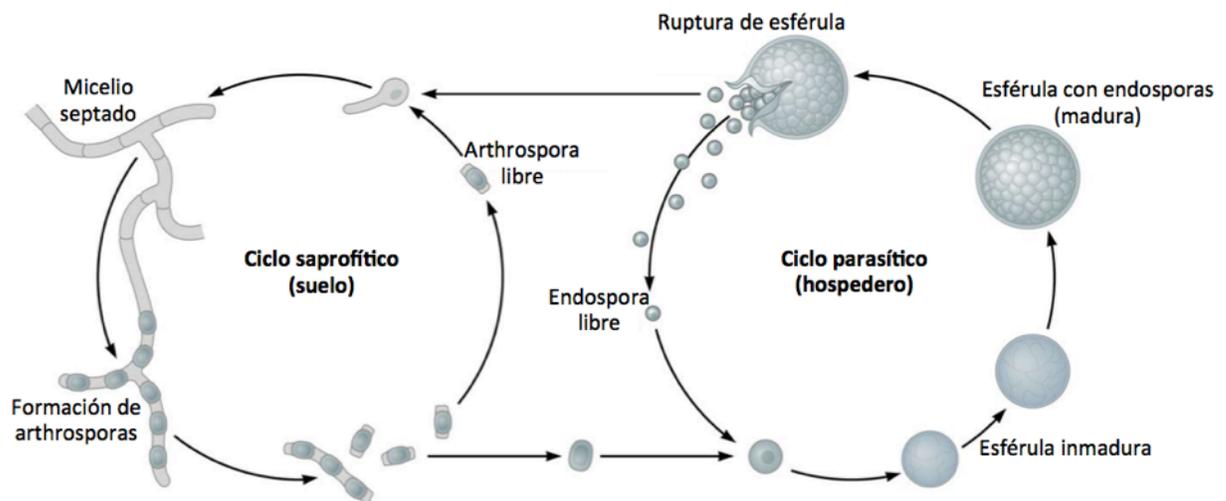


Figura 2. Ciclo de vida de *Coccidioides* spp. Modificado de Nguyen *et al.*, 2013.

1.2 Incidencia y aislados clínicos vs ambientales

Se consideran enfermedades infecciosas emergentes aquellas nuevas en una población o que ya existen, pero cuya incidencia o rango geográfico ha incrementado rápidamente (Kirkland & Fierer, 1996). Este es el caso de la CM. En los últimos años el número de casos ha incrementado considerablemente en California y Arizona (Hector *et al.*, 2011). En el periodo de 2001 a 2010, el departamento de salud de California reportó un incremento en la incidencia de CM de 4.3 a 11.6 casos por cada 100,000 habitantes y en Arizona de 12 a 58.2 casos (Garcia-Garcia *et al.*, 2014). Uno de los primeros estudios sobre casos de

CM adquirida por soldados en campos de entrenamiento del Valle de San Joaquín, California durante la segunda guerra mundial, reportó desde casos asintomáticos, hasta casos con lesiones cutáneas tipo eritema nodoso (Smith & Beard, 1946), las cuales se caracterizan como nódulos dolorosos de color rojo en la piel. Alrededor del 60% de los individuos afectados por CM no presentan síntomas, el 40% presentan principalmente manifestaciones pulmonares y en menor porcentaje (del 1% al 5%) la enfermedad es diseminada afectando cualquier órgano, aunque se ha reportado con mayor prevalencia en la piel, en el sistema nervioso central y en el sistema músculo-esquelético (García-García *et al.*, 2014).

En México, según la información epidemiológica previa al año 1994, se estimaron más de 1,500 casos de CM pulmonar anuales y 15 casos de micosis diseminada fuera de los pulmones (Baptista-Rosas *et al.*, 2007). Actualmente se carece de datos epidemiológicos de CM, ya que desde 1995 esta enfermedad fue excluida del informe para el registro epidemiológico nacional, por lo que su reporte dejó de ser de carácter obligatorio (Baptista-Rosas & Riquelme, 2007).

A pesar del aumento en la incidencia de esta enfermedad y de su interés debido al impacto en la salud pública, se conoce muy poco sobre el ambiente donde se desarrolla *Coccidioides* spp. (Barker *et al.*, 2012). Los aislados ambientales de *Coccidioides* spp. han sido muy escasos en contraste con los aislados clínicos; esto podría deberse a la falta de muestreos dirigidos como resultado de la poca caracterización de su nicho ecológico (Baptista-Rosas *et al.*, 2012). Los primeros estudios de campo para conocer el hábitat de *Coccidioides* se realizaron en 1932, donde se aisló por primera vez a partir de muestras de suelo (Stevens, 1980). El interés por conocer el hábitat de *Coccidioides* tuvo un auge de los años 1950 a 1970, sin embargo, el avance en el área de medicina provocó una tendencia hacia el estudio del hongo en su ambiente parasítico, es decir en los pulmones de hospederos. Posteriormente, gracias al avance de tecnologías moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue posible detectar DNA de *Coccidioides* spp. a partir de muestras de suelo; esto devolvió el interés por estudiar al hongo en su hábitat ambiental a finales de los 90s y principios del siglo XXI (Fisher *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2001; De Macedo *et al.*, 2011; Lauer *et al.*, 2012).

1.3 Factores bióticos y abióticos que influyen en el desarrollo de *Coccidioides* spp.

Factores como la duración y cantidad de precipitación, humedad disponible, temperatura y humedad del suelo, alcalinidad y contenido de materia orgánica del suelo, exposición a radiación solar y competencia con otros microorganismos y plantas influyen en el crecimiento de *Coccidioides* spp. (Fisher *et al.*, 2007). También se ha reportado una relación entre eventos meteorológicos tales como la cantidad y duración de la precipitación, y el número de casos de CM (Kolivras *et al.*, 2001; Comrie, 2005; Baptista-Rosas *et al.*, 2010; Tamerius & Comrie, 2011). Otro factor importante es la presencia de roedores ya que se ha propuesto que son posibles reservorios del hongo (Emmos & Ashburn, 1942; Catalán-Dibene *et al.*, 2014). Adicionalmente se cree que en el interior de sus madrigueras, se establece un microclima que contribuye a una mayor estabilidad en características físico-químicas que el suelo superficial y favorece la proliferación y permanencia de la diversidad fúngica (Vargas-Gastélum *et al.*, 2015).

1.4 Modelos de nicho ecológico (MNE) como herramienta para conocer la distribución potencial de una especie

Los modelos de nicho ecológico (MNE) son una herramienta numérica que relaciona, a través de un algoritmo, los puntos de ocurrencia geo-referenciados con las variables ambientales en esos puntos y el resultado es proyectado a un espacio geográfico (Elith & Leathwick, 2009). El producto da a conocer las zonas geográficas donde las variables ambientales son similares a aquellas donde se registró la ocurrencia de la especie, lo cual permite identificar el nicho fundamental de la especie (Hutchinson, 1959); es decir zonas de distribución potencial de la especie, donde las condiciones ambientales son aptas para que la especie esté presente. Estos modelos han sido ampliamente utilizados en epidemiología ya que permiten predecir la distribución de patógenos, vectores y reservorios, e identificar regiones con riesgo potencial de exposición (Purse & Golding, 2015).

Existen distintos algoritmos para generar MNE y una manera de clasificarlos es según los datos de distribución que requieren como datos de entrada (Pearson, 2008). Algunos utilizan solamente presencias, como BioClim, donde el área ocupada por algún porcentaje de los puntos de ocurrencia de una especie, se analiza en cada variable ambiental, creando así, rangos de tolerancia de la especie para

cada variable. Estos rangos son utilizados para generar una regla de decisión para predecir dónde puede ocurrir la especie, fuera de esa área.

Otros algoritmos utilizan presencia y pseudoausencia, como *GARP (Genetic Algorithm for Rule-set Prediction)*, que para crear puntos de pseudoausencia selecciona puntos aleatorios o en zonas donde las variables ambientales son muy diferentes a donde hay puntos de presencia. Creando así dos conjuntos de datos para comparar su relación con las variables ambientales. Los modelos se generan a través de la iteración de algoritmos con un enfoque de inteligencia artificial, donde cada algoritmo produce una regla y el conjunto de ellas determinará la distribución potencial de la especie (Townsend, 2001). También hay algoritmos que requieren presencia y ausencia como datos de entrada; sin embargo, los datos de ausencia son escasos y muy difíciles de obtener (Soberón & Townsend, 2005). Finalmente, hay algoritmos que utilizan presencia y “fondo” como *MaxEnt*, el cual contrasta datos de presencia con las variables ambientales disponibles para la especie, conocido como fondo (*background*). Este algoritmo ubica mediante un enfoque de aprendizaje automático, la zona de probabilidad de distribución con máxima entropía, es decir la más extendida e uniforme, basándose en la relación de los puntos de ocurrencia y las variables ambientales disponibles. Se ha reportado que MaxEnt, aparte de generar modelos detallados, es capaz de determinar la importancia de cada variable ambiental en la predicción del modelo (Ortega-Huerta & Townsend, 2008) empleando una prueba denominada “*Jackknife*”. También tiene la capacidad de generar MNE con mejor predicción que otros algoritmos, a partir de un número limitado de puntos de ocurrencia (Pearson *et al.*, 2007). La prueba *Jackknife* es una de las técnicas más comunes de remuestreo y consiste en calcular un parámetro estadístico de interés para un subconjunto de datos disponibles (Walsh, 2000). En Maxent, esta prueba se utiliza para estimar la importancia de cada variable ambiental utilizada para la construcción de un modelo, donde cierto número de modelos son generados excluyendo cada variable por turnos, de tal manera que el modelo se construye con las variables restantes. Adicionalmente se construyen modelos utilizando cada variable en aislamiento. El resultado es una gráfica donde en el eje Y se muestran el total de variables utilizadas para el modelo y en el eje X la contribución al modelo al utilizar todas las variables pero excluyendo sólo una (línea azul claro), así como la contribución de cada variable utilizada en aislamiento (línea azul fuerte) (Phillips, 2005) ver anexo 3.

1.5 Características topográficas y su influencia en microclimas

Los factores edáficos y topográficos son considerados críticos, ya que se ha reconocido que tienen una gran influencia sobre la temperatura y humedad del suelo (Cochran, 2010), debido a que pueden modificar los contrastes de pluviosidad creando microclimas (Ferrerías & Fidalgo, 2014). También tienen influencia sobre los patrones del viento y proveen sitios de exposición o de resguardo (Hogan, 2012). Otros factores que intervienen en la temperatura y humedad del suelo son el grado de exposición solar, altitud, tipo de suelo y cobertura vegetal, además de eventos meteorológicos como cobertura de nubes, precipitación y vientos (Cochran, 2010).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Modelo de nicho ecológico de *Coccidioides* spp.

En estudios previos se generaron MNE para *Coccidioides* utilizando el algoritmo GARP (Baptista-Rosas *et al.*, 2007). En un primer modelo se utilizaron variables climáticas y 18 puntos de ocurrencia de *Coccidioides* (16 de Arizona, 1 en California y 1 en Sonora). En el segundo modelo se utilizaron los mismos puntos de ocurrencia pero con variables bioclimáticas y variables topográficas. Al sobreponer en un SIG (Sistema de información geográfica) cada modelo con datos epidemiológicos georeferenciados, se obtuvo una mayor correlación de los registros epidemiológicos con el modelo que incluía variables topográficas. En estudios posteriores, se detectó por métodos de PCR anidada, la presencia de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo (superficiales y de madrigueras) obtenidas en zonas de alta probabilidad de ocurrencia (*Hotspots*), según los modelos generados en 2007, perteneciendo a zonas en Valle de las Palmas (VDP), Tecate y San José de la zorra (SJZ), en el municipio de Ensenada, Baja California (Baptista-Rosas *et al.*, 2012). Aunque no se encontró una relación directa entre presencia o ausencia de *Coccidioides* y suelo de madrigueras o superficial, se reportó que las zonas donde se llevaron a cabo los muestreos presentaron gran abundancia de madrigueras activas de roedores.

2.2 *Coccidioides* spp. y roedores

Recientemente, se determinó la diversidad fúngica en dos micro hábitats en VDP: madrigueras activas de roedores y suelo superficial (Vargas-Gastélum *et al.*, 2015). Se encontró que en distintas estaciones (verano e invierno) la estructura de la comunidad fúngica, es menos variable dentro de madrigueras que en el suelo superficial. Adicionalmente, se confirmó la presencia de *Coccidioides* spp. y se observó que existe mayor prevalencia dentro de madrigueras activas que en el suelo superficial. De 40 muestras en total, se detectó *Coccidioides* spp. en 11; de las cuales 9 correspondieron a muestras dentro de madrigueras y 2 en suelo superficial. Con base en estos resultados, los autores sugirieron que la presencia o ausencia del hongo puede estar asociada al micro hábitat dentro de las madrigueras, además que la estabilidad en la comunidad fúngica podría favorecer su presencia.

Utilizando el método de ELISA, se detectaron anticuerpos contra *Coccidioides* spp. en el suero de dos especies de roedores: ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) y rata cambalachera desértica (*Neotoma lepida*) en VDP, Baja California, México (Catalán-Dibene *et al.*, 2014), en la zona donde se había detectado previamente *Coccidioides* spp. en muestras de suelo (Baptista-Rosas *et al.*, 2012). Los autores sugieren que la resistencia que presentan estas especies a la enfermedad, podría proponerlas como hospederos o reservorios. De las especies de roedores que se colectaron, también se identificaron el ratón de abazones de San Diego (*Chaetodipus fallax*) y la rata canguro de dulzura (*Dipodomys simulans*), mas no se detectó la presencia de anticuerpos contra el hongo. Los autores atribuyeron esta falta de detección a la utilización de anticuerpos secundarios de ratón común (*mus musculus*) ya que pertenece a una familia filogenéticamente más distante a la familia que incluye a *C. fallax* y *D. simulans* (Heteromyidae). Sin embargo, tiene una relación filogenética más estrecha con la familia Cricetidae, a la cual pertenecen las especies *N. lepida* y *P. maniculatus*, especies que presentaron anticuerpos contra el hongo.

No obstante, se han detectado lesiones granulomatosas causadas por *Coccidioides* spp. en pulmones de roedores pertenecientes a estos géneros, sin embargo la naturaleza crónica de estas lesiones sugiere a estos roedores como reservorios naturales, ya que no mueren por CM (Emmons & Ashburn, 1942).

Capítulo 3. Justificación

A pesar de su impacto en la salud pública, se conoce muy poco sobre el ambiente donde se desarrolla *Coccidioides* spp. y conocer su distribución es de suma importancia para delimitar zonas de riesgo a la salud. Actualmente se cuenta con muy pocos puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp. registrados a partir de muestras ambientales, por lo que es necesario incrementar el número de puntos de ocurrencia para obtener MNE más robustos y proporcionar sitios de muestreos dirigidos para futuras investigaciones. Algo que no ha sido tomado en cuenta para modelar la distribución potencial de *Coccidioides* spp. es la distribución de roedores. Contemplarla es de suma importancia, debido a que son considerados reservorios del hongo y sus madrigueras proveen condiciones favorables para su desarrollo.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Modelar la distribución potencial de *Coccidioides* spp. en los estados de Baja California, Arizona y California mediante modelos de nicho ecológico y sistemas de información geográfica, tomando en cuenta la distribución potencial de *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*.

4.2 Objetivos particulares

1. Obtener modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp., *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida* y *P. maniculatus*, identificando las variables ambientales que tienen mayor efecto sobre la distribución de *Coccidioides* spp.
2. Identificar zonas donde se traslapen los hotspots de los modelos del hongo y roedores.
3. Obtener un modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando como variables biológicas los modelos de distribución potencial de *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida* y *P. maniculatus*.
4. Identificar características topográficas que puedan dar lugar a microclimas en *hotspots* de *Coccidioides* spp., según el MNE.
5. Determinar molecularmente la presencia de *Coccidioides* spp. en *hotspots* y de este modo contribuir al número de puntos de ocurrencia en BC.

Capítulo 5. Hipótesis

Al incluir la distribución potencial de roedores como variable biótica en un MNE de *Coccidioides* spp, se obtendrán sitios de alta probabilidad de ocurrencia más restringidos. Los resultados servirán como base para llevar a cabo muestreos dirigidos.

Los *hotspots* obtenidos a partir del MNE de *Coccidioides* spp. presentaran características topográficas similares.

Capítulo 6. Metodología

6.1 Recopilación y procesamiento de datos de entrada

6.1.2 Variables ambientales

A partir de la base de datos de *WorldClim* (<http://www.worldclim.org/current>) se descargaron capas temáticas de mapas correspondientes a las variables bioclimáticas enlistadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables bioclimáticas de *Worldclim*.

Variable	Descripción
Bio 1	Temperatura media anual
Bio 2	Rango de temperatura diurno medio (Temperatura máxima - temperatura mínima)
Bio 3	Isotermalidad ((Bio 2/Bio 7)(*100))
Bio 4	Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar *100)
Bio 5	Temperatura máxima del mes más cálido
Bio 6	Temperatura mínima del mes más frío
Bio 7	Rango de temperatura anual (Bio 5 - Bio 6)
Bio 8	Temperatura media del trimestre más húmedo
Bio 9	Temperatura media del trimestre más seco
Bio 10	Temperatura media del trimestre más cálido
Bio 11	Temperatura media del trimestre más frío
Bio 12	Precipitación anual
Bio 13	Precipitación del mes más lluvioso
Bio 14	Precipitación del mes más seco
Bio 15	Estacionalidad de precipitación (coeficiente de variación)
Bio 16	Precipitación del trimestre más húmedo
Bio 17	Precipitación del trimestre más seco
Bio 18	Precipitación del trimestre más cálido
Bio 19	Precipitación del trimestre más frío

Las capas fueron generadas por *Worldclim*, interpolando en una cuadrícula de 30 arcossegundos de resolución, los datos mensuales promedio de precipitación y de temperatura obtenidos de estaciones meteorológicas. Estos datos incluyen precipitación total mensual, y temperaturas media,

mínima y máxima mensual, a partir de los cuales se derivan las 19 variables bioclimáticas. Estas variables representan tendencias anuales, estacionales y extremas o factores ambientales limitantes, por lo cual se consideran variables biológicamente significativas y han sido ampliamente utilizadas en el modelado de nicho ecológico.

Se descargó el modelo digital de elevación GTOPO30 a partir de <http://earthexplorer.usgs.gov>. Los mapas de disponibilidad de nutrientes y capacidad de retención de nutrientes se obtuvieron de la base de datos “*Harmonized World Soil Database v 1.2*” (<http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-maps-and-databases/harmonized-world-soil-database-v12/en/>).

Las distintas características de suelo que se utilizaron para generar estos mapas se muestran en la Tabla 2. Todas las variables ambientales tienen una resolución de 30 arcosegundos y fueron descargadas en formato raster.

Tabla 2. Características de suelo utilizadas para la elaboración de las capas de calidad de suelo.

Mapas	Características del suelo
Disponibilidad de nutrientes (SQ1)	Textura de suelo, carbón orgánico, pH, bases intercambiables totales.
Capacidad de retención de nutrientes (SQ2)	Carbón orgánico, textura de suelo, saturación de bases, capacidad de intercambio iónico y fracción de arcilla.

A partir de mapas de división política de México y Estados Unidos, descargados del portal de CONABIO y la página web www.census.gov, respectivamente, y utilizando el programa Quantum GIS versión 2.8Wien, se extrajeron los polígonos correspondientes a los estados de Arizona, California y Baja California. Posteriormente se unieron en un solo archivo tipo shape y se utilizó como molde para cortar los mapas globales de Worldclim y obtener la información de cada variable en el área de estudio (Figura 4); para este procedimiento se utilizó la herramienta “*Clip*”. El MDE y las capas de calidad del suelo fueron procesadas con la herramienta “*Extraer por mascara*”, de manera que el tamaño de pixel en todas las capas fuera el mismo. La capa bioclimática BIO2 del área de estudio fue empleada como máscara en este procedimiento. Las capas fueron transformadas a formato ASCII (.asc) para utilizarlas como datos de entrada en el programa Maxent versión 3.3.3k.

6.1.3 Puntos de ocurrencia

Los puntos de ocurrencia de *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus* fueron descargados del portal GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*) y depurados eliminando puntos repetidos, puntos sin datos de localidad y aquellos que geográficamente estuvieran fuera de alguna de las capas ambientales, posiblemente debido al rango de error de los GPS utilizados por los usuarios. Finalmente, los archivos se guardaron en formato de valores separados por comas (.csv) para utilizarlos como datos de entrada en el programa *Maxent*.

Los puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp. fueron proporcionados por los colaboradores B. Barker de TGEN, Flagstaff y J. Taylor de la Universidad de California Berkeley (comunicación personal) y adquiridos de datos publicados por Lauer *et al.*, 2014 y Catalán-Dibene *et al.*, 2014. Finalmente los archivos se guardaron en formato de valores separados por comas (.csv) para utilizarlos como datos de entrada en el programa *Maxent*.

6.2 Selección de variables

Utilizando el software *Maxent* versión 3.3.3k se corrieron 50 réplicas para cada especie utilizando las 22 variables ambientales descargadas y se seleccionó llevar a cabo la prueba *Jackknife*.

Con el fin de evitar el sobreajuste del modelo, se seleccionaron las dos variables de mayor importancia para cada especie según la prueba *Jackknife* (Tabla 3) y que no estuvieran altamente correlacionadas, obteniendo un total de 8 variables. Para consultar los resultados de la prueba *Jackknife* ver anexo 3.

Tabla 3. Variables de mayor importancia para cada especie según la prueba *Jackknife*.

Especie	Mayor ganancia en aislamiento	Menor ganancia al omitirla
<i>Coccidioides</i> spp	BIO19	DEM
<i>C. fallax</i>	BIO8	BIO18
<i>D. simulans</i>	BIO11	BIO17
<i>N. lepida</i>	BIO18	BIO18
<i>P. maniculatus</i>	BIO5	BIO15

Para identificar variables correlacionadas, en QGIS, se construyó un polígono alrededor de la zona de estudio y se generaron 3000 puntos al azar, de los cuales 968 resultaron dentro de la zona de estudio (ver Anexo 1). Utilizando la herramienta *Point Sampling* se extrajeron los valores de las 22 variables ambientales en cada uno de los puntos aleatorios. Con el software matlab versión 2009, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson de las 22 variables utilizando los valores extraídos anteriormente. Las variables con una correlación mayor a 0.8 (ver Anexo 2), fueron clasificadas como variables altamente correlacionadas, sin embargo las 8 variables seleccionadas no presentaron correlación mayor a 0.8.

Tabla 4. Variables ambientales utilizadas para la construcción de los MNE de *Coccidioides* spp., *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*.

Bio 5	Temperatura máxima del trimestre más caliente.
Bio 8	Temperatura media del trimestre más húmedo.
Bio 11	Temperatura media del trimestre más frío.
Bio 15	Estacionalidad de la precipitación.
Bio 17	Precipitación del trimestre más seco
Bio 18	Precipitación del trimestre más caliente.
Bio 19	Precipitación del trimestre más frío.
MDE	Modelo Digital de Elevación.

6.3 Modelos de distribución potencial

Utilizando el software Maxent versión 3.3.3k se corrieron 50 réplicas para cada especie, utilizando el 85% de los puntos de ocurrencia para construir el modelo y el 15% para probarlo. Para evitar repetir los puntos de prueba en cada corrida, se seleccionó la opción “*random seed*”. Se seleccionó la opción de resultados tipo “logística”, la cual proporciona una estimación entre 0 y 1 de probabilidad de presencia. Para todas las especies se utilizaron las mismas variables ambientales y parámetros (Tabla 4). Como resultado el programa genera un mapa de distribución potencial en formato *.asc* conformado de pixeles con valores continuos entre 0 y 1, siendo 1 la probabilidad de obtener las condiciones ambientales óptimas para la ocurrencia de la especie.

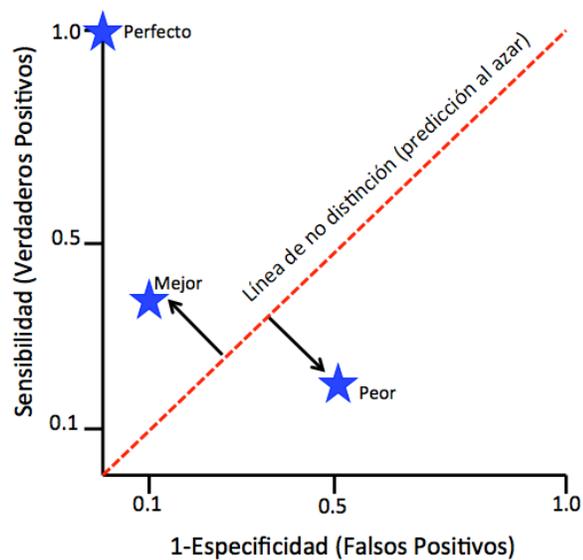
6.3.1 Evaluación de modelos

Para la evaluación de modelos se utilizan dos tipos de pruebas: Una para cuantificar el desempeño de predicción del modelo, es decir la capacidad del modelo para predecir correctamente presencias y ausencias, y pruebas para cuantificar la significación estadística, es decir si la predicción del modelo es mejor que una predicción al azar. Para el primer tipo de evaluación se utiliza la curva *ROC (Receiver Operating Characteristic)*, que representa la proporción de verdaderos positivos en el eje Y (sensibilidad) y falsos positivos en el eje X (1-especificidad). En otras palabras, con este tipo de análisis podemos conocer la proporción de zonas predichas como favorables donde hay registros de presencia en función de zonas predichas como favorables aunque sin registros de presencia. Un modelo con alta capacidad de distinguir presencias de pseudoausencias (información de fondo) se caracteriza por presentar alta sensibilidad y alta especificidad. Se espera que en la curva ROC los valores de sensibilidad aumenten a partir de (0,0), aproximándose a (0,1) para continuar hacia (1,1) (Figura 3) (Phillips, 2005).

El área bajo la curva (AUC) ROC es la medida que se utiliza para evaluar el poder predictivo del modelo, el cual puede tomar valores entre 0 y 1, entre más cercano a 1 sea el AUC mejor la predicción del modelo (Figura 3). Una medida cualitativa para interpretar los valores de AUC se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Índices cualitativos para la evaluación del AUC de la ROC (Modificado de Swets, 1988).

Valor de AUC	Poder predictivo
>0.9	Muy bueno
0.7-0.9	Bueno
<0.7	No informativo

**Figura 3.** Interpretación de la curva ROC.

Para cuantificar la significación estadística se utilizan los gráficos de omisión, donde se muestra la variación de la tasa de omisión, es decir la tasa en la que el modelo predice erróneamente ausencias (falsos negativos) para los datos utilizados en la construcción del modelo y el área predicha. Se espera que la tasa de omisión de los datos sea similar a la tasa de omisión predicha.

6.4 Traslape de Modelos de distribución potencial

Se llevó a cabo un traslape de modelos de distribución potencial mediante álgebra de mapas, con la finalidad de identificar zonas donde coincidiera la distribución potencial de todas las especies. Los modelos adquiridos anteriormente se transformaron de mapas continuos a mapas binarios estableciendo un valor umbral, a partir del cual las zonas con probabilidad igual o mayor al umbral se clasificaron como “zonas favorables” para la especie y aquellas zonas con probabilidad menor al umbral como “zonas no favorables”.

Un método subjetivo para determinar el valor umbral es *Least training presence threshold* propuesto por Pearson en 2007 (Townsend *et al.*, 2011). El método supone que la presencia de especies se restringe a sitios donde la probabilidad es por lo menos igual o mayor que en sitios donde la especie ha sido observada. Debido a que *Coccidioides* spp. y las cuatro especies de roedores han sido identificados previamente en el poblado de VDP (Baptista-Rosas *et al.*, 2012; Catalán-Dibene *et al.*, 2014; Vargas-Gastélum *et al.*, 2015) se tomó como umbral el valor de probabilidad en esa zona para cada especie, tomando como base los modelos generados (Tabla 6).

Tabla 6. Valor umbral para la transformación de mapas continuos a binarios.

Espece	Valor umbral
<i>Coccidioides</i> spp.	0.208
<i>C. fallax</i>	0.288
<i>D. simulans</i>	0.242
<i>N. lepida</i>	0.484
<i>P. maniculatus</i>	0.485

Utilizando la herramienta *Raster Calculator* en QGIS se transformaron los mapas continuos a binarios utilizando la siguiente expresión:

$$(\text{“MNEspp1”} \geq \text{Valor umbral}) * (1) + (\text{“MNEspp1”} !) * (0) \quad (1)$$

Donde de los pixeles del MNE de una especie (“MNEspp1”) con valores mayor o igual que el umbral (\geq valor umbral), se les asignó el valor de uno (*1). Adicionalmente (+) los pixeles del MNE de la especie que no fueran iguales o mayor que el umbral (“MNEspp1”) se les asignó el valor de cero (*0).

Se asignaron los valores de 1, 10, 100, 1,000, y 10,000 a aquellos pixeles con valores mayores que el umbral establecido para *Coccidioides* spp., *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*, respectivamente. Una vez generados los mapas binarios de cada especie, se sumaron para obtener como resultado el traslape de MNE de todas las especies.

6.5 MNE de *Coccidioides* spp. utilizando la distribución potencial de roedores como variables bióticas

Se generó un modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando los mismos ajustes del programa *Maxent* mencionados anteriormente. Se emplearon las 8 variables ambientales listadas en la Tabla 4 y se incluyeron los modelos de distribución potencial de los roedores como capas bióticas (mapas continuos en formato *.asc*).

6.6 Aspectos topográficos en las zonas idóneas para *Coccidioides*

Utilizando la herramienta *Terrain analysis* de QGIS Wien 2.8, se calcularon el ángulo y la orientación de las pendientes dentro de las zonas idóneas para *Coccidioides* spp. así como el índice de rugosidad del suelo.

La pendiente es una medida de la inclinación del terreno, expresada en grados o en porcentaje y representa un medio por el cual la gravedad permite el flujo de agua y suelo. El grado de inclinación es un factor que altera la velocidad de este flujo teniendo un efecto sobre el contenido de agua en el suelo y erosión potencial, entre otros procesos importantes. Se calcula midiendo la tasa de cambio de la elevación en dirección al descenso más pronunciado, comparando el valor de un pixel con 8 pixeles circundantes.

De acuerdo con las pendientes, el suelo recibe insolación con un periodo e intensidad diferentes según su orientación, creando así un rango de microclimas (Holland & Steyn, 1957). En general en el hemisferio norte, los suelos con pendientes orientadas al sur reciben más luz solar convirtiéndose en suelos áridos y calientes, mientras que los suelos con pendientes orientadas al norte retienen más humedad y son menos calientes (Måren *et al.*, 2015). Incluso en áreas con pendientes moderadas, es posible encontrar gradientes significativos en la humedad del suelo, así como en la temperatura del aire y suelo cercanos a la superficie (Bennie *et al.*, 2008).

6.7 Sitios de muestreo

Las zonas idóneas para *Coccidioides* spp. y las cuatro especies de roedores coinciden solamente en la región de VDP, según el mapa de traslape de MNE. Debido a que se han llevado a cabo muestreos previos por Baptista-Rosas *et al.*, 2012 en esa zona, no se seleccionaron sitios de muestreo basándonos en el traslape de MNE. No obstante, utilizando como base el MNE de *Coccidioides* que incluye la distribución potencial de roedores como variable biológica, se seleccionaron como sitios positivos zonas con mayor probabilidad de idoneidad, localizados al norte de la Sierra Cucapah y lado oeste del cerro El Centinela en Mexicali B.C. Como sitio negativo se seleccionó una zona en Ojos Negros, Ensenada, donde la probabilidad de idoneidad es cercana a 0 (Figura 4). En la figura 5 se observa de color rojo áreas de probabilidad de idoneidad mayores que el umbral y en verde las zonas de mayor probabilidad (≈ 0.25) y los sitios de muestreo se identifican con una flecha blanca.

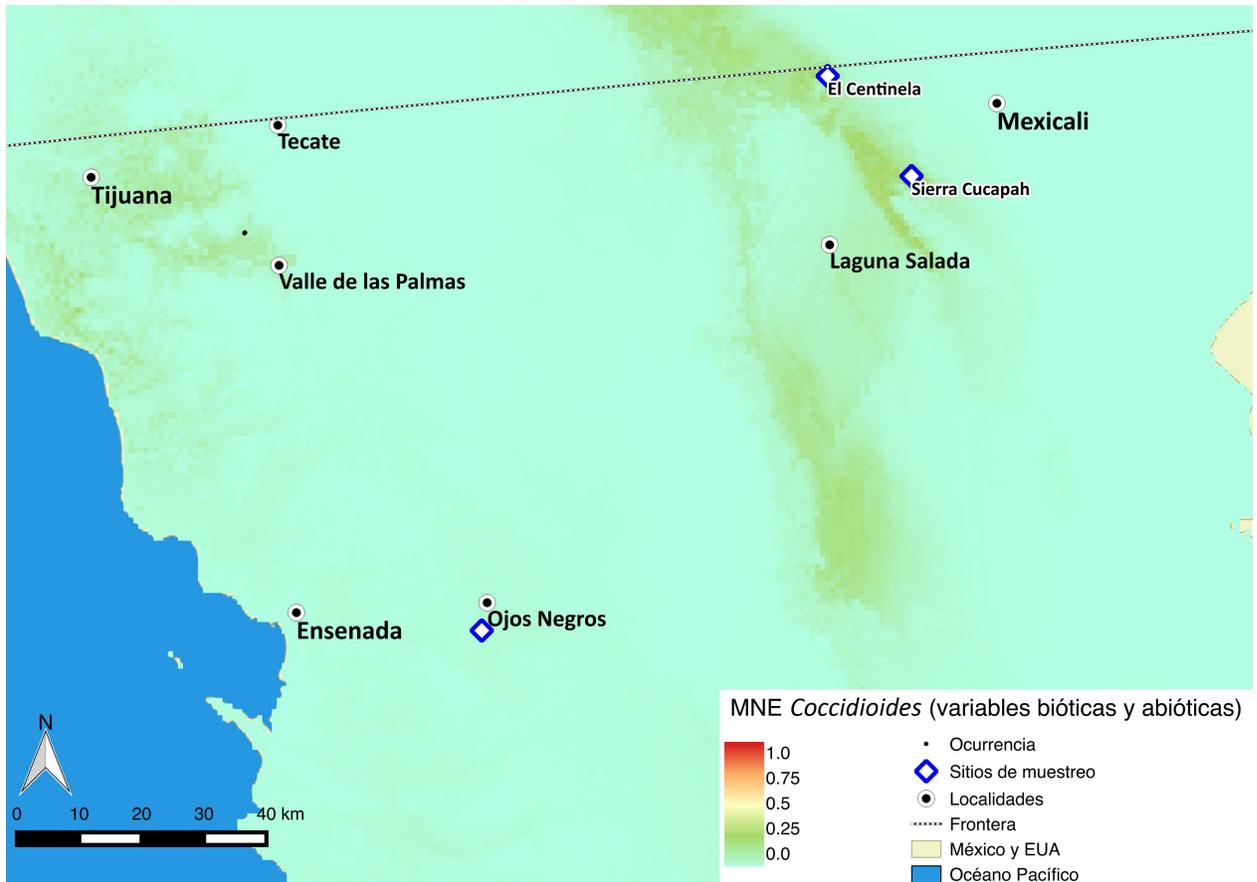


Figura 4. Sitios de muestreo con base al MNE de *Coccidioides* que incluye variables bióticas y abióticas. De manera similar a los próximos mapas, la paleta de colores indica en rojo las zonas de mayor probabilidad de idoneidad (1) y en azul cian las de menor (0).

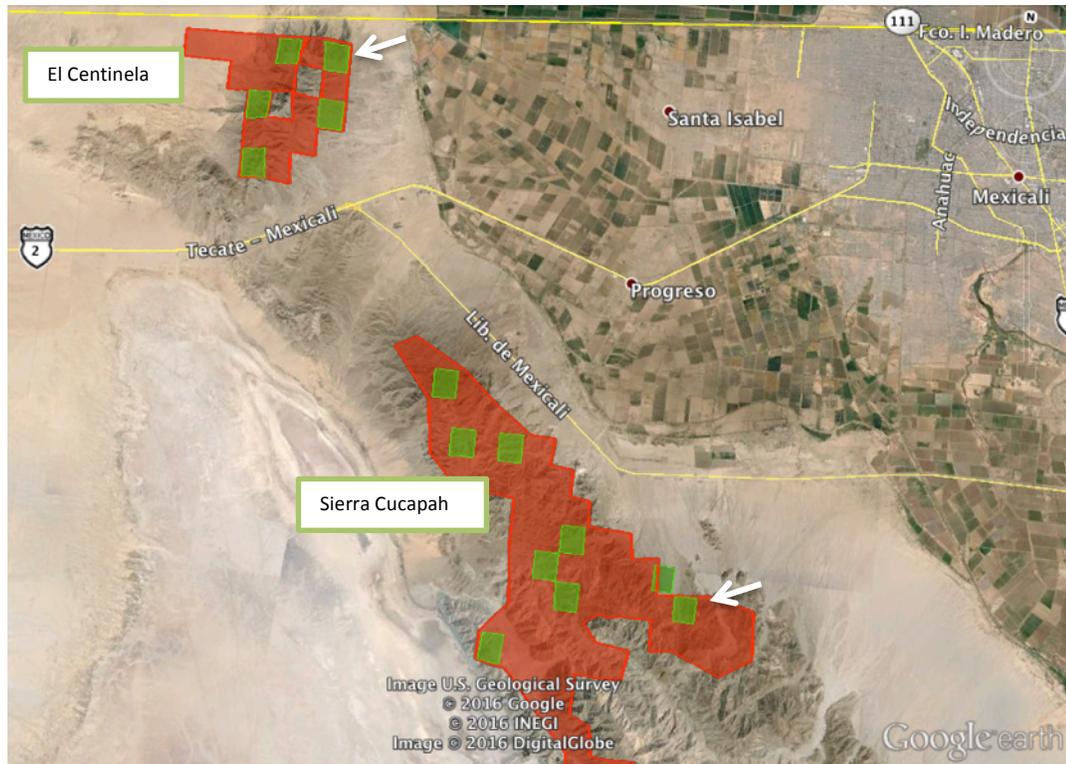


Figura 5. Acercamiento al mapa de sitios de muestreo. En rojo se observan las zonas idóneas para *Coccidioides* spp. y en verde las zonas de mayor probabilidad de idoneidad (≈ 0.25).

6.7.1 Muestreo

Los muestreos se llevaron a cabo en áreas aproximadamente de 100m^2 y fueron dirigidos a madrigueras activas de roedores, aquellas sin evidencia de telarañas u objetos que obstruyen la entrada. Posteriormente utilizando un boroscopio (Medit INC), se inspeccionó el interior de las madrigueras para corroborar que no estuvieran obstruidas. Se colectaron aproximadamente 50 g de suelo en botes estériles de plástico con tapa rosca utilizando una cuchara metálica de 30 cm de longitud. Las muestras se colectaron a una profundidad entre 10 cm y 15 cm en el interior de la madriguera. Se lavó la cuchara metálica con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, cloro al 10% y etanol antes de colectar cada muestra (Figura 6). Se almacenaron las muestras dentro de una hielera con hielo para su traslado y una vez en el laboratorio se almacenaron a -80°C . Se colectaron un total de 60 muestras de suelo.

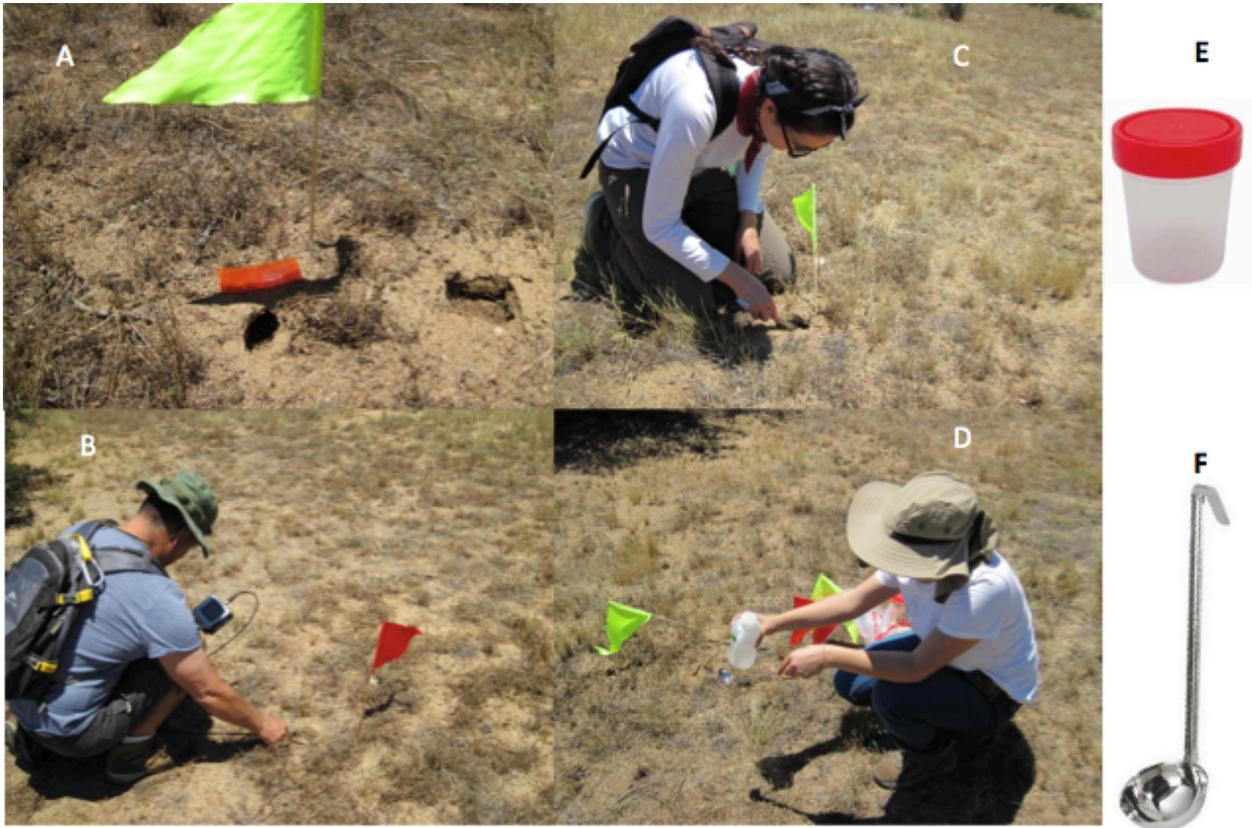


Figura 6. Recolección de muestras donde A) Representa un ejemplo de madriguera activa de roedor, B) La corroboración de que la madriguera no estuviera obstruida, C) La toma de muestra D) El lavado del material entre cada toma de muestras, E) El envase donde se almacenó la muestra y F) El cucharón recolector.

6.8 Extracción y purificación de DNA a partir de muestras de suelo

La extracción de DNA total a partir de las muestras de suelo se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Powersoil DNA Isolation* de *MO Bio Laboratories Inc.* siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se midió la concentración y pureza del DNA genómico total a 260nm y empleando la relación A260/280 respectivamente, en un espectrofotómetro Nanodrop LITE de Thermo Scientific .

6.9 Detección molecular de *Coccidioides* por PCR anidada

El DNA genómico total extraído de cada muestra se ajustó a 10 ng/ μ L y se utilizó 1 μ L como templado para llevar a cabo la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que

comprende a una región del rDNA. Debido a que esta región no codifica para componentes ribosomales, es altamente variable, con algunas excepciones (Gazis *et al.*, 2011); por ello la región ITS se ha propuesto como el código de barras por excelencia para hongos (Schoch *et al.*, 2012) y está conformado por las regiones ITS1-5.8S-ITS2 (≈ 900 pb). Se utilizaron los oligonucleótidos sentido NS11 5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3' y anti-sentido NLB4: 5'-GGATTCTCACCTCTATGAC-3' (Martin & Rygiewicz 2005; Baptista-Rosas *et al.*, 2012). Como blanco y controles positivos se utilizó agua HPLC y DNA de *N. crassa* cepa N1 y *Coccidioides* cepa 3242, respectivamente.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100TM de BIORAD, utilizando por cada reacción 4.0 μ L de *GoTaq Buffer* [5x], 1.6 μ L MgCl₂ [25mM], 0.25 μ L de polimerasa GoTaq (Promega) [5u/ μ L], 0.4 μ L de dNTP [10 μ M], 1 μ L de oligonucleótido sentido NS11 [10 μ M], 1 μ L de oligonucleótido anti-sentido NLB4 [10 μ M], agua HPLC y DNA [10 ng/ μ L]. El protocolo a seguir fue: desnaturalización inicial durante 2min a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30s, alineamiento a 62°C durante 40s y extensión a 72°C durante 1min, por último se mantuvo la reacción a 72°C durante 5min para la fase final de elongación. La amplificación se corroboró por el método de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se corrieron 5 μ L del marcador de peso molecular *GeneRuler*TM (1 kb) así como 5 μ L de controles y muestras a 65 volts por 30min.

Se realizó una dilución 1:10 del producto de la primera amplificación y se utilizó 1 μ L de esta dilución como templado para llevar a cabo la amplificación de la región del rDNA ITS1 (≈ 120 pb) específica para detectar *Coccidioides* spp. utilizando los oligonucleótidos sentido ITS1CF: 5'-GTGGCGTCCGGCTGCGCACCTCCCCGCGG-3' y anti-sentido ITS1CR: 5'-GCGCAAGGCGGGCGATCCCCGGCAGCC-3' (Vargas-Gastelum *et al.*, 2015). Como blanco y controles positivo y negativo se utilizó agua HPLC, y ADN de *Coccidioides* cepa 3242 [10 ng/ μ L] y de *N. crassa* N1 [10ng/ μ L] respectivamente.

Se utilizaron los mismos reactivos a igual volumen y concentración para las segundas PCRs, a excepción de los oligonucleótidos y se siguió el siguiente protocolo: Desnaturalización inicial a 95°C por 2min, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30s, alineamiento a 70°C por 40s y extensión a 72°C por 1min; por último se mantuvo la reacción a 72°C por 5min para la fase final de elongación. Se corroboró la amplificación por el método de electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se corrieron 5 μ L del marcador de peso molecular *GeneRuler*TM (100 pb), así como del producto de PCR de cada muestra y los controles, a 53 volts por 120 min.

7. Resultados

7.1 Procesamiento de las variables ambientales y puntos de ocurrencia

Se generaron 22 mapas en formato ASCII, los cuales contienen la información de cada variable ambiental únicamente en la zona de estudio. En la figura 7 se muestra un ejemplo del procedimiento que se siguió para cada variable.

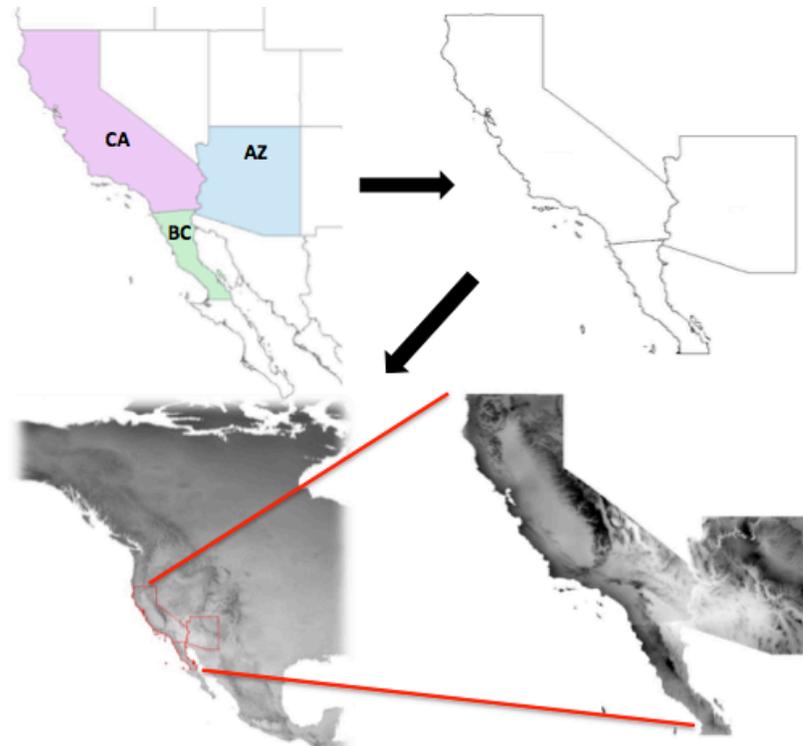


Figura 7. Procesamiento de variables ambientales. A partir de los mapas globales se cortó la zona de estudio de las 22 variables ambientales y se convirtieron a formato ASCII (.asc).

A partir de la recopilación de coordenadas publicadas por Lauer *et al.*, 2014 y Catalán-Dibene *et al.*, 2014, así como las proporcionadas por los colaboradores B. Barker y J. Taylor se obtuvieron en total 45 puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp.; 11 en Baja California, 18 en California y 16 en Arizona (Figura 8).

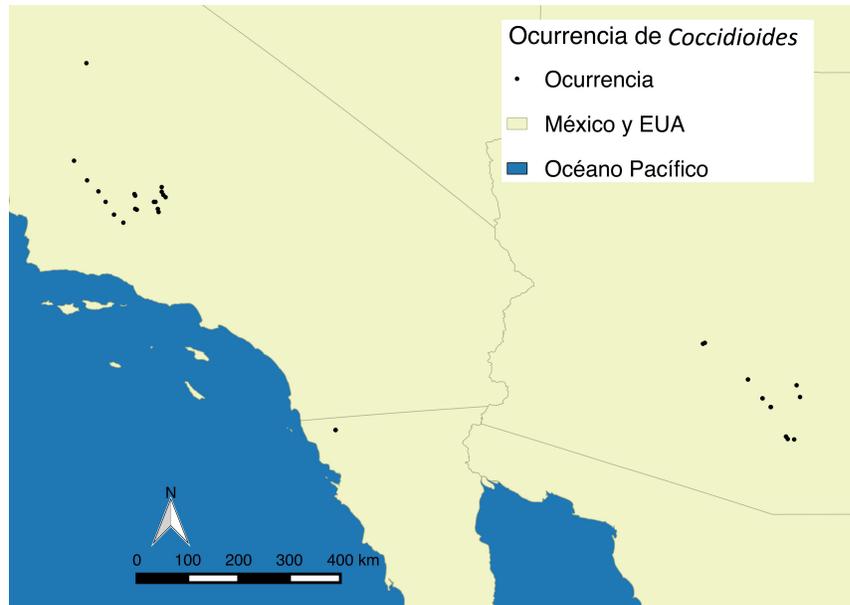


Figura 8. Puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp. 11 en Baja California, 18 en California y 16 en Arizona.

A partir de la base de datos de GBIF y después de depurarse se obtuvieron 318 puntos de ocurrencia correspondientes a *C. fallax*, 64 a *D. simulans*, 1,084 a *N. lepida*, y 4,172 a *P. maniculatus* (Figuras 9-12).

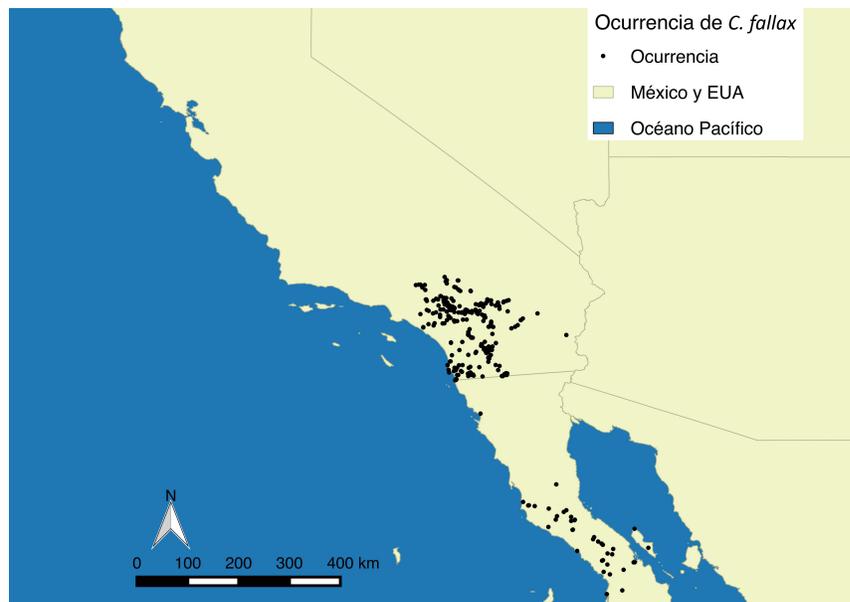


Figura 9. Ocurrencia de *C. fallax*.

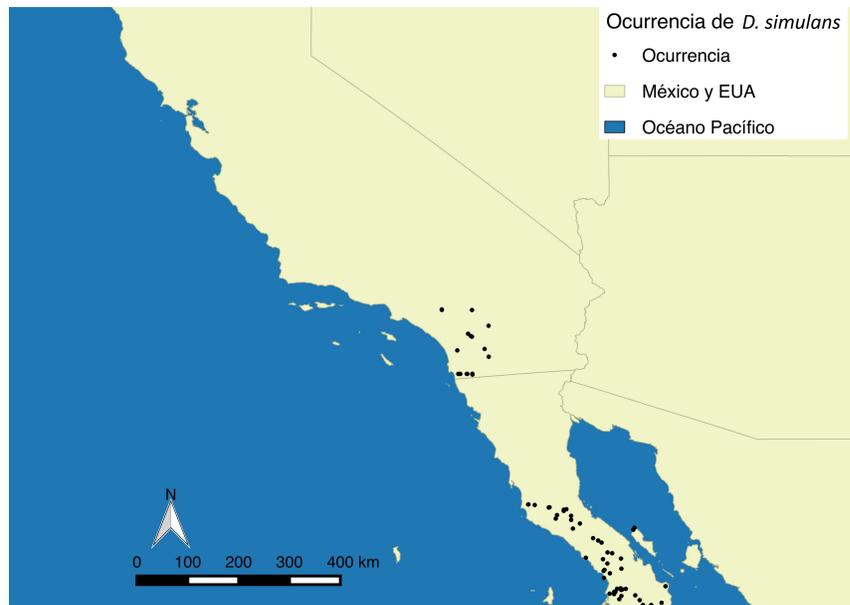


Figura 10. Ocurrencia de *D. simulans*.

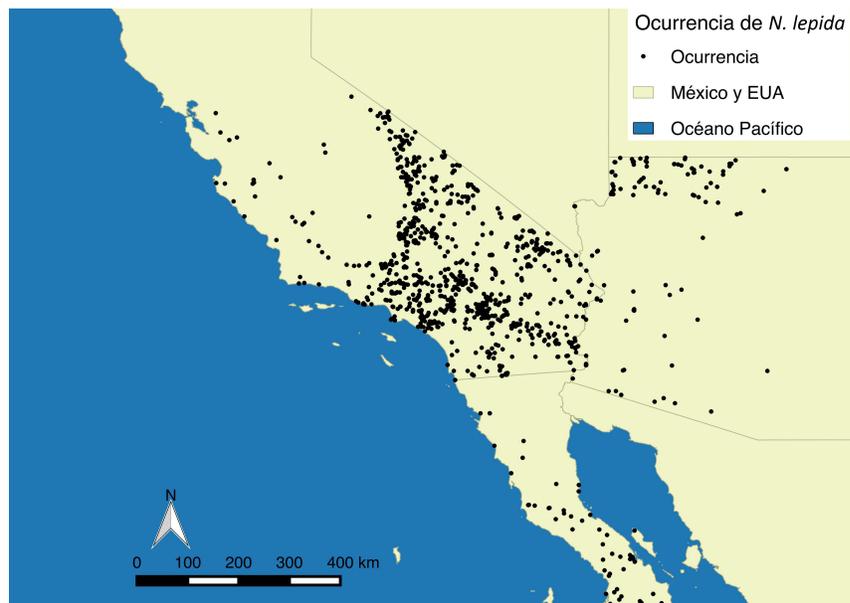


Figura 11. Ocurrencia de *N. lepida*.

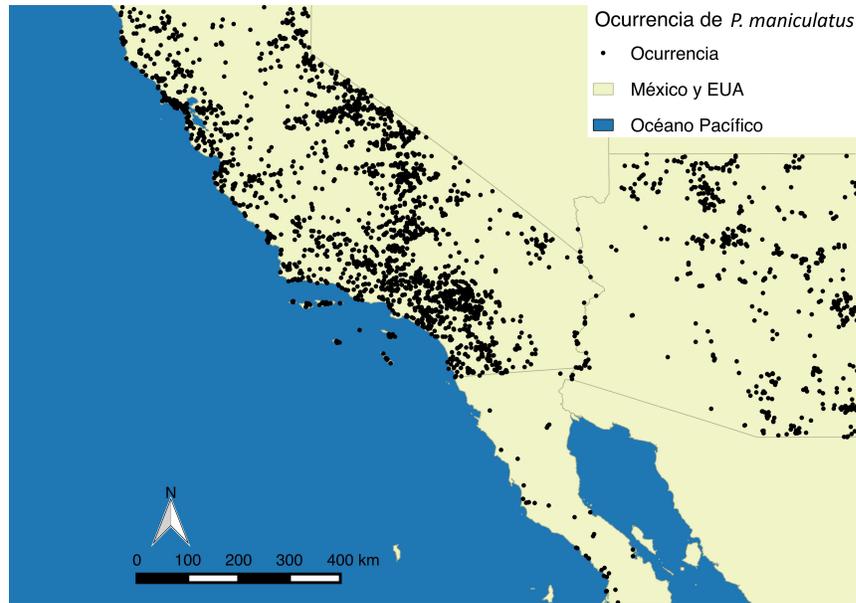


Figura 12. Ocurrencia de *P. maniculatus*.

7.2 Modelos de distribución potencial utilizando variables abióticas

A continuación, se muestran los modelos de distribución potencial de cada especie utilizando las 8 variables abióticas, así como sus respectivas evaluaciones. Los colores en los mapas representan la probabilidad de ocurrencia; en azul las de menor probabilidad y en rojo las de mayor.

7.2.1 *Coccidioides* spp.

La distribución potencial de *Coccidioides* spp. (Figura 13) incluye la región de Central Valley, y las regiones de Phoenix y Tucson en Arizona, siendo la región de California la que presenta mayores valores de probabilidad (≈ 0.89). En Baja California (Figura 14), la mayor probabilidad alcanza un valor de ≈ 0.25 y corresponde al extremo noreste de la Laguna Salada, cercano a la ciudad de Mexicali. En la región noroeste de Baja California, colindante con la frontera entre EUA y México se localiza la segunda zona con una probabilidad de ocurrencia de ≈ 0.22 , entre las ciudades de Tijuana y Tecate, incluyendo el poblado de VDP. Por último se observa una coloración amarillo muy tenue, correspondiente a

probabilidades menores que 0.1 a lo largo de la costa oeste del estado, hasta unos kilómetros al sur del poblado de San Quintín. De manera similar se presentaron valores bajos de probabilidad en el sur del estado. El AUC de la curva ROC es de 0.987, por lo que se sugiere un poder predictivo muy bueno. La tasa de omisión calculada a partir de los datos es parcialmente igual a la predicción cuando los valores acumulativos del umbral son igual a 100 (Figura 15).

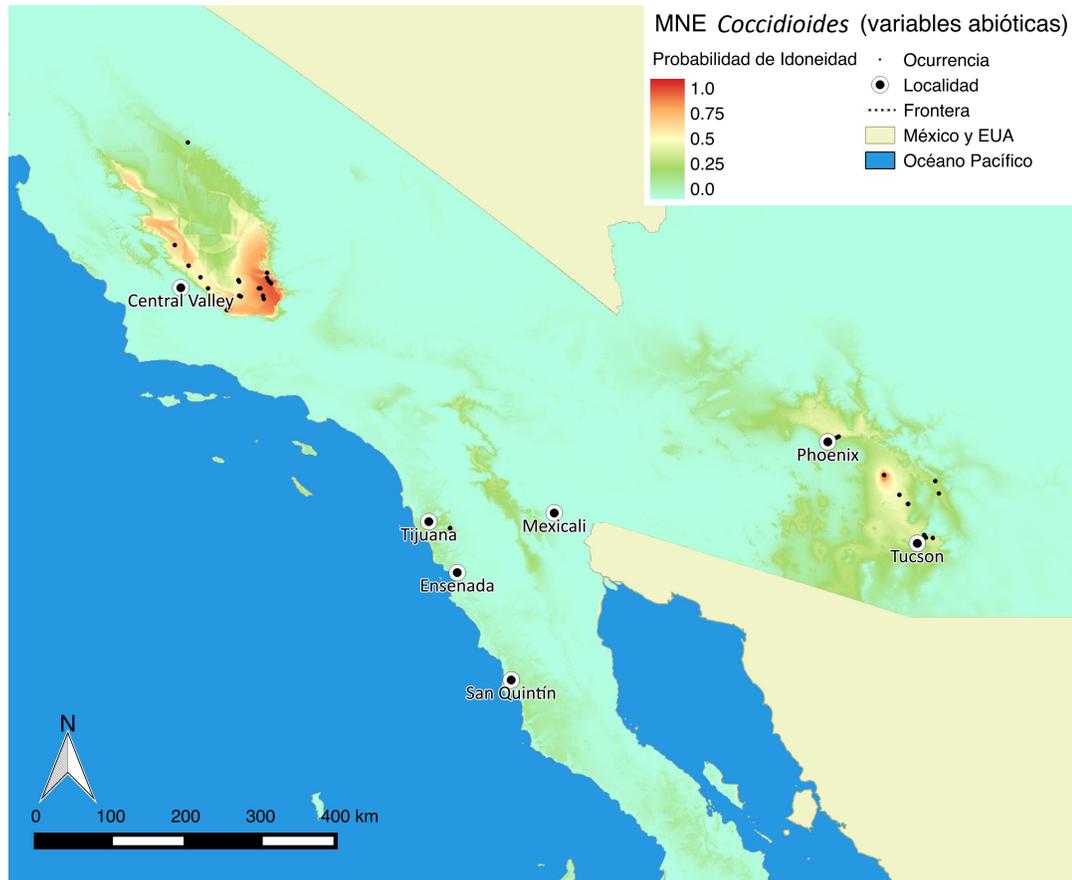


Figura 13. Modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando variables abióticas.

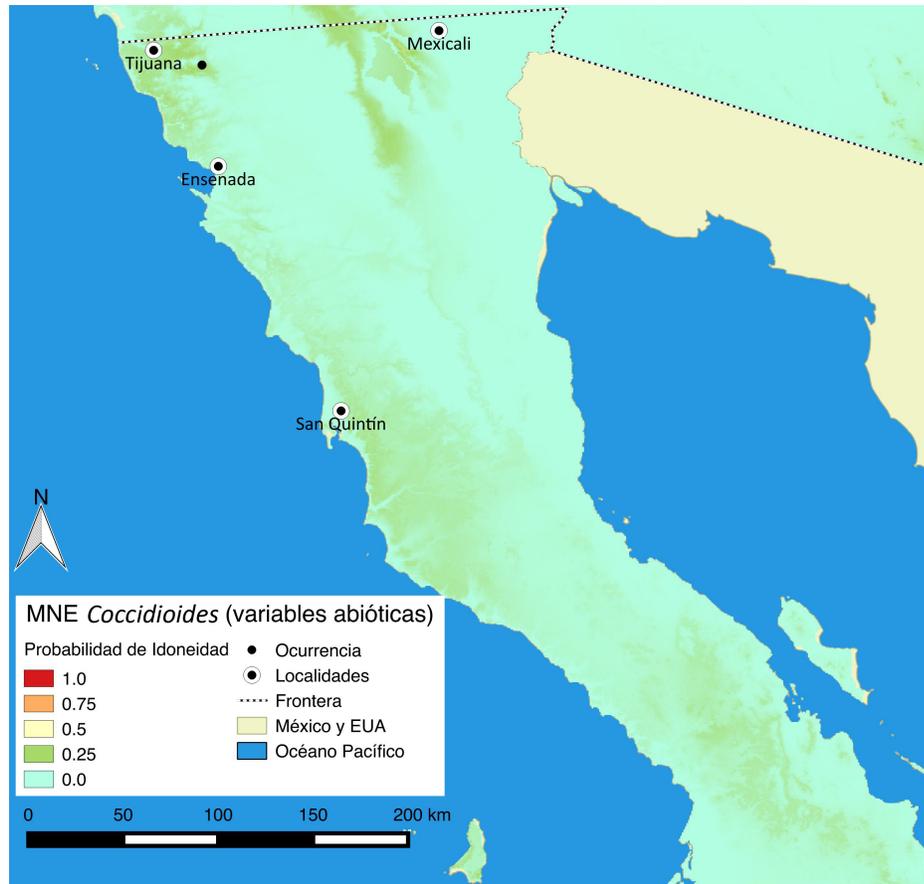


Figura 14. Acercamiento a la región noroeste de BC del modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando variables abióticas.

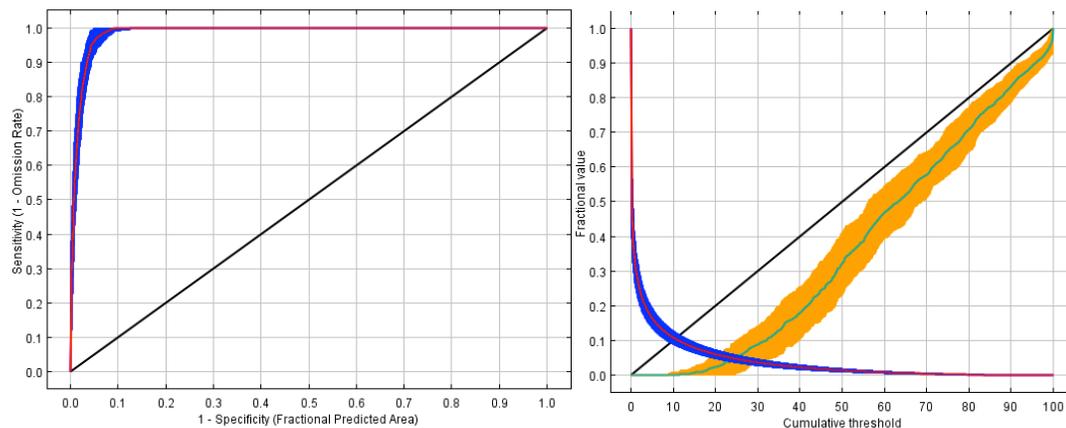


Figura 15. Evaluación del modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando variables abióticas. A la izquierda el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 réplicas del MNE de *Coccidioides* spp. con un AUC de .987. A la derecha el gráfico de omisión, donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo y la línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio ± 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio ± 1 desviación estándar.

7.2.2 *Chaetodipus fallax* (Ratón de abazones de San Diego)

La distribución potencial de *C. fallax* (Figura 16) presenta valores importantes desde el sur de California hasta Baja California, con mayor probabilidad de ocurrencia en California. También se observan zonas aisladas de baja probabilidad (≈ 0.20) al norte. El valor del AUC es de 0.963, lo que sugiere un poder predictivo muy bueno. La tasa de omisión de los datos se ajusta a la predicha hasta alcanzar un umbral acumulativo superior a 80 (Figura 17).

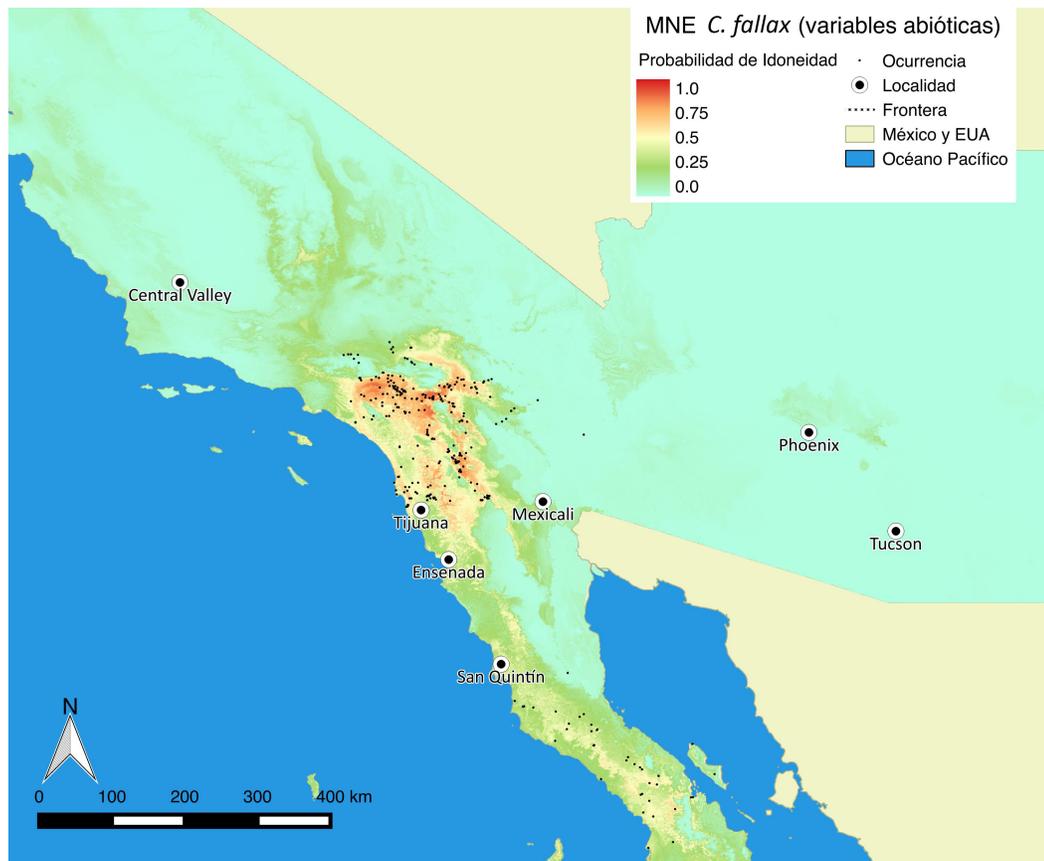


Figura 16. Modelo de distribución potencial de *C. fallax*, utilizando variables abióticas.

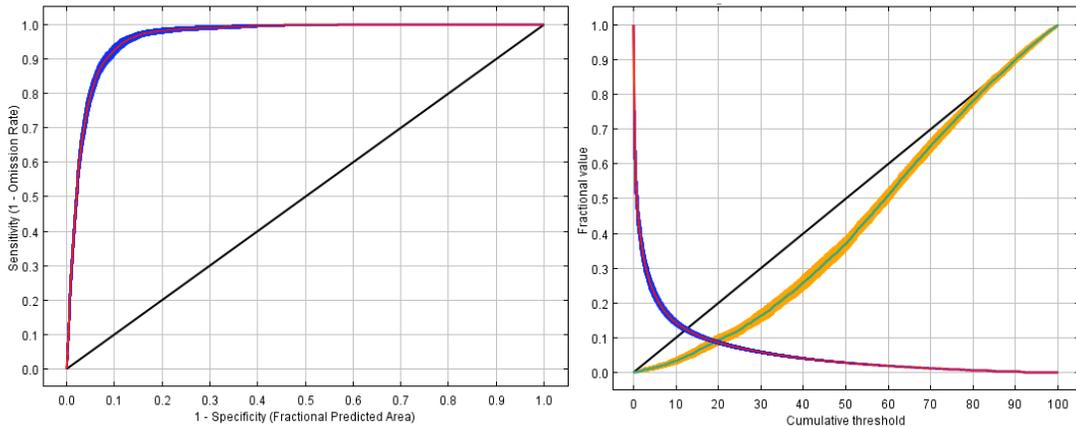


Figura 17. Evaluación del modelo de distribución potencial para *C. fallax* utilizando variables abióticas. A la izquierda se representa el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 replicas del MNE para *C. fallax.*, con un AUC de 0.963. A la derecha el gráfico de omisión donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo. La línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio +/- 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio +/- 1 desviación estándar.

7.2.3 *Dipodomys simulans* (Rata canguro de dulzura)

D. simulans, similar a *C. fallax* presenta una distribución potencial (Figura 18) desde el sur de California hasta Baja California, con mayor probabilidad de ocurrencia al sur de Baja California. El valor del AUC es de 0.981, por lo cual tiene un poder predictivo muy bueno. La tasa de omisión calculada a partir de los datos es parcialmente igual a la predicción cuando los valores acumulativos del umbral son mayor que 80 (Figura 19).

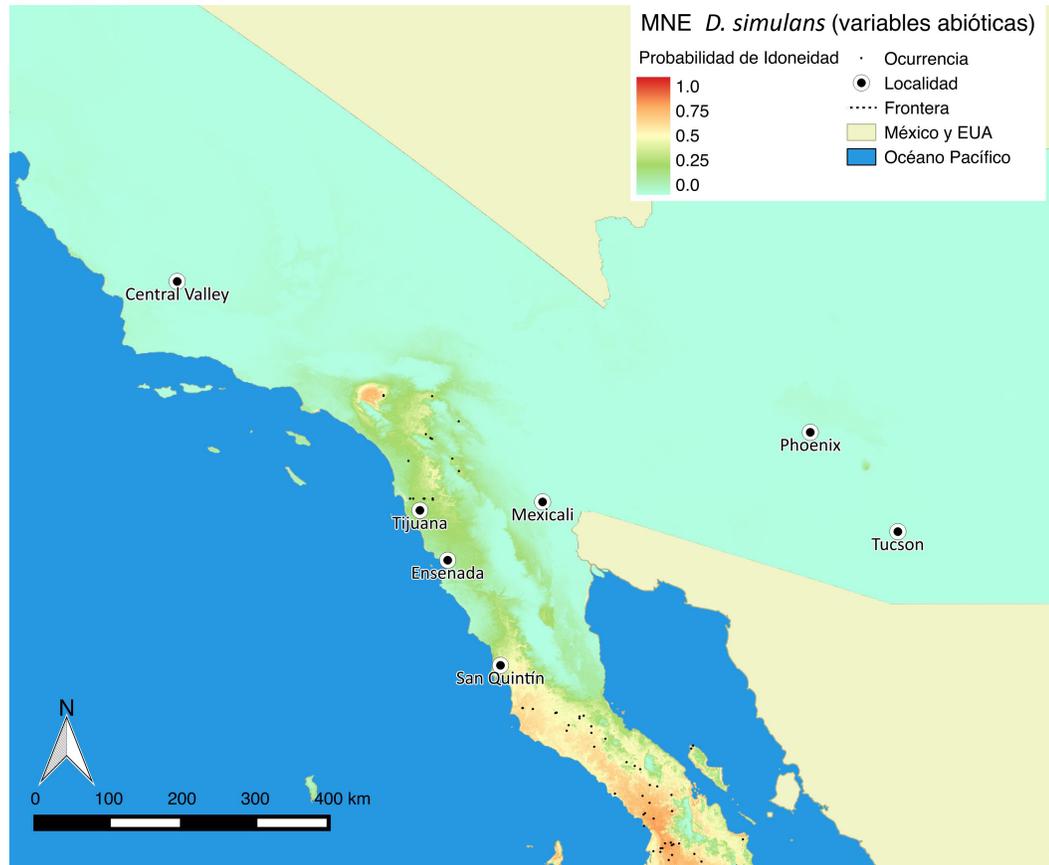


Figura 18. Modelo de distribución potencial de *D. simulans*, utilizando variables abióticas.

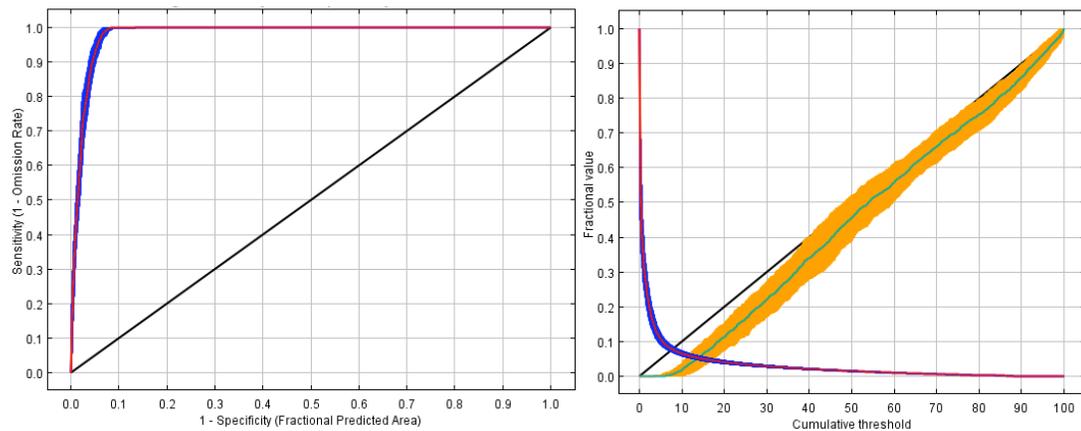


Figura 19. Evaluación del modelo de distribución potencial para *D. simulans* utilizando variables abióticas. A la izquierda se representa el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 replicas del MNE para *D. simulans*., con un AUC de 0.981. A la derecha el gráfico de omisión donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo. La línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio ± 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio ± 1 desviación estándar.

7.2.4 *Neotoma lepida* (Rata cambalachera desértica)

La distribución potencial de *N. lepida* (Figura 20) comprende el sur de California, Baja California y la región Oeste y Noroeste de Arizona, con mayor probabilidad de ocurrencia en el Sur de California. El valor del AUC es de 0.857, por lo cual tiene un poder predictivo bueno. La tasa de omisión calculada a partir de los datos es parcialmente igual a la predicción cuando los valores acumulativos del umbral son mayor que 90 (Figura 21).

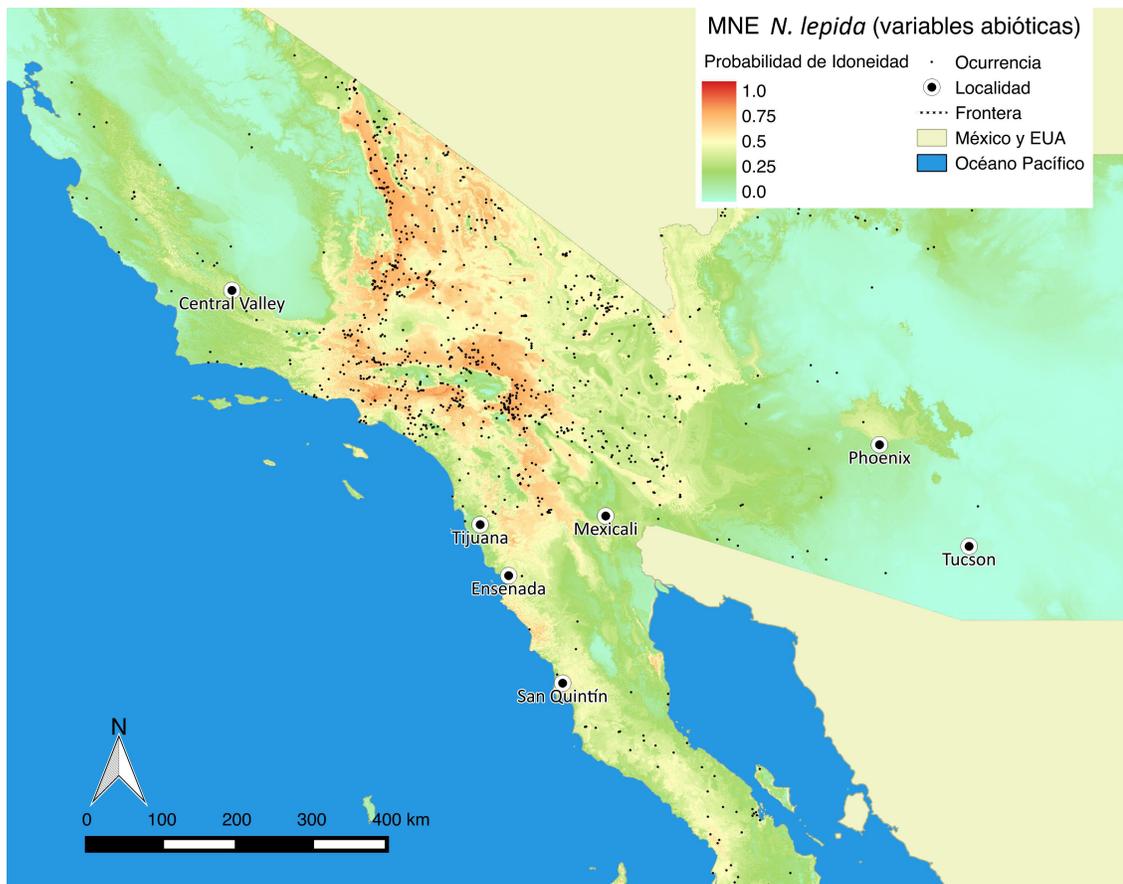


Figura 20. Modelo de distribución potencial de *N. lepida*, utilizando variables abióticas.

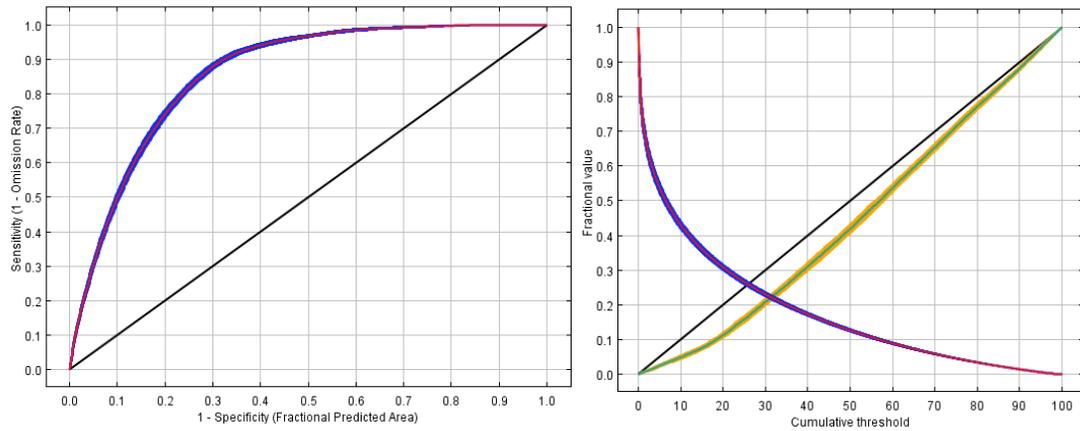


Figura 21. Evaluación del modelo de distribución potencial para *N. lepida* utilizando variables abióticas. A la izquierda se representa el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 replicas del MNE para *N. lepida*., con un AUC de 0.857. A la derecha el gráfico de omisión donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo. La línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio +/- 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio +/- 1 desviación estándar.

7.2.5 *Peromyscus maniculatus* (Ratón ciervo)

La distribución potencial de *P. maniculatus* (Figura 22) es aproximadamente en toda el área de estudio, con mayor probabilidad de ocurrencia en el estado de California. El valor del AUC es de 0.728, por lo cual tiene un poder predictivo bueno, sin embargo, se encuentra en el límite bajo del rango. La tasa de omisión calculada a partir de los datos es parcialmente igual a la predicción cuando los valores acumulativos del umbral son mayor que 75. (Figura 23).

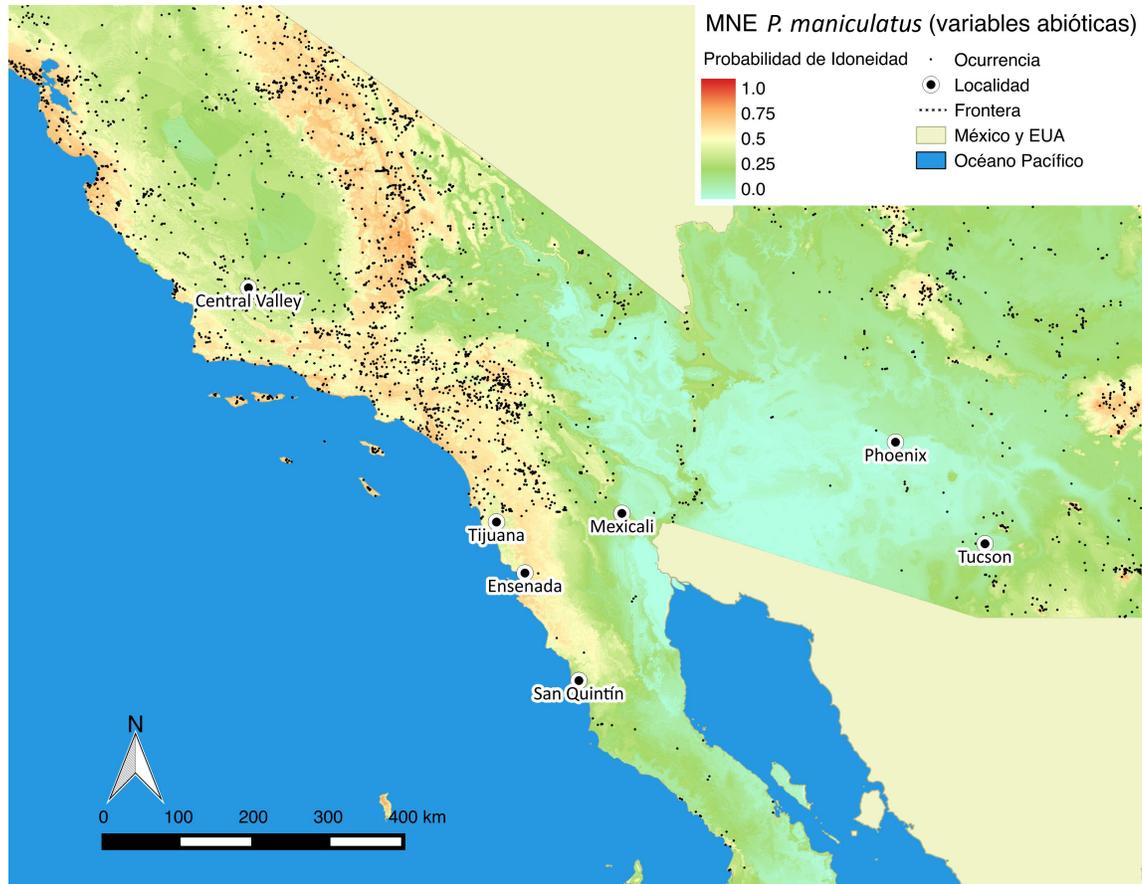


Figura 22. Modelo de distribución potencial de *P. maniculatus*, utilizando variables abióticas.

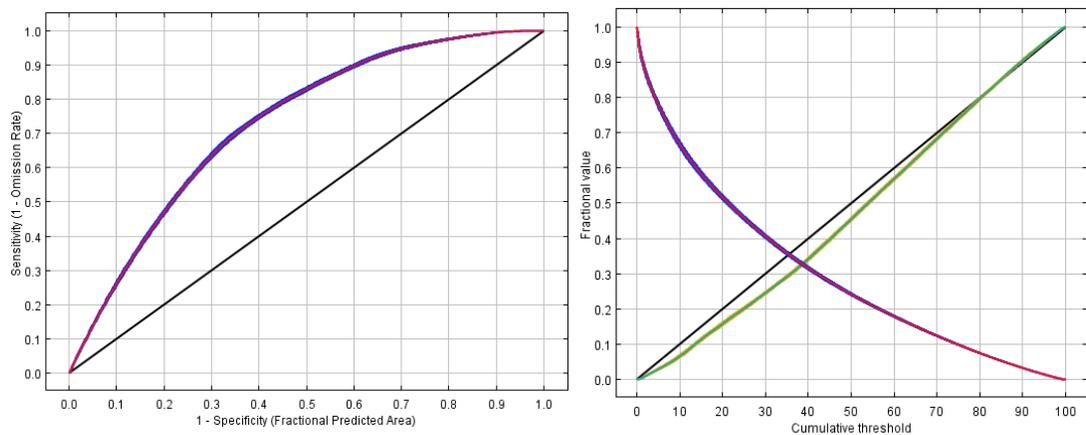


Figura 23. Evaluación del modelo de distribución potencial de *P. maniculatus*: A la izquierda se representa el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 réplicas del MNE para *P. maniculatus*, con un AUC de 0.728. A la derecha el gráfico de omisión donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo. La línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio ± 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio ± 1 desviación estándar.

7.3 Traslape de modelos de distribución potencial

Gran parte de la zona de estudio está dominada por la distribución potencial de una o dos especies de roedores. En la región de Central Valley se distribuye potencialmente *Coccidioides* spp. sin ninguna especie de roedor presente, al igual que en la zona entre Phoenix y Tucson. Se observa únicamente una región donde la distribución potencial de *Coccidioides* y dos especies de roedores coinciden, desde el sur de California en Riverside (Figura 24) hacia la frontera entre México y EUA (Figura 25).

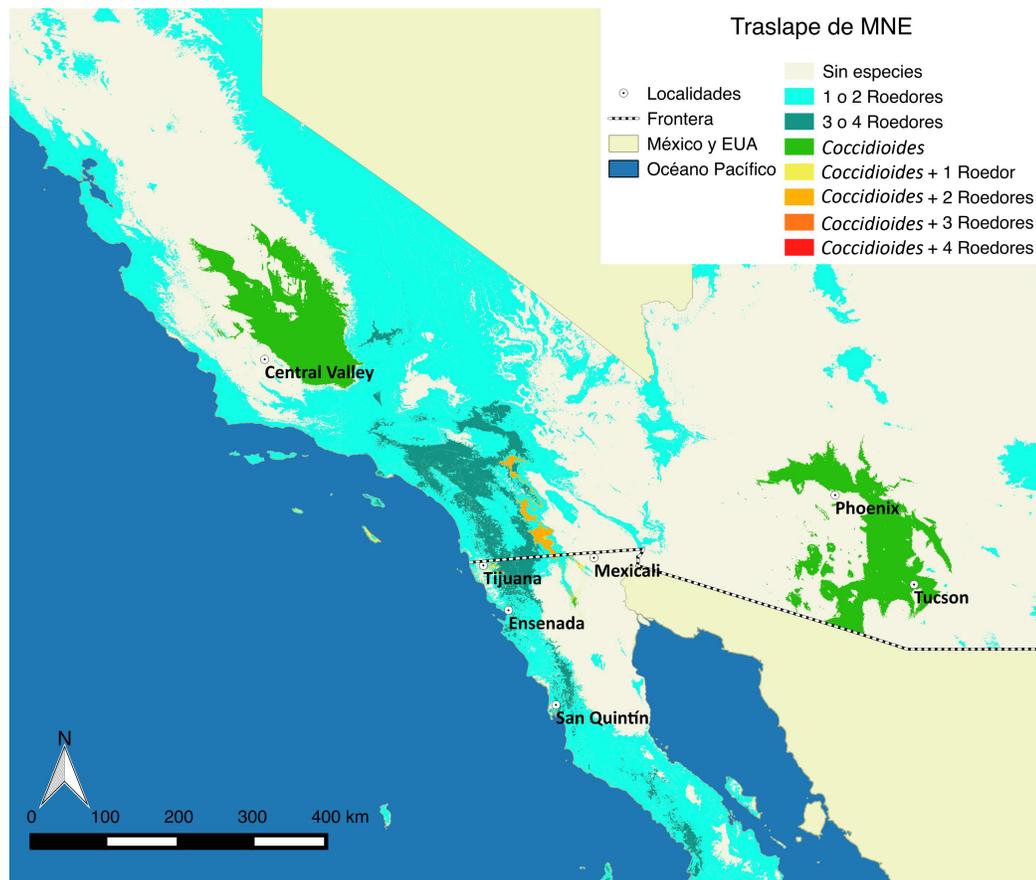


Figura 24. Traslape de modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp., *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*.

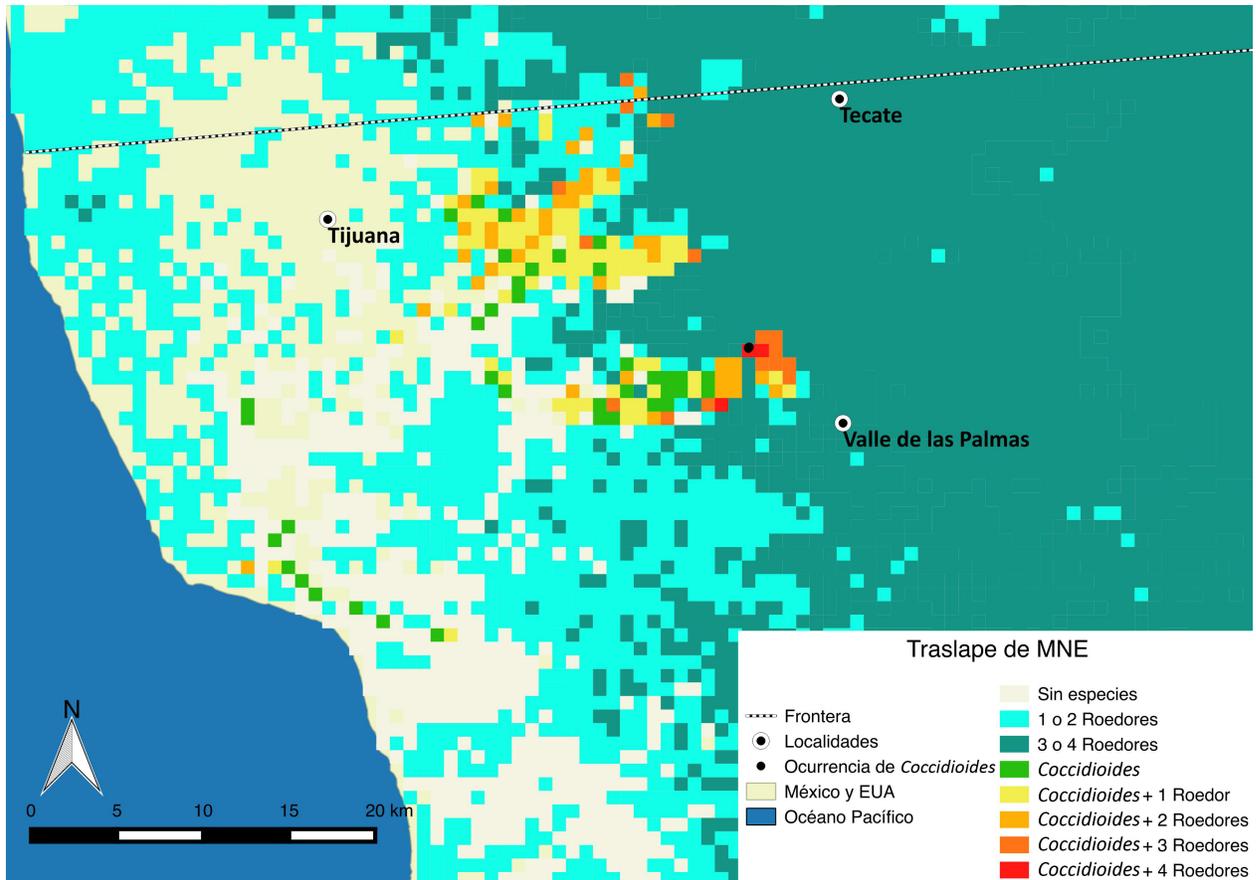


Figura 25. Acercamiento a la región Noroeste de BC del traslape de modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp., *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*.

7.4 Modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando la distribución potencial de roedores como variables bióticas

En el modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. (Figura 26) se presentan mayores valores de probabilidad de idoneidad en la región de Central Valley (con valores de probabilidad máximos de ≈ 0.8), también al Sur de Arizona (con valores de probabilidad máximo de ≈ 0.7) y en el Norte de Baja California en zonas colindantes con EUA (con valores de probabilidad máximo de ≈ 0.25) al extremo Noreste de la Laguna Salada (Figura 27). El valor del AUC es de 0.988, por lo cual tiene un poder predictivo muy bueno. La tasa de omisión de los datos no se ajusta a la predicha (Figura 28).

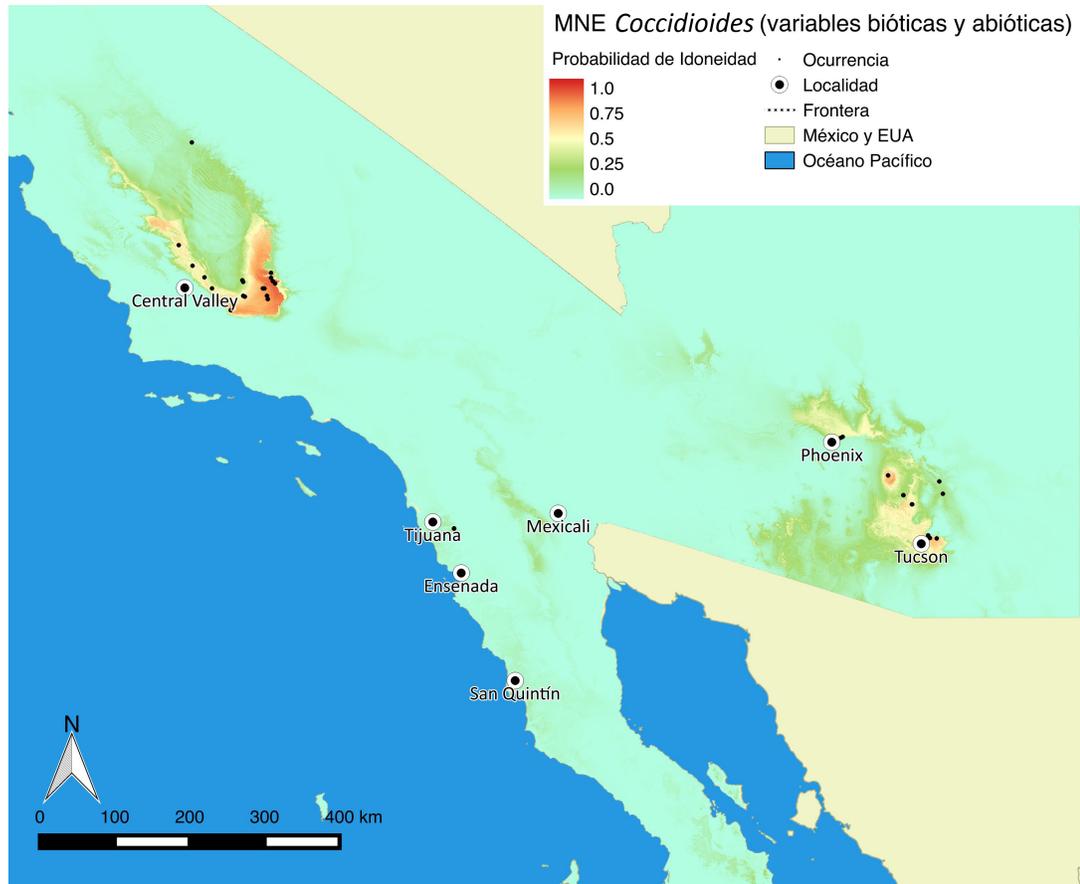


Figura 26. Modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando variables bióticas y abióticas.

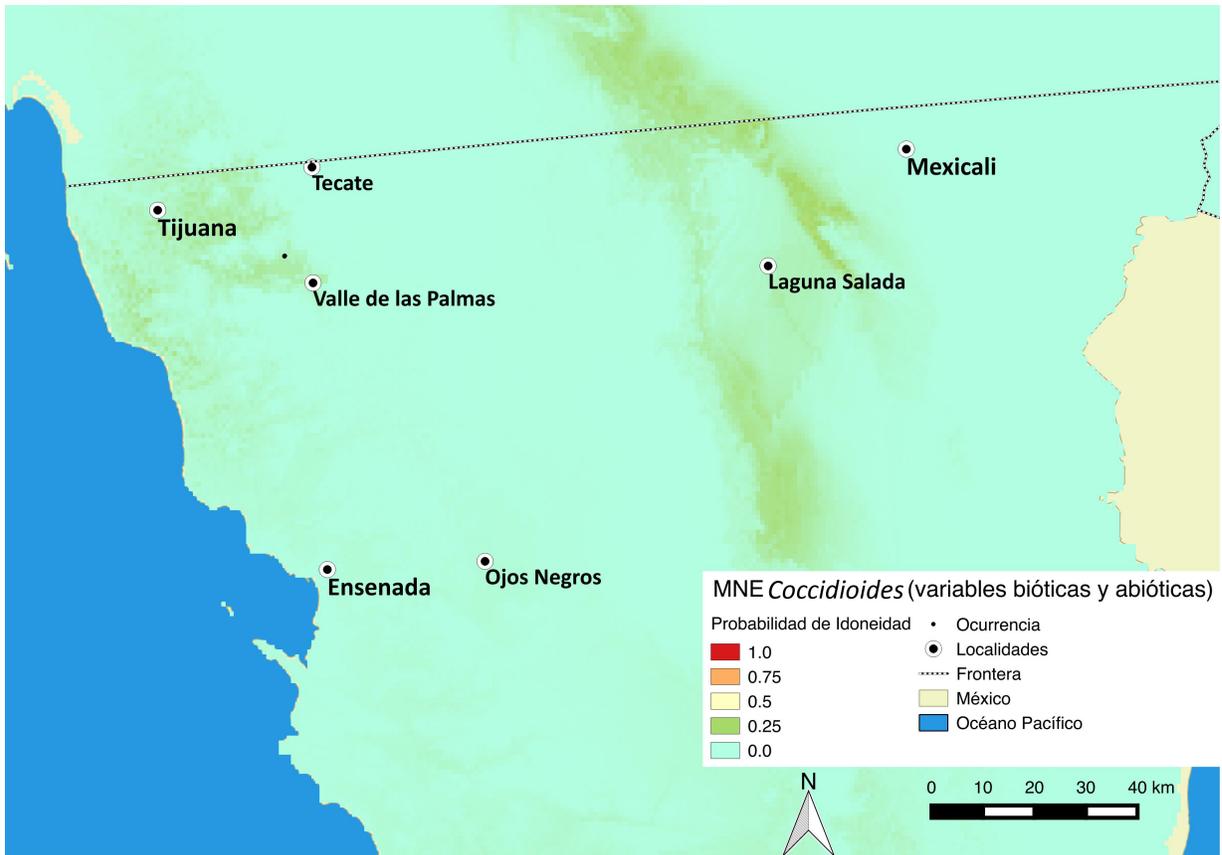


Figura 27. Acercamiento del modelo de distribución potencial de *Coccidioides* spp. utilizando variables bióticas y abióticas. Se muestra un valor de probabilidad de 0.11 en el sitio de puntos de ocurrencia en VDP y ≈ 0.25 cercano a Mexicali.

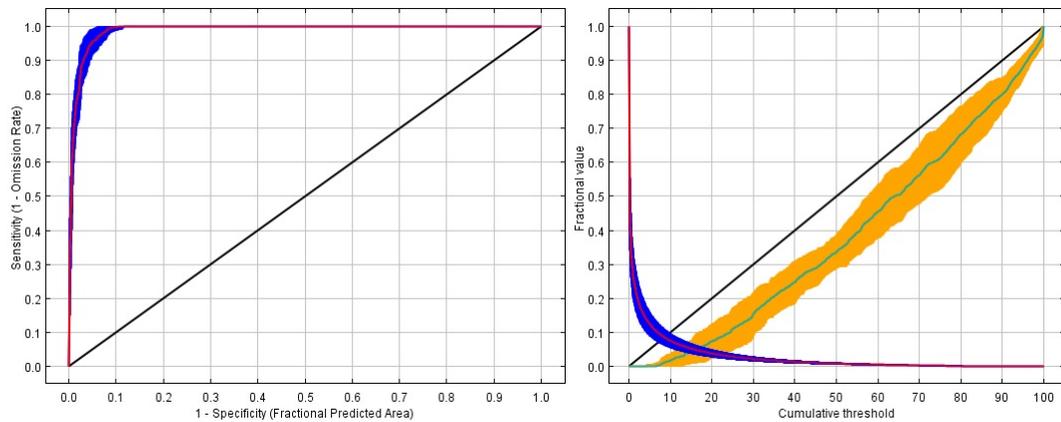


Figura 28. Evaluación del MNE de *Coccidioides* spp. que incluye variables bióticas. A la izquierda se representa el gráfico de sensibilidad vs 1-especificidad promedio de las 50 replicas del MNE para *Coccidioides* spp., con un AUC de 0.988. A la derecha el gráfico de omisión donde la línea roja muestra el área total predicha usando diferentes umbrales acumulativos. La línea azul claro muestra la variación en la tasa de omisión de los datos utilizados para la construcción del modelo. La línea negra representa la tasa de omisión predicha, la franja amarilla representa la omisión promedio ± 1 desviación estándar y la azul representa el área promedio ± 1 desviación estándar.

7.5 Topografía en las zonas idóneas para *Coccidioides* spp.

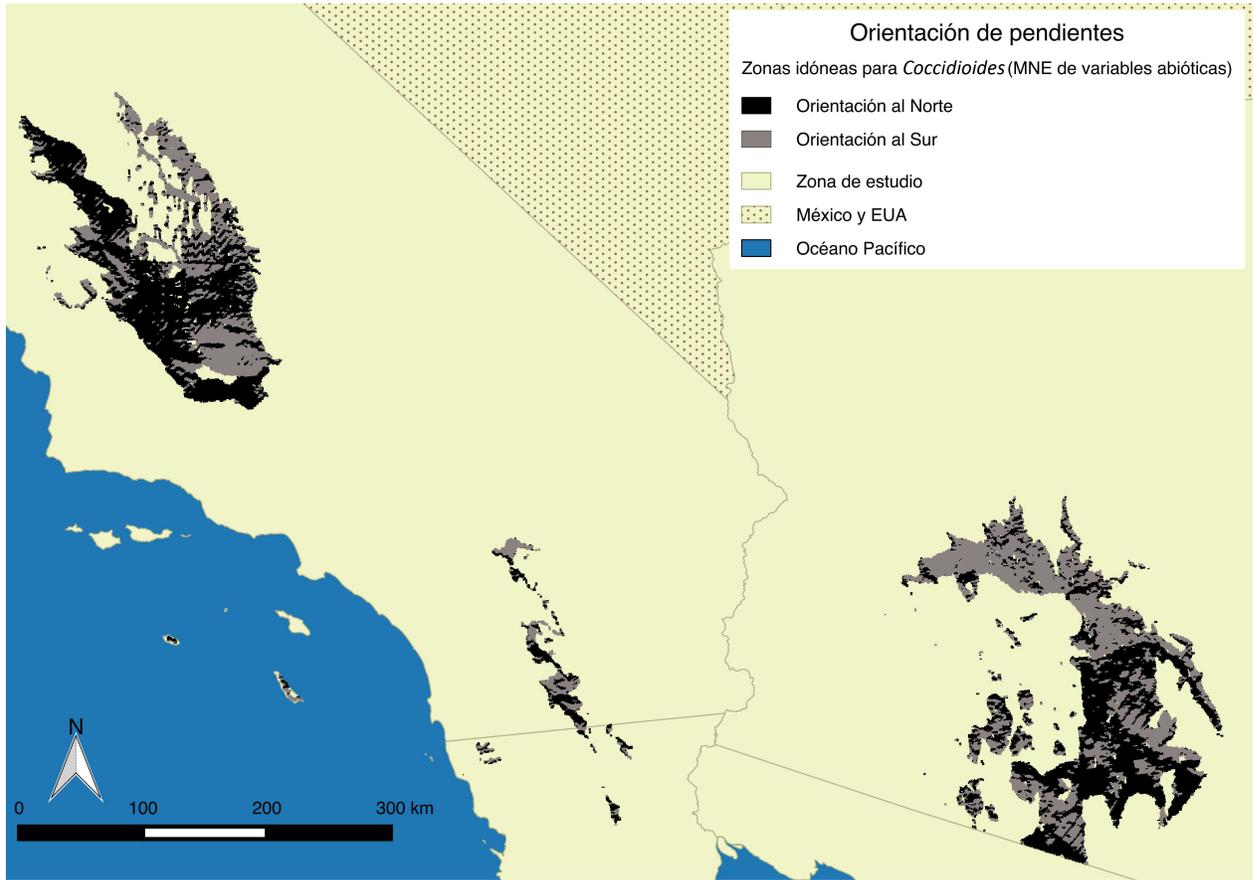


Figura 29. Mapa de la orientación de las pendientes del terreno dentro de las zonas predichas como idóneas para *Coccidioides* spp. según el MNE que incluye variables abióticas.

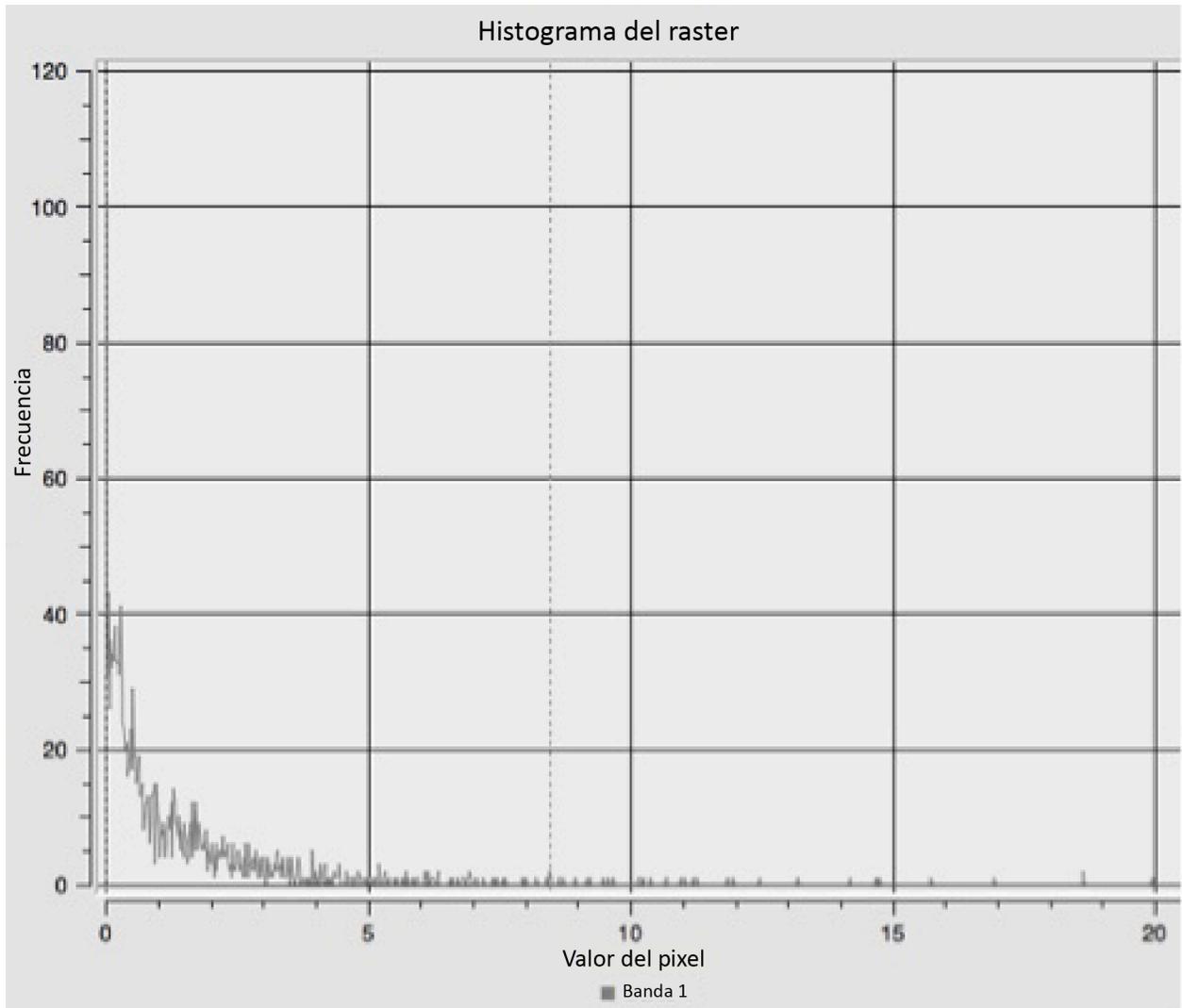


Figura 30. Histograma de las pendientes del terreno en las zonas idóneas para *Coccidioides* spp. En el eje X se presentan los valores de ángulo de inclinación del terreno en cada pixel que conforma las zonas idóneas. En el eje Y se presenta la frecuencia de ocurrencia de cada valor.

Tabla 7. Área de la zona idónea para *Coccidioides* spp. agrupadas en función de su grado de inclinación.

Pendiente	Km ²
0° a 9°	48,526.45
10° a 20°	377.55
21° a 30°	10.24

7.6 Detección molecular de *Coccidioides* spp.

7.6.1 Extracción y purificación de DNA genómico.

Se midió la concentración de DNA genómico de las muestras colectadas en los diferentes sitios de muestreo y determinó el promedio, concentración mínima y máxima. Además se determinó el promedio de la razón de pureza A260/280 de cada muestra, la cual corresponde a la razón de absorbancia a 260nm y 280nm utilizada para medir la pureza del DNA, donde una razón de ~1.8 generalmente se acepta como “puro” para DNA.

Adicionalmente se calculó la desviación estándar de la concentración de DNA por cada sitio (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Concentración de DNA total extraído a partir de muestras del sitio negativo Ojos Negros y los sitios positivos El Centinela y Sierra Cucapah.

Concentración y pureza del DNA genómico						
Muestra	Ojos Negros		El Centinela		Sierra Cucapah	
	DNA [ng/μl]	A260/280	DNA [ng/μl]	A260/280	DNA [ng/μl]	A260/280
n1	44.70	1.61	14.6	1.66	16.3	1.55
n2	30.40	1.64	13.8	1.76	6.2	1.68
n3	21.50	1.76	34.2	1.78	21.8	1.8
n4	21.50	1.64	17.4	1.71	31.4	1.72
n5	40.90	1.69	15.4	1.74	32.1	1.67
n6	49.80	1.46	26.3	1.71	18.9	1.64
n7	51.90	1.76	3	1.48	6	1.65
n8	32.30	1.69	10.8	1.76	17	1.49
n9	29.50	1.68	11.7	1.6	10.3	1.59
n10	20.90	1.7	19.6	1.76	11.2	1.65
Promedio	34.34	1.66	16.68	1.69	17.12	1.64
Mínimo	20.90	1.46	3	1.48	6	1.49
Máximo	51.90	1.76	34.2	1.78	32.1	1.8
σ	11.79	0.09	8.62	0.09	9.30	0.09

Tabla 9. Concentración de DNA total extraído a partir de muestras del sitio negativo Traslape – 0 y sitios positivos Traslape +1 y Traslape +2.

Concentración y pureza del DNA genómico						
Muestra	Traslape - 0		Traslape +1		Traslape +2	
	DNA [ng/μl]	A260/280	DNA [ng/μl]	A260/280	DNA [ng/μl]	A260/280
n1	44.90	1.77	23.2	1.79	29.1	1.76
n2	25.50	1.74	18.5	1.77	26.4	1.81
n3	29.20	1.73	26.4	1.83	24.3	1.74
n4	43.60	1.77	28	1.81	21	1.76
n5	56.40	1.82	33.1	1.8	27	1.79
n6	45.90	1.68	43.1	1.81	29.2	1.79
n7	35.50	1.74	21.5	1.73	37.2	1.8
n8	47.60	1.77	31.5	1.81	32.4	1.81
n9	43.50	1.72	75.3	1.84	43	1.82
n10	22.60	1.58	23.8	1.78	21.1	1.79
Promedio	39.47	1.73	32.44	1.80	29.07	1.79
Mínimo	22.60	1.58	18.5	1.73	21	1.74
Máximo	56.40	1.82	75.3	1.84	43	1.82
σ	10.84	0.07	16.61	0.03	6.94	0.03

7.6.2 Amplificación de las regiones ITS e ITS1 del rDNA

En todas las muestras se logró amplificar la región ITS y se obtuvieron por electroforesis en gel de agarosa, bandas por debajo de 1000 pb y mayores a 750 pb (Figura 31). Sin embargo, en la segunda PCR no se obtuvo amplificación de la región ITS1 del rDNA correspondiente a *Coccidioides* spp. en ninguna de las muestras (Figura 32).

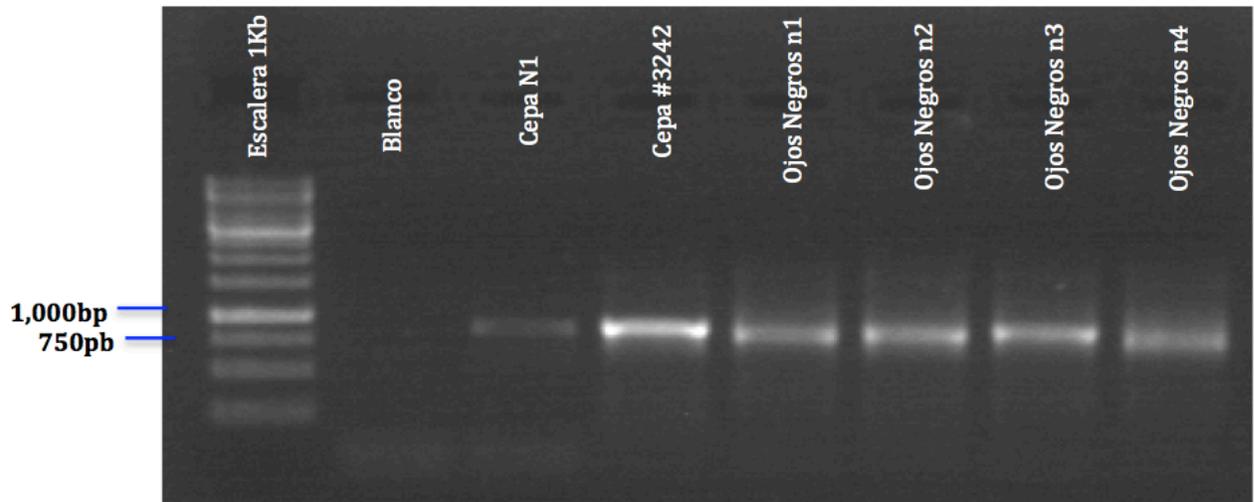


Figura 31 . Amplificación de la región ITS de rDNA. Escalera GeneRuler™ (1Kb), blanco (agua HPLC), y controles positivos: DNA de *N. crassa* (Cepa N1) y DNA de *Coccidioides* (Cepa 3242).

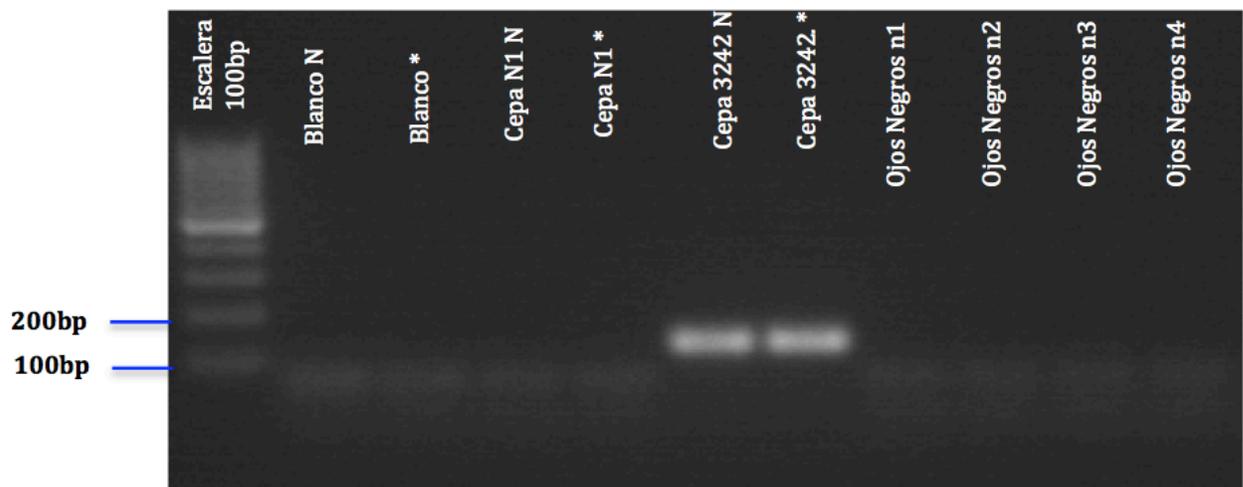


Figura 32. Amplificación de la región ITS1 de rDNA. Escalera GeneRuler™ (100 pb), blanco N (agua HPLC), blanco* (Blanco acarreado), control negativo DNA de *N. crassa* (Cepa N1 N), Cepa N1*(Control acarreado), Control positivo DNA de *Coccidioides* (Cepa 3242 N) y Cepa 3242* (Control acarreado).

Capítulo 8. Discusión

Emplear los MNE como herramienta, representa una gran ventaja ya que podemos predecir la distribución potencial de alguna especie en zonas donde no se han hecho observaciones, esto basándose en que las condiciones ambientales serán similares a puntos donde se ha detectado la especie con anterioridad. Es una herramienta cada vez más utilizada para abordar preguntas sobre la geografía y ecología de transmisión de enfermedades (Townsend, 2006).

8.1 Criterios de selección de variables ambientales iniciales y puntos de ocurrencia.

Se utilizaron las variables bioclimáticas, debido a que se construyen a partir de variables climáticas de temperatura y precipitación mensual, anual o promedio y reflejan tendencias anuales, estacionalidad y factores ambientales extremos o limitantes, por lo que se consideran variables biológicamente significativas y son ampliamente utilizadas para modelar la distribución potencial de especies (<http://www.worldclim.org/bioclim>).

Los roedores fueron elegidos tomando como base trabajos previos en VDP, un sitio donde se ha detectado molecularmente *Coccidioides* spp. a partir de muestras de suelo y en donde también se detectaron anticuerpos contra el hongo en los roedores *N. lepida* y *P. maniculatus* (Catalán-Dibene *et al.*, 2014). Y la presencia de *C. fallax* y *D. simulans* en el sitio de muestreo, no se detectó el hongo en estas últimas dos especies (Catalán-Dibene *et al.*, 2014).

Anteriormente, Emmons 1942, detectó *Coccidioides* spp. en 6 especies de roedores silvestres en San Carlos, Arizona: *Peromyscus eremicus*, *Perognathus baileyi*, *P. penicillatus*, *P. intermedius*, *Dipodomys merriami*, y *Citellus harrisii*, siendo el género *Perognathus* (actualmente *Chaetodipus*) aparentemente el hospedero de mayor importancia.

En este trabajo los puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp. corresponden a coordenadas geográficas donde se ha detectado el hongo a partir de muestras de suelo por técnicas moleculares, que

a diferencia de registros clínicos (donde existe la incertidumbre del lugar exacto de infección del hospedero), indican sitios exactos de ocurrencia.

8.2 AUC en modelos de distribución potencial

Los modelos con menor AUC fueron los generados para *N. lepida* y *P. maniculatus*. Ambas especies presentan una distribución geográfica amplia por lo que resulta difícil obtener un número y distribución de puntos de ocurrencia suficientemente significativo. Para ambas especies se observa una diferencia en la densidad de puntos entre EUA y México. Esta falta de puntos de ocurrencia en BC resulta en zonas predichas como favorables sin puntos de ocurrencia, es decir falsos positivos y así reflejándose en una menor AUC para ambos modelos. Un sesgo común en los puntos de ocurrencia tiene lugar cuando en una zona de estudio hay mayor densidad de puntos de ocurrencia en el norte y menor densidad en el sur; este tipo de sesgo es común cuando una especie es monitoreada con distinta frecuencia, por ejemplo en países distintos o grupos de países distintos (Fourcade et al., 2014). Los MNE de *N. lepida* y *P. maniculatus*, a pesar de ser los de menor valor de AUC, se clasifican como modelos con poder predictivo bueno, según los índices cualitativos propuestos por Swets, 1988 (ver Tabla 5). Con base en los mismos índices cualitativos, los MNE de *Coccidioides* spp., *C. fallax* y *D. simulans*, al presentar AUC mayores a 0.9 representan modelos con muy buen poder predictivo.

8.3 Comparación de modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp.

La distribución potencial de *Coccidioides* spp. según el MNE biótico y abiótico se redujo a un 63% en comparación con el modelo que incluye solo variables abióticas (Tabla 10), aunque ocupa un patrón muy similar (Figura 33). Debido a que la distribución de *C. fallax* y *D. simulans* está restringida al sur de California y Baja California, incluir su distribución en conjunto con *N. lepida* y *P. maniculatus* posiblemente podría estar limitando la predicción del modelo. Por lo que se procedió a modelar la distribución de *Coccidioides* incluyendo variables abióticas y la distribución potencial de una especie de roedor a la vez (anexo 4). El área idónea para *Coccidioides* utilizando sólo variables abióticas resultó muy similar cuando se incluyó la distribución de solo una especie roedor (Tabla 11).

Ello hace rechazar parcialmente la hipótesis propuesta, la cual sugería que al incluir los modelos de distribución potencial de roedores para modelar la distribución potencial de *Coccidioides* spp. se obtendrían zonas más dirigidas, por lo tanto más reducidas y así aumentar las probabilidades de obtener muestras de suelo positivas para *Coccidioides* spp.

Tabla 10. Áreas de las zonas de idoneidad.

Hotspot	Km ²
MNE abiótico	46,586.19
MNE biótico y abiótico	29,486.11

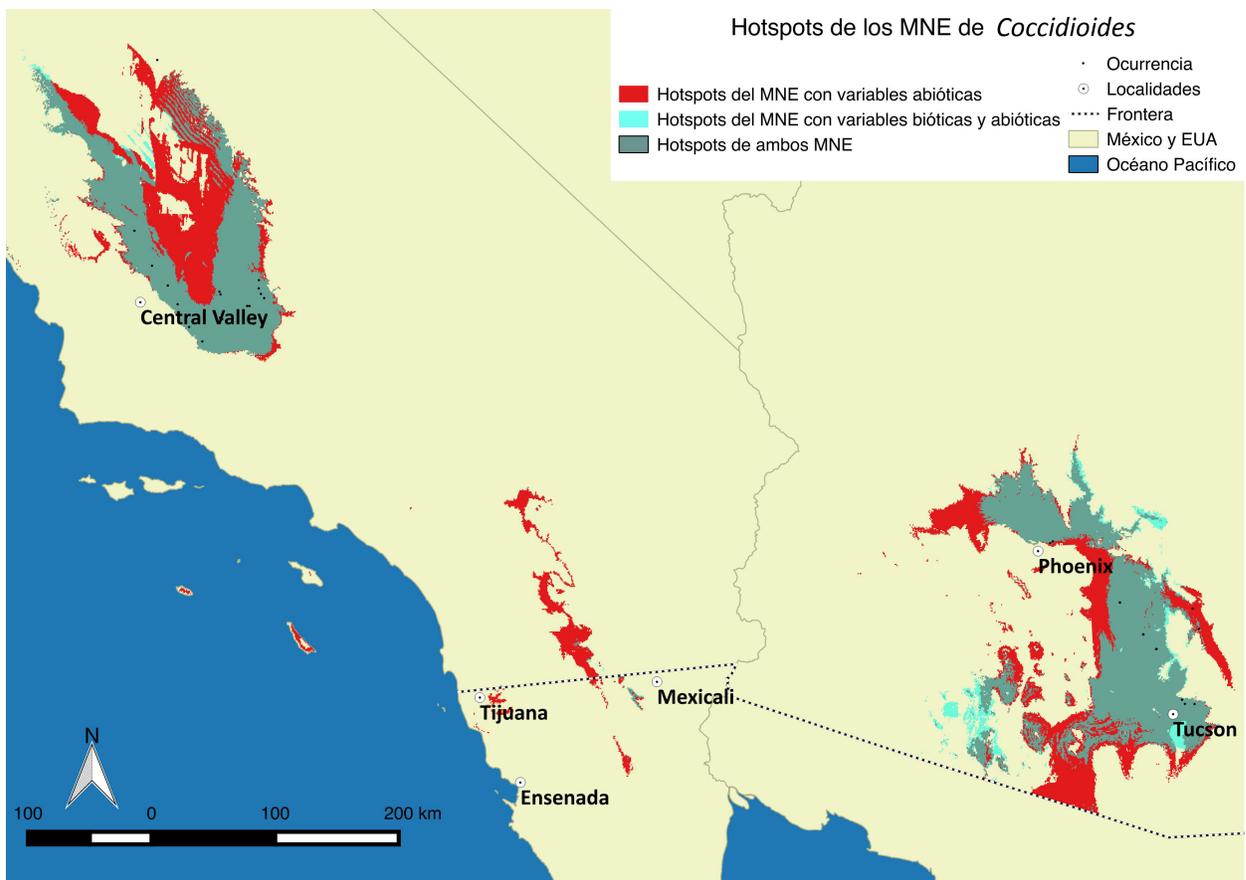


Figura 33. Comparación espacial de zonas idóneas para *Coccidioides* spp. según ambos MNE. Se observan las zonas idóneas según el MNE abiótico y con base al MNE biótico y abiótico de color rojo y cian, respectivamente. Las zonas de intersección entre ambas predicciones se observa de color azul.

Tabla 11. Hotspots de *Coccidioides* incluyendo variables abióticas y una especie de roedor.

Hotspot	Área en Km ²
<i>Coccidioides</i> (abióticas)	46,586.19
<i>Coccidioides</i> [bióticas (4 roedores) y abióticas]	29,486.11
<i>Coccidioides</i> (abióticas y <i>C. fallax</i>)	45,435.27
<i>Coccidioides</i> (abióticas y <i>D. simulans</i>)	42,184.75
<i>Coccidioides</i> (abióticas y <i>N. lepida</i>)	45,210.39
<i>Coccidioides</i> (abióticas y <i>P. maniculatus</i>)	44,126.91

8.4 Traslape de modelos de distribución potencial

Se observó que en la región sur de California convergen la distribución potencial de *Coccidioides* spp., *N. lepida* y *C. fallax*; Aunque no coinciden las distribuciones potenciales de todas las especies, los puntos de ocurrencia de *Coccidioides* spp. en California corresponden a sitios con actividad de roedores. Lauer *et al.*, 2014 reportaron que en 11 de los 13 sitios de crecimiento de *Coccidioides* spp. observaron evidencia de actividad de roedores, siendo las ardillas, ratas canguro y liebres los mamíferos pequeños observados con mayor frecuencia. En Arizona se distribuyen especies de los géneros *Peromyscus*, *Chaetodipus* y *Dipodomys* que coinciden con las especies asociadas a *Coccidioides* spp. reportadas por Emmons en 1942.

A partir de registros de GBIF, CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad) en su sitio www.naturalista.mx, muestra mapas de distribución a nivel taxonómico de género (Figura 34) donde se observa que *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida* y *P. maniculatus* pertenecen a géneros ampliamente distribuidos.

Respecto al traslape de MNE los sitios de probabilidad de ocurrencia únicamente de *Coccidioides* spp. podría coincidir con alguna otra especie incluida en estos géneros, al menos en la zona de Arizona (Figura 35).

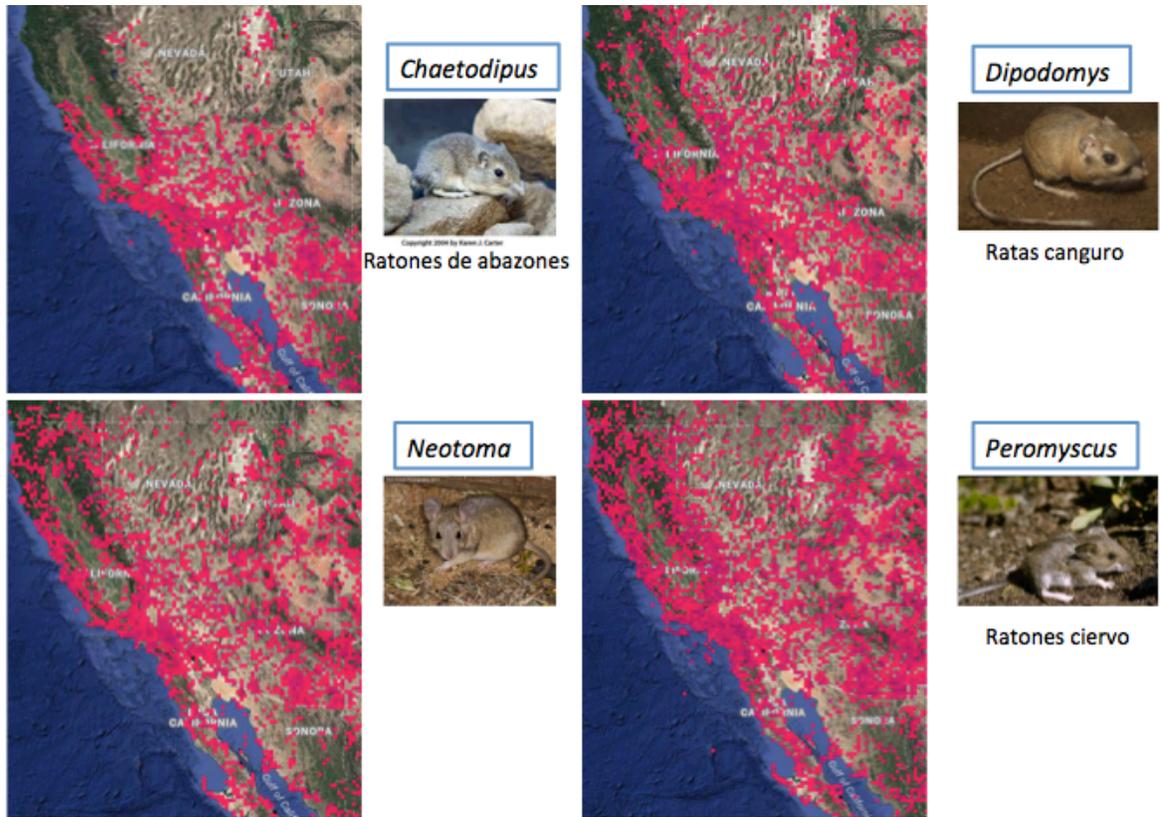


Figura 34. Ocurrencia de roedores a nivel taxonómico de género.

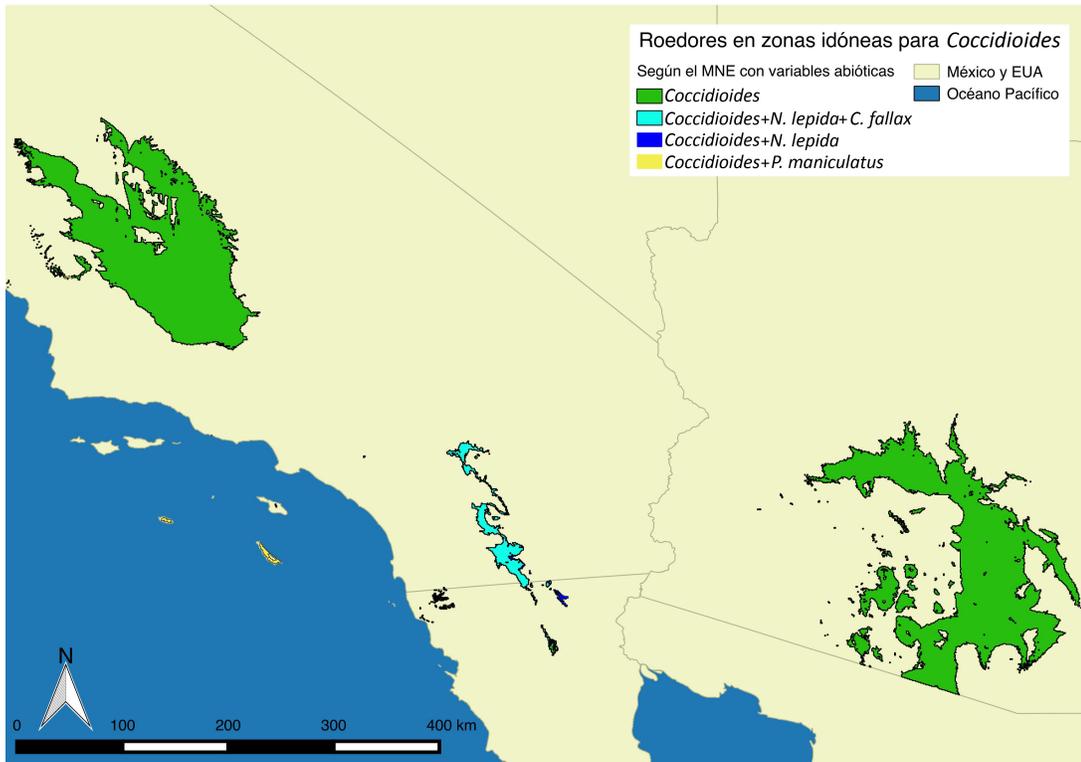


Figura35. Mapa de traslape de MNE de *Coccidioides* spp. *C. fallax*, *D. simulans*, *N. lepida*, y *P. maniculatus*.

8.5 Comparación de MNE utilizando GARP y Maxent

Una de las diferencias entre los modelos generados por *GARP* y *Maxent* es el formato salida; *Maxent* produce predicciones con valores continuos, permitiendo una distinción más fina de la probabilidad de idoneidad en diferentes regiones, por otro lado *GARP* genera predicciones binarias lo cual impide la detección de cambios sutiles entre regiones con distinta probabilidad de idoneidad (Phillips et al., 2006), estas diferencias se reflejan en su interpretación visual. En una zona donde *GARP* “generaliza” en un intervalo de probabilidad, produce una predicción más amplia. En cambio debido a que *Maxent* tiene la capacidad de distinguir de manera más detallada entre dos zonas idóneas cuál de ellas presenta mayor predicción de probabilidad, tiende a ajustar su predicción a los puntos de ocurrencia, resultando en áreas de distribución potencial más restringidas (Phillips et al., 2006). En congruencia con la literatura, si comparamos de manera visual las zonas de Arizona, California y Baja California del MNE reportado por Baptista-Rosas et al., 2007 utilizando el algoritmo *GARP*, se observa una predicción de la distribución potencial más amplia que en el MNE de *Coccidioides* spp. utilizando *Maxent* (Figura 36). Un área de distribución más restringida, representa una ventaja si el objetivo es

identificar sitios de muestreo dirigidos, ya que ayuda a enfocar los esfuerzos de muestreo a un área menor.

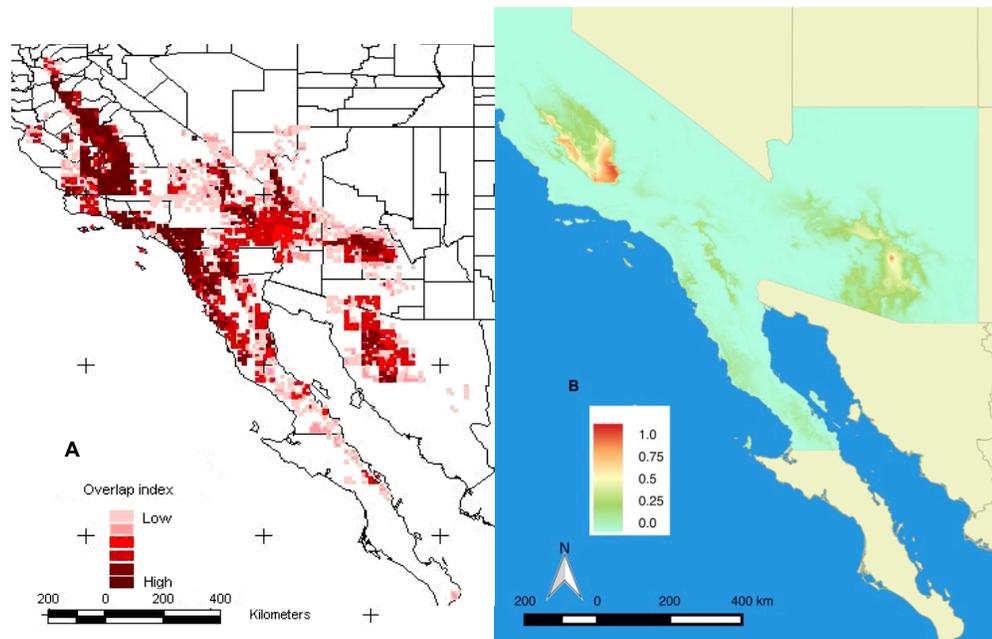


Figura 36. Comparación visual de MNE generados por GARP y Maxent. A) MNE de *Coccidioides* spp. utilizando el algoritmo GARP. B) MNE de *Coccidioides* spp. utilizando el algoritmo Maxent.

Según el reporte anual de coccidioidomicosis del 2014 publicado por *Arizona Department of Health Services* y estimando el promedio de casos por cada 100,000 habitantes durante el periodo de 2008 a 2014, los condados de Kern y Kings en California y Maricopa, Pinal, Pima y La Paz en Arizona presentaron el mayor número de casos reportados (Tabla 12). Al ubicar los condados en el MNE abiótico se observa que hay una concordancia entre los condados con más casos reportados y las zonas de alta probabilidad de idoneidad (Figura 37), esto sugiere una buena predicción del MNE.

Tabla 12. Casos de coccidioidomosis por condado.

Estado	Condado	p/ 1×10^5
California	Kern	205.1
	Kings	191.7
Arizona	Maricopa	193.3
	Pinal	145
	Pima	124.3
	La Paz	105

p/ 1×10^5 : Número de casos por cada 100,000 habitantes

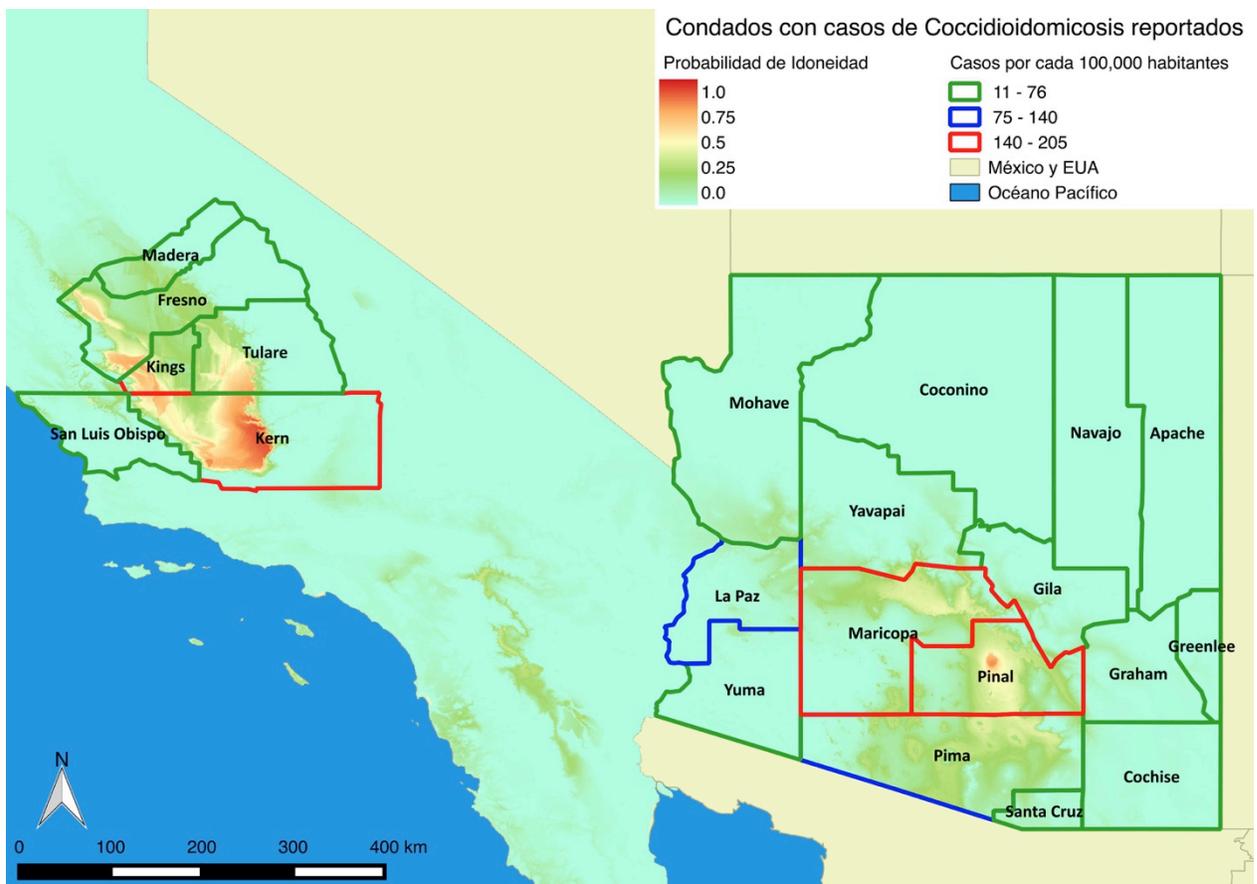


Figura 37. Condados con el mayor número promedio de casos reportados por cada 100,000 habitantes en los años 2008 – 2014). Delimitados con color rojo se observan los condados con 140 a 205 casos, en azul aquellos con 76 a 140 casos y en verde de 11 a 76 casos por cada 100,000 habitantes.

8.6 Topografía

Tal como reportaron Fisher et al., 2007, más que la precipitación, un factor de suma importancia es la cantidad de agua que se infiltra en el suelo quedando disponible para *Coccidioides*. También reportaron que la pendiente del terreno influye en la infiltración, debido a que el agua se drena con mayor lentitud en zonas planas proveyendo mayor tiempo para la infiltración. Además, el periodo e intensidad de insolación cambian con respecto a la orientación de la pendiente, formando un rango de microclimas en paisajes con grandes pendientes orientadas de manera distinta (Holland & Steyn, 1957)

Con base a lo anterior, podremos proponer que los resultados obtenidos cumplen parcialmente con la hipótesis propuesta debido a que las zonas predichas como favorables para *Coccidioides* corresponden a regiones relativamente planas, ya que la mayoría de las pendientes presentan una inclinación menor a 5° (Figura 30). El 57% de las zonas idóneas para la ocurrencia del hongo se caracterizan por pendientes orientadas al sur, que generalmente presentan suelos de menor humedad y más cálidas, sin embargo al tratarse de zonas relativamente planas, el efecto que pueda tener dicha orientación en términos de periodos e intensidad de insolación es nulo o muy poco perceptible. Cabe destacar que las variables utilizadas en este trabajo presentan una resolución de 30 arcosegundos, que en la latitud correspondiente a la zona de estudio, cada pixel generaliza la información de aproximadamente 1km² en escala real, siendo un área lo suficientemente extensa para presentar cambios en pendiente y orientación no detectables.

8.7 Detección molecular

Uno de los factores que limita la detección molecular de *Coccidioides* a partir de muestras de suelo, es su distribución irregular a manera de parches. Incluso los aislados en un mismo sitio han sido esporádicos a pesar de ser áreas endémicas (Barker *et al.*, 2012). Adicionalmente, la cantidad de suelo analizado en este trabajo corresponde a .25g por muestra y al tratarse de un hongo poco competitivo (Swatek, 1970; Green *et al.*, 2000; Baker et al., 2012) es probable que otros organismos lo superen en abundancia, esto podría resultar en concentraciones bajas de DNA de *Coccidioides* en el DNA total de cada muestra. Por otro lado, el área de muestreo y número de muestras fueron muy escasos.

Inconvenientemente, para la construcción de MNE se toma en cuenta una mínima parte de los factores que permiten que una especie esté ocupando su nicho. No se incluyen dispersión, competencia o barreras geográficas, entre otros factores que contribuyen a la presencia de una especie. No obstante, han resultado ser una herramienta poderosa debido a que, utilizando información incompleta, se logró obtener un MNE donde las probabilidades más altas coinciden con zonas de alto número de casos de coccidioidomicosis reportados en Arizona y California, lo cual se podría traducir en la presencia del hongo. Aunque en Baja California las probabilidades de idoneidad son menores que en California y Arizona, se ha logrado detectar el hongo en Valle de las Palmas y San José de la Zorra en trabajos anteriores del grupo de laboratorio, presentando una probabilidad de idoneidad según el MNE abiótico de 0.11 y 0.09 respectivamente. Encontrar otros lugares de crecimiento de *Coccidioides spp.* utilizando esta herramienta representa un gran reto y se requiere de un mayor esfuerzo de muestreo.

Capítulo 9. Conclusiones

Aunque incluir la distribución de roedores haya cambiado poco la extensión del área de distribución de *Coccidioides* (utilizando solo variables abióticas), la inclusión de las cuatro especies de roedores resultó en la reducción del área de distribución potencial del hongo, siendo la distribución de *D. simulans* y *P. maniculatus* las que ejercieron mayor efecto.

A pesar de que la mayor parte de la distribución potencial de los roedores contemplados en este trabajo no coincide con la de *Coccidioides* spp., al no reportarse aún una relación especie específica, la distribución potencial de cuatro especies de roedores no influye de manera drástica en distribución de *Coccidioides* spp. Sin embargo, pertenecen a los mismos géneros de especies observadas en sitios endémicos para el hongo en California y Arizona, así como especies que han sido infectadas por *Coccidioides* spp.

Al hacer una comparación de la distribución predicha al utilizar *GARP* y *Maxent*, este último genera áreas idóneas más restringidas, reduciendo el área de estudio para llevar a cabo muestreos dirigidos, lo cual representa una ventaja.

Favorablemente para la salud pública, las zonas de distribución potencial para *Coccidioides* en Baja California no son igual de extensas que California y Arizona, restringiendo los probables sitios de muestreo.

Literatura citada

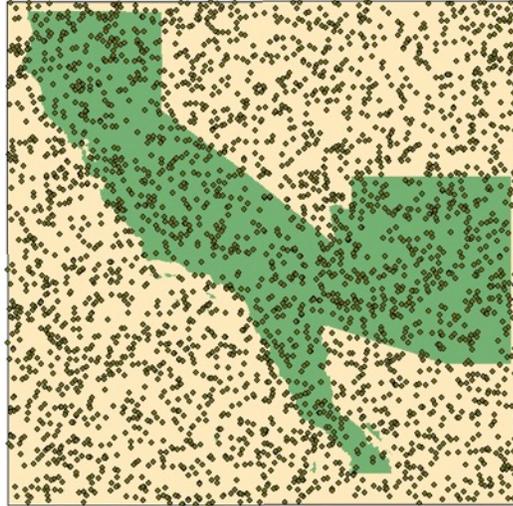
- Baptista-Rosas, R.C., Hinojosa, A., Riquelme, M. 2007. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North American deserts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111:35-46.
- Baptista-Rosas, R.C., Riquelme, M. 2007. Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24:100-105.
- Baptista-Rosas, R.C., Arellano, E., Hinojosa, A., Riquelme, M. 2010. Bioclimatología de la coccidioidomicosis en Baja California, México. *Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*. 71:21-30.
- Baptista-Rosas, R.C., Catalán-Dibene, J., Romero-Olivares, A.L., Hinojosa, A., Cavazos, T., Riquelme, M. 2012. Molecular detection of *Coccidioides* spp. from environmental samples in Baja California: linking valley fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecology*. 5:177-190.
- Barker, B.M., Tabor, J.A., Shubitz, L.F., Perrill, R., Orbach, M.J. 2012. Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona soil samples. *Fungal Ecology*. 5:163-176.
- Bennie, J., Huntley, B., Wiltshire, A., O.Hill, M., Baxter, R. 2008. Slope, aspect and climate: Spatially explicit and implicit models of topographic microclimate in chalk grassland. *Ecological Niche Modelling*. 216:47-59.
- Catalán-Dibene, J. 2012. Caracterización de los heterómidos del Valle de las Palmas como portadores del agente causal de la coccidioidomicosis. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada BC. 65 pp.
- Catalán-Dibene, J., Johnson, S.M., Eaton, R., Romero-Olivares, A.L., Baptista-Rosas, R.C., Pappagianis, D., Riquelme, M, 2014. Detection of coccidioidal antibodies in serum of small rodent community in Baja California, Mexico. *Fungal Biology*. 118:330-339.
- Chen, CH S.J., Hsu, Y.T., Perng, R.P. 1991. Disseminated coccidioidomycosis with lung, skin and lymph node involvement: report of a case. *Journal of the Formosan Medical Association*. 90:788-792.
- Cochran, C.C. 2010. Soil moisture-temperature correlation and classification model. En 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia, 1–6 Agosto.
- Cole, G.T. & Sun, S.H. 1985. Arthroconidium-spherule-endospore transformation in *Coccidioides immitis*. En: Szaniszlo, P.J. (Ed) *Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans*. Penum, New York.281-333.
- Comrie, A.C. 2005. Climate factors influencing coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. *Environmental Health Perspectives*. 113:688-692.
- Daniels, J.I., Wilson, W.J., DeSantis, T.Z., Gouveia, F.J., Anderson, G.L., Shin, J.H., Pletcher, R., Johnson, S. M., Pappagianis, D. 2001. Development of a quantitative TagMan-PCR assay and feasibility of atmospheric collection for *Coccidioides immitis* for ecological studies. *Lawrence Livermore National Laboratory*.

- De Macedo, R.C., Rosado, A.S., da Mota, F.F., Cavalcante, M.A., Eulalio, K.D., Filho, A.D., Martins, L.M., Lazera, M.S., Wanke, B. 2011. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BioMedical Central Microbiology*. 11(108).
- Elith, J. & Leathwick, J.R. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40:677-697.
- Ferreras, C.C. & Fidalgo, H.C. 2014. *Biogeografía y Edafogeografía*. En: Editorial Síntesis. pp 264.
- Fisher, F.S., Bultman, M.W., Johnson, S.M., Pappagianis, D., Zaborsky, E. 2007. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States: a matter of scale. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111:47-72.
- Fisher, M.C., White, T.J., Taylor, J.W., 1999. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Ecology*. 8:1082-84.
- Fourcade, Y., Engler, J.O., Rödder, D., Secondi, J. 2014. Mapping species distribution with Maxent using a geographically biased sample of presence data: A performance assessment of methods for correcting sampling bias. *PLOSone*. 9(5):1-13.
- Garcia-Garcia, S.C., Gomez-Flores, M., Cabrera-Vera, L., Salas-Alanis, J.C., Gonzalez-Gonzalez, S.E., Ocampo-Candiani, J. 2014. Coccidioidomycosis and the skin: a comprehensive review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 90(5):610-621.
- Gazis, R., Rehner, S., Chaverri, P. 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*. 20:3001–3013.
- Greene, D.R., Koenig, G., Fisher, M.C., Taylor, J.W. 2000. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 93(3):406-410.
- Hector, R.F., Rutherford, G.W., Tsang, C.A., Erhart, L.M., McCotter, O., Anderson, S.M., Komatsu, K., Tabnak, F., Vugia, D.J., Yang, Y., Galgiani, J.N. 2011. The public health impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8:1150-1173.
- Hogan, M. & Cleveland, C. 2012. Microclimate. En: Encyclopedia of Earth, Washington, DC.
- Holland, P.G., Steyn, D.G., 1975. Vegetational responses to latitudinal variations in slope angle and aspect. *Journal of Biogeography*. 2:179-183.
- Kantarcioglu, A.S., Sandoval-Denis, M., Aygun, G., Kiraz, N., Akman, C., Apaydin, H., Karaman, E., Guarro, J., de Hoog, G.S., Gurel, M.S., 2014. First imported coccidioidomycosis in Turkey: A potential health risk for laboratory workers outside endemic areas. *Medical Mycology Case Reports*. 3:20-25.
- Kirkland, T. & Fierer, J. 1996. Coccidioidomycosis: A reemerging infectious disease. *Emerging Infectious Disease*. 2(3):192-199.
- Kolivas, K.N., Johnson, P.S., Comrie, A.C., Yool, S.R. 2001. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). *Aerobiologia*. 17:31-42.
- Lauer, A., Baal, J.D., Baal, J.C., Verma, M., Chen, J.M. 2012. Detection of *Coccidioides immitis* in Kern County, California, by multiplex PCR. *Mycologia*. 104:62-69.

- Laure, A., Talamantes, J., Casteñón-Olivares, L., Medina, L., Hugo-Baal, J., Casimiro, K., Shroff, N., Emery, K.W. 2014. Combining forces- The use of landsat TM satellite imagery, soil parameter information, and multiplex PCR to detect *Coccidioides immitis* growth sites in Kern County, California. *PLOS one*. 9(11):1-14.
- Måren, E.I., Karki, S., Prajapati, C., Yadav, R.K., Shrestha, B.B., 2015. Facing north or south: Does slope aspect impact forest stand characteristics and soil properties in a semiarid trans-Himalayan valley? *Journal of Arid Environments*. 121:112-123.
- Nguyen, C., Barker, B.M., Hoover, S., Nix, D.E., Ampel, N.M., Frelinger, J.A., Orbach, M.J., Galgiani, J.N. 2013. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 26: 505-525.
- Ortega-Huerta, M.A. & Townsend, P.A. 2008. Modeling ecological niches and predicting geographic distributions: a test of six presence-only methods. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79: 205-216.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Townsend, P.A. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*. 34:102-117.
- Pearson, R.G. 2008. Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners. Synthesis. *American Museum of Natural History*. Available at <http://ncep.amnh.org>.
- Phillips, S. 2005. A brief tutorial on Maxent. Recuperado el 03 de Septiembre de 2015 de <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/tutorial/tutorial.doc>
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190:231-259.
- Purse, B.V. & Golding, N. 2015. Tracking the distribution and impacts of diseases with biological records and distribution modelling. *Biological Journal of the Linnean Society*. 115:664-677.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109:6241–6246.
- Smith, C.E. & Beard, R.R., 1946. Varieties of coccidioid infection in relation to epidemiology and control of the disease. *American Journal of Public Health*. 36:1394-1402.
- Soberón, J. & Townsend, P.A. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics*. 2:1-10.
- Stevens, D.A., 1980. Coccidioidomycosis. En: *Plenum Medical*. New York, USA.
- Swatek, F.E., Omieczynski, D.T. 1970. Isolation and identification of *Coccidioides immitis* from natural sources. *Mycopathology and Mycology Applications*. 41:155–166.
- Swets, J.A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 240(4857):1285-1293.

- Tamerius, J.D. & Comrie, A.C. 2011. Coccidioidomycosis incidence in Arizona predicted by seasonal precipitation. *PLOS one*. 6(6):1-7.
- Townsend, P.A. 2001. Predicting species' geographical distributions based on ecological niche modeling. *The Condor*. 103:599-605.
- Townsend, P. A. 2006. Ecologic niche modeling and spatial patterns of disease transmission. *Emerging Infectious Diseases*. 12(12):1822-1826.
- Townsend, P.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M., Araújo, M.B. 2011. Ecological niches and geographic distributions. *Monographs in Population Biology*, Princeton University Press. 314 pp.
- Vargas-Gastelum, L., Romero-Olivares, A.L., Escalante, A.E., Rocha-Olivares, A., Brizuela, C., Riquelme, M. 2015. Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology*. 91(5)
- Walsh. B. 2008 Resampling methods: Randomization tests, jackknife and bootstrap estimators. Lecture Notes for EEB 596z.

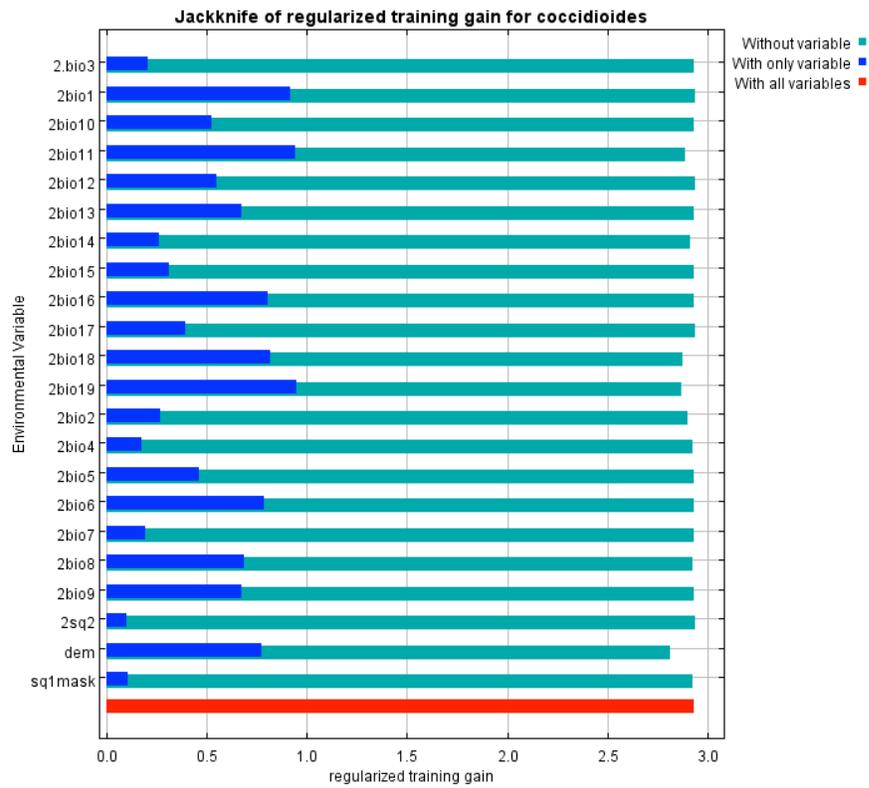
Anexo 1. Se generaron 3000 puntos aleatorios dentro de un polígono alrededor de la zona de estudio, de los cuales 968 puntos resultaron dentro de la zona de estudio.



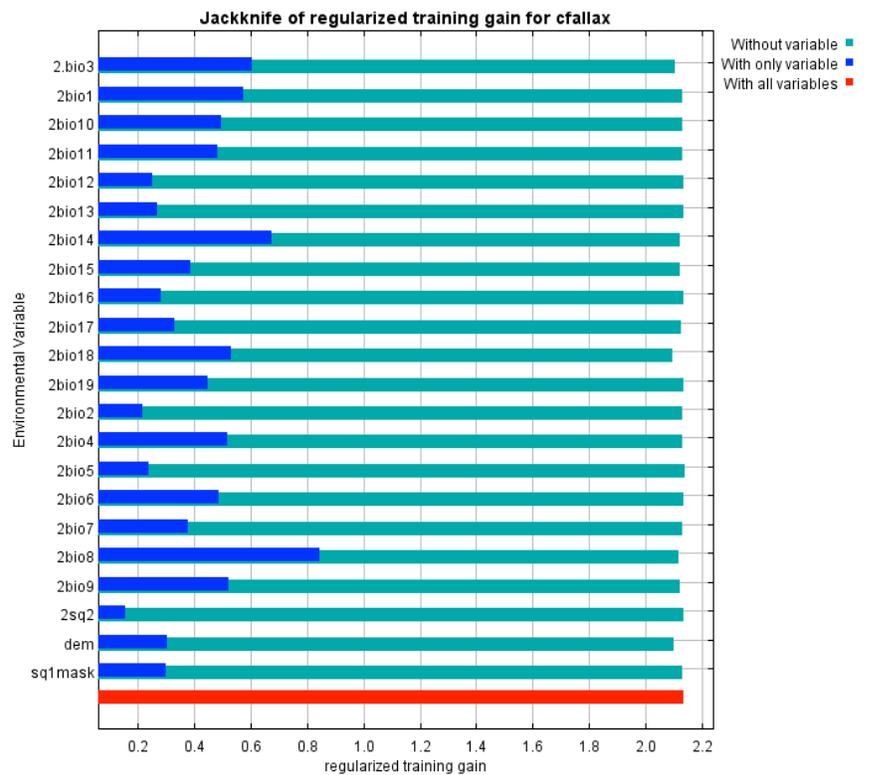
Anexo 2. Variables correlacionadas según el coeficiente de correlación de Pearson (≥ 0.8).

Variables con correlación ≥ 0.8	
BIO1	BIO5, BIO6, BIO9, BIO10, BIO11
BIO4	BIO7
BIO5	BIO9, BIO10
BIO6	BIO11
BIO9	BIO10, BIO11
BIO12	BIO13, BIO16, BIO19
BIO13	BIO16, BIO19
BIO14	BIO17
BIO16	BIO19
SQ1	SQ2

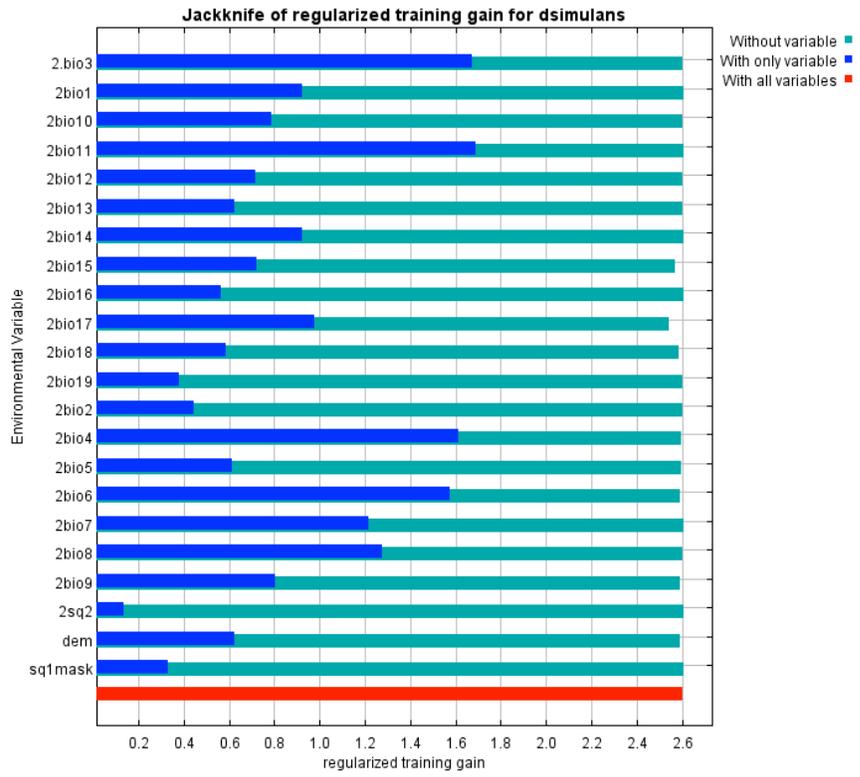
Anexo 3. Pruebas Jackknife del MNE inicial de cada especie.



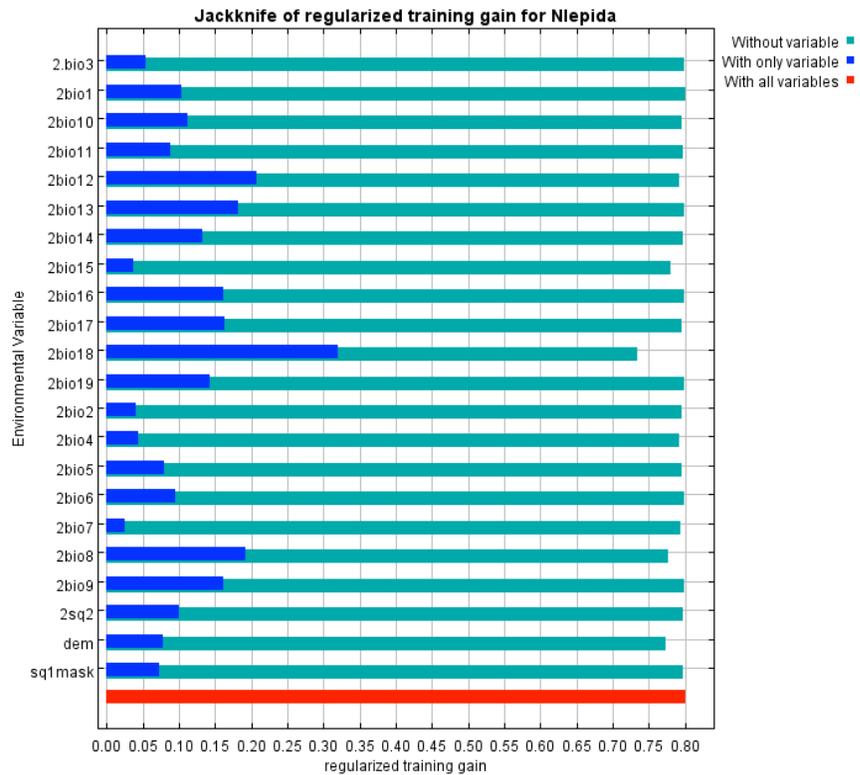
Anexo 3.1. Jackknife del MNE de *Coccidioides*.



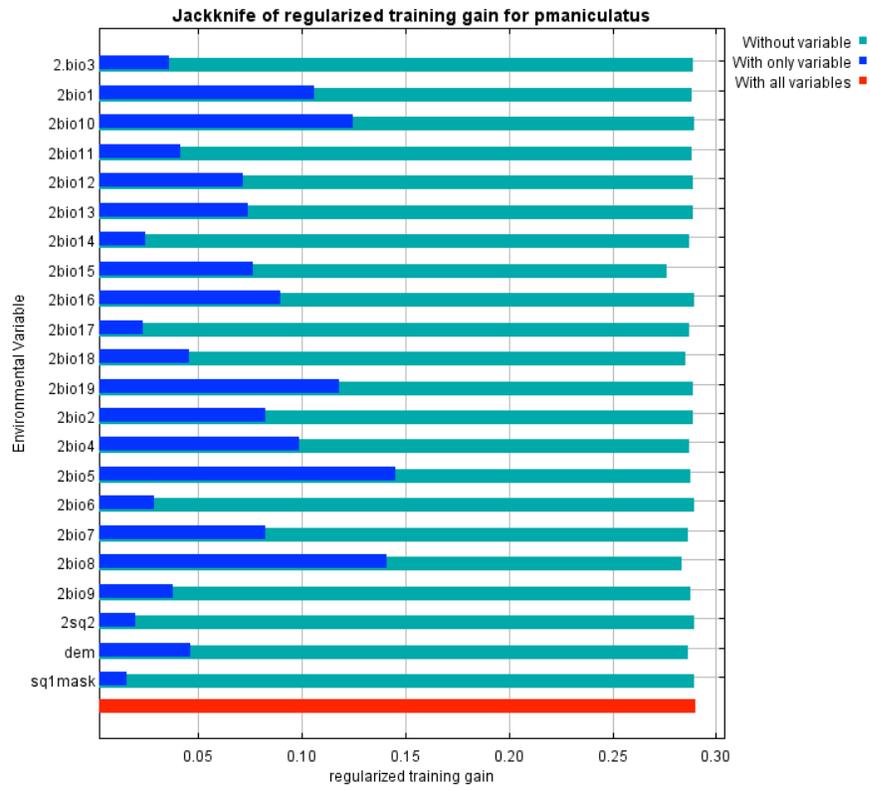
Anexo 3.2. Jackknife del MNE de *C. fallax*.



Anexo 3.3. Jackknife del MNE de *D. simulans*.

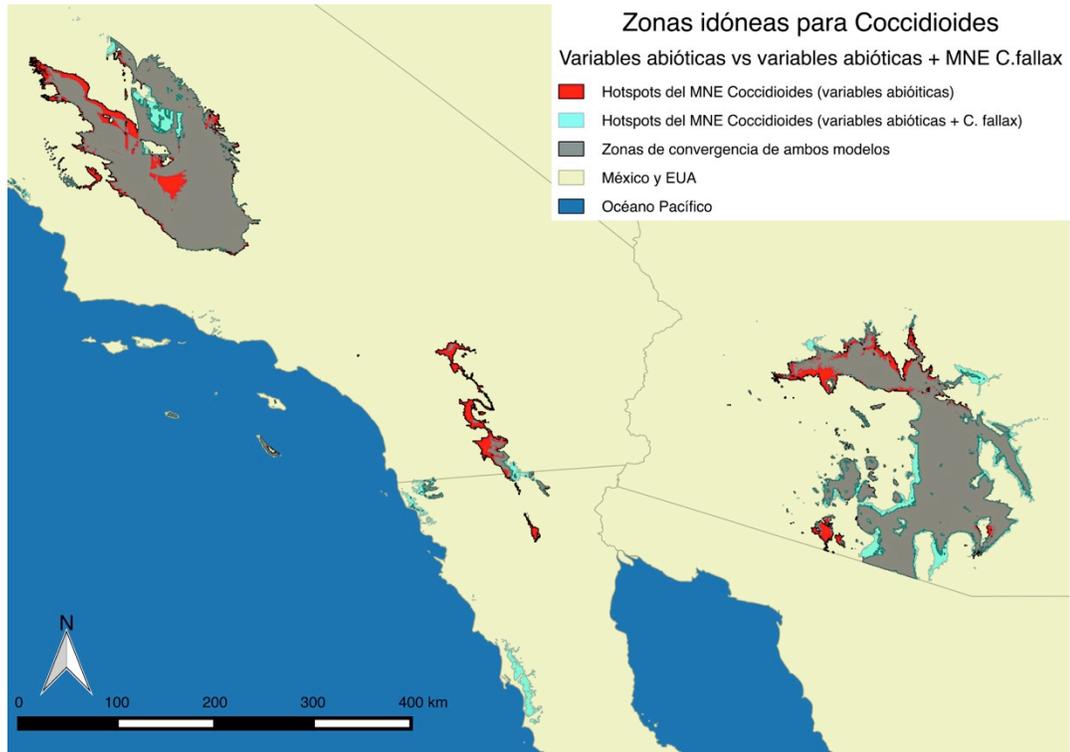
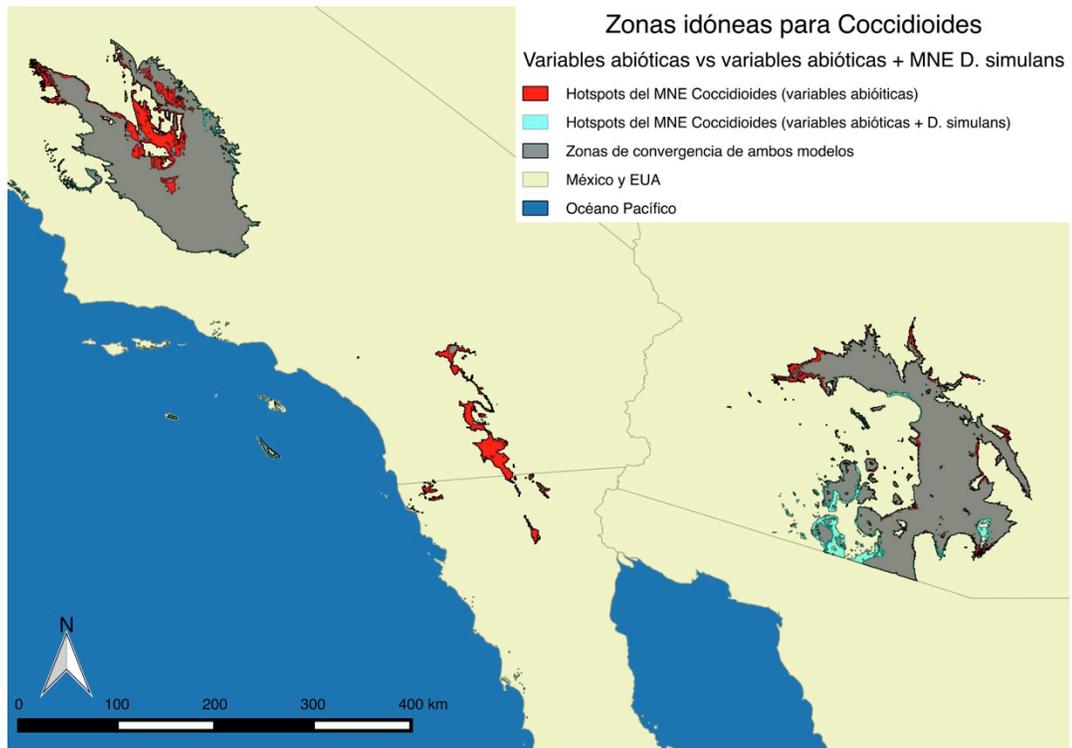


Anexo 3.4. Jackknife del MNE de *N. lepida*.

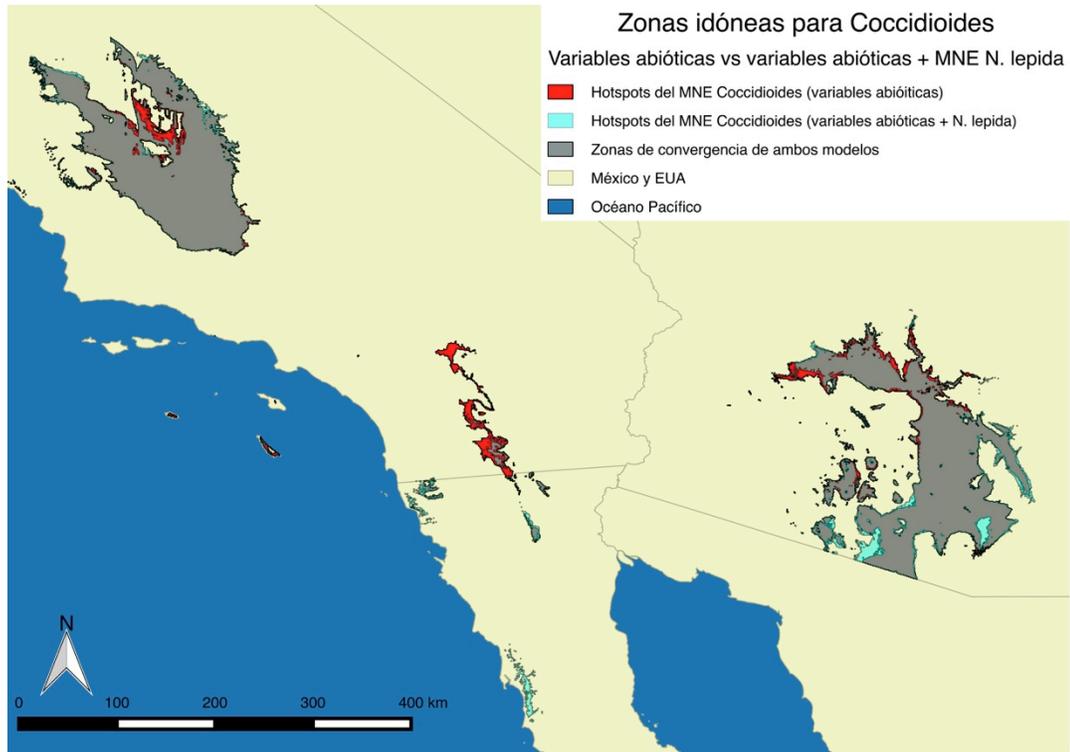


Anexo 3.5. Jackknife del MNE de *P. maniculatus*.

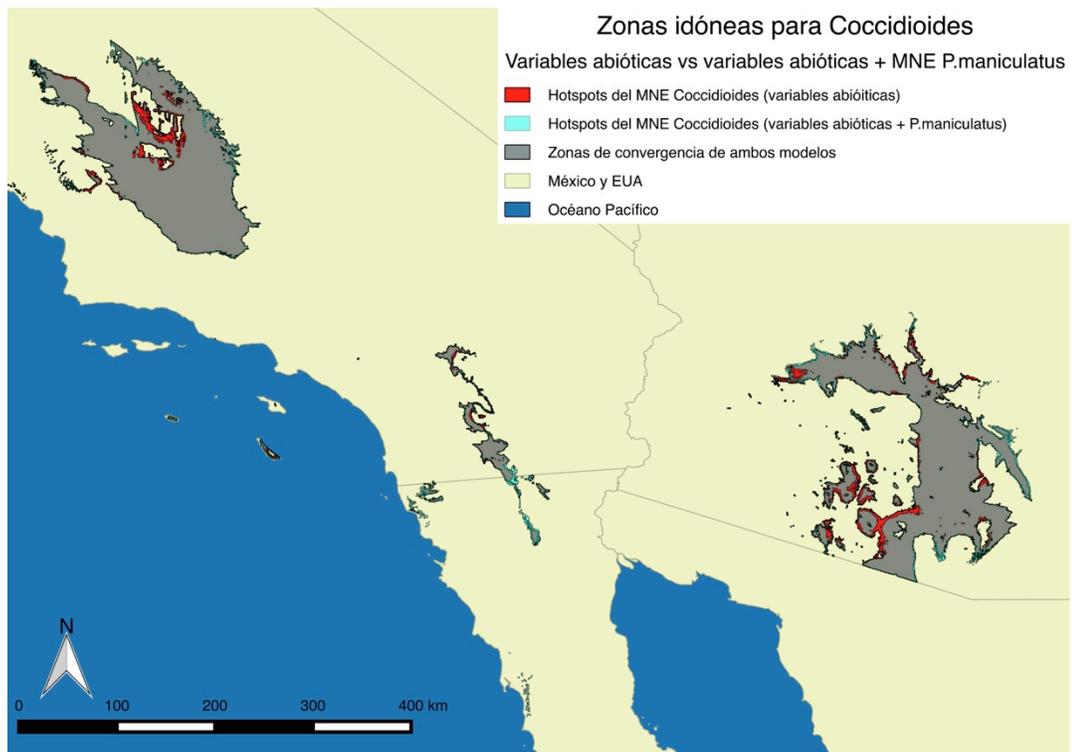
Anexo 4

Anexo 4.1. Variables abióticas + MNE de *C. fallax*.

Anexo 4.2. Variables abióticas + MNE de *D. simulans*.



Anexo 4.3. Variables abióticas + MNE de *N. lepida*.



Anexo 4.4. Variables abióticas + MNE de *P. maniculatus*.