

11261

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"RELACION GENETICA ENTRE CEPAS DE Histoplasma capsulatum AISLADAS DE PACIENTES CON DIFERENTES FORMAS CLINICAS DE HISTOPLASMOSIS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (PARASITOLOGIA) PRESENTA LA BIOLOGA CLAUDIA RIOS ROSAS



MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Jefa del Laboratorio de Inmunología de Hongos

TUTOR DE CRÉDITOS DE MAESTRÍA

DR. RUBÉN LÓPEZ MARTÍNEZ

Jefe del Laboratorio de Micología Médica

Tesis realizada en el Laboratorio de Inmunología de Hongos

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Medicina, UNAM

DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

Apoyo técnico-financiero y asesoría académica

Tesis financiada por CONACYT (Proyecto No 34443-M)

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo que se me ofreció al otorgarme la beca-manutención No de registro 87907, durante mi preparación académica

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Por la dirección de tesis, por todo el apoyo académico y valiosa asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María del Rocío Reyes Montes

Por el especial apoyo académico y crítica oportuna durante el desarrollo e interpretación de este trabajo.

Al Dr. Rubén López Martínez

Por su valiosa participación durante la realización de créditos de maestría y por su asesoría como parte del Comité Tutorial

Al Comité Evaluador

Por la revisión de este trabajo, por sus valiosas sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.

Presidente: Dr. Guillermo Ruíz-Palacios y Santos

Secretario: Dr. Carlos Eslava

Vocal: Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Suplente: Dr. Rubén López Martínez

Suplente: Dra. Concepción Toriello Nájera

Al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires; al Instituto Nacional del Nordeste e Instituto de Medicina Regional, Chaco, Argentina por brindar parte del material biológico utilizado para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Zúñiga

Por su valiosa asesoría académica, en la interpretación de resultados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIA

A mi hijo Leonardo Damián Mondragón Ríos, porque es la fuerza que me motiva a seguir adelante, porque sus sonrisas y alegría alimentan cada momento de mi vida. Espero dejar lo mejor de mi durante el largo camino que tienes por recorrer en la vida que apenas comienzas. Te amo hijo.

A mi esposo Rafael Mondragón, por todos los momentos compartidos, su apoyo y porque compartimos el principal motivo de nuestra existencia, nuestro hijo. Te amo.

A mis padres Guillermo Ríos y María de los Angeles Rosas por el apoyo incondicional y amor que siempre he recibido los cuales son un motivo de orgullo.

A mi directora de tesis Dra Maria Lucia Taylor, por su paciencia y enseñanzas, que dejarán por siempre una huella en mi formación profesional.

A la Dra María del Rocío Reyes, porque además de la enorme ayuda que siempre me brindó, recibí siempre un cordial abrazo y amistad.

A la memoria de mis abuelas y abuelos Esperanza, Irene, Daniel y Guillermo porque aun cuando no se encuentran con nosotros, están presentes en mi corazón y cada momento de mi vida.

A mis hermanas y hermano, Isela, Miriam, Leticia y Guillermo por entenderme y apoyarme incondicionalmente.

A mis sobrinos Isaac, Antonio, Erick, Daniel, Liliana, Daniela, Gerson, Giovanna y Haniel con todo el amor.

A todos mis familiares por sus buenos deseos y por creer en mi.

A mis amigas de tiempo pasado y presente. Gracias por su amistad y apoyo moral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis compañeros del laboratorio, por la amistad y ambiente de cordialidad brindado.

A Dios por iluminarme y permitirme culminar esta etapa en la vida.

A la Facultad de Medicina de la UNAM por permitirme desempeñar como profesora y alumna.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) por permitirme superar académicamente.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
AISLADOS FÚNGICOS.....	11
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y ANTIGÉNICA DE <i>H. capsulatum</i>	11
Macroscopia de la fase micelial.....	11
Microscopia de la fase micelial.....	12
Conversión de la fase micelial a levaduriforme.....	12
Producción de exoantígenos específicos.....	13
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE <i>H. capsulatum</i>	13
Termosensibilidad a 40 °C de la fase levaduriforme.....	13
Tiempo de generación (Tg) de la fase levaduriforme.....	14
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE <i>H. capsulatum</i>	15
Extracción del DNA genómico.....	15
Determinación de la concentración de DNA.....	16
Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).....	16
Programa de amplificación.....	16
Electroforesis.....	16
Análisis de similitud.....	17
Secuenciación parcial de genes.....	17
RESULTADOS.....	19
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y ANTIGÉNICA DE LOS AISLADOS ESTUDIADOS.....	19
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE <i>H. capsulatum</i>	20

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Termosensibilidad a 40 °C de la fase levaduriforme.....	20
Tiempo de generación (Tg) de la fase levaduriforme.....	21
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE <i>H. capsulatum</i>.....	22
Polimorfismo genético por RAPD-PCR.....	22
Secuenciación parcial de genes.....	23
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS.....	32

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. Relación de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> de diferentes procedencias y fuentes.....	40
TABLA 2. Características de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	41
TABLA 3. Registro de los datos del crecimiento de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> a diferentes temperaturas.....	42
TABLA 4. Efecto de la termosensibilidad de la fase levaduriforme en el crecimiento de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	43
TABLA 5. Tiempo de generación de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	44
TABLA 6. Matriz de datos de los perfiles de RAPD-PCR obtenidos de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	45
TABLA 7. Comparación del alineamiento de las secuencias de los genes <i>ARF</i> , <i>H-ANTI</i> , <i>OLE</i> y <i>TUB1</i> de una cepa de referencia de EUA, con cada secuencia parcial generada por los oligonucleótidos arf1 y arf2, H-anti3 y H-anti4, ole3 y ole4, y tub1 y tub2, de los DNA obtenidos de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiadas.....	46
FIGURA 1 (a-d). Macro y micromorfología de <i>H. capsulatum</i>	49
FIGURA 2. Producción de exoantígenos de aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> de distintas procedencias geográficas.....	50
FIGURA 3. Termosensibilidad de <i>H. capsulatum</i> a 37 °C.....	51
FIGURA 4. Termosensibilidad de <i>H. capsulatum</i> a 40 °C.....	52
FIGURA 5. Curva de crecimiento de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	53
FIGURA 6. RAPD-PCR de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	54
FIGURA 7. Porcentaje de similitud de los patrones polimórficos de DNA de los aislados y/o cepas de <i>H. capsulatum</i>	55

RESUMEN

El presente trabajo se planteó con el fin de discriminar mediante características fenotípicas y/o genotípicas la relación entre la forma clínica asociada al tropismo del patógeno a ciertos tejidos del hospedero infectado y la procedencia geográfica de aislados de *H. capsulatum*. Se trabajaron aislados clínicos procedentes de México, Guatemala, Argentina y Estados Unidos de América (EUA), además de aislados obtenidos de murciélagos infectados. Se realizaron estudios de las características fenotípicas reveladas por la termosensibilidad a 40 °C y el tiempo de generación de la fase levaduriforme de los aislados, asimismo de sus características genotípicas reveladas por RAPD-PCR y por el análisis comparativo de las secuencias de fragmentos de DNA obtenidos por PCR, empleando oligonucleótidos elegidos a partir de cuatro genes de *H. capsulatum* (*ARF*, *H-ANTI*, *OLE*, *TUB1*). La cepa Downs (paciente inmunodeprimido de EUA) y los aislados de pacientes mexicanos asociados a SIDA, EH-316 y EH-317, fueron termosensibles a diferencia de los otros 12 aislados estudiados que se comportaron como termotolerantes. El efecto de la termosensibilidad a 40 °C se analizó con base en los porcentajes de inhibición del crecimiento, observándose que los valores inhibitorios más altos se asociaron a la cepa Downs (57.9 y 88.4 %) y los aislados EH-316 (100 y 99.9 %) y EH-317 (96.9 y 98 %) en los tiempos de 6 y 12 h, respectivamente. En los aislados termotolerantes los valores de inhibición del crecimiento no alcanzaron el 50 %. Los tiempos de generación (Tg) de la mayoría de los aislados estudiados variaron en un intervalo de 3 a 6:30 h, a excepción de la cepa de referencia Downs que presentó un Tg muy largo de 14:30 horas. Las observaciones de estas características fenotípicas de los aislados y/o cepas estudiadas permitieron corroborar una diversidad relacionada a la histoplasmosis asociada a pacientes inmunodeprimidos. Por otro lado, dos bandas polimórficas de 1.2 y de aproximadamente 0.123 Kb se destacaron en los patrones de RAPD-PCR obtenidos de los aislados y/o cepas estudiadas. La banda 0.123 Kb fue común a todos los aislados y cepas, independientemente de su origen geográfico y forma clínica. Sin embargo, la banda de 1.2 Kb sólo se reveló en los aislados de procedencia de América Central y del Norte, independientemente de su fuente de aislamiento y forma clínica. El patrón polimórfico por RAPD-PCR de los aislados procedentes de México, Guatemala y la cepa de referencia G-217B esta representado por ocho bandas comunes, mientras que los aislados procedentes de los casos clínicos argentinos revelaron sólo seis bandas, lo que marca una diferencia geográfica entre ambos patrones distribuidos entre América Central y del Norte con relación a un patrón de América del Sur. El análisis de los perfiles polimórficos por UPGMA expresados en un dendrograma de similitud permitió reconocer tres grupos. El grupo I integró a los aislados de casos clínicos mexicanos, de murciélagos infectados capturados en Morelos, así como el aislado de Guatemala y la cepa G-217B de EUA. El grupo II incluyó a los aislados procedentes de casos clínicos argentinos. El grupo III fue formado exclusivamente por la cepa Downs. Los grupos I y II se relacionaron entre sí en 50 % de similitud, y estos a su vez se relacionaron con el grupo III en 42 %. Este análisis de similitud sugiere que los grupos polimórficos obtenidos entre los aislados, están más asociados a patrones geográficos que a formas clínicas de la histoplasmosis. La secuenciación parcial de genes reveló en todos los aislados y cepas estudiados una alta homología genética (identidad), del 95-99 % con la secuencia del gen *ARF*, del 95 a 99 % con la secuencia del gen *H-ANTI*, del 96 a 99 % con la secuencia del gen *OLE*, y del 86 a 92 % con la secuencia del gen *TUB1*. Los bajos porcentajes de mutaciones por inserciones o deleciones en los fragmentos génicos secuenciados no revelaron cambios sustanciales entre los aislados y/o cepas estudiadas. El presente trabajo resalta la importancia del estudio de las características fenotípicas y genómicas de aislados de *H. capsulatum* entre los que destaca el desarrollo de posibles marcadores fenotípicos y genotípicos para dilucidar aspectos epidemiológicos y de diversidad de este patógeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* es el agente etiológico de la "histoplasmosis capsulati", micosis sistémica ampliamente distribuida en el continente americano. Es un hongo dimórfico que crece en la naturaleza como saprobio en una fase micelial o filamentosa multicelular (forma infectante), pero cuando infecta un hospedero susceptible se convierte en una fase levaduriforme unicelular (forma parasitaria) (1, 2). Bajo condiciones de laboratorio, la conversión de la fase multicelular puede ser reversiblemente inducida por el cambio de temperatura de 25 a 37 °C, compatibles con el crecimiento de micelio o levadura, respectivamente. Esta conversión dimórfica es de particular interés, ya que es necesaria para la manifestación de virulencia del hongo (3). La habilidad de crecer con distintas morfológicas implica que el organismo puede adaptarse a diferentes condiciones de vida por la expresión de genes específicos de fase, cuyos productos son críticos para la supervivencia y colonización de un ambiente dado (4-6). *Histoplasma capsulatum* infecta humanos y otros mamíferos cuando estos inhalan microconidios y pequeños fragmentos de hifas. Con frecuencia causa infecciones respiratorias que son generalmente resueltas por el sistema inmune y cuando no se elimina totalmente el hongo, este puede causar enfermedad activa con curso moderado a grave, según la dosis de infección y la susceptibilidad del hospedero. Asimismo, se ha sugerido que el hongo puede mantenerse en forma latente, en ambientes intracelulares de células permisivas de algunos tejidos del hospedero susceptible (7). Adicionalmente, una disminución en la función del sistema inmune debido a circunstancias como la edad avanzada, tratamientos inmunosupresivos por diferentes causas o enfermedades debilitantes como el SIDA, pueden resultar en una reactivación endógena de la infección, con la posible aparición de enfermedad sistémica (7).

Hasta hace algún tiempo, la epidemiología de la enfermedad estaba restringida a datos de inmuncontacto sensibilizante en sujetos infectados donde se aplicaba la prueba cutánea con el antígeno fúngico "histoplasmina", o bien por obtención de aislados del hongo a partir de casos clínicos y de algunas fuentes de la naturaleza. Con el advenimiento de las técnicas moleculares surge la epidemiología molecular, con la cual se lograron avances importantes tanto en la ubicación de nuevas zonas endémicas como en el conocimiento de la relación paciente-fuente de infección. Estudios en los Estados Unidos de América (EUA) utilizando técnicas moleculares, permitieron clasificar y/o subclasificar aislados de *H. capsulatum* obtenidos de diferentes fuentes

y distribución en el país. Para esto, se ha utilizado el análisis polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA) y ribosomal (rDNA), y el polimorfismo determinado por hibridación con sondas de mtDNA y del gen *YPS3* (expresado en la fase levaduriforme y virulenta del hongo). Según el polimorfismo del DNA determinado por RFLP, *H. capsulatum* se agrupa en seis clases y cuatro subclases (8-10).

Debido a que el RFLP presenta limitaciones como altas cantidades de DNA del orden de microgramos y extrema pureza para ser digerido por endonucleasas de restricción, se ha propuesto una modificación de la amplificación del DNA por PCR, utilizando oligonucleótidos arbitrarios, conocida como RAPD-PCR (11). Este sistema requiere de pequeñas cantidades de DNA (nanogramos) y no necesita que éste sea puro. Al utilizar este método, Kersulyte *et al.* (12) y Woods *et al.* (13), probaron varios oligonucleótidos como iniciadores y seleccionaron aquellos que produjeron suficientes bandas polimórficas para *H. capsulatum*, las cuales permitieron agrupar aislados del hongo y obtener resultados reproducibles. Con los iniciadores seleccionados, los autores analizaron 29 aislados clínicos agrupados previamente por Vincent *et al.* (8) en la clase 2 y encontraron mayor diversidad genética entre los aislados de esta clase. Por tal motivo, el RAPD-PCR es un método molecular de selección para discriminar diferencias sutiles entre grupos de aislados y cepas afines. Recientemente, Poonwan *et al.* (14) analizaron 12 aislados clínicos de *H. capsulatum* de pacientes de Tailandia así como una cepa de EUA. Al utilizar tres oligonucleótidos por separado en RAPD-PCR, los aislados se integraron en 2 a 4 grupos, siendo los procedentes de Tailandia muy similares entre sí, y notoriamente diferentes de la cepa de Norteamérica. Estos autores identificaron además una banda común de 700 bp, la cual fue secuenciada y utilizada para diseñar oligonucleótidos para PCR que resultaron ser 100 % efectivos en la identificación de aislados de origen tailandés.

Se han encontrado distintas estructuras de poblaciones para *H. capsulatum* (15-17). Carter *et al.* (16) analizaron poblaciones del hongo usando marcadores bialélicos y multialélicos, éstos últimos funcionaron adecuadamente para distinguir aislados individuales tanto de los EUA como de Sudamérica, por lo que son considerados como una herramienta importante en estudios epidemiológicos. La relación filogenética de aislados de *H. capsulatum*, representantes de las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farcimosum*, fue analizada por Taylor *et al.* (17) y Kasuga *et al.* (18, 19). Con base en la detección de secuencias parciales del DNA de cuatro genes que codifican para el factor de ribosilación de ADP (*ARF*), el precursor del antígeno H (*H-ANTI*), la

desaturasa Δ -9 de ácido graso (*OLE*) y la α -tubulina (*TUB1*), se propone que *Histoplasma* tiene ocho clados, y cada clado, corresponde a una especie filogenética independiente. 1-población 1 de Norteamérica; 2-población 2 de Norteamérica; 3-población A de Sudamérica; 4-población B de Sudamérica; 5-población Australiana; 6-población de una colonia Holandesa; 7—población Euroasiática; 8-población Africana. Esta última población incluye aislados de *H. c.* var. *capsulatum* y *duboisii*. Aislados de *H. c.* var. *farcinosum* fueron colocadas en tres especies filogenéticas distintas: población 2 de Norteamérica; población Africana y la población Euroasiática. Se sugiere que la asignación de tres variedades de *Histoplasma* no tiene sentido filogenético. En cambio, se reconoce la existencia de poblaciones geográficamente distintas o especies filogenéticas (19).

Anteriormente, para tipificar diferentes aislados de *H. capsulatum* se usaban los métodos fenotípicos. Gaur *et al.* (20), estudiaron la variación de ocho isoenzimas a partir del hongo aislado de suelo de cuatro áreas geográficas de EUA. Estos autores observaron una gran variación de isoenzimas, las cuales produjeron de dos a diez diferentes fenotipos enzimáticos para los aislados del suelo, éstos difirieron 40.5 % con relación al fenotipo predominante. En el presente, la mayoría de los investigadores han utilizado de preferencia métodos genotípicos para clasificar el hongo aunque refieren la necesidad de apoyarse en los métodos fenotípicos, como lo han reportado Spitzer *et al.* (21) quienes, con base en el análisis de dos características fenotípicas relacionadas a la cepa de *H. capsulatum* denominada "Downs" (que se identifica por su sensibilidad a la temperatura de 40 °C y avirulencia para ratones), encontraron que los aislados de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA del área de St. Louis MO, EUA, comparten estas mismas características fenotípicas. La asociación fenotípica de los aislados de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA, fue corroborada por los autores con métodos genotípicos, los cuales revelaron un patrón polimórfico del mtDNA igual al de la cepa Downs, permitiendo su inclusión en la clase 1, descrita originalmente por Vincent *et al.* (8), la cual contenía solamente a la cepa Downs.

En México, los datos epidemiológicos iniciales y aún los actuales sobre la histoplasmosis, se han apoyado primordialmente en la respuesta a la intradermorreacción con la histoplasmina, que define infección pasada o presente en la población expuesta al agente etiológico (22-31). Sin embargo, se cuenta con escasa información sobre la distribución de *H. capsulatum* en diferentes fuentes de infección en la naturaleza dentro del territorio nacional. En trabajos recientes, se ha

acumulado información actualizada y detallada sobre la histoplasmosis en el país; asimismo se ha obtenido y estudiado aislados de *H. capsulatum* de varias entidades federativas (19, 26, 29, 31-39). Los aislados procedieron de diferentes fuentes en la naturaleza como, murciélagos infectados, excretas de ave o de murciélago, y casos clínicos asociados o no a SIDA. Avances en la epidemiología molecular de la histoplasmosis en México, han permitido consolidar varios aspectos del panorama de la enfermedad en el país. Se utilizó el método de RAPD-PCR para el análisis de los patrones polimórficos del DNA del hongo aislado tanto de la naturaleza como de pacientes residentes en el país con curso clínico definido. Al utilizar este método con un sólo oligonucleótido, se encontraron dos patrones polimórficos de DNA en los aislados procedentes de murciélagos infectados y capturados en Guerrero y Morelos (32). Taylor *et al.* (37, 38), estudiaron estos mismos aislados de *H. capsulatum*, junto con otros obtenidos de murciélagos migratorios capturados en los estados de Puebla y Oaxaca, mediante una modificación del RAPD-PCR usando doble oligonucleótido para amplificar el DNA genómico, la cual, tiene la característica de aumentar el polimorfismo genético. Se observó un patrón polimórfico común en la mayoría de los aislados, por lo que este patrón de DNA podría funcionar como un marcador molecular del hongo para las áreas geográficas de dispersión de éste. Por otro lado, Reyes-Montes *et al.* (33) caracterizaron aislados clínicos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA, que referían una residencia definida. Los resultados de genotipificación por RAPD-PCR mostraron que la mayoría de los aislamientos clínicos se relacionaron en un 94 %. Estos mismos autores (35), analizaron nuevos aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA, comparándolos con cepas de casos clínicos de Guatemala, Colombia, Panamá y EUA, así como con aislamientos de diferentes fuentes en la naturaleza procedentes de México. Los aislados procedentes de pacientes mexicanos se relacionaron con aislados de casos clínicos de Guatemala mientras que resalta el comportamiento distinto de los aislados procedentes de Colombia y las cepas de referencia de Panamá y de los EUA (33, 35). Recientemente, el uso de RAPD-PCR con doble oligonucleótido para amplificar el DNA genómico de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA corroboró los hallazgos previos (33, 35), que sugieren que estos aislados forman un grupo muy similar, independientemente de su origen geográfico en el territorio nacional (39).

Los resultados obtenidos con RAPD-PCR lograron discriminar diferencias entre algunos aislamientos que no fueron detectadas por un método fenotípico como el perfil de electrotipos por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (33, 35). Sin embargo, la utilización de la electroinmunotransferencia permitió relacionar con mayor precisión a los aislados estudiados, mostrando buena correlación con el método genotípico, además detectaron en todos los aislados tres bandas comunes de 43, 28 y 18 kDa que podrían ser utilizadas como potenciales marcadores fenotípicos del hongo (33). Por otro lado, Salas-Ríos *et al.* (34), utilizando el polimorfismo del DNA por RFLP, estudiaron 31 aislados de *H. capsulatum* de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA. Al analizar los fragmentos de restricción obtenidos con la endonucleasa *HaeIII* y comparándolos con los polimorfismos de las cepas de referencia G-217B y Downs (EUA) y la G-186B (Panamá), encontraron diez patrones polimórficos denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J. Los perfiles A y C fueron los más frecuentes, con porcentajes de 33.3 y 29.1, respectivamente. En los demás, se observaron frecuencias menores al perfil J que incluyen dos aislados de *H. capsulatum* de pacientes mexicanos con SIDA. Los perfiles polimórficos de las clases 2 y 3 según Vincent *et al.* (8), representados por las cepas de referencia G-217B (clase 2) y G-186B (clase 3), no se presentaron en los aislados estudiados, a pesar de que el perfil de la cepa G-217B es el más común en EUA. Los resultados del ensayo de RFLP evaluados por un análisis de agrupación mostraron una similitud de 85 % entre los aislados en los perfiles de mayor frecuencia (A y C).

A pesar del creciente número de estudios moleculares en hongos patógenos a la fecha, ningún enfoque molecular ha sido abordado para caracterizar aislados con diferentes tropismos en el hospedero. Por ejemplo *H. capsulatum* en ocasiones tiene predilección por un sitio determinado en el hospedero parasitado, ya que produce diversos cuadros clínicos localizados como los pulmonares, meningoencefálicos, oculares, cutáneos y mucocutáneos. En América, en la enfermedad conocida como histoplasmosis capsulati (2) predomina el cuadro localizado pulmonar y el cuadro diseminado asociado a inmunosupresiones, todos causados por *H. capsulatum* var. *capsulatum*. La histoplasmosis que se presenta en el continente africano y producida por *H. capsulatum* var. *duboisii*, se caracteriza por la presencia, en humanos, de lesiones primariamente pulmonares o bien, cutáneas, subcutáneas y en tejido óseo; mientras que *H. capsulatum* var. *farcinosum* causa lesiones subcutáneas y ulcerativas en la piel de caballos y mulas. Sin negar el papel importante del hospedero, las características inherentes al patógeno son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

también relevantes y pueden tener una implicación directa en el comportamiento biológico del hongo, como por ejemplo el facilitar su tropismo a piel. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se contempló el estudio de la variabilidad fenotípica y genotípica de aislados y cepas de *H. capsulatum*, relacionando el hongo tanto con las diferentes formas clínicas de la histoplasmosis que pudieran estar asociadas con usos y costumbres de una población humana susceptible como con su posible distribución geográfica.

La caracterización de posibles marcadores del hongo para definir formas clínicas localizadas y la presencia de estos marcadores en diferentes áreas geográficas, sería útil para definir zonas de riesgo de adquisición de ciertas formas clínicas, además de trazar un mapa de distribución del hongo en la naturaleza.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La histoplasmosis presenta diversos cuadros clínicos. En México, está asociada a una morbilidad alta y elevada letalidad de la forma epidémica, conocida como histoplasmosis pulmonar primaria (HPP) que puede diseminarse a diversos órganos y que está relacionada con actividades ocupacionales en ambientes cerrados, como cueva o minas abandonadas, que facilitan la inhalación de altas concentraciones de propágulos (conidios y fragmentos de hifas) del hongo (22, 30, 38). La forma diseminada de reactivación endógena se presenta de preferencia en pacientes inmunocomprometidos. Otra de sus formas clínicas es la cutánea primaria y la mucocutánea, las cuales son raras en el país y por lo general, se presentan asociadas a SIDA, con una mayor frecuencia en ciertas áreas geográficas del mundo como es el caso de la región del Chaco, Argentina. La cutánea primaria ha sido referida como consecuencia de la implantación de material contaminado (guano de murciélagos y aves) al momento de su colecta y la mucocutánea se desconoce su puerta de entrada. Por tal motivo, es de gran interés estudiar los aislados de *H. capsulatum* procedentes de pacientes que presentan formas localizadas como la cutánea o la mucocutánea, además de otras formas como la pulmonar sin diseminación. Uno de los objetivos del presente trabajo es determinar a través del análisis de caracteres fenotípicos y genotípicos, posibles similitudes y diversidades entre los aislados y cepas del hongo que pudieran relacionarse con el tropismo de éste en tejidos del hospedero. Asimismo, sería importante determinar también la existencia de un comportamiento diferencial del hongo asociado a factores geográficos.

HIPÓTESIS

El tropismo de *H. capsulatum* hacia piel, mucosas y pulmón refleja diferencias genotípicas y/o fenotípicas del patógeno relacionadas con la forma clínica asociada.

El tropismo de *H. capsulatum* hacia piel, mucosas y pulmón refleja diferencias genotípicas y/o fenotípicas del patógeno relacionadas con la ubicación geográfica de los aislados y/o cepas del hongo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante características fenotípicas y/o genotípicas posibles diferencias en los aislados de *H. capsulatum* asociados a distintas formas clínicas y orígenes geográficos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la termosensibilidad de la fase levaduriforme de los aislados de *H. capsulatum* asociados a distintas formas clínicas y orígenes geográficos.

Determinar el tiempo de generación de la fase levaduriforme de los aislados de *H. capsulatum* asociados a distintas formas clínicas y orígenes geográficos.

Determinar los patrones de RAPD-PCR de los aislados de *H. capsulatum* asociados a distintas formas clínicas y orígenes geográficos.

Determinar las secuencias parciales de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, a partir de cuatro genes (*ARF*, *H-ANTI*, *OLE*, *TUB1*) de los aislados de *H. capsulatum* asociados a distintas formas clínicas y orígenes geográficos.

Comparar y relacionar los resultados obtenidos para los aislados de diferentes formas clínicas localizadas de histoplasmosis y con orígenes geográficos distintos, con los de cepas de referencia de clasificaciones moleculares previas.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLADOS FÚNGICOS

Se trabajaron 15 aislados clínicos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* procedentes de México, Guatemala, Argentina y EUA, además de aislados obtenidos de murciélagos infectados (Tabla 1). Los aislados procedentes de México pertenecen a la Colección de Cepas de *H. capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, cuatro de éstos provienen de pacientes mexicanos con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA, uno de paciente con histoplasmosis mucocutánea y dos recuperados de murciélagos naturalmente infectados. Se estudiaron además: un aislado obtenido de un paciente guatemalteco con histoplasmosis cutánea no asociada a SIDA; cinco aislados de casos clínicos con histoplasmosis mucocutánea asociada a SIDA del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Buenos Aires, del Instituto Nacional del Nordeste y del Instituto de Medicina Regional, Chaco, Argentina; y dos cepas de referencia de EUA procedentes de casos clínicos diseminados no asociados a SIDA, cortesía del Dr. G. S. Kobayashi de la Universidad de Washington, St. Louis, MO, EUA (Tabla 1). Todos los aislados se mantuvieron en fase micelial a temperatura ambiente en agar-micobiótico (Bioxón, Becton-Dickinson de México, D.F.).

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y ANTIGÉNICA DE *H. capsulatum*

Macroscopia de la fase micelial. Las características de morfología colonial de cada aislado o cepa estudiada fueron registradas con respecto a la pigmentación de la colonia, para lo cual se consideró la clasificación siguiente: a) cepas tipo "A" (albina); b) cepas tipo "B" (color pardo claro a oscuro). Asimismo, se consideró la pigmentación del anverso y reverso de la colonia y posible presencia de pigmento difusible al medio, además de la textura de la colonia con micelio aéreo (filamentoso o pulverulento). Se registraron para todos los aislados el tiempo de crecimiento (semanas) de esta fase del hongo.

Microscopia de la fase micelial. Se empleó un método de microcultivo para la apreciación de la morfología microscópica. El método se realizó en condiciones de esterilidad y consistió en cortar un bloque de agar micobiótico de 1 cm² con 4 mm de profundidad y colocarlo sobre un portaobjeto dentro de una caja de Petri conteniendo glicerol al 10 %. Se inoculó por picadura, las cuatro caras laterales del bloque de agar, con la fase micelial del hongo y se colocó un cubreobjeto sobre éste. Se incubó de 2 a 4 semanas a 28 °C, se inactivó el microcultivo con formol al 10 %, se eliminó el bloque de agar del portaobjeto y se colocó una gota de azul de algodón con lactofenol de Amman, se cubrió con un cubreobjeto y finalmente se observó al fotomicroscopio Olympus BX50 (Olympus Optical, Japan) para describir la morfología del microcultivo y proceder a la toma de fotografías representativas para la especie.

Conversión de la fase micelial a levaduriforme. La conversión del micelio a levadura se llevó a cabo a partir de cultivos puros: se disgregó el micelio, crecido a 28 °C, con mortero y pistilo de porcelana, en presencia de amortiguador salino de fosfatos (PBS) 150 mM pH 7.2; se inoculó el micelio disgregado en medio sintético de Tewari y Kegel (40) (glucosa 5 g, L-cisteína 0.1 g, L-glutamina 0.1 g, NH₄Cl 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ 7H₂O 0.1 g, K₂HPO₄ 2.5 g, FeCl₃ 0.001 g, estreptomina 100 mg, penicilina 100 UI, en 1 L H₂O, pH 7.2), y se incubó a 37 °C en la oscuridad con agitación moderada (120 rpm). Se hicieron resiembras cada 72 h hasta alcanzar la conversión dimórfica. Una vez obtenida la fase levaduriforme, ésta fue mantenida por cultivos sucesivos a 37 °C en agar o caldo infusión cerebro corazón (BHI, Bioxón), adicionado de 0.1 % de cisteína y 1 % de glucosa. La confirmación del cambio de fase se efectuó por reversión de la fase levaduriforme a la micelial, la cual se realizó a partir del crecimiento de levaduras incubadas a 28 °C en placas de Petri con agar-BHI (Bioxón) sin cisteína, durante 15-30 días, hasta observar la aparición de micelio sobre las colonias iniciales de levaduras.

Las características de las colonias de levaduras fueron registradas refiriendo su textura lisa o rugosa, además de las dimensiones en µm de las células levaduriformes, determinadas por microscopia de luz. La fase levaduriforme, de cada aislado, fue conservada a -80 °C en ultracongelador y a -196 °C en criotanks de nitrógeno líquido, en presencia de suero fetal de ternera (GIBCO BRL, Gran Island, Biological Co. NY) y de dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) utilizado como crioprotector, en una relación 9:1.

Producción de exoantígenos específicos. Se empleó el método de producción de exoantígenos de acuerdo con Kaufman *et al.* (41). La fase micelial de cada aislado se inoculó en caldo BHI (Bioxón), se incubó en baño María a 28 °C con agitación moderada (120 rpm), durante 8-10 días, se inactivó cada cultivo con timerosal 1:5000 y se separó la masa micelial por filtración. Para identificar la especificidad antigénica de cada exoantígeno, se utilizó el método de doble inmunodifusión en gel (IDG) (42) en presencia de sueros positivos tanto de conejo inmunizado con *H. capsulatum* como de paciente con histoplasmosis activa, comprobada por cultivo del hongo. Se emplearon testigos pertinentes, tanto del suero como del antígeno. Como antígeno específico se seleccionó la histoplasmina de la cepa de referencia EH-53, producto antigénico previamente estandarizado en el Laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM. Los sueros y antígenos utilizados son parte del Banco de Sueros y Antígenos del Laboratorio de Inmunología de Hongos. La identificación inmunológica de los aislados se efectuó con base en la aparición de las bandas de identidad, comparadas con la cepa de referencia.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE *H. capsulatum*

Termosensibilidad a 40 °C de la fase levaduriforme. Se descongeló paulatinamente cada uno de los aislados preservados en fase levaduriforme a -80 °C y posteriormente se sembró individualmente en caldo BHI (Bioxón) suplementado con cisteína y glucosa. Se incubó a 37 °C durante 24 h, tiempo estimado para cada aislado alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Se transfirió cada uno a nuevo caldo BHI y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se cosecharon las levaduras, de cada aislado, por centrifugación a 800 x g y el sobrenadante fue colectado y concentrado para prueba de exoantígeno. Se resuspendió cada paquete de levaduras en 10 mL de caldo BHI suplementado con glucosa y cisteína. De cada una de las mezclas se preparó una dilución 1:10 a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048) en un volumen final de 200 µL por cada pozo, de una microplaca de cultivo de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark). En el primer pozo se le agregó 200 µL de la solución blanco (caldo BHI suplementado) y a partir del segundo pozo se realizaron las diluciones. La lectura de las diferentes diluciones se llevó a cabo en un lector Multiskan MS Labsystems (Helsinki, Finland) a una longitud de onda de 405 nm. Se eligió la dilución con 0.2

DO para ajustar los inóculos de cada aislado para el ensayo de termosensibilidad. Por cada aislado, se llenaron ocho pozos con el inóculo ajustado a 0.2 DO. Se incubaron, separadamente, microplacas a 37 °C (testigo de crecimiento) y a 40 °C, durante 6, 12 y 24 h. Se leyeron las densidades ópticas a 405 nm tanto del tiempo cero como de los diferentes tiempos de incubación, en las dos temperaturas probadas. Se calculó la media y la desviación estándar de las ocho lecturas de DO de cada aislado, en las distintas temperaturas y tiempos de incubación probados. Los datos fueron estadísticamente analizados por la prueba t de Student (n = 8). Los resultados se expresaron graficando los datos de DO versus tiempo de incubación, en las dos temperaturas utilizadas. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de inhibición (% I) considerando la fórmula: $\% I = 1 - (\text{Dot}_y - \text{DO}_{t_0} \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C} / \text{Dot}_y - \text{DO}_{t_0} \text{ a } 37 \text{ }^\circ\text{C}) \times 100$, siendo y cada uno de los tiempos de lectura de DO.

Tiempo de generación (Tg) de la fase levaduriforme. Cada uno de los aislados y/o cepas en fase levaduriforme preservada a -80 °C fue descongelado previo el subsecuente cultivo a 37 °C en caldo BHI (Bioxón) suplementado con cisterna y glucosa. Después de 24 h de incubación se transfirió, cada cultivo, a nuevo caldo BHI y se incubó a 37 °C. A las 24 h de incubación se centrifugaron los cultivos a 800 x g separando los respectivos sobrenadantes y paquetes obtenidos. Los sobrenadantes fueron concentrados para la prueba de exoantígeno. Cada paquete de levadura fue resuspendido en 10 mL de caldo BHI suplementado, a partir del cual se preparó una dilución 1:10 en el mismo medio y se ajustó a 0.2 DO. Se sembraron ocho pozos de una microplaca de cultivo por cada aislado y/o cepa. Se incubaron las microplacas a 37 °C, durante 6, 12 y 24 h. Se leyeron las densidades ópticas de los diferentes tiempos de incubación a 405 nm, incluyendo el tiempo cero. Se calculó la media de las ocho lecturas de cada aislado en el tiempo cero y los tiempos de incubación probados. Se trazaron las curvas de crecimiento de cada aislado y/o cepa. El tiempo de generación fue calculado a partir de una modificación del procedimiento descrito por Amaral *et al.* (43), considerando dos puntos en la pendiente de la fase logarítmica mediana de crecimiento, eligiendo el segundo punto como el doble de la DO del primer punto seleccionado. Se extrapolaron estos puntos sobre el eje de las abscisas donde fueron graficados los tiempos de incubación. La diferencia en tiempo (horas) entre los dos puntos extrapolados se registró como el Tg, para cada aislado y/o cepa estudiada. El promedio del Tg

representa el cálculo de éste considerando dos grupos extrapolados en la pendiente de la fase logarítmica de crecimiento, uno sobre el estadio mediano y el otro sobre el tardío.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE *H. capsulatum*

Extracción del DNA genómico. Se estimuló el crecimiento micelial de cada aislado de *H. capsulatum* en medio GEL (glucosa 2 % y extracto de levadura 1 %), con agitación a 28 °C, durante 2-3 semanas. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración en un embudo Büchner con papel filtro normal. Para determinar el destino de cada micelio se realizó la prueba de IDG con el filtrado concentrado frente a sueros testigos, positivo (paciente con histoplasmosis) y negativo (voluntario sano); sólo los micelios con filtrados capaces de desarrollar reacción de precipitación con el suero testigo positivo en IDG se utilizaron en la extracción de DNA. Enseguida, se lavaron los micelios seleccionados con amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8.0, EDTA 1 mM). Se transfirió cada micelio a un mortero y se trituroó con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adicionaron 30 mL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 62.5 mM, SDS 2 %) y se agitó 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1500 x g a 4 °C, por 10 min. Se adicionó ¼ de volumen de acetato de potasio 8 M al sobrenadante, se incubó en hielo por 45 min y se centrifugó a 15000 x g a 4 °C, por 12 min. Se filtró el sobrenadante en papel filtro normal. Se adicionó ¼ de volumen de acetato de amonio 8 M y un volumen igual de isopropanol, se incubó toda la noche a -20 °C (1-2 h a -80 °C), se centrifugó a 15000 x g a 4 °C, por 12 min. Se resuspendieron los ácidos nucleicos con amortiguador TE a un volumen de 0.5 mL. Se adicionó el volumen necesario de SDS al 10 % a la suspensión anterior para ajustarla al 2 % y se agregó 0.8 mg/mL de proteinasa K. Se incubó a 56 °C por 30 min. Se extrajeron dos veces los ácidos nucleicos con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y dos o más veces con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), hasta obtener la fase acuosa superior transparente. Se adicionó RNasa a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó a 37 °C, por 30 min. Se extrajo el DNA con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se obtuvo la malla de DNA con una punta de pipeta de 1 mL, previamente recortada. Se centrifugó y se lavó el botón de DNA con etanol al 70 % y se disolvió en TE. Para verificar la presencia y

calidad del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparado en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) y 2 μ L de bromuro de etidio a una concentración de 10 μ g/mL. El gel se corrió con el mismo amortiguador a 100 V hasta que el colorante avanzó a la mitad y se observó en un transiluminador. Se verificó la calidad del DNA de las muestras y se conservó a -40 °C hasta su uso posterior.

Determinación de la concentración de DNA. Para determinar las concentraciones de los DNA, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 %, las cuales se corrieron a diferentes concentraciones del fago λ (GIBCO) de 20, 50 y 100 ng. Estas concentraciones se compararon con 2 μ L de los DNA problemas adicionados de 2 μ L de bromuro de etidio y se registraron las concentraciones de cada muestra.

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Se uso el método de RAPD-PCR empleando doble iniciador de 10 nucleótidos (44), el 1281 (5'-aacgcgcaac-3') y el 1283 (5'-gcgatcccca-3'), que han sido probados con excelentes resultados para *H. capsulatum* por Kersulyte *et al.* (12) y Woods *et al.* (13), respectivamente. En nuestro laboratorio, para estos iniciadores, las condiciones de trabajo han sido estandarizadas por Taylor *et al.* (37) y Reyes-Montes *et al.* (33, 35, 39). Las condiciones de trabajo iniciales fueron: volumen de reacción de 20 μ L, conteniendo 10 ng de DNA genómico, 15 pmoles de cada iniciador, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Perkin-Elmer Cetus Norwalk, CT) y amortiguador 10X. Los reactivos se ajustaron hasta obtener las condiciones óptimas de todos los reactantes.

Programa de amplificación. Se siguió el programa estandarizado por Reyes Montes *et al.* (35), en un termociclador Cycler (BioRad, Hercules, CA) con un ciclo inicial de 7 min a 94 °C (para activar la *Taq* DNA polimerasa), seguido por 45 ciclos de: 1 min a 92 °C (desnaturalización); 1 min a 35 °C (alineación) y 1 min a 72 °C (extensión). Se llevó a cabo una extensión final de 5 min a 72 °C.

Electroforesis. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1

mM). Para visualizar las bandas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 10 µg/mL. El gel se corrió con el mismo amortiguador a 70 v hasta que el colorante avanzó aproximadamente a la mitad del gel. Se utilizó como estándar de pares de bases el 123 bp DNA Ladder (GIBCO). La imagen de cada gel se capturó con un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge) y se imprimió en una impresora térmica (Sony 650, Tokio).

Análisis de similitud. Los perfiles de los fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR, se registraron en una matriz elaborada con base en los tamaños de los fragmentos revelados. Para el cálculo de los respectivos Kb de los fragmentos o bandas se procedió según Sambrook *et al.* (45) y se consideró además la ayuda del programa BiImage por comparación con el marcador molecular 123 bp DNA Ladder. A través del programa NTSYSPC versión 2.0 (F. James Rohlf), utilizando un coeficiente de correlación (r) de Jaccard y un procedimiento de agrupamiento jerárquico a través del análisis de grupos desbalanceados con base en promedios aritméticos (UPGMA), los datos de la matriz fueron procesados para obtener un dendrograma de similitud.

Secuenciación parcial de genes. Para llevar a cabo este método se seleccionaron cuatro genes de *H. capsulatum* para los cuales se diseñaron los oligonucleótidos según Kasuga *et al.* (18, 19). Para el gen *ARF* del factor de ribosilación del ADP, arf1 (5'-agaatatggggcaaaaagga-3') y arf2 (5'-cgcaattcatcttcggtgag-3'); para el gen *H-ANTI* del precursor del antígeno H, H-anti3 (5'-cgcagtcacctccatactatc-3') y H-anti4 (5'-gcgccgacattaacct-3'); para el gen *OLE* de la desaturasa Δ-9 de ácido graso, ole3 (5'-tttaaacgaagccccacgg-3') y ole4 (5'-caccacctccaacagcagca-3'); y para el gen *TUB1* de la α-tubulina, tub1 (5'-ggtggccaatcgaaactc-3') y tub2 (5'-ggcagcttttcgctctcag-3'). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Se usaron 2 µL de DNA genómico en una mezcla de reacción de 50 µL, la cual contenía 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Perkin-Elmer), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 50 mM de KCl y 0.2 mM dNTPs con el siguiente programa: un ciclo inicial de activación de la *Taq* DNA polimerasa de 6 min a 94 °C y 32 ciclos de: 15 s a 94 °C (desnaturalización); 30 s a 65 °C (alineación) y 1 min a 72 °C (extensión). Se procedió a una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. La temperatura de alineación en el primer ciclo fue de 65 °C. La temperatura de alineación fue paulatinamente reducida en 0.7 °C para los próximos 12 ciclos

y la PCR continuó a una temperatura de alineación de 56 °C para los restantes 20 ciclos. Los productos de la PCR se enviaron al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para su secuenciación en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA). Se generaron secuencias para una sola hebra, las cuales se editaron, alinearon y compararon mediante el programa BLAST 2 (46), con las secuencias de cada gen estudiado (*ARF*, *H-ANTI*, *OLE* y *TUB1*) depositadas en el Banco de Genes.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y ANTIGÉNICA DE LOS AISLADOS ESTUDIADOS

Los aislados fueron identificados con base en los criterios de inclusión para la especie *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. La cepa de referencia G-217B procedente de EUA presentó morfología colonial poco filamentosa con pigmentación pardo-clara con aspecto macroscópico similar al tipo A (Fig. 1a) y la cepa de referencia Downs desarrolló colonias glabras, secas, duras y de crecimiento muy limitado. Los aislados de los cinco pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA mostraron una morfología colonial de aspecto filamentoso-pulverulento y una pigmentación pardo-oscuro, característica de las colonias B (Fig. 1b), destacando que el aislado de paciente con lesión mucocutánea (EH-359) desarrolló además un pigmento rosa visible al reverso de la colonia y poco difusible al medio. Los aislados de los cinco pacientes argentinos con histoplasmosis asociada a SIDA desarrollaron colonias tipo B con textura pulverulenta y una pigmentación pardo-claro. El aislado del paciente guatemalteco desarrolló colonia filamentosa-pulverulenta tipo B. Las colonias procedentes de los aislados de murciélagos presentaron morfología colonial B de pigmentación pardo-oscuro con textura pulverulenta. El crecimiento de las colonias de la fase micelial fue lento, variando entre 3-5 semanas de incubación, característica propia de la especie.

Mediante la microscopia de luz se observaron hifas septadas, hialinas y delgadas; microconidios escasos o ausentes, piriformes o redondos, sésiles o unidos a la hifa por conidióforos cortos y macroconidios característicos de la especie de 8-15 μ m de diámetro, redondos o piriformes, de pared gruesa con proyecciones irregulares (digitiformes). Una apreciación fotográfica de la micromorfología de aislados representativos de cada grupo regional estudiado, se observa en las figuras 1c y d.

Se corroboró la identificación de los aislados y cepas estudiados mediante la conversión dimórfica de la fase micelial a la levaduriforme. En general, el tiempo promedio de transición de fase requerido fue de 2 semanas en la mayoría de los aislados, con límites de transición de 1 a 3 semanas. Todos los aislados desarrollaron colonias levaduriformes de superficie y bordes regulares y color crema; las levaduras de forma ovaladas, en general, presentaron diámetros

promedio de $1.81 \times 1.43 \mu\text{m}$ en las condiciones artificiales de cultivo. En la tabla 2 se muestran los registros del tiempo de conversión dimórfica, la morfología colonial y las dimensiones de las levaduras de los aislados y/o cepas estudiadas. La confirmación de la conversión dimórfica se realizó por la reversión de la fase levaduriforme a la micelial, la cual se efectuó en medio sólido a 28°C , observándose la aparición de micelio aéreo después de 2-3 semanas.

Para demostrar la identidad antigénica de todos los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* incluidas en este estudio se utilizó un método de producción rápida de exoantígenos. Todos los aislados y/o cepas se identificaron por compartir las bandas H y M. En la figura 2 se muestran las bandas de precipitación entre los exoantígenos de algunos aislados representativos de cada grupo regional estudiado.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE *H. capsulatum*

Termosensibilidad a 40°C de la fase levaduriforme. Los registros de lecturas de DO correspondientes al crecimiento de la población de levaduras a diferentes temperaturas, 37°C (testigo de crecimiento) y 40°C (efecto termosensible), con diferentes tiempos de incubación, desde 0, 6, 12 hasta 24 h (t_0 , t_6 , t_{12} y t_{24}), se observan en la tabla 3. El crecimiento testigo de los aislados en la temperatura de 37°C se muestra en la figura 3, la cual está graficada con un orden particular de los valores de DO de cada cepa (Tabla 3) con el objeto de una mejor visualización de la respuesta de crecimiento determinada para cada aislado y/o cepa. La comparación del mayor crecimiento de la cepa de referencia G-217B y de los aislados EH-375, EH-316 y EH-317 durante las incubaciones de 6, 12 y 24 h, con el crecimiento limitado de la cepa de referencia Downs, muestra diferencias significativas con valores de $p < 0.01$ (G-217B), $p < 0.01$ (EH-375), $p < 0.01$ (EH-316) y $p < 0.01$ (EH-317). Los resultados del ensayo de termosensibilidad a 40°C se observan en la figura 4, la cual está graficada con un orden distinto de la figura 3 para una mejor visualización de la respuesta de inhibición de crecimiento. La cepa Downs (paciente inmunocomprometido, EUA) y los aislados de pacientes mexicanos con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA, EH-316 y EH-317, fueron termosensibles a diferencia de los demás aislados que se comportaron como termotolerantes. Cabe destacar que el aislado EH-375, procedente de murciélago infectado capturado en México, fue el que mejor creció a la temperatura de 40°C . La comparación estadística del crecimiento a 40°C de los aislados

termosensibles con el crecimiento testigo a 37 °C muestra diferencias significativas para la cepa Downs ($p < 0.05$) y los aislados EH-316 ($p < 0.01$) y EH-317 ($p < 0.01$).

El efecto de la termosensibilidad a 40 °C en el crecimiento de los aislados estudiados fue también analizado con base en el cálculo de inhibición del crecimiento expresado en porcentaje, utilizando una fórmula que considera tanto el crecimiento de cada aislado y/o cepa a 40 °C como su correspondiente testigo a 37 °C. Los resultados se observan en la tabla 4, donde sobresalen los porcentajes más altos de inhibición asociados a la cepa Downs (57.9 y 88.4) y los aislados EH-316 (100 y 99.9) y EH-317 (96.9 y 98) en los tiempos de 6 y 12 h, respectivamente. En los demás aislados termotolerantes los valores de inhibición no alcanzaron el 50 %, destacando que el aislado 01/97 de Argentina se inhibió a 6 h de incubación pero recuperó su crecimiento a las 12 h siguientes. Un aislado de México (EH-375) procedente de murciélago infectado y el aislado de Argentina 02/97, fueron los menos inhibidos en su crecimiento (Tabla 4). Los resultados mostrados en la figura 4 y tabla 4 se relacionan y reafirman el comportamiento de los aislados reportados como termosensibles. El aislado EH-359 procedente de un caso clínico mexicano con histoplasmosis mucocutánea, en repetidas ocasiones, no pudo ser analizado con respecto a la característica de termosensibilidad.

Tiempo de generación (Tg) de la fase levaduriforme. Las curvas de crecimiento a 37 °C de cada aislado y/o cepa estudiada se presentan en la figura 5. En la mayoría de los aislados estudiados y en la cepa de referencia G-217B se observaron, a las 6 h la fase logarítmica temprana, indicando que la fase de latencia o fase lag fue más corta, en las condiciones del cultivo probadas. Asimismo, la fase estacionaria de crecimiento fue alcanzada entre las 12 y 24 h. Sin embargo, la cepa de referencia Downs presentó un comportamiento muy distinto, su crecimiento fue extremadamente lento, lo cual se refleja en una prolongada adaptación inicial a las condiciones de cultivo y con una marcada latencia o fase lag, que se prolongó hasta las 6 h de incubación, observando que hasta las 12 y 24 h se inició la fase logarítmica (log) temprana de crecimiento. Los valores promedio de Tg calculados para cada aislado y/o cepa se registran en la tabla 5. Los Tg en la mayoría de los aislados estudiados variaron en un intervalo de 3 a 6:30 h, en cambio, la cepa de referencia Downs presentó un Tg muy largo de 14:30 h. Además de la cepa Downs, el aislado que registró el Tg más largo fue el de un paciente argentino con histoplasmosis mucocutánea asociada a SIDA (01/97) con un Tg de 8:50 h. En contraparte, el aislado EH-375 de

murciélago naturalmente infectado, los aislados obtenidos de casos clínicos mexicanos asociados a SIDA, EH-324 y EH-326, y el aislado de Argentina 01/98, mostraron los Tg más cortos de 3:00, 3:25, 3:00 y 3:30 h, respectivamente. Nuevamente, los datos del aislado de un caso clínico mexicano (EH-359) no fueron obtenidos.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE *H. capsulatum*

Polimorfismo genético por RAPD-PCR. Dos bandas polimórficas de 1.2 y de aproximadamente 0.123 Kb se destacan en los patrones de RAPD-PCR obtenidos de los aislados y/o cepas estudiadas (Fig. 6). La banda de 0.123 Kb es común a todos los aislados y cepas, independiente de su origen geográfico y forma clínica. Sin embargo, la banda de 1.2 Kb sólo se observó en los aislados de procedencia de América Central y del Norte, independientemente de la fuente de aislamiento y forma clínica. El patrón polimórfico de todos los aislados de México, el del aislado de Guatemala y el de la cepa G-217B de EUA está representado por ocho bandas comunes variables en su intensidad que no difieren en los aislamientos de distintas fuentes y formas clínicas. Mientras que los aislados procedentes de pacientes argentinos presentaron un polimorfismo identificado por la expresión de cuatro bandas comunes con los aislados de pacientes mexicanos y guatemalteco además de la cepa de referencia G-217B de EUA, de dos bandas únicas de aproximadamente 0.47 y 0.41 Kb y la ausencia de la banda polimórfica de 1.2 Kb. La figura 6 muestra la diversidad polimórfica expresada por los aislados de procedencia de América Central o del Norte y los del cono Sur, asimismo incluye la cepa de referencia Downs (asociada a un caso clínico con lesión en mucosa, EUA). El polimorfismo en RAPD-PCR expresado por esta última, fue distinto de los demás obtenidos, ya que la cepa Downs desarrolló un patrón de cinco bandas tenues, de las cuales tres son comunes a los demás patrones revelados y dos son exclusivas de la cepa Downs. Entre los aislados clínicos de México, los procedentes de pacientes con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA, EH-316, EH-317, EH-324 y EH-326, desarrollaron el mismo patrón polimórfico que el aislado EH-359 procedente de un caso clínico de histoplasmosis mucocutánea que no refería posible asociación con SIDA. Los aislados de murciélago EH-373 y EH-375 presentaron un patrón polimórfico idéntico a los de los aislados procedentes de pacientes mexicanos anteriormente mencionados, así como al del aislado H.1.12.96 de Guatemala y la cepa G-217B de EUA. Los aislados clínicos de Argentina, 01/97,

02/97, 01/98, 02/98 y Hc993267, presentaron un polimorfismo idéntico entre ellos. Sin embargo, con base en los estudios con RAPD-PCR no se observó una mayor relación polimórfica entre los aislados de pacientes argentinos con manifestaciones mucocutáneas de la histoplasmosis y los aislados de diagnósticos clínicos similares procedentes de México (EH-359) y Guatemala (H.1.12.96).

Se construyó una matriz de presencia o ausencia de bandas representando además los valores de Kb calculados para las 12 bandas polimórficas reveladas en los perfiles de RAPD-PCR de los aislados y/o cepas estudiadas (Tabla 6). A partir de la matriz, se analizaron los perfiles polimórficos de los DNA obtenidos por el programa UPGMA que permitió determinar un porcentaje de similitud entre los grupos formados por los aislados y/o cepas estudiadas, expresado en un dendrograma (Fig. 7). La figura 7 muestra que los 15 aislados y/o cepas estudiadas se asociaron en 3 grupos. El grupo I integró a los aislados de casos clínicos mexicanos (EH-316, EH-317, EH-324, EH-326 y EH-359) y de murciélagos infectados capturados en Morelos (EH-373 y EH-375), todos relacionados con el aislado H.1.12.96 de Guatemala y la cepa G-217B de referencia de EUA. El grupo II incluyó a los aislados procedentes de casos clínicos argentinos (01/97, 02/97, 01/98, 02/98 y Hc993267). El grupo III se formó con una cepa única, la Downs. Los grupos I y II se relacionaron entre sí en 50 % de similitud, y estos a su vez se relacionaron con el grupo III en 42 %. El análisis de similitud sugiere que los grupos polimórficos identificados por RAPD-PCR a partir de los aislados y/o cepas estudiadas, están más asociados a patrones geográficos que a formas clínicas de la histoplasmosis.

Secuenciación parcial de genes. Los fragmentos del DNA de cada uno de los aislados y/o cepas amplificados por PCR con los oligonucleótidos arf1 y arf2, H-anti3 y H-anti4, ole3 y ole4, tub1 y tub2, fueron alineados y comparados con las secuencias de la cepa G-217B depositadas en el Banco de Genes para los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE* y *TUB1*, respectivamente. En todos los aislados y cepas estudiadas se encontró una alta homología genética (identidad), del 95 a 99 % con la secuencia del gen *ARF*, del 95 a 99 % con la secuencia del gen *H-ANTI*, del 96 a 99 % con la secuencia del gen *OLE*, y del 86 a 92 % con la secuencia del gen *TUB1* (Tabla 7).

Se determinó una relación de inserción/delección que fue de 0 % para la mayoría de los productos amplificados y comparados con el gen *ARF*, a excepción de los productos de los aislados de murciélago EH-373 que presentó una relación del 1 % y el aislado de paciente

argentino con histoplasmosis asociada a SIDA Hc993267 con una relación del 2 %, asimismo se encontró una relación del 0 % o ausencia de mutación para los productos amplificados y comparados con los genes *H-ANTI* y *OLE*. Finalmente, la relación de inserción/delección varió del 3 al 7 % en los productos amplificados comparados con el gen *TUB1* (Tabla 7).

DISCUSIÓN

En los aislados y/o cepas estudiadas se observaron colonias de tipo A y B predominando las últimas, tanto en los aislados de pacientes con SIDA de diferentes procedencias geográficas (México, Guatemala y Argentina) como en los aislados de otras fuentes en la naturaleza. Cabe destacar la presencia de un pigmento rosa poco difusible al medio observado en la colonia del aislado EH-359, procedente de un paciente mexicano con lesión mucocutánea. Esta característica no es única de este aislado de *H. capsulatum*, considerando los reportes previos en el extranjero de un aislado de suelo de un cañaveral (47) y otro de un paciente con SIDA (48), además de algunos aislados procedentes del país tanto de la naturaleza como de pacientes con SIDA (49). Aunque la producción de pigmento rojo difusible no es común en *H. c.* var. *capsulatum*, su presencia en aislados que cumplen todos los criterios de identificación para la especie (47-49), genera especulaciones sobre la acumulación de un metabolito de color rojo posiblemente relacionado con la síntesis del pigmento pardo-claro a oscuro presente tanto en hifas como en conidios del hongo. En la actualidad este pigmento es motivo de investigación. Sin embargo, es pertinente resaltar que la presencia de este pigmento no está relacionada ni con la forma clínica ni con las fuentes de aislamientos en la naturaleza.

Los resultados sobre la morfología microscópica revelaron las clásicas características referidas para *H. capsulatum* (1, 2), observándose micelios con hifas delgadas, microconidios y en la mayoría de las colonias B el predominio de macroconidios esféricos de paredes gruesas con proyecciones digitiformes. La conversión dimórfica de los aislados y/o cepas permitió una confirmación más de la especie y además, marcó diferencias en el tiempo de transición de fase de 1 a 3 semanas, tiempo estimado por la mayoría de los autores para lograr cambios de fase en condiciones artificiales de cultivo. Sin embargo, la presencia de cepas de difícil conversión es conocida en los diferentes grupos de investigación que manejan este patógeno. De 15 aislados y/o cepas estudiadas, el aislado 01/97 y el EH-316 fueron los más retardados en la conversión (Tabla 2). En general, todas las colonias de los aislados presentaron superficies y bordes regulares, parámetros morfológicos actualmente muy importantes en la descripción macroscópica de la fase levaduriforme del hongo. Las levaduras de todos los aislados y/o cepas estudiadas crecidas en condiciones homogéneas de cultivo mantuvieron una variación mínima en el diámetro de largo ($\bar{X} = 1.81$) y de ancho ($\bar{X} = 1.43$) de las células levaduriformes, coincidiendo con las variaciones

en diámetros referidas para la especie $2-4 \times 1.5-3 \mu\text{m}$ (1, 2). Las características antigénicas se confirmaron por la aparición de bandas de precipitación que revelaron la presencia del antígeno H (banda cercana al pozo del suero) y del antígeno M (banda cercana al pozo del antígeno) en todos los exoantígenos probados.

La confirmación de las características arriba referidas sugiere que los aislados y/o cepas estudiadas cumplen los requisitos de identificación de la especie y no se observaron particularidades distintivas morfo- o fisiológica asociadas tanto a la forma clínica como a la procedencia geográfica.

El análisis del comportamiento de cada uno de los aislados y/o cepas estudiadas con respecto a la termosensibilidad a 40°C de la fase levaduriforme de *H. capsulatum*, expresados tanto por la cinética de crecimiento como por el cálculo del porcentaje de inhibición a esta temperatura, reveló que sólo dos aislados de casos clínicos mexicanos, EH-316 y EH-317, manifestaron ser termosensibles a 40°C a semejanza de la cepa Downs (cepa prototipo de termosensibilidad) clasificada por su perfil polimórfico según Vincent *et al.* (8), en la clase I de EUA. En contraste, a 37°C estos mismos aislados clínicos mexicanos mostraron un desarrollo exuberante a diferencia de la cepa Downs que crece más lentamente. Este resultado se confirmó por la curva de crecimiento y la determinación del tiempo de generación de estos aislados (Fig. 5 y Tabla 5) donde se observaron que estos aislados son de crecimiento más rápido que la cepa Downs y además presentaron tiempos de generación más cortos. Por otro lado, es interesante destacar el comportamiento en repetidos ensayos a 40°C del aislado 01/97 de paciente argentino, que se inhibió a las 6 h de incubación recuperando su crecimiento a las 12 h siguientes, asimismo fue el único aislado además de la cepa Downs que presentó una fase de latencia (lag) de crecimiento a 37°C muy prolongada (Fig. 5). Los datos anteriores permiten inferir que la termosensibilidad es un evento fisiológico no asociado a la velocidad de crecimiento de las cepas. Además, el comportamiento termosensible de estos aislados parece no estar relacionado ni con la fuente ni con la forma clínica asociada y tampoco con sus orígenes geográficos, aunque no descartamos la mayor frecuencia de aislados termosensibles en pacientes inmunocomprometidos, como es el caso de la cepa Downs (50) y de los aislados EH-316 y EH-317 procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA (51). Spitzer *et al.* (21) ya referían esta asociación en pacientes americanos con distintos tipos de inmunocompromiso. Una característica interesante asociada a estos aislados es la variación en su virulencia. Lo anterior es apoyado por el hecho de

que la cepa Downs, considerada también como prototipo de cepa de baja virulencia, se agrupa con el aislado EH-317 con respecto a la expresión de una baja virulencia en ensayos *in vivo*, en ratones machos subadultos BALB/c (M. L. Taylor, comunicación personal). Las observaciones de estas características fenotípicas permitieron corroborar una diversidad de los aislados y/o cepas relacionadas a la histoplasmosis asociada a pacientes inmunodeprimidos.

De los 15 aislados y/o cepas incluidas en el estudio, sólo el aislado EH-359 procedente de un caso clínico mexicano con histoplasmosis mucocutánea no pudo ser analizado con respecto a la característica de termosensibilidad por el escaso desarrollo y alta labilidad de su fase levaduriforme.

El crecimiento poblacional de la fase levaduriforme en la mayoría de los aislados y/o cepas estudiadas presentó una fase lag muy corta y la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó entre las 12 y 24 h (Fig. 5). Los Tg encontrados variaron en un intervalo de 3 a 6:30 h (Tabla 5), lo que confirma que son microorganismos de crecimiento lento, característica propia de este parásito (52). Un dato adicional que se relacionó con los hallazgos de la literatura, fue la observación de que el más largo Tg detectado correspondió a la cepa de referencia Downs (14:30 h), lo que explica su selección como prototipo de cepa de crecimiento muy lento. Este hallazgo es apreciable además por la cinética de su curva de crecimiento con una fase lag muy larga (12 h) y con la aparición de la fase logarítmica temprana de crecimiento después de las 24 h. Por lo expuesto, se puede sugerir que el tiempo de generación no parece estar relacionado ni con la forma clínica ni con el origen geográfico de los aislados y/o cepas estudiadas.

El polimorfismo genético obtenido por RAPD-PCR permitió una definida agrupación de los aislados y/o cepas estudiadas, de acuerdo con su procedencia geográfica. Es importante destacar que la banda de 0.123 Kb la cual es común para todos los aislados y cepas, representa un excelente marcador molecular para *H. capsulatum* independientemente de su origen geográfico y forma clínica. Por otro lado, la banda de 1.2 Kb revela un patrón único para los aislados procedentes de América del Norte y Central. Ambas bandas están en proceso de purificación y secuenciación para la posterior utilización como sondas específicas para *H. capsulatum* (M. R. Reyes-Montes, comunicación personal). Los aislados clínicos de México procedentes de pacientes con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA compartieron el mismo patrón polimórfico con un aislado procedente de un caso clínico mexicano de histoplasmosis mucocutánea no asociada a SIDA. Además, los aislados de murciélagos incluidos en el estudio

presentaron un patrón de RAPD-PCR idéntico al de los aislados procedentes de pacientes mexicanos anteriormente mencionados, asimismo al de la cepa G-217B (clase 2 de EUA) y del aislado H.1.12.96 de Guatemala, lo que sugiere una estrecha relación entre casos clínicos y fuentes de infección en la naturaleza, compartiendo un posible patrón polimórfico regional. Por otro lado, los aislados clínicos de Argentina presentaron un polimorfismo idéntico entre sí, lo que podría representar otro posible patrón regional para el sur del continente americano. Aunque, no se encontró una asociación directa entre polimorfismo genético y la forma clínica mucocutánea de la enfermedad, al análisis de los porcentajes de similitud expresados en el dendrograma reiteró la diversidad polimórfica de los aislados y/o cepas estudiadas, definiendo tres grupos que se asociaron de preferencia a los patrones polimórficos geográficos más que a las formas clínicas de la enfermedad.

El análisis del cariotipo de *H. capsulatum* también marca diferencias genotípicas entre aislados y/o cepas del hongo, como lo define el estudio de la cepa Downs por electroforesis de campo pulsado que ha evidenciado la presencia de siete cromosomas para esta cepa a diferencia de las cepas de la clase 2 de Norteamérica, como la G-217B que tiene cuatro cromosomas (53).

Asimismo, resultados preliminares de Canteros *et al.* (54) mostraron que las cepas procedentes de México tienen un cariotipo muy relacionado a la cepa G-217B (comparten cuatro cromosomas) y difieren de las argentinas que tienen tres cromosomas. Nuevamente, este análisis destaca patrones muy regionales más que diferencias sutiles de carácter clínico.

La secuenciación parcial de genes conocidos constituye un método accesible para corroborar la relación de identidad entre aislados y/o cepas y permite además, determinar cambios sutiles de bases (posibles mutaciones por inserciones o deleciones) en los fragmentos génicos secuenciados a partir de la amplificación del DNA de cada aislado y/o cepa, con oligonucleótidos específicos para los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE* y *TUB1*, referidos originalmente para la cepa G-217B por Kasuga *et al.* (18).

Cuando se compararon mediante el programa BLAST 2 (46), las secuencias parciales de los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE* de todos los aislados y/o cepas obtenidas con la secuencia original de las regiones de las cuales fueron amplificados los fragmentos del DNA, los fragmentos génicos de todos los aislados y/o cepas estudiadas se ordenaron de acuerdo con sus polimorfismos, revelando altos porcentajes de identidad entre ellos (Tabla 7). Por otro lado, el gen *TUB1* presentó mayor polimorfismo en relación con los tres genes anteriores, aunque de

modo similar a *ARF*, *H-ANTI* y *OLE* no permitió detectar diferencias críticas entre los aislados y/o cepas relacionadas. Estos resultados coinciden con los reportados por Kasuga *et al.* (18, 19), donde se registraron porcentajes de identidad muy similares para este gen. El gen *TUB1* estará sujeto a estudios posteriores, debido al alto polimorfismo presentado en los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*. Además, los bajos porcentajes de mutaciones por inserciones o deleciones en los fragmentos génicos secuenciados no revelaron cambios sustanciales entre los aislados y/o cepas estudiadas. Los más altos porcentajes de identidad reportados en la tabla 7 para la cepa de referencia G-217B se debieron a que ésta constituye la fuente originaria de los fragmentos génicos analizados y depositados en el Banco de Genes. Con este método además, fue posible destacar la observación de que en la amplificación parcial con el gen *OLE*, un aislado de México (EH-359) se ubicó con los aislados de Argentina. En este caso en particular, aunque estos aislados no comparten el origen geográfico, si comparten una característica clínica común, la forma mucocutánea de la histoplasmosis.

En la actualidad, se han desarrollado un número apreciable de marcadores moleculares para estudiar aspectos epidemiológicos y de diversidad genética en *H. capsulatum*. Estos marcadores han detectado grupos genéticamente distintos, los cuales frecuentemente correlacionan con el origen geográfico como lo muestran Vincent *et al.* (8), Spitzer *et al.* (9), y Keath *et al.* (10). Posteriormente, otros investigadores como Carter *et al.* (16, 55), encontraron tres marcadores multialélicos que tienen la característica de ser hipervariables y por lo tanto altamente polimórficos, debido a la variación en las longitudes y secuencias de sus productos de amplificación, y que tienen la característica de presentar secuencias muy repetitivas y conservadas (microsatélites), por lo que estos marcadores multialélicos resultaron adecuados para tipificar y determinar niveles de variación genética de aislados del hongo, provenientes de regiones de los EUA y de otros países (16, 55). A la fecha, se han encontrado cinco loci microsatélites en el genoma de *H. capsulatum*, los cuales son capaces de discriminar aislados con características muy peculiares (55).

Jiang *et al.* (56) tipificaron 24 aislados de *H. capsulatum* a través de variaciones en las secuencias nucleotídicas de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1, ITS2) y del gen 5.8S rRNA. Cuando alinearon las secuencias de los aislados estudiados encontraron 10 diferentes patrones de secuencias designados como tipos A (con 3 representaciones A-1, A-2, A-3), B hasta H. Doce aislados de Indianápolis se clasificaron en cuatro tipos diferentes (A-1, A-2, A-3, F), dos

de Nueva York en el tipo G, tres de distintas ciudades de EUA en el tipo F, y los restantes se ubicaron en tipos diferentes. En este estudio, la cepa Downs [clase 1 de Vincent *et al.* (8)] se agrupó con dos aislados tipo F, uno de Indianápolis y otro de Houston [clase 2 de Vincent *et al.* (8)], por lo que los autores sugieren que este método de tipificación reubica aislados de otras clasificaciones.

Kasuga *et al.* (18, 19) y Taylor *et al.* (57) han tratado de resolver la disyuntiva entre la clasificación molecular y el concepto de variedades de *H. capsulatum*, a través del estudio de la secuenciación parcial de genes del hongo, reconociendo a la fecha 8 clados o especies filogenéticas. Aparentemente, estos marcadores de secuencias génicas funcionaron como polimórficos para los aislados estudiados de diferentes países, por esta razón, éstos marcadores fueron utilizados para caracterizar los aislados y/o cepas del presente estudio.

CONCLUSIONES

Las características fenotípicas de los aislados y/o cepas estudiados, como la termosensibilidad y el tiempo de generación, son eventos fisiológicos aparentemente no relacionados ni con la fuente de infección ni con el origen geográfico de los aislados y/o cepas.

Se corroboró la asociación de aislados termosensibles con pacientes inmunocomprometidos, como es el caso de la cepa Downs (inmunodepresión no asociada a patología infecciosa) y de los aislados EH-316 y EH-317 procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA.

El polimorfismo genético revelado por RAPD-PCR y el subsecuente análisis de similitud permitió observar la agrupación de los aislados y/o cepas estudiadas con relación a su procedencia geográfica más que a su forma clínica.

La secuenciación parcial de genes conocidos permitió corroborar la alta identidad entre los aislados y/o cepas estudiadas apoyada por los bajos porcentajes de mutaciones en los fragmentos génicos secuenciados.

Aunque no se encontró una relación que reflejara diferencias fenotípicas y/o genotípicas del patógeno para explicar el tropismo de *H. capsulatum* hacia piel y mucosas o su preferencia por la forma localizada pulmonar, un análisis más detallado de los aislados pudiera arrojar diferencias más sutiles entre éstos, como es el caso de la amplificación parcial con el gen *OLE*, donde el aislado EH.359 de paciente mexicano con lesión en piel y mucosa se relacionó con los aislados de Argentina que comparten una característica clínica común, la forma mucocutánea de la histoplasmosis.

REFERENCIAS

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. En: Medical Mycology, 3ra ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992; 464-513.
2. Tewary R, Wheat LJ, Ajello L. Agents of histoplasmosis. En: Ajello L, Hay RJ (eds.). Medical Mycology. Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections, 9º ed. New York: Arnold and Oxford University Press, Inc., 1998; 373-407.
3. Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi G, Carratu L. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. Science 1986; 231: 476-479.
4. Colonna-Romano S, Porta A, Franco A, Kobayashi GS, Maresca B. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophage infection. Microbiol. Pathol. 1998; 25: 55-56.
5. Abidi FE, Roh H, Keath EJ. Identification and characterization of a phase-specific nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 1998; 66: 3867-3873.
6. Retallack DM, Heinecke EL, Gibbons R, Deepe GS, Woods JP. The URA5 gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. Infect. Immun. 1999; 67: 624-629.
7. Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4: 411-421.
8. Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. J. Bacteriol. 1986; 165: 813-818.

9. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 1989; 57: 1409-1412.
10. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2104-2107.
11. Williams JGK, Rubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990; 18: 6531-6535.
12. Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. J. Bacteriol. 1992; 174: 7075-7079.
13. Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction based epidemiological and clinical studies. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 463-464.
14. Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazaka K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 3073-3076.
15. Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 2577-2584.

16. Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ, A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* 1997; 18: 1047-1053.
17. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 126-146.
18. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 653-663.
19. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva-Lacaz C, Heins-Vaccari EM, de Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Zhenyu Q, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. 2002 (Submitted).
20. Gaur PK, Lichtwardt RW, Hamrick JL. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Exp. Mycol.* 1981; 5: 69-77.
21. Spitzer DE, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 258-261.
22. González-Ochoa A, Cervantes-Ochoa A. Histoplasmosis epidémica y su prevención. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1960; 20: 129-145.
23. González-Ochoa A. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* 1971; 31: 74-77.
24. Taylor ML, Pedrosa-Serés M, Gámez-Aranda A, Toriello C. Retrospective serological study of histoplasmosis in Mexico. *Mycoses* 1993; 36: 25-30.

25. Pedroza-Serés M, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: A preliminary study. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994; 32: 83-92.
26. Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. *Rev. Mex. Mic.* 1994; 10: 49-62.
27. Taylor ML, Granados J, Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 1996; 39: 375-379.
28. Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 1997; 137: 137-141.
29. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* 1997; 23: 58-63.
30. Vaca-Marín MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev. Nal. Enf. Resp. Méx.* 1998; 11: 208-215.
31. Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montaña-Ortiz G, Pedroza-Serés M. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gac. Méd. Méx.* 2000; 123: 441-448.
32. Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 1998; 11: 187-191.

33. Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osorio J, Taylor ML. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genéticos. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 1998; 11: 195-201.
34. Salas-Ríos MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML. Genotificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 1998; 11: 202-207.
35. Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osorio J, Taylor ML. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 1404-1408.
36. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 61: 914-919.
37. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fung. Genet. Biol. 2000; 30: 207-212.
38. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. En: Benedik M (ed.). Research Advances in Microbiology. Kerala: Global Research Network, 2000; 29-35.

39. Taylor ML, Reyes-Montes MR. Nuevos aportes sobre la epidemiología de la histoplasmosis en México. VITAE Academia Biomédica Digital, CAIBCO, 2002; <http://www.caibco.ucv.ve/vitae/VitaeDiez/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/Archivos HTLM/Antecedentes.htm>.
40. Tewary RP, Kegel H. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. Mycopath. Mycol. Appl. 1971; 44: 231-240.
41. Kaufman L, Standar P, Padhye AA. Exoantigen test for the immunoidentification of fungal cultures. Mycopathologia 1983; 83: 3-12.
42. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Weir DM (ed.). Handbook of Experimental Immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1978; 19:1-19.44.
43. Amaral D, Costa SOP, Schwab A, De Oliveira ENS, Branco CL, Curry A, Travassos LR. Experimentos de Microbiología Geral. Curitiba: Ministerio da Educacao e Cultura e Universidade Federal do Paraná, 1967.
44. Hu J, Van Eysden J, Quiros CF. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions. En: PCR Methods Applications. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995; 346-351.
45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. En: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds.). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 6:1-6.62.
46. Tatusova TA, Madden TL. Blast 2 sequences- a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 1999; 174: 247-250.

47. Morris PR, Terreni AA, DiSalvo F. Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*- an unusual variant. J. Med. Vet. Mycol. 1986; 24: 231-233.
48. Staib F, Grosse G. Brown-red pigment formation by the mycelial phase of a clinical isolated of *Histoplasma capsulatum* of Staib agar. A preliminary report. Zentralbl. Bakteriol. 1996; 283: 515-521.
49. Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Romero-Martínez R. Diversidad de cepas de *Histoplasma capsulatum*. En: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F (eds.). Actualidades de Micología Médica. IV Diplomado de Micología Médica. México DF: Facultad de Medicina, UNAM, 2002; 275-284.
50. Gass M, Kobayashi GS. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. Arch. Derm. 1969; 100: 721-727.
51. Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Mejía A, Duarte-Escalante E, Taylor ML. Organización de la colección de cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos. Facultad de Medicina, UNAM. Rev. Inst. Nal. Resp. Méx. 1998; 11: 243-246.
52. Daniels LS, Berliner MD, Campbell CC. Varying virulence in rabbits infected with different filamentous types of *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 1968; 96: 1535-1539.
53. Steel PA, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. Mol. Cell. Biol. 1989; 9: 983-987.
54. Canteros C, Zuiani F, Perrota D, Reyes-Montes MR, Taylor ML, Davel G. Utilidad de la electroforesis de campo pulsante en la caracterización de cepas regionales de *Histoplasma capsulatum*: Estudio preliminar. En: Guzmán G, Mata G (eds.). Estudios sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología.

NANACATEPEC. Xalapa: Universidad Veracruzana, SEP-CONACyT, Asociación Latinoamericana de Micología, Instituto de Ecología A.C., 2002; 430.

55. Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fung. Genet. Biol.* 2001; 34: 37-48.
56. Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, Lee CH. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 241-245.
57. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fung. Genet. Biol.* 2000; 31: 21-32.

TABLA 1. Relación de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* de diferentes procedencias y fuentes

No. REGISTRO	PROCEDENCIA	FUENTE
EH-316*	México, Guerrero	Humano SIDA (HD)
EH-317*	México, Morelos	Humano SIDA (HD)
EH-324*	México, Distrito Federal	Humano SIDA (HD)
EH-326*	México, Distrito Federal	Humano SIDA (HD)
EH-359*	México, Oaxaca	Humano (HMC)
EH-373*	México, Morelos	Murciélago
EH-375*	México, Morelos	Murciélago
H.1.12.96*	Guatemala, Guatemala	Humano (HC)
G-217B*	Estados Unidos de América	Humano (HD)
Downs *	Estados Unidos de América	Humano-Inmunodeprimido (HMC)
01/97**	Argentina	Humano SIDA (HMC)
02/97**	Argentina	Humano SIDA (HMC)
01/98**	Argentina	Humano SIDA (HMC)
02/98**	Argentina	Humano SIDA (HMC)
Hc993267**	Argentina	Humano SIDA (HMC)

HD- histoplasmosis diseminada; HMC- histoplasmosis mucocutánea; HC- histoplasmosis cutánea. Los aislados EH-373 y 375 fueron obtenidos de pulmón de murciélagos naturalmente infectados y capturados al azar. *Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM; **Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires, Instituto Nacional del Nordeste e Instituto de Medicina Regional, Chaco, Argentina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2. Características de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*

AISLADO	CONVERSIÓN DIMÓRFICA (semanas)	COLONIA*	LEVADURA (diámetros en μm)
EH-316	3	regular	1.82 x 1.55
EH-317	2	regular	1.98 x 1.55
EH-324	2	regular	1.98 x 1.55
EH-326	2	regular	1.95 x 1.58
EH-359	2	regular	1.55 x 1.35
EH-373	2	regular	1.95 x 1.48
EH-375	1	regular	1.75 x 1.32
H.1.12.96	1	regular	1.82 x 1.39
G-217B	2	regular	1.72 x 1.38
Downs	2	regular	1.65 x 1.32
01/97	3	regular	1.72 x 1.35
02/97	1	regular	1.75 x 1.35
01/98	2	regular	1.98 x 1.55
02/98	2	regular	1.88 x 1.48
Hc 993267	2	regular	1.72 x 1.32
$\bar{X} \pm DS$			1.81 \pm 0.135 x 1.43 \pm 0.102

*Superficie y borde de las colonias de la fase levaduriforme.

TABLA 3. Registro de los datos del crecimiento de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* a diferentes temperaturas

AISLADO	37 °C			
	DO ₁₀ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₆ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₁₂ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₂₄ $\bar{X} \pm DS$
EH-316	0.200 ± 0	0.790 ± 0.02	1.006 ± 0.033	1.063 ± 0.027
EH-317	0.200 ± 0	0.875 ± 0.014	1.020 ± 0.036	1.075 ± 0.016
EH-324	0.204 ± 0.16	0.802 ± 0.039	0.790 ± 0.066	0.786 ± 0.074
EH-326	0.184 ± 0.008	0.747 ± 0.045	0.765 ± 0.052	0.811 ± 0.090
EH-373	0.140 ± 0.006	0.617 ± 0.021	0.865 ± 0.035	0.911 ± 0.040
EH-375	0.203 ± 0.006	0.919 ± 0.061	0.853 ± 0.028	0.943 ± 0.035
H.1.12.96	0.187 ± 0.011	0.667 ± 0.031	0.816 ± 0.047	0.816 ± 0.047
G-217B	0.200 ± 0	0.931 ± 0.025	1.022 ± 0.042	1.022 ± 0.042
Downs	0.200 ± 0	0.238 ± 0.024	0.372 ± 0.031	0.495 ± 0.024
01/97	0.218 ± 0.005	0.235 ± 0.019	0.230 ± 0.013	0.947 ± 0.037
02/97	0.209 ± 0.013	0.595 ± 0.035	0.756 ± 0.035	0.756 ± 0.035
01/98	0.296 ± 0.013	0.986 ± 0.066	0.885 ± 0.055	0.898 ± 0.042
02/98	0.222 ± 0.016	0.766 ± 0.014	0.916 ± 0.037	0.916 ± 0.037
Hc 993267	0.184 ± 0.012	0.721 ± 0.022	0.872 ± 0.025	0.872 ± 0.025

AISLADO	40 °C			
	DO ₁₀ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₆ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₁₂ $\bar{X} \pm DS$	DO ₁₂₄ $\bar{X} \pm DS$
EH-316	0.200 ± 0	0.200 ± 0.012	0.201 ± 0.006	0.451 ± 0.059
EH-317	0.200 ± 0	0.221 ± 0.016	0.217 ± 0.011	0.217 ± 0.011
EH-324	0.168 ± 0.045	0.662 ± 0.051	0.640 ± 0.099	0.714 ± 0.102
EH-326	0.178 ± 0.018	0.696 ± 0.048	0.641 ± 0.050	0.676 ± 0.077
EH-373	0.150 ± 0.010	0.667 ± 0.026	0.756 ± 0.034	0.796 ± 0.038
EH-375	0.213 ± 0.015	0.914 ± 0.052	0.842 ± 0.049	0.898 ± 0.079
H.1.12.96	0.194 ± 0.015	0.568 ± 0.021	0.673 ± 0.050	0.673 ± 0.050
G-217B	0.200 ± 0	0.651 ± 0.021	0.643 ± 0.052	0.622 ± 0.072
Downs	0.200 ± 0	0.216 ± 0.008	0.220 ± 0.005	0.600 ± 0.020
01/97	0.210 ± 0.013	0.214 ± 0.012	0.234 ± 0.010	0.849 ± 0.041
02/97	0.194 ± 0.010	0.625 ± 0.048	0.804 ± 0.037	0.804 ± 0.037
01/98	0.287 ± 0.013	0.873 ± 0.014	0.581 ± 0.043	0.037 ± 0.028
02/98	0.210 ± 0.011	0.612 ± 0.030	0.733 ± 0.032	0.733 ± 0.032
Hc 993267	0.203 ± 0.021	0.606 ± 0.045	0.684 ± 0.044	0.684 ± 0.044

Se calculó la media y la desviación estándar de las ocho lecturas de DO de cada aislado, en las distintas temperaturas y tiempos de incubación probados.

TABLA 4. Efecto de la termosensibilidad de la fase levaduriforme en el crecimiento de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*

AISLADO	FUENTE	ORIGEN	% INHIBICIÓN (% I) A 40 °C	
			t6	t12
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	100	99.9
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	96.9	98
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	17.4	19.5
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	8	20.4
EH-373	Murciélago	MX	8.4	16.4
EH-375	Murciélago	MX	2.1	4
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	22.1	23.9
G-217B	Humano (HD)	EUA	38.4	46.2
Downs	Humano (HMC)	EUA	57.9	88.4
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	76.5	0
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	0	0
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	15.5	49.8
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	26.2	24.7
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	25	30.1

Los ensayos de termosensibilidad vienen descritos con detalles en materiales y métodos. Para el cálculo del % I se consideró la fórmula: $\% I = 1 - (DO_{ty} - DO_{t0} \text{ a } 40 \text{ °C} / DO_{ty} - DO_{t0} \text{ a } 37 \text{ °C}) \times 100$, siendo "y" cada uno de los tiempos de lectura de DO. HD- histoplasmosis diseminada; HMC- histoplasmosis mucocutánea; HC- histoplasmosis cutánea; EUA- Estados Unidos de América; MX- México; GT- Guatemala; AR- Argentina.

TABLA 5. Tiempo de generación de la fase levaduriforme de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*

AISLADO	FUENTE	ORIGEN	PROMEDIO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN (T _g) (h)
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	5:07
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	5:00
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	3:25
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	3:00
EH-373	Murciélago	MX	5:40
EH-375	Murciélago	MX	3:00
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	6:15
G-217B	Humano (HD)	EUA	5:00
Downs	Humano (HMC)	EUA	14:30
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	8:50
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	6:30
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	3:30
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	6:25
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	5:15

El procedimiento y cálculo del T_g vienen descritos con detalles en materiales y métodos. El promedio del T_g representa el cálculo de éste considerando dos grupos extrapolados en la pendiente de la fase logarítmica mediana de crecimiento, uno sobre el estadio medio y el otro sobre el tardío. HD- histoplasmosis diseminada; HMC- histoplasmosis mucocutánea; HC- histoplasmosis cutánea; EUA- Estados Unidos de América; MX- México; GT- Guatemala; AR- Argentina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 6. Matriz de datos de los perfiles de RAPD-PCR obtenidos de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*

	>1.2	1.2	1.1	0.79	0.64	Kb 0.52	0.47	0.41	0.37	0.246	0.15	<0.123
	0.296	0.418	0.454	0.545	0.600	Rf 0.636	0.672	0.727	0.763	0.854	0.963	1.09
	.3	2.3	2.5	3.0	3.3	Migración 3.5	3.7	4.0	4.2	4.7	5.3	6.0
EII-316	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-317	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-324	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-326	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-359	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-373	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
EII-375	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
H.I.12.96	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
G-217B	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
Downs	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
01/97	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
02/97	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
01/98	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
02/98	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Hc993267	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1

A partir de los perfiles de los fragmentos de DNA de la figura 6 se calcularon los Rf según la fórmula: Distancia del DNA migrado del origen/Distancia del frente de corrimiento. Los valores de Kb se calcularon según Sambrook *et al.* (45) y se consideró además la ayuda del programa Biolmage por comparación con el marcador molecular 123 bp DNA Ladder, graficando en papel semilogarítmico los valores de los estándares (Kb vs. Rf) y extrapolando los Kb de cada banda de DNA, según sus respectivos Rf. Se dieron valores arbitrarios de 1-0 para la construcción de la matriz, 1 indicando la presencia de la banda y el valor 0 a la ausencia de ésta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 7. Comparación del alineamiento de las secuencias de los genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE* y *TUB1* de una cepa de referencia de EUA, con cada secuencia parcial generada por los oligonucleótidos *arf1* y *arf2*, *H-anti3* y *H-anti4*, *ole3* y *ole4*, y *tub1* y *tub2*, de los DNA obtenidos de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum* estudiadas

DNA	FUENTE	GEN <i>ARF</i> (N° Acceso L25117)		
		ORIGEN	IDENTIDAD	I/D*
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	447/463 (96 %)	4/463 (0 %)
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	452/466 (96 %)	4/466 (0 %)
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	452/466 (96 %)	4/466 (0 %)
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	451/465 (96 %)	4/465 (0 %)
EH-359	Humano (HMC)	MX	457/473 (96 %)	4/473 (0 %)
EH-373	Murciélago	MX	450/467 (96 %)	5/467 (1 %)
EH-375	Murciélago	MX	450/465 (96 %)	4/465 (0 %)
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	460/475 (96 %)	4/475 (0 %)
G-217B	Humano (HD)	EUA	464/465 (99 %)	(-)
Downs	Humano (HMC)	EUA	ND	ND
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	ND	ND
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	456/473 (96 %)	3/473 (0 %)
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	455/468 (97 %)	3/468 (0 %)
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	455/468 (97 %)	3/468 (0 %)
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	183/191 (95 %)	4/191 (2 %)

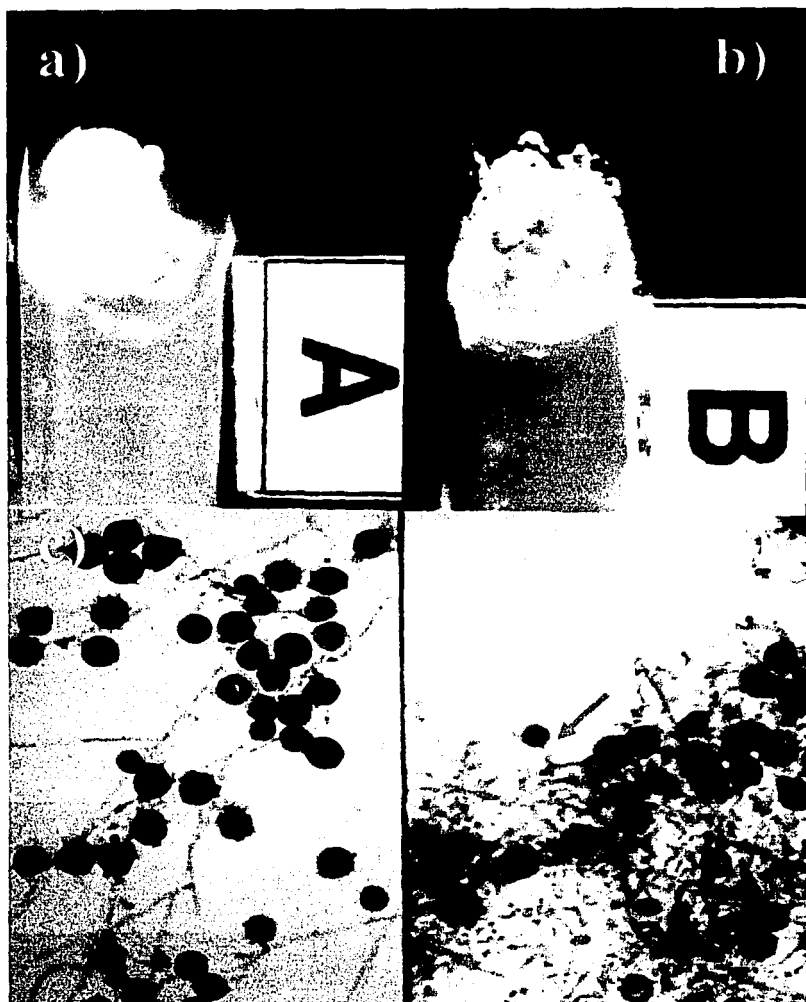
DNA	FUENTE	GEN <i>H-ANTI</i> (N° Acceso U20346)		
		ORIGEN	IDENTIDAD	I/D*
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	390/407 (95 %)	3/407 (0 %)
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	403/422 (95 %)	4/422 (0 %)
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	392/410 (95 %)	4/410 (0 %)
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	394/412 (95 %)	4/412 (0 %)
EH-359	Humano (HMC)	MX	392/409 (95 %)	3/409 (0 %)
EH-373	Murciélago	MX	400/419 (95 %)	4/419 (0 %)
EH-375	Murciélago	MX	400/418 (95 %)	3/418 (0 %)
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	398/415 (95 %)	3/415 (0 %)
G-217B	Humano (HD)	EUA	406/412 (98 %)	1/412 (0 %)
Downs	Humano (HMC)	EUA	408/411 (99 %)	2/411 (0 %)
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	399/417 (95 %)	4/417 (0 %)
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	397/412 (96 %)	3/412 (0 %)
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	393/409 (96 %)	3/409 (0 %)
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	392/407 (96 %)	3/407 (0 %)
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	390/405 (96 %)	3/405 (0 %)

TABLA 7. Continuación

GEN <i>OLE</i> (N° Acceso X85962)				
DNA	FUENTE	ORIGEN	IDENTIDAD	I/D*
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	424/434 (97 %)	(-)
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	416/425 (97 %)	(-)
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	414/424 (97 %)	(-)
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	416/425 (97 %)	(-)
EH-359	Humano (HMC)	MX	421/436 (96 %)	4/436 (0 %)
EH-373	Murciélago	MX	414/424 (97 %)	1/424 (0%)
EH-375	Murciélago	MX	424/434 (97 %)	(-)
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	426/435 (97 %)	(-)
G-217B	Humano (HD)	EUA	415/418 (99 %)	(-)
Downs	Humano (HMC)	EUA	ND	ND
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	412/425 (96 %)	(-)
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	420/435 (96 %)	(-)
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	412/427 (96 %)	1/427 (0 %)
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	414/428 (96 %)	(-)
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	417/430 (96 %)	(-)
GEN <i>TUB1</i> (N° Acceso M28358)				
DNA	FUENTE	ORIGEN	IDENTIDAD	I/D*
EH-316	Humano SIDA (HD)	MX	250/283 (88 %)	12/283 (4 %)
EH-317	Humano SIDA (HD)	MX	229/253 (90 %)	12/253 (4 %)
EH-324	Humano SIDA (HD)	MX	225/259 (86 %)	18/259 (6 %)
EH-326	Humano SIDA (HD)	MX	225/260 (86 %)	19/260 (7 %)
EH-359	Humano (HMC)	MX	254/284 (89 %)	13/284 (4 %)
EH-373	Murciélago	MX	233/259 (89 %)	12/259 (4 %)
EH-375	Murciélago	MX	253/285 (88 %)	15/285 (5 %)
H.1.12.96	Humano (HC)	GT	259/297 (87 %)	15/297 (5 %)
G-217B	Humano (HD)	EUA	276/298 (92 %)	11/298 (3 %)
Downs	Humano (HMC)	EUA	ND	ND
01/97	Humano SIDA (HMC)	AR	231/256 (90 %)	12/256 (4 %)
02/97	Humano SIDA (HMC)	AR	252/285 (88 %)	14/285 (4 %)
01/98	Humano SIDA (HMC)	AR	247/278 (88 %)	13/278 (4 %)
02/98	Humano SIDA (HMC)	AR	246/277 (88 %)	13/277 (4 %)
Hc993267	Humano SIDA (HMC)	AR	256/293 (87 %)	14/293 (4 %)

Se amplificaron fragmentos de cuatro genes de *H. capsulatum* a partir de oligonucleótidos referidos por Kasuga *et al.* (18, 19). Para el gen *ARF* del factor de ribosilación del ADP, arf1 (5'-agaatatggggcaaaaagga-3') y arf2 (5'-cgcaattcctctcgttgag-3'); para el gen *H-ANTI* del precursor del antígeno H, H-anti3 (5'-cgcagtcacctccatactatc-3') y H-anti4 (5'-gcccgcacattaacc-3'); para el

gen *OLE* de la desaturasa Δ -9 de ácido graso, *ole3* (5'-ttaaacgaagccccacgg-3') y *ole4* (5'-caccacctcaacagcagca-3'); y para el gen *TUB1* de la α -tubulina, *tub1* (5'-ggtggcctaaatcgaaactc-3') y *tub2* (5'-ggcagctttccgttctcagt-3'). La PCR se realizó bajo las mismas condiciones descritas por Kasuga *et al.* (18). De los productos de la PCR se generaron secuencias para una sola hebra que se editaron, alinearon y compararon, mediante el programa BLAST 2 (46), con la secuencia de cada gen estudiado depositada en el Banco de Genes para la cepa de referencia G-217B procedente de EUA. HD- histoplasmosis diseminada; HMC- histoplasmosis mucocutánea; HC- histoplasmosis cutánea; EUA- Estados Unidos de América; MX- México; GT- Guatemala; AR- Argentina; *I/D = Inserción/Delección; (-)- Ausencia de I/D; ND- No determinado.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

FIGURA 1 (a-d). Macro y micromorfología de *H. capsulatum*. Del cultivo en agar-micobiótico a 28 °C, se observaron las características de la morfología macroscópica. a) Cepa G-217B con colonia tipo "A"; b) Aislado EH-324 con colonia tipo "B". La descripción microscópica se realizó en microcultivos teñidos con azul de algodón-lactofenol de Amman (ver materiales y métodos) bajo la observación en un fotomicroscopio Olympus BX50. c) Micelio delgado septado, macroconidios con proyecciones digitiformes, 800X (aislado EH-324); d) Micelio delgado septado, numerosos macroconidios con proyecciones digitiformes y macroconidio con conidióforo corto formando un ángulo de 90° con la hifa original (flecha), característica propia de la especie, 800X (aislado 02/97).

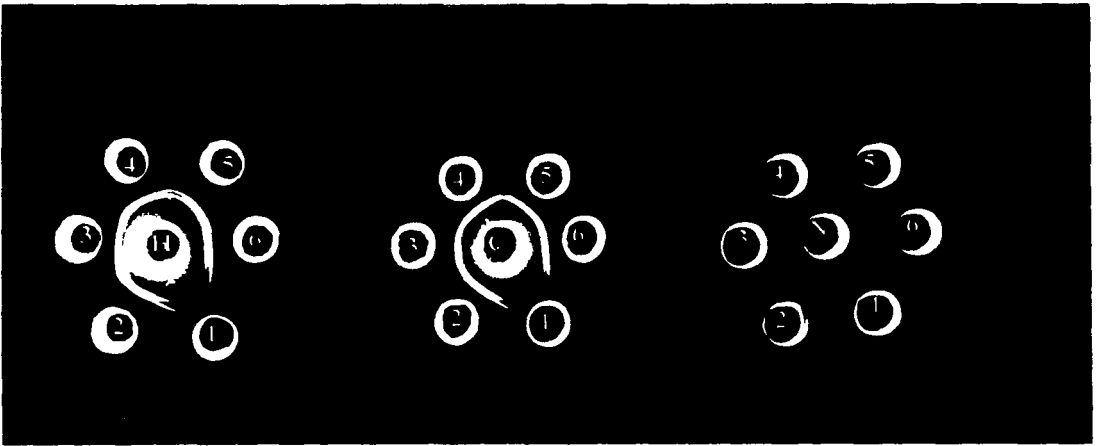


FIGURA 2. Producción de exoantígenos de aislados y/o cepas de *H. capsulatum* de distintas procedencias geográficas. Los exoantígenos (histoplasminas) se obtuvieron por el método rápido de Kaufman *et al.* (41). Los testigos, incluyeron a sueros positivos de paciente con histoplasmosis comprobada (H) y de conejo hiperinmune (C), asimismo a un suero negativo de voluntario sano (N), además del antígeno específico de la cepa de referencia EH-53. Los testigos fueron obtenidos del Banco de Sueros y Antígenos del Laboratorio de Inmunología de Hongos. La actividad inmunológica de los exoantígenos se comprobó por el método de doble inmunodifusión en gel de Ouchterlony (42). 1- Solución salina; 2- EH-53; 3- EH-316; 4- H.1.12.96; 5- 01/97; 6- G-217B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

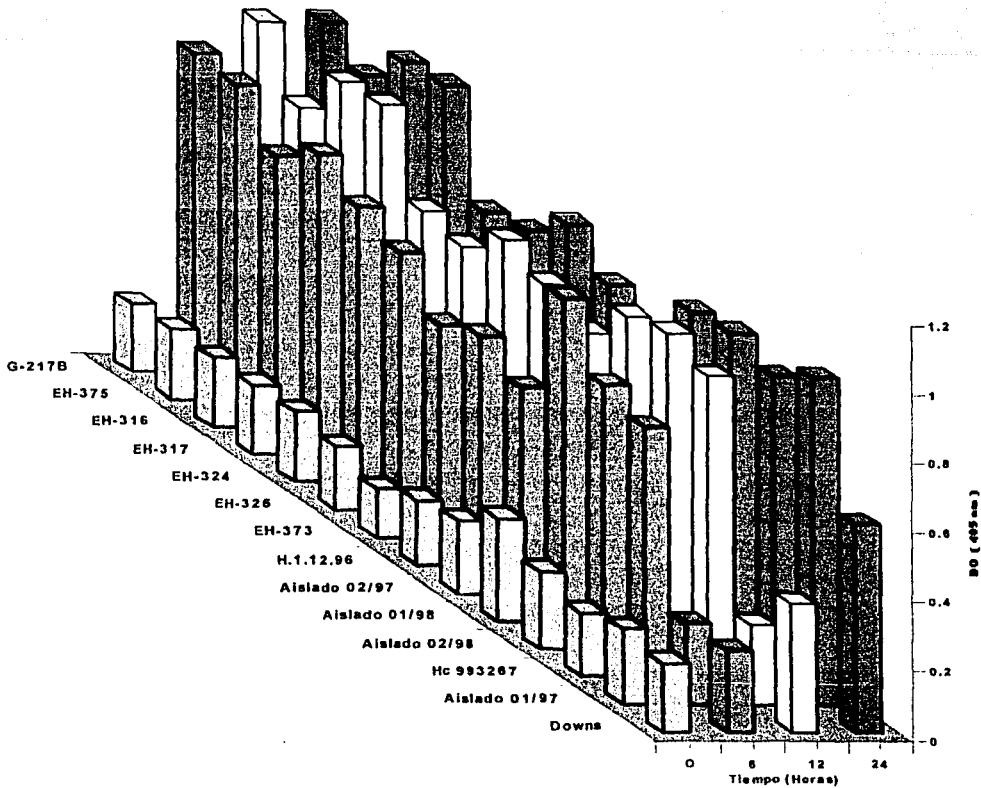


FIGURA 3. Termosensibilidad de *H. capsulatum* a 37 °C. Las levaduras cosechadas previamente en caldo BHI suplementado con glucosa y cisteína fueron centrifugadas a 800 x g, resuspendidas en nuevo medio y diluidas en serie para ajustar los inóculos a 0.2 DO (ver detalles en materiales y métodos). Por cada aislado, se llenaron con el inóculo ajustado, ocho pozos de microplacas de cultivo que fueron incubadas a 37 °C (testigo de crecimiento). Se leyeron las densidades ópticas a 405 nm tanto del tiempo cero como de los diferentes tiempos de incubación de 6, 12 y 24 h. Los resultados se expresaron en gráficas de barra considerando los datos de DO de la tabla 3 vs. tiempo de incubación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

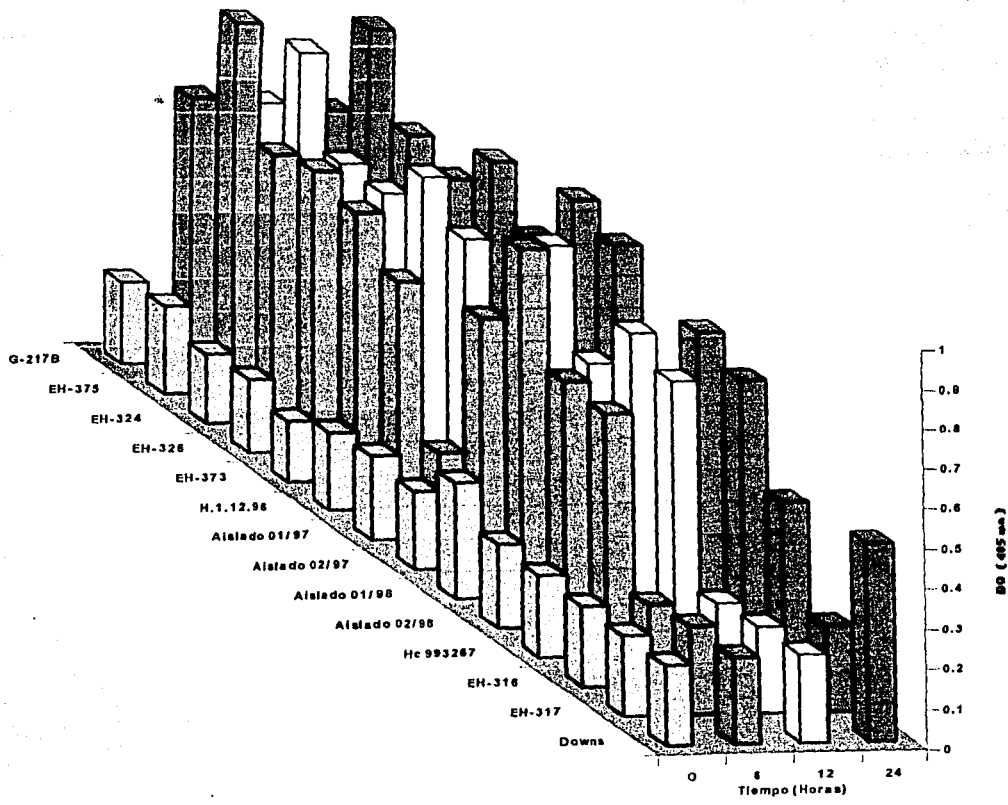
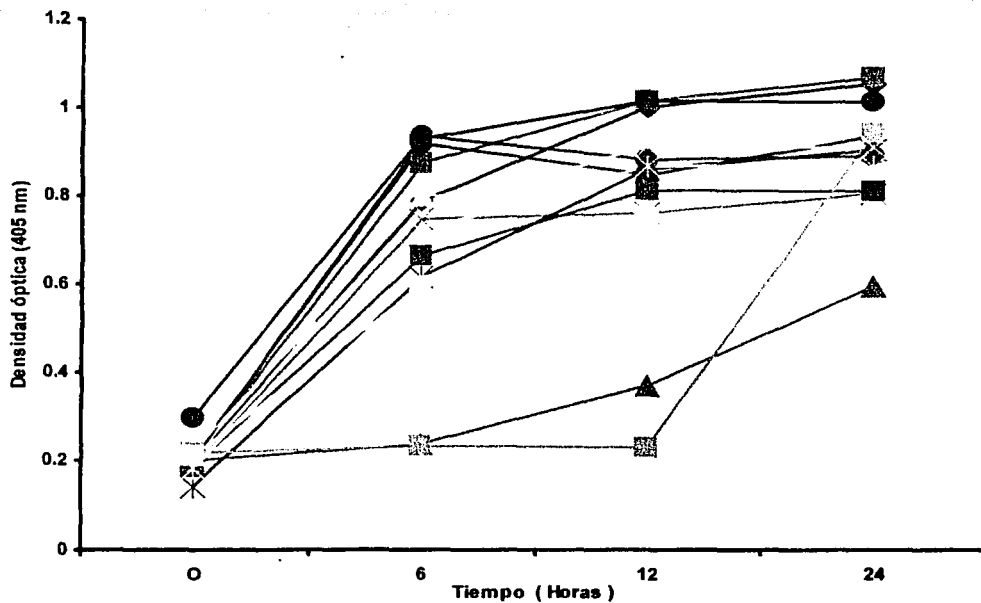


FIGURA 4. Termosensibilidad de *H. capsulatum* a 40 °C. Este ensayo se realizó en las mismas condiciones descritas en la figura 3, variando únicamente la temperatura de incubación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



—●— EH-316	—■— EH-317	—●— EH-324	—×— EH-326	—*— EH-373
—●— EH-375	—■— H.1.12.96	—●— G-217B	—▲— Dow ns	—*— Aislado 01/97
—●— Aislado 02/97	—●— Aislado 01/98	—●— Aislado 02/98	—●— Hc 993267	

FIGURA 5. Curva de crecimiento de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*. A partir de los procedimientos descritos en la figura 3, los resultados se expresaron en gráfica lineal considerando los datos de DO de la tabla 3 vs. tiempo de incubación, lo que generó las curvas de crecimiento necesarias para el cálculo de los tiempos de generación de cada aislado y/o cepa, según una modificación del procedimiento descrito por Amaral *et al.* (43).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

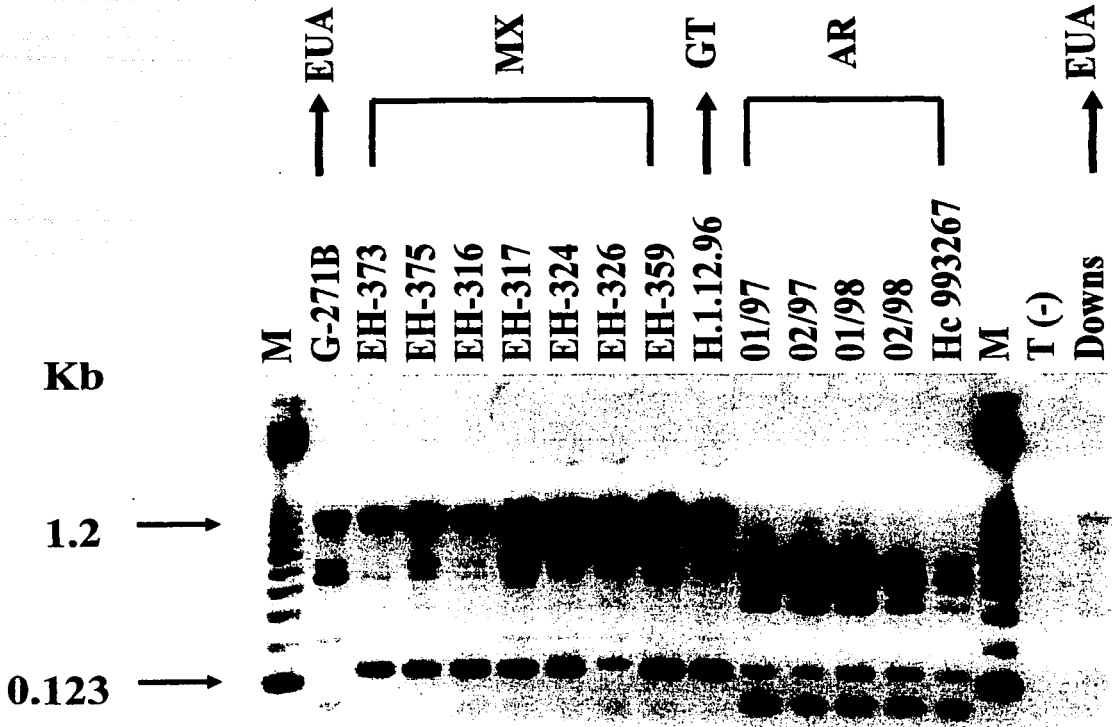


FIGURA 6. RAPD-PCR de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*. De los aislados estudiados cuatro proceden de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA (EH-316, EH-317, EH-324 y EH-326), uno de paciente mexicano con histoplasmosis mucocutánea no asociada a SIDA (EH-359), dos de murciélagos naturalmente infectados (EH-373 y EH-375), uno de un caso clínico guatemalteco (H.1.12.96) y cinco de casos clínicos argentinos de histoplasmosis mucocutánea asociada a SIDA (01/97, 02/97, 01/98, 02/98, Hc993267). Se utilizaron las cepas las cepas de referencia G-217B y Downs de EUA. La extracción del DNA se realizó como se refiere en materiales y métodos. El RAPD-PCR se realizó empleando doble iniciador de 10 nucleótidos (44), el 1281 (5'-aacgcgcaac-3') y el 1283 (5'-ggatcccca-3'). Las condiciones de trabajo y el programa de amplificación se especifican en materiales y métodos. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, el cual fue teñido con bromuro de etidio. Como estándar de pares de bases (M) se utilizó el 123 bp DNA Ladder (GIBCO). La imagen del gel fue capturada con un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge) y se imprimió en una impresora térmica (Sony 650, Tokio).

H. capsulatum

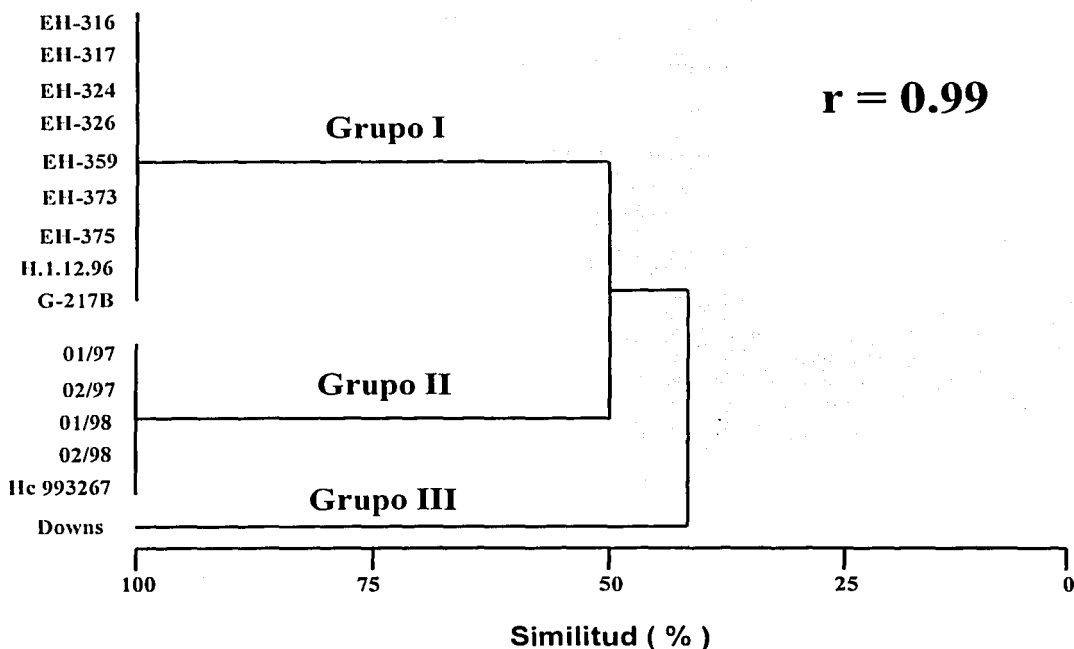


FIGURA 7. Porcentaje de similitud de los patrones polimórficos de DNA de los aislados y/o cepas de *H. capsulatum*. Los perfiles de los fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR, se registraron en una matriz elaborada con base en los tamaños de los fragmentos revelados (Tabla 6). A través del programa NTSYSPC versión 2.0 (F. James Rohlf), utilizando un coeficiente de correlación (r) de Jaccard y un procedimiento de agrupamiento jerárquico a través del análisis de grupos desbalanceados con base en promedios aritméticos (UPGMA), los datos de la matriz fueron procesados para obtener un dendrograma de similitud. Ver detalles en materiales y métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN