

00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**Relación Genética Entre Aislamientos de
Histoplasma capsulatum Asociados a
Diferentes Formas Clínicas y Distribución
Geográfica**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

SAHAZA CARDONA JORGE HUMBERTO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA LUCIA TAYLOR

MÉXICO, D.F.

Febrero 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Relación Genética Entre Asistidos de
Histeresis Correlativa Asociada a
Cilindros Formas Clónicas y Distribución
/ genética

TESIS

por el licenciado en ciencias biológicas
MARTÍN DE ALBA BARRALES
BIÓLOGO EXPERIMENTAL

México, D.F.

1974

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

1974

1974



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jorge Humberto Sahaza C.

FECHA: 9-03-04

FIRMA: Jorge H. Sahaza

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de julio de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Sahaza Cardona Jorge Humberto**, con número de cuenta 501459750, con la tesis titulada: "Relación genética entre aislamientos de *Histoplasma capsulatum* asociados a diferentes formas clínicas y distribución geográfica", bajo la dirección del(a) **Dra. María Lucía Taylor da Cunha e Mello**.

Presidente:	Dr. Julio Granados Arriola
Vocal:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Secretario:	Dra. María Lucía Taylor da Cunha e Mello
Suplente:	Dra. Miriam Bobadilla del Valle
Suplente:	Dra. María del Rocío Reyes Montes

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de diciembre de 2003.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico de CONACYT, proyecto N° 34444-M.

Se desarrolló bajo la dirección de la Doctora Maria Lucia Taylor y colaboración de la Doctora Maria del Rocío Reyes Montes, en los laboratorios de Inmunología de Hongos y Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico brindado a través de la beca que recibí del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través del proyecto de investigación N° 34443-M.

Agradezco al comité tutorial por su valioso consejo y aporte para el buen desarrollo de este trabajo.

Doctora Miryam Bobadilla del Valle

Doctor Joaquin Cifuentes

Doctor Julio Granados

Agradezco al Doctor Gerardo Zúñiga, un gran maestro, por su paciencia y su valiosa ayuda en el desarrollo de todos los análisis de secuencias y el RAPD-PCR. Igualmente a la colaboración de la M. en C. Flor Rivera. Ambos en el Instituto Politécnico Nacional, IPN.

Por siempre

A NORELA

El apoyo de mi familia siempre incondicional, mis padres, Humberto y Noelia, Mis hermanos, Cristina, Diana, Andrea, David, Diego y Claudia, Esteban y por su puesto Sahren.

De todo corazón muchas gracias a la Dra. Lucia y la Dra. Rocío, por todo su apoyo tanto académico, como moral y económico, no hay palabras para expresar mi gratitud.

Al gran tesoro que encontré en México, mis amigos. Roberto Suárez y Cristina Canteros.

A David Basilio, Elena Montoya, Patricia Jiménez y Daniel Villamil, Por hacer de este viaje una gran aventura.

A Hortensia, Amelia, Adriana, Edith, Erika, Elba, Blanca, Nancy, Claudia, Águeda, Gabriel, Rene, Marisol, Gina, Rafael, Esperanza, Gabriela R, Gabriela P, Aurora, Paulina y los muchos que no aparecen aquí, por permitir que un extraño se sintiera como en su casa.

A mi gran familia en Colombia, Paula, Marta , Erika, Ángel, Diana, Soraya, Lula, Dra. Restrepo, Miguel Ángel, Mabel, Reined, Raúl, Ana María.

A MEXICO, un gran País, una gran cultura y sobretodo una gente maravillosa.

A la UNAM, por acogerme y permitirme robarle un poquito de su gran saber.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRAC	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVO GENERAL	13
V. OBJETIVOS PARTICULARES	13
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	14
i. Aislamientos fúngicos	14
ii. Conversión de la fase micelial a levaduriforme	14
b. Caracterización fenotípica del hongo	15
i. Termosensibilidad y tiempo de generación (Tg) de la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	15
c. Caracterización genotípica del hongo	16
i. Extracción del DNA	16
ii. Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR)	17
iii. Amplificación y secuencias parciales del DNA de cuatro genes de <i>H. capsulatum</i>	18
iv. Análisis de secuencias	19
VII. RESULTADOS	21
a. Caracterización fenotípica	21
i. Termosensibilidad a 40 °C de la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	21
ii. Tg de la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	22
b. Caracterización molecular	23
i. Polimorfismo genético por RAPD-PCR de <i>H. capsulatum</i>	23
ii. Secuenciación parcial de genes de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i>	25
iii. Diversidad y divergencia nucleotídica	27

VIII. DISCUSIÓN	28
IX. CONCLUSIONES	34
X. PERSPECTIVAS	35
XI. BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE TABLAS Y DE FIGURAS

Tabla 1. Datos de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	42
Tabla 2. Registro de lecturas de DO a 37 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i>	43
Tabla 3. Registro de lecturas de DO a 40 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i>	44
Tabla 4. Resultado de la Inhibición del crecimiento de levaduras de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> a 40 °C	45
Tabla 5. Tiempos de generación (Tg) a 37 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i>	46
Tabla 6. Matriz de ausencia y presencia de bandas generadas por los ensayos de RAPD-PCR de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	47
Tabla 7. Matriz de Fst pareadas para el origen geográfico	48
Tabla 8. Matriz de Fst pareadas para la forma clínica	48
Figura 1 (a - d). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de México	49
Figura 2 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de Argentina	50
Figura 3 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de Colombia	50
Figura 4 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de Guatemala y de las cepas de referencia	51
Figura 5. Cálculo del Tg a 37 °C	52
Figura 6. RAPD-PCR de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1253	53

Figura 7. RAPD-PCR de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1281	54
Figura 8. RAPD-PCR de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1283	55
Figura 9. RAPD-PCR de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> empleando la mezcla de oligonucleótidos 1281-1283	56
Figura 10. Dendrograma de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	57
Figura 11. Relación entre los perfiles de bandas del RAPD-PCR con la procedencia geográfica de <i>H. capsulatum</i>	58
Figura 12. Relación entre los perfiles de bandas del RAPD-PCR con la forma clínica de <i>H. capsulatum</i>	59
Figura 13. Árboles consenso por Neighbor-Joining de los aislamientos y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	60
Figura 14. Árboles consenso de Máxima Parsimonia de los aislamientos y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiados	61

RESUMEN

Histoplasma capsulatum (*Hc*) es el agente etiológico de la histoplasmosis. Es un hongo dimórfico que crece en fase filamentosa multicelular (micelial) en la naturaleza, pero cuando infecta un huésped susceptible se convierte en levadura unicelular. Aunque *Hc* ha sido tipificado por diferentes métodos, su diversidad no ha conducido a una clasificación preferencial y la necesidad de conocer las especificaciones geográficas y clínicas de sus aislamientos sigue vigente. El presente trabajo planteó analizar aspectos fenotípicos como termosensibilidad a 40 °C y tiempo de generación (T_g) a 37 °C además de los genotípicos como el polimorfismo genético obtenido por RAPD-PCR y la secuenciación de cuatro fragmentos génicos, para determinar similitudes y diversidades entre los aislamientos y cepas del hongo de cuadros clínicos localizados (pulmonares y mucocutáneos) y diseminados. Asimismo, se investigó el comportamiento diferencial del hongo asociado a factores geográficos. Para ello, se utilizaron 37 especímenes clínicos de *Hc* procedentes de diferentes regiones de América. Los resultados de las curvas de crecimiento para la fase levaduriforme del hongo a temperatura de 37 °C mostraron diferencias en la densidad poblacional de levaduras con respecto a su cinética. La mayoría de los aislamientos, a 37 °C, iniciaron la fase logarítmica de crecimiento a las 3 h, a excepción del 993444 (AR) y de la cepa Downs (EUA), que presentaron una latencia de 12 h. Aunque la cinética de crecimiento a 37 y a 40 °C para el aislamiento 993444 fue similar, la cepa Downs fue totalmente inhibida a 40 °C, confirmando su termosensibilidad. El comportamiento termosensible o termotolerante de los aislamientos y cepas estudiados a 40 °C fue confirmado por el cálculo del porcentaje de inhibición (% I) del crecimiento. El 100 % I para la cepa Downs, enfatiza su termosensibilidad. Los demás aislamientos y cepas estudiados se comportaron como termotolerantes. El cálculo del T_g se realizó en la temperatura óptima de crecimiento de la fase levaduriforme (37 °C). El intervalo de T_g obtenido para los diferentes aislamientos de *Hc* varió de 4:45 (H.1.02.W) a 12:45 h (MZ2). El T_g fue > 9:45 h, en dos aislamientos (EH-359, MX y MZ2, CO) y en la cepa Downs, todos obtenidos de formas mucocutáneas con datos de inmunosupresión no asociada a VIH. Mientras que, un aislamiento (H.1.02.W, GT) y una cepa de referencia (G-186B, PA), ambas procedentes de formas localizadas pulmonares no asociadas a VIH, desarrollaron los más bajos T_g . Con respecto al estudio genotípico, los resultados de RAPD-PCR generados con el oligonucleótido 1281, revelaron una banda de 1.2 Kb común para la mayoría de los aislamientos de MX, para algunas cepas de referencia, para escasos aislamientos de CO y ausente en los aislamientos de AR. Los oligonucleótidos (1253, 1281, 1283) y la combinación (1281-1283) amplificaron 55 bandas bien definidas en el perfil molecular del RAPD y repetitivas en los diferentes ensayos de los 37 aislamientos estudiados. Se obtuvieron tres grupos por UPGMA, entre los aislamientos y/o cepas estudiados. El grupo I se formó con cinco subgrupos relacionados fundamentalmente con el origen geográfico. La consistencia del dendrograma fue determinada por el coeficiente cofenético de correlación (r), el cual alcanzó un valor de 0.94 con una $P = 0.001$, demostrando que el análisis generado representó un fenómeno biológico real. El análisis de varianza (AMOVA) nos permitió inferir que la manifestación clínica de *Hc* podría estar asociada a un mecanismo de presión del huésped. Para seguir la genotipificación, se secuenciaron un total de 148 fragmentos génicos, 37 para cada gen estudiado (*arf*, *H-anti*, *ole* y *tub1*). Los árboles generados por máxima parsimonia son en general semejantes a los de distancia (Neighbor-Joining), destacándose la alta consistencia y estrecha relación entre los aislamientos de AR para los cuatro genes estudiados, lo que permite inferir que estos aislamientos son monomórficos y posiblemente representan una estructura de población clonal. Los demás aislamientos presentaron mayor variabilidad. En general, se observó baja diversidad nucleotídica dentro los clados formados, mostrando una alta homogeneidad en la población de *Hc* estudiada.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum (*Hc*) is the causative agent of histoplasmosis. It is a dimorphic fungus that grows in filamentous multicellular-phase (mycelia) in nature, in contrast, when it infects a susceptible host it converts into a unicellular yeast. Although *Hc* has been typified through different methods, its diversity has not allowed to establish a preferential classification; hence the geographical and clinical specifications of *Hc* isolates have not been elucidated. The present work was aimed at analyzing some phenotype aspects related to thermosensitivity at 40 °C and generation time (Gt) at 37 °C, as well as the genotype aspects associated with genetic polymorphisms, revealed either by RAPD-PCR patterns or by sequencing four *Hc* genes fragments, to determine similarity and diversity among the fungal isolates and strains from localized (pulmonary and mucocutaneous) and disseminated clinical cases. Therefore, a differential behavior of the fungus associated with geographical factors was also investigated. In the present study, 37 clinical specimens of *Hc* from different regions of the American continent were used. Results from growth curves at 37 °C for the yeast phase showed differences in the population density of yeasts with respect to their growth kinetics. Most isolates, at 37 °C, initiated their log-phase growth at 3 h, with the exception of the 993444 isolate (AR) and the Downs strain (USA), which presented a latency of 12 h. Although the growth kinetics at 37 and 40 °C was similar for the 993444 isolate at both temperatures, the Downs strain was completely inhibited at 40 °C, confirming its thermosensitive. The thermosensitive or thermotolerant behavior of the *Hc* isolates and strains, studied at 40 °C, was confirmed by calculating the percentage of growth inhibition (% I). The 100 % I data from Downs strain, at 24 and 30 h of incubation, emphasize its thermosensitivity. All other isolates and strains studied behaved as thermotolerant. The generation time was calculated at the optimal temperature for the yeast phase growth (37 °C), and it ranged from 4:45 (H.1.02. W) to 12:45 h (MZ2). The Gt was > 9:45 h in two isolates (EH-359, MX and MZ2, CO) as well as in the Downs strain, obtained from mucocutaneous clinical form with data of non HIV-associated immunosuppression; whereas, one isolate (H.1.02. W, GT) and one reference strain (G-186B, PA), both from localized pulmonary non HIV-associated forms, developed the lowest Gt. In regard to the genotype study, the RAPD-PCR pattern with the 1281 primer revealed a common 1.2 Kb band in most isolates from MX, in some reference strains, and in scarce isolates from CO; this band was absent in isolates from AR. The primers (1253, 1281, 1283) and the primer combination (1281-1283) amplified 55 well-defined bands in the RAPD-PCR molecular pattern that were repetitive in the different assays of all 37 studied isolates. Three groups were obtained by UPGMA. Group I was formed with five subgroups, mainly related to the geographical origin of the studied isolates and/or strains. The consistency of the dendrogram was determined by the cophenetic correlation coefficient (r), which reached a value of 0.94 with a $P = 0.001$, supporting a real biological phenomenon in the generated analysis. Variance analysis (AMOVA) allowed to infer that the *Hc*'s clinical manifestation might be associated to a pressure mechanism in the host. To continue the genotyping, 148 gene fragments, 37 for each studied gene (*arf*, *H-anti*, *ole*, and *tub1*), were sequenced. Maximum parsimony trees were similar to those obtained through the distance method (Neighbor-Joining). Both analyses highlight the high consistence and the tight relation among the isolates from AR for the four studied genes, which suggests that these isolates are monomorphic and possibly have a clonal population structure. The remaining isolates presented a greater variability. In general, low nucleotide diversity was observed within the formed clades, revealing high homogeneity in the studied *Hc* population.

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico que crece en fase filamentosa multicelular en la naturaleza, pero cuando infecta un huésped susceptible se convierte en levadura unicelular (Kwon-Chung *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1997a; 1997b; Tewari *et al.*, 1998). Bajo condiciones de laboratorio, el paso de la fase micelial a la levaduriforme puede ser reversiblemente inducida por cambios de temperatura. La conversión dimórfica es de particular interés, ya que es necesaria para la manifestación de virulencia del hongo (Retallack & Woods, 1999). La habilidad de crecer con distintas morfologías 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 (Eissenberg & Goldman, 1994; Retallack & Woods, 1999). La fase filamentosa (micelial) del hongo es saprobia-geofílica y se encuentra en recintos cerrados como minas, cuevas, pozos, casas u otras construcciones abandonadas, así como en espacios abiertos donde existe guano de murciélago y/o aves, que son ricos en nutrientes necesarios para su crecimiento (González-Ochoa, 1963; Taylor *et al.*, 1996; 1999a; 2000c). La presencia de estos nutrientes unidos a condiciones del suelo, humedad y temperatura óptima, integran un ambiente favorable para el desarrollo de la fase micelial o infecciosa de *H. capsulatum* (Eissenberg & Goldman, 1994; Kwon-Chung & Bennett, 1992; Tewari *et al.*, 1998). La dispersión aérea es de gran importancia en la diseminación de *H. capsulatum* a nuevos ambientes. Se ha establecido claramente que las infecciones ocurren en ambientes donde el suelo es revuelto por la acción mecánica del hombre o de algunos animales, lo que provoca la dispersión de aerosoles que contienen los propágulos fúngicos infecciosos y que al ser inhalados (contacto directo) conllevan a la posterior infección (Chick *et al.*, 1981). Entretanto, pájaros y murciélagos pueden contribuir a la diseminación de conidias viables (Taylor *et al.*, 2000a-c; 2003a). Algunos investigadores han demostrado que los murciélagos pueden infectarse en un nicho ecológico determinado y transportar los organismos presentes de este nicho a otros (Taylor *et al.*, 2003a).

Histoplasma capsulatum infecta humanos y otros mamíferos que funcionan como huéspedes susceptibles (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Taylor *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1997b; Tewari *et al.*, 1998; Vargas-Yáñez *et al.*, 1998; <http://www.histoplas-mex.unam.mx>). Después de la inhalación de microconidios y

pequeños fragmentos de hifas (propágulos) y cuando se establece la infección respiratoria, ésta puede manifestarse desde formas clínicas muy leves que se confunden con catarro común hasta evolucionar a enfermedad severa que conduce a una resolución fatal, dependiendo del inóculo y virulencia del hongo, así como del estado inmune del huésped (inmunodeficiencias y/o inmunosupresiones). El 90-95 % de los individuos adquieren la infección, cursándola en forma subclínica o asintomática (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Tewari *et al.*, 1998). La infección, en la mayoría de los casos, es resuelta por el sistema inmune. Sin embargo, cuando no se limita totalmente al hongo, éste puede mantenerse en forma latente en ambientes intracelulares, en particular, en células permisivas de algunos tejidos del huésped susceptible, y activarse posteriormente (reactivación endógena), bajo una eventual depresión inmune de diversos orígenes (nutrición deficiente, edad avanzada, transplantes, cáncer, SIDA, etc.) lo que conduciría a una posible enfermedad sistémica (McKinsey *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 1998).

La histoplasmosis humana puede ser dividida en dos categorías distintas, una la histoplasmosis clásica o enfermedad de Darling (enfermedad de las cavernas), antes denominada también histoplasmosis americana y ahora reconocida como "histoplasmosis capsulati" y causada por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* y otra la histoplasmosis africana que tiene como agente etiológico a *H. capsulatum* var. *duboisii*. Existe una tercera forma de histoplasmosis que afecta de preferencia a equinos y sólo ha sido reportada en Asia y África, cuyo agente etiológico es *H. capsulatum* var. *farciminosum*. En este estudio *H. capsulatum* var. *capsulatum* es el agente etiológico de interés, ya que su amplia distribución mundial también incluye a México, donde afecta tanto individuos inmunocompetentes, como aquellos con depresión inmunológica.

Hasta hace algún tiempo, la epidemiología de la enfermedad estaba restringida a datos de inmunocontacto sensibilizante en sujetos infectados (prueba cutánea con el antígeno histoplasmina), o bien por obtención de aislamientos del hongo a partir de casos clínicos y de escasas fuentes en la naturaleza. Con el advenimiento de las técnicas moleculares surge la epidemiología molecular, especialmente con los estudios desarrollados en los Estados Unidos de América (EUA) que evidenciaron avances importantes tanto en la ubicación de nuevas zonas endémicas como en el conocimiento de la relación paciente-fuente de infección. La aplicación de las técnicas moleculares ha posibilitado la identificación de distintas fuentes de infección y la determinación de

una relación genotípica entre aislamientos clínicos de pacientes de diferentes procedencias, lo que podría contribuir a la implementación de mapas genotípicos que ubiquen aislamientos fúngicos de ocurrencia más frecuente en diferentes áreas geográficas. Además, estas técnicas aplicadas en *H. capsulatum* han permitido identificar y diferenciar una reactivación endógena de un proceso similar causado por una reinfección exógena (Keath *et al.*, 1992).

Los métodos más utilizados en la genotipificación de *H. capsulatum* y empleados en la clasificación molecular de este patógeno, son hasta el momento: la hibridación con sondas específicas; el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (restriction fragment length polymorphisms, RFLP); la amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction-based random amplified polymorphic DNA method, RAPD-PCR); la utilización de marcadores de microsatélites y regiones espaciadoras internas transcritas (internal transcribed spacer, ITS); la determinación de ciertas secuencias génicas en particular; y por último el microarreglo para la secuenciación del genoma completo del hongo que esta bajo la dirección de un grupo de investigadores, con la información disponible en la dirección electrónica: <http://genome.wustl.edu/projects/hcapsulatum/index.php>.

Vincent *et al.* (1986) analizaron 21 aislamientos de *H. capsulatum* por RFLP, 19 procedentes de humanos y dos de animales, los agruparon en tres clases. La clase 1 consistió solamente de la cepa Downs, obtenida de una úlcera vaginal de una paciente diabética con histoplasmosis diseminada según Gass & Kobayashi (1969). La clase 2 contenía 14 aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de Norteamérica y dos de *H. capsulatum* var. *duboisii* de África. Los cuatro aislamientos restantes, procedentes de Centro y Sudamérica, formaron la clase 3. Spitzer *et al.* (1989), ampliaron el estudio anterior al incluir nueve aislamientos procedentes del suelo de Norteamérica, con el objeto de determinar si había diferencia en los perfiles obtenidos por RFLP entre los aislamientos de suelo y los de origen clínico; las clases 1 y 2 permanecieron sin variación y la última, incluyó a la mayoría de los aislamientos procedentes de siete puntos geográficos distintos de EUA y que además no se distinguieron de los aislamientos clínicos previos; sólo un aislamiento del suelo de Florida constituyó una clase nueva, la clase 4.

Keath *et al.* (1992), actualizaron la clasificación molecular de *H. capsulatum*. Estos autores utilizaron los perfiles de RFLP del DNA genómico para proceder el "Southern blot" revelados por dos sondas de *H. capsulatum*, una del mtDNA y otra de

un fragmento de 1.85 Kb obtenido por digestión del gen *yps-3* con la enzima *HindIII*. Ésta clasificación que prevalece hasta el momento, se fundamentó en el análisis de cinco aislamientos de pacientes con SIDA residentes en Nueva York (zona no endémica de histoplasmosis) y procedentes de Puerto Rico (zona endémica), los cuales eran diferentes de los aislamientos de las clases ya establecidas y, se agruparon en una clase 5 con las subclases 5a, 5b, 5c y 5d. Además, se estableció una clase 6, a partir de un aislamiento de un paciente panameño con SIDA.

Paralelamente, el grupo de J. W. Taylor (Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2003) ha clasificado a *H. capsulatum* con base en una relación filogenética incluyendo representantes de las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum*, procedentes de varios sitios geográficos en el mundo. La relación filogenética fue estudiada mediante la detección de secuencias parciales del DNA de cuatro genes (*ARF*, *H-ANTI*, *OLE*, *TUB1*) que codifican para las proteínas: factor de ribosilación del ADP; precursor del antígeno H; desaturasa delta-9 de ácido graso; y alfa tubulina, respectivamente. De acuerdo con los resultados del análisis filogeográfico obtenido a la fecha, se sugiere que *Histoplasma* tiene ocho especies filogenéticas o clados, en lugar de tres variedades; a saber: (1) población de la clase 1 de Norteamérica; (2) población de la clase 2 de Norteamérica; (3) población del grupo A de Latinoamérica; (4) población del grupo B de Latinoamérica; (5) población australiana; (6) población holandesa que incluye una población de Indonesia; (7) población eurasiática; (8) población africana (Kasuga *et al.*, 2003).

Métodos como el RAPD-PCR o sus variantes, aunque podrían servir para una clasificación más general de aislamientos de distintos orígenes, han sido mejor utilizados para discriminar aislamientos afines. Kersulyte *et al.* (1992) y Woods *et al.* (1993) aplicaron el RAPD-PCR a 29 aislamientos clínicos pertenecientes a la clase 2 de Norteamérica, encontrando una mayor diversidad que la demostrada por el método de RFLP. Poonwan *et al.* (1998), utilizando el RAPD-PCR con tres oligonucleótidos independientes, analizaron 12 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de pacientes de Tailandia y uno de EUA, los cuales fueron separados de dos a cuatro grupos según el oligonucleótido utilizado; los aislamientos procedentes de Tailandia fueron muy similares entre sí y claramente diferentes del aislamiento de EUA. Medeiros-Muniz *et al.* (2001), utilizando el RAPD-PCR con cuatro distintos oligonucleótidos y sobre un total de 48 aislamientos (13 del ambiente, 7 de animales infectados y 28 de pacientes), encontraron de cuatro a seis grupos bien definidos de genotipos dentro de una área

geográfica común de Río de Janeiro, Brasil.

En México, el RAPD-PCR ha sido una herramienta útil para obtener información epidemiológica de la histoplasmosis además de aportar conocimiento sobre la distribución del patrón molecular del microorganismo en diferentes regiones. Lo anterior, ha permitido relacionar aislamientos procedentes de diferentes fuentes en la naturaleza como, murciélagos infectados, excretas de ave o de murciélago, y los de origen clínico asociados o no a SIDA. Inicialmente, se reportaron dos patrones polimórficos de DNA en los aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de murciélagos capturados en Guerrero y Morelos (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2000a). Para definir con mayor precisión estos grupos, Taylor *et al.* (2000a; 2004a) estudiaron los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de murciélagos residentes y migratorios capturados en Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca, mediante el uso de una modificación del RAPD-PCR, la cual emplea dos oligonucleótidos a la vez para amplificar el DNA genómico. Aunque esta modificación aumentó el polimorfismo del DNA de los aislamientos estudiados, se observó en la mayoría de éstos un patrón común, por lo que este perfil molecular de RAPD-PCR fue propuesto como marcador fúngico para las áreas geográficas estudiadas. Por otro lado, Reyes-Montes *et al.* (1998) caracterizaron aislamientos clínicos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA cuya residencia fuera bien establecida; los resultados de la genotipificación por RAPD-PCR mostraron que la mayoría de los aislamientos se relacionaron en un 94 %, a diferencia de la fenotipificación de los antígenos crudos del hongo (histoplasminas) por perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) que se relacionaron en un 86 % con los aislamientos estudiados. Estos mismos autores (Reyes-Montes *et al.*, 1999), analizaron nuevos aislamientos clínicos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos y de otras procedencias, Guatemala, Colombia, Panamá y EUA, con base en los mismos métodos de geno- y fenotipificación. Los resultados del polimorfismo del DNA obtenido por RAPD-PCR con un oligonucleótido y la diversidad revelada con los electrotipos de las histoplasminas en SDS-PAGE, permitieron agrupar a los aislamientos. La mayoría de los aislamientos clínicos de México se concentraron en un sólo grupo, sin embargo, el RAPD-PCR discriminó diferencias entre algunos aislamientos que no fueron detectadas por el SDS-PAGE.

Por otro lado Carter *et al.* (1996), mediante una variante del RAPD conocida como AP-PCR (arbitrary primer-PCR), analizaron 30 aislamientos clínicos de *H.*

capsulatum procedentes de Indianápolis, Indiana, EUA. Los autores desarrollaron marcadores bialélicos a partir de secuencias de DNA polimórfico amplificadas con nucleótidos específicos (20 nt) y encontraron que cada aislamiento tenía un genotipo multilocus único, por lo que infirieron que existían recombinaciones frecuentes dentro de la población de *H. capsulatum* estudiada. Simultáneamente, Carter *et al.* (1997), al utilizar 11 marcadores bialélicos para analizar poblaciones de *H. capsulatum* procedentes tanto de EUA como de otros países, observaron que estos marcadores mostraban polimorfismos sólo para los aislamientos procedentes de EUA. Aunque estos marcadores fueron considerados como una buena herramienta para analizar los aislamientos y medir la extensión del flujo de genes del hongo dentro de diferentes regiones de EUA, tienen la desventaja de ser monomórficos para regiones más distantes, por lo que no se pueden usar para investigar la diversidad de aislamientos procedentes de otros países. Posteriormente, estos mismos autores encontraron tres marcadores multialélicos con la característica de ser hipervariables, por tanto altamente polimórficos, y de presentar secuencias muy repetitivas además de conservadas (microsatélites) que resultaron adecuados para tipificar y determinar niveles de variación genética de aislamientos provenientes tanto de regiones de EUA como de otros países. A la fecha, se han reportado cinco loci microsatélites en el genoma de *H. capsulatum* con capacidad de discriminar aislamientos con características peculiares (Carter *et al.*, 2000). El estudio de la diferenciación genética de aislamientos de *H. capsulatum* con base en un genotipo multilocus (amplificados de un loci polimórfico) y un marcador microsatélite, reveló diferenciación genética entre poblaciones de aislamientos de *H. capsulatum*, separando particularmente poblaciones de la clase 1 en las áreas donde predominaban poblaciones de la clase 2 y asimismo, diferenciando poblaciones de Norteamérica de las de Sudamérica (representada por una población de Colombia) (Carter *et al.*, 2001).

Los métodos moleculares, como hemos visto anteriormente, han permitido discriminar poblaciones de *H. capsulatum* de distintas procedencias geográficas, sea de diferentes continentes o de áreas geográficas del mismo país. En este sentido, existen varias aportaciones que nos permiten apoyar la gran diversidad de *H. capsulatum* en regiones geográficas cercanas o distantes. Jiang *et al.* (2000), tipificaron 24 aislamientos de *H. capsulatum* de EUA, a través de variaciones en la secuencia nucleotídica de regiones ITS y del gen 5.8S rRNA. Encontraron 10 diferentes perfiles de secuencias, designados de A - H (con tres representaciones para A, a saber: A-1; A-

2; A-3). Aislamientos procedentes de Indianápolis se clasificaron en cuatro grupos distintos (A-1, A-2, A-3 y F), dos aislamientos de Nueva York se ubicaron en el grupo G, tres aislamientos de diferentes ciudades de EUA se colocaron en el grupo F, y los restantes se distribuyeron en grupos diferentes. La cepa de referencia Downs de EUA (clase 1), en este estudio, se agrupó con los aislamientos de tipo F. Los autores sugieren que este método reubica aislamientos de otras clasificaciones. En otros países también se han utilizado métodos moleculares para esclarecer la procedencia geográfica de aislamientos de *H. capsulatum*, Tamura *et al.* (2002), con base en el análisis de la secuencia de la región ITS separaron aislamientos de distintas procedencias en ocho clados geográficos, proponiendo dos clados más para un aislamiento de China y otro de Tailandia.

Aunque en el presente, la mayoría de los investigadores han utilizado métodos genotípicos para clasificar *H. capsulatum*, éstos no siempre han logrado discriminar diferencias sutiles entre aislamientos del hongo, razón por la cual persiste la necesidad de apoyarse en los métodos fenotípicos, los cuales han favorecido la detección de ciertas características particulares del hongo y por ende facilitar el reconocimiento y agrupación de aislamientos de *H. capsulatum*.

Uno de los aspectos fenotípicos más relevantes de *H. capsulatum* var. *capsulatum* es la caracterización de su macro- y micromorfología, tanto en su estado saprobio como parasitario. Cuando se encuentra en el suelo o es cultivado a temperatura ambiente (25–28 °C), este hongo forma colonias filamentosas blancas algodonosas (tipo colonial A) o colonias pulverulentas pardas claras u oscuras (tipo colonial B); microscópicamente se observa una trama de filamentos delgados multicelulares (hifas), hialinos o en algunas ocasiones pigmentados, septados y ramificados, que soportan las estructuras de propagación, esporas o conidios, los cuales están presentes tanto lateralmente como en los extremos terminales de las hifas. Estas esporas se presentan en forma de: macroconidios esféricos o piriformes, hialinos o pigmentados de 8-16 µm de diámetro, pared gruesa, con numerosas proyecciones semejantes a tubérculos o pequeños dedos en toda su superficie, siendo denominados macroconidios tuberculados o digitiformes (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Tewari *et al.*, 1998); y microconidios ovalados de 2 x 5 µm de diámetro en promedio, en general con paredes lisas. Los conidios (macro y micro) nacen de cortos conidióforos en ángulo recto. Cuando se encuentra como parásito en un huésped, en cultivo a 37 °C o en condiciones de alto potencial de oxidorreducción, *H. capsulatum*

forma pequeñas células levaduriformes de 2 x 6 μm de diámetro en promedio, unibrotantes y uninucleadas. Las colonias producidas por esta fase morfológica del hongo son semejantes a las de otras levaduras pequeñas de aspecto compacto, textura cremosa y coloración blanca-beige. Aunque las características descritas definen el prototipo macro- y micromorfológico de *H. capsulatum*, distintos fenotipos han sido reportados que refieren cambios en el aspecto y forma de los conidios así como de las colonias (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Los estudios fenotípicos de *H. capsulatum* no sólo se centran en sus características morfológicas, también se considera el comportamiento fisiológico del hongo. Spitzer *et al.* (1990), con base en el análisis de dos características fenotípicas relacionadas a la cepa de referencia Downs (clase 1), su termosensibilidad a la temperatura de 40 °C y su avirulencia para ratones, reportaron que los aislamientos estudiados procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA del área de St. Louis MO, EUA, compartían las características fenotípicas de la cepa Downs. Esta asociación fue corroborada por métodos genotípicos, los cuales revelaron que los aislamientos de St. Louis presentaron un perfil polimórfico del mtDNA igual al de la cepa Downs, por lo que fueron incluidos en la clase 1.

Por otro lado, Gaur *et al.* (1981) encontraron altos niveles de variación en el perfil electroforético en gel de almidón de ocho isoenzimas, al estudiar 369 aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos de suelo de cuatro áreas geográficas de EUA. Los autores registraron de dos a diez diferentes fenotipos enzimáticos, los cuales difirieron 40.5 % del fenotipo predominante.

Cabe resaltar que la mayoría de los estudios feno- y genotípicos se han realizado con un número limitado de aislamientos de *H. capsulatum* y siempre utilizando como referencia a las cepas Downs (baja virulencia), G-186B y G-217B (alta virulencia). La virulencia es uno de los parámetros fenotípicos más importantes del microorganismo y se puede medir con diferentes tipos de ensayos. Cuando se relaciona la virulencia con estudios genéticos, los datos obtenidos permiten inferir el comportamiento de ciertas cepas, por ejemplo, la baja virulencia detectada en la cepa Downs se asocia posiblemente a la presencia de un mayor número de cromosomas (siete), a diferencia de las cepas de alta virulencia G-186B y G-217B las cuales tienen tres y cuatro cromosomas, respectivamente (Steele *et al.*, 1989; Carr & Sherer, 1998). De la misma manera, la presencia de cromosomas pequeños se asocia a cepas virulentas (Romero-Martínez *et al.*, 2004; Canteros *et al.*, 2004). Asimismo, la

asociación de termosensibilidad con baja virulencia y la posibilidad de tropismo a piel o mucosas es otro evento relacionado a los aislamientos denominados tipo Downs. Aunque estas asociaciones son especulativas, constituyen hallazgos interesantes.

Se consideraba que la cepa Downs estaba restringida geográficamente a los EUA. Sin embargo, dos genotipos tipo Downs han sido descritos por el análisis de RFLP del DNA genómico de 31 aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA (Salas-Ríos *et al.*, 1998). Asimismo, un número igual de cromosomas al de la cepa Downs ha sido reportado en aislamientos procedentes de lesiones mucocutáneas de tres pacientes argentinos con histoplasmosis asociada a SIDA (Canteros *et al.*, 2004). Además, la presencia de cromosomas pequeños en la cepa virulenta G-186B y en un aislamiento (EH-325) obtenido de un paciente mexicano fue corroborada por Canteros *et al.* (2004).

Considerando que la cepa Downs posee baja virulencia, proviene de una lesión mucocutánea, es termosensible a 40 °C y tiene un genotipo particular que la caracteriza (clase 1 por análisis de RFLP, siete cromosomas por análisis de electrocariotipo); considerando además que en contraparte existe otro prototipo de cepa (G-186B) que es virulenta, termotolerante a 40 °C y se destaca por presentar cromosomas pequeños; el comportamiento fenotípico y genotípico de estas cepas permitiría relacionar nuevos aislamientos de *H. capsulatum* al utilizar marcadores que los identifiquen como tipo Downs o como semejante a la cepa prototipo de virulencia, G-186B.

Por tal motivo, la tendencia a desarrollar ciertas manifestaciones clínicas, a compartir características fenotípicas (virulencia y termosensibilidad) y genéticas (número de cromosomas, tamaño genómico, perfil molecular de RAPD-PCR, RFLP, además de secuencias específicas), son parámetros a estudiar para ampliar el conocimiento y discriminar los grupos de aislamientos de *H. capsulatum* que están distribuidos en varias regiones geográficas de América.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del creciente número de estudios moleculares realizados a la fecha en hongos patógenos, ningún enfoque molecular ha sido abordado para caracterizar aislamientos procedentes de diferentes formas clínicas en el paciente. *Histoplasma capsulatum* en ocasiones tiene predilección por un sitio determinado en el huésped parasitado, ya que produce diversos cuadros clínicos localizados como los pulmonares, meningoencefálicos, oculares, cutáneos y mucocutáneos. Sin menospreciar el papel del huésped, consideramos que ciertas características inherentes al patógeno son relevantes y pueden tener una implicación directa en el comportamiento biológico de las cepas, como por ejemplo el facilitar el tropismo a piel. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó analizar algunos aspectos fenotípicos y genotípicos para determinar posibles similitudes y diversidades entre los aislamientos y cepas del hongo que provienen de distintos cuadros clínicos, localizados o diseminados. Asimismo, resulta importante identificar si la variabilidad fenotípica y genotípica del hongo está asociada a factores geográficos.

La caracterización de posibles marcadores del hongo sería útil para definir formas clínicas y la presencia de éstos en diferentes áreas geográficas para delimitar zonas de riesgo de adquisición de ciertas formas clínicas, además de realizar un mapeo de la distribución del hongo en la naturaleza.

HIPÓTESIS

Las diferencias fenotípicas y genotípicas de *H. capsulatum* se relacionan con la forma clínica asociada y con la posible ubicación geográfica de los aislamientos y cepas del hongo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características fenotípicas y genotípicas de aislamientos de *H. capsulatum* provenientes de diferentes formas clínicas y orígenes geográficos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si las características fenotípicas como sensibilidad o tolerancia a 40 °C y tiempo de generación pueden discriminar las diferentes formas clínicas y orígenes geográficos asociados a aislamientos de *H. capsulatum*.
2. Determinar si las características genotípicas reveladas por RAPD-PCR y el análisis de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes *arf*, *H-anti*, *ole* y *tub1* pueden discriminar las diferentes formas clínicas y orígenes geográficos asociados a aislamientos de *H. capsulatum*.
3. Comparar los resultados obtenidos de los aislamientos de *H. capsulatum* estudiados contra los referidos para las cepas prototipos de otras clasificaciones fenotípicas y genotípicas previas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos Fúngicos

Los aislamientos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* fueron tomados de la colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Se puede acceder a la información sobre los aislamientos en un catálogo (Taylor *et al.*, 1999b) o en la página web: <http://www.histoplas-mex.unam.mx>. Esta colección se encuentra registrada en la base de datos del Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Centre on Microorganisms, WDCM) de la Federación Mundial para Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collections, WFCC) bajo el acrónimo y número LIH-UNAM WDCM817. Todos los aislamientos y cepas han sido previamente tipificados según las normas de ingreso a la colección. Durante el desarrollo del presente estudio los aislamientos fueron mantenidos a 25-28 °C en agar-BHI (brain heart infusion-agar, Bioxón, Becton-Dickinson, México DF). Se trabajaron 37 aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de casos clínicos: 13 mexicanos; ocho argentinos; dos guatemaltecos; 11 colombianos; y tres cepas de referencia, una de Panamá y dos de EUA. El origen clínico y geográfico de los aislamientos estudiados se encuentran en la Tabla 1.

Conversión de la Fase Micelial a Levaduriforme

Para la conversión de fase morfológica de los diferentes aislamientos y cepas de *H. capsulatum* estudiados, cada micelio fue inoculado en medio sintético de Tewari y Kegel (1971) e incubado a 37 °C en baño María con agitación. Los cultivos fueron procesados individualmente y sembrados cada 72 h, hasta obtener levaduras. Una vez obtenida éstas, se cultivaron en caldo-BHI (Bioxón), suplementado de cisteína 0.1 % y glucosa 1 %, durante 24-48 h a 37 °C. Posteriormente, las levaduras fueron cosechadas por centrifugación (800 g), se lavaron dos veces con caldo-BHI suplementado y fueron preservadas en criocongelación a -80 °C y -196 °C, en presencia de suero fetal de ternera (GIBCO BRL, Gran Island, Biological Co. N.Y.) y dimetilsulfóxido (9:1), hasta su uso.

Caracterización fenotípica del hongo

Termosensibilidad y Tiempo de Generación (Tg) de la Fase Levaduriforme de H. capsulatum

Cada uno de los aislamientos en fase levaduriforme fue descongelado gradualmente y posteriormente sembrado en caldo-BHI suplementado, seguido de incubación a 37 °C durante 24 h, tiempo estimado para alcanzar la fase- logarítmica de crecimiento (fase-log). Cada aislamiento en fase-log fue transferido a caldo-BHI fresco y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se cosecharon las levaduras por centrifugación a 800 g durante 10 min para realizar los ensayos de termosensibilidad y determinación de Tg. Para garantizar ausencia de contaminantes, el sobrenadante fue utilizado para prueba de exoantígenos por doble inmunodifusión en gel (IDG) en presencia de sueros inmunes específicos (Ouchterlony & Nilsson, 1978).

Cada paquete de levaduras fue resuspendido en 10 ml de caldo-BHI suplementado, para su ajuste a la densidad óptica deseada. De cada suspensión, se preparó una dilución 1:10 y a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas de 1:2 hasta 1:2048, en una microplaca de cultivo de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark) con volumen final de 200 µl por pozo. En la primera columna, los pozos sólo recibieron 200 µl de caldo-BHI suplementado (blanco); a partir de la segunda columna, se realizaron las diluciones en los pozos. La lectura de densidad óptica (DO) de las diferentes diluciones se realizó en un lector Multiskan MS Labsystems (Helsinki, Finland) a una longitud de onda de 405 nm. Se seleccionó, para cada aislamiento, la dilución con DO cercana o igual a 0.2. Una vez hecha la selección, se ajustó cada inóculo a 0.2 DO; se llenaron ocho pozos por columna de la microplaca con 200 µl del inóculo.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron simultáneamente, por separado, un juego de tres placas a 37 °C (control de crecimiento) y otro a 40 °C (termosensibilidad). Las lecturas de DO se realizaron a diferentes tiempos 0, 3, 6, 12, 24, y 30 h para ambas temperaturas. Las DO, de cada tiempo a diferentes temperaturas, fueron promediadas considerando una n = 12 pozos. Los resultados se expresaron gráficamente comparando las DO contra los tiempos de incubación, en ambas temperaturas probadas.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de inhibición (% I) a 40 °C, considerando la fórmula $\% I = 1 - [(DO_{t_x} - DO_{t_0} \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C}) / (DO_{t_x} - DO_{t_0} \text{ a } 37 \text{ }^\circ\text{C})] \times 100$, siendo t_x cada uno de los tiempos de lectura de DO diferentes al tiempo 0.

Por otro lado, el Tg se calculó a 37 °C a partir de una modificación del protocolo descrito por Amaral *et al.* (1967). Para el cálculo se consideró dos puntos en la pendiente de la fase-log mediana de la curva de crecimiento graficadas en papel semi-logarítmico. Se eligió 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 tiempos (h), entre los dos puntos extrapolados se registró como el Tg para cada aislamiento estudiado.

Todos los datos fueron analizados estadísticamente por la prueba t de Student (Microsoft Excel 2000 for Windows).

Caracterización genotípica del hongo

Extracción del DNA

Para cada aislamiento, se cultivó el micelio de *H. capsulatum* en medio GYE (glucosa 2 % y extracto de levadura 1 %), a 26 °C con agitación constante, durante 1-2 semanas, hasta alcanzar la fase-log de crecimiento. Se cosechó éste por filtración en un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 1. Para comprobar la procedencia del micelio se realizó con el filtrado concentrado de éste la prueba de exoantígenos en IDG (Ouchterlony & Nilsson, 1978) y sólo los micelios cuyos filtrados desarrollaron reacción de precipitación con el suero testigo positivo, fueron utilizados en la extracción de DNA. Cada micelio seleccionado se lavó con amortiguador TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM) y se transfirió a un mortero, donde fue triturado con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. El polvo fue depositado en tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, donde se adicionaron 600 µl de amortiguador de extracción (Tris-HCl 500 mM pH 8.0, EDTA 500 mM, SDS 10 %, 2-mercaptoetanol 10 %), se agitó la mezcla 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 20000 g, 4 °C, por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se adicionó proteinasa K (a una concentración final de 200 µg/ml) mezclando fuertemente e incubando a 56 °C por 2 h. A continuación, se agregó RNAsa (a una concentración final de 50 µg/ml) y se incubó toda la noche. Los ácidos nucleicos se extrajeron dos veces con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), hasta obtener una fase acuosa superior transparente. Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10 µl de acetato de sodio 3 M, y se incubó la mezcla a -20 °C hasta el día siguiente. Posteriormente, se centrifugó para obtener el botón de DNA, el cual se lavó con etanol al 70 % y nuevamente se centrifugó

por 1 min, eliminando totalmente el alcohol. Finalmente, se disolvió el DNA en agua grado Milli Q. Se determinaron tanto la pureza como la concentración del DNA problema por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % adicionado de bromuro de etidio. Para lo último, se corrieron 20, 50 y 100 ng del fago λ (GIBCO), como indicador de concentraciones de un DNA estándar. Estas concentraciones se compararon con 2 μ l del DNA problema de cada muestra y se registró su respectiva concentración.

Amplificación al Azar del DNA Polimórfico por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR)

Se usó el método de RAPD-PCR empleando dos variantes del mismo, con un oligonucleótido según Kersulyte *et al.* (1992) y Woods *et al.* (1993) o con doble oligonucleótido según Hu *et al.* (1995). Se utilizaron tres iniciadores de 10 nt, 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3'), 1281 (5'-AACGCGCAAC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) previamente probados con excelentes resultados para *H. capsulatum* por Kersulyte *et al.* (1992). Para la variante de RAPD con doble oligonucleótido se utilizó la combinación 1281 y 1283, que ha sido previamente utilizada por Taylor *et al.* (2000a). Las condiciones de la reacción fueron: volumen final de 25 μ l; 10 ng de DNA genómico; 100 pmol de cada iniciador; 2.5 mM $MgCl_2$; 200 μ M de cada dNTP (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA); 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Applied Biosystems) y amortiguador TE 10 X. Los reactivos fueron estandarizados para obtener sus respectivas condiciones óptimas de trabajo. Para las amplificaciones se utilizó un termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA) con el siguiente programa: un ciclo a 94 °C por 7 min (para activar la enzima); 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 un ciclo final de 5 min a 72 °C, para asegurar la amplificación total de los productos. Los amplicones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) y fueron teñidos con bromuro de etidio 10 μ g/ml. Se usó como marcador de peso molecular el 123 bp DNA Ladder (GIBCO). La imagen de los geles se capturó con un Fotodocumentador Synoptics (GeneCam, Syngene, Cambridge, UK), se imprimió en una impresora térmica Sony 650 (Sony Electronics Inc.; Park Ridge, N.J.), y se editó con el programa GeneSnapTM (Syngene) para una óptima resolución. El tamaño de los fragmentos se calculó con ayuda del programa BiImage por comparación con el marcador molecular 123 bp DNA Ladder.

Los perfiles del RAPD-PCR fueron codificados como datos binarios de ausencia (0) y presencia (1). Se construyó, entre los aislamientos estudiados, una matriz de similitudes genéticas pareadas, utilizando el coeficiente de apareamiento simple (simple matching, SM) (Sneath & Sokal, 1973). El coeficiente SM se define como, $(nw + nz) / (nw + nx + ny + nz)$, donde n = número de posiciones de las bandas; nw = el número de posiciones donde los aislamientos uno y dos muestran presencia de bandas; nx = el número de posiciones donde el aislamiento uno muestra banda y el dos no exhibe banda; ny = número de posiciones donde el aislamiento uno no muestra banda pero sí el aislamiento dos; nz = número de posiciones donde tanto el aislamiento uno como el dos no presentan bandas. Se generó un dendrograma, a partir de la matriz de similitudes genéticas pareadas, utilizando el método de agrupación de los promedios aritméticos no ponderados (unweighted pair group method analysis, UPGMA). La confiabilidad estadística del dendrograma se estableció tanto por medio del coeficiente de correlación cofenética (r) estimado por la prueba aleatorizada no paramétrica de Mantel (Manly, 1997) después de 5000 permutaciones como por la prueba del mejor punto de corte (Strauss, 1982) y por el método del bootstrap (Efron, 1982). Para los análisis estadísticos multivariados se utilizaron los programas, NTSYS-PC versión 2.0 (Rohlf, 1998), TreeView versión 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod/html>) y Freetree versión 0.9.1.50 (Pavliček *et al.*, 1999). Por último, con el fin de conocer la variación genética de los aislamientos y/o cepas estudiados, en función de sus orígenes geográficos y formas clínicas, se realizó un análisis jerárquico de varianza molecular AMOVA (analysis of molecular variance) a un nivel, utilizando los programas AMOVA PREP 1.01 y AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992; Nybom & Bartish, 2000). Con los datos de AMOVA se generaron dos dendrogramas por el método UPGMA y se calcularon los respectivos coeficientes de correlación cofenética (r) a partir de las matrices de las F_{st} pareadas de los aislamientos y/o cepas, con el objeto de establecer las relaciones geográficas y clínicas entre ellos.

Amplificación y Secuencias Parciales del DNA de Cuatro Genes de H. capsulatum

Se obtuvieron las secuencias parciales de cuatro genes de *H. capsulatum* para los cuales se diseñaron los oligonucleótidos según Kasuga *et al.* (1999), a saber: para el gen *arf*, *arf1* (5'-agaatatggggcaaaaagga-3') y *arf2* (5'-cgcaattcatcttcgttgag-3'); para el gen *H-anti*, *H-anti3* (5'-cgcagtcacctccatactatc-3') y *H-anti4* (5'-gcgccgacattaacctt-3');

para el gen *ole*, *ole3* (5'-tttaaacgaagccccacgg-3') y *ole4* (5'-caccacctccaacagcagca-3'); y para el gen *tub1*, *tub1* (5'-ggtggccaaatcgcaaactc-3') y *tub2* (5'-ggcagctttccgttctcagt-3') (Operon Technologies). La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones: se usaron 10 ng de DNA genómico en una mezcla de reacción de 50 μ l, conteniendo 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 1 U de *Taq* DNA polimerasa, 2.5 mM MgCl₂ y 0.2 mM dNTPs, con el siguiente programa: 15 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C por 32 ciclos, seguido por un ciclo final de 5 min a 72 °C. La temperatura inicial de alineación de 65 °C del primer ciclo fue paulatinamente reducida en 0.7 °C por ciclo, durante los siguientes 12 ciclos. Posteriormente, la PCR continuó a una temperatura de alineación de 56 °C para los 20 ciclos restantes. Los productos de la PCR se enviaron al Instituto de Fisiología Celular, UNAM-México, para ser secuenciados en un Secuenciador de DNA ABI-automatizado (Applied Biosystems).

Análisis de Secuencias

Se generaron para los cuatro genes secuencias para una sola hebra, las cuales se editaron, alinearon y compararon mediante el programa Clustal X versión 1.81 (NCBI) (Higgins & Sharp, 1988; Thompson *et al.*, 1997). Las secuencias de la cepa G-217B fueron utilizadas como grupo externo (números de acceso en la base de datos del GenBank: L25117 para el gen *ARF*, U20346 para el gen *H-ANTI*, X85962 para el gen *OLE* y M28358 para el gen *TUB1*). Los parámetros del mejor alineamiento fueron: penalización por apertura del gap- 15.00; penalización por extensión del gap- 3.00; porcentaje de similitud 30 %; peso de transición del DNA- 0.50; y peso de la matriz de DNA- IUB; matriz negativa- OFF.

La relación filogenética entre los aislamientos se estableció tanto por métodos de distancia como de máxima parsimonia (MP), utilizando el programa PAUP-versión 4.0. El análisis de los genes se llevó a cabo de manera independiente ya que la prueba de heterogeneidad no paramétrica de Templeton mostró incongruencia entre los cuatro conjuntos de datos (Templeton, 1983; Farris, 1995). Para definir el modelo de sustitución nucleotídica de las regiones génicas estudiadas, se estimó la proporción de transiciones y transversiones así como la frecuencia de las bases nucleotídicas. De esta manera, para el gen *arf* se utilizó el modelo HKY85+ Γ (Hasegawa *et al.*, 1985) y para las secuencias de los genes *H-anti*, *ole* y *tub1* el modelo de 2-parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Las topologías correspondientes se construyeron usando el algoritmo "neighbor-joining" (NJ). Para el método de MP se realizó un procedimiento de

búsqueda heurística con adición de secuencias al azar, 1000 repeticiones y un intercambio de ramas del árbol por el método de bisección y reconexión (TBR). La confiabilidad estadística de los árboles inferidos a partir de las secuencias fue evaluada por el método de bootstrap (Efron, 1982) y el índice de Bremer o de decaimiento (Bremer, 1988; Donoghue *et al.*, 1992). Finalmente, los árboles consenso para cada uno de los genes analizados por NJ y MP fueron generados mediante el método de la regla de la mayoría (major rule). Por último, se estimó la diversidad y divergencia nucleotídica (π) de las regiones génicas estudiadas de *H. capsulatum* por el método de Nei & Li (1979).

RESULTADOS

Caracterización fenotípica

Termosensibilidad a 40 °C de la Fase Levaduriforme de H. capsulatum

Los registros de las lecturas de DO correspondientes al crecimiento de la población de levaduras en dos distintas temperaturas, a 37 °C (testigo de crecimiento) y a 40 °C (efecto termosensible), a diferentes tiempos de incubación, desde 0, 3, 6, 12, 24 hasta 30 h (t_0 , t_3 , t_6 , t_{12} , t_{24} y t_{30} , respectivamente) se muestran en las tablas 2 y 3. Todos los datos de DO registrados al t_0 tanto a la temperatura de 37 como de 40 °C, para una $n = 12$, se encuentran en el rango de 0.1 a 0.4 DO, considerando que los inóculos fueron ajustados a 0.2 de DO, la variación obtenida entre el menor (0.116 ± 0.002 , tabla 2) y el mayor promedio de DO (0.366 ± 0.008 , tabla 3). Aunque las poblaciones de algunos aislamientos de *H. capsulatum* presentaron variaciones, éstas fueron ajustadas para que todos los aislamientos partieran de una población inicial (t_0) lo más homogénea posible. Las desviaciones estándar confirman la mínima variación de lecturas dentro de la misma población (tablas 2 y 3).

Las curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de la mayoría de los aislamientos de *H. capsulatum*, tanto a 37 como a 40 °C en los tiempos de incubación utilizados, se observan las figuras 1-4. Las curvas en condiciones óptimas de temperatura (37 °C) para la fase levaduriforme del hongo funcionaron como testigos y permitieron observar diferencias en la cinética de crecimiento de las levaduras con relación a sus distintas fases (fase-lag o de latencia, fase-log también llamada de crecimiento logarítmico o exponencial, fase estacionaria y fase de descenso o muerte). Algunos aislamientos en las condiciones probadas, alcanzaron rápidamente la fase-log en un tiempo de incubación <3 h (EH-319 y 993446) (Figs. 1a y c, y 2a, respectivamente) sin manifestar la fase-lag. La cinética de crecimiento de éstas cepas a 40 °C fue similar a la temperatura de 37 °C (Figs. 1b y d, y 2b, respectivamente). En contraste el aislamiento 993444 y la cepa Downs en las mismas condiciones, alcanzaron tardíamente la fase-log (Figs. 2a y 4a, respectivamente) y presentaron una latencia de 12 h.

La cinética de crecimiento a 40 °C para el aislamiento 993444 (Fig. 2b) fue similar a la obtenida a temperatura de 37 °C, mientras que el crecimiento de la cepa Downs fue totalmente inhibido a 40 °C (Fig. 4b). Todos los demás aislamientos y las

cepas de referencia, G-186B y G-217B, mostraron una cinética de crecimiento similar tanto a 37 como a 40 °C (Figs 1-4) acorde con las características descritas para *H. capsulatum*.

El comportamiento cinético entre el crecimiento de las cepas de referencia G-217B (prototipo de termotolerancia a 40 °C) y Downs (prototipo de termosensibilidad a 40 °C) revela diferencias significativas ($P < 0.001$; $\alpha = 0.01$) tanto a 37 °C en los tiempos de incubación t_6 , t_{12} , t_{24} y t_{30} así como a 40 °C en todos los tiempos de incubación. Las comparaciones entre el crecimiento del aislamiento 993444 tanto a 37 como a 40 °C con el de las cepas G-217B y Downs mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$; $\alpha = 0.01$) en los tiempos de t_6 , t_{12} , t_{24} y t_{30} a 37 °C y de t_3 , t_6 , t_{12} , t_{24} y t_{30} a 40 °C con la cepa termotolerante; asimismo en los tiempos de t_{24} y t_{30} a 37 °C y de t_{12} , t_{24} , y t_{30} a 40 °C con la cepa termosensible.

El comportamiento termosensible o termotolerante de los aislamientos y cepas estudiados a 40 °C fue confirmado por el cálculo del % I del crecimiento (Tabla 4). Sobresale el 100 % de inhibición para la cepa Downs en los tiempos de incubación correspondientes a 24 y 30 h, lo que confirma su termosensibilidad. Los demás aislamientos y cepas estudiados se comportaron como posibles termotolerantes ya que los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron inferiores a los valores más altos, 31.9 y 28.7 %, obtenidos para el aislamiento EH-359 en t_{24} y t_{30} , respectivamente (Tabla 4).

Tg de la Fase Levaduriforme de H. capsulatum

El cálculo de cada Tg se realizó con base en los datos de las figuras 1-4, según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Para cada aislamiento se generó una curva, como se representa en la figura 5, que permitió extrapolar los valores del Tg (Tabla 5). El intervalo de Tg obtenido para los diferentes aislamientos de *H. capsulatum* varió de 2:30 (EH-319) a 12:45 h (MZ 2). En general, el Tg promedio de los aislamientos y cepas estudiados osciló entre 5:30 y 8:30 h. En dos aislamientos (EH-359, MX; MZ 2, CO) obtenidos de formas mucocutáneas con antecedentes de inmunosupresión no asociada a VIH, además de la cepa Downs, el Tg fue >9:45 h, mientras que en el aislamiento H.1.02.W procedente de un paciente guatemalteco con una forma localizada pulmonar bien caracterizada y no asociada a VIH, se detectó uno de los más bajos Tg de 4:45 h (Tabla 5). Cabe destacar que el aislamiento 993444 (AR) y la cepa de referencia Downs (EUA), que mostraron una fase-lag muy

prolongadas, presentaron un Tg dentro de los valores aceptables para este microorganismo de crecimiento lento.

Caracterización molecular

Polimorfismo Genético por RAPD-PCR de H. capsulatum

El polimorfismo genético de los aislamientos y cepas estudiados generado por RAPD-PCR, con tres oligonucleótidos y la combinación de dos de ellos, se revelan, de modo representativo, en las figuras 6 a, b (1253); 7 a, b (1281); 8 a, b (1283) y 9 (mezcla 1281-1283). Los aislamientos de Argentina (AR), Colombia (CO), Guatemala (GT), México (MX) y cepas de referencia, difirieron entre sí, tanto en el número como en el desplazamiento (movilidad) de las bandas. La banda de 1.2 Kb fue común para la mayoría de los aislamientos de MX, para algunas cepas de referencia y para escasos aislamientos de CO, independiente de la forma clínica y no se reveló en los aislamientos de AR cuando los marcadores moleculares se generaron con el oligonucleótido 1281 (Fig. 7a). Los tres iniciadores y la combinación 1281-1283, amplificaron 55 bandas de DNA repetitivas y bien definidas en los 37 aislamientos estudiados (Tabla 6), que sirvieron para el análisis estadístico de los RAPD. El análisis de la matriz de similitud mostró una media general de similitud de 0.659 entre los 37 aislamientos. Además, reveló que los aislamientos 993444, 993445 y 92590 de AR fueron los más relacionados entre sí con un valor de similitud de 1.0, mientras que el aislamiento GeM de CO fue el menos relacionado con un valor de 0.3636 al compararlo con los aislamientos EH-326 y EH-359 de MX (datos no mostrados).

En el dendrograma generado por UPGMA se observaron tres grupos grandes (Fig. 10). El I se subdividió en cinco subgrupos, principalmente relacionados con su origen geográfico. El subgrupo Ia fue conformado por 12 de los 13 aislamientos de MX, el Ib por todos los aislamientos de AR, el Ic por nueve de los 11 aislamientos de CO, el Id por los aislamientos de GT y un aislamiento de CO (JG), el Ie por un aislamiento único de CO (GeM). El grupo II se conformó con un aislamiento único de MX (EH-319) y dos cepas de referencia, una de EUA (G-217B) y otra de PA (G-186B). Finalmente, el grupo III sólo incluyó a la cepa de referencia Downs de EUA. El coeficiente de correlación cofenético ($r = 0.94$, $P = 0.001$) sugiere que el dendrograma obtenido tiene una buena representación de la similitud de los aislamientos. Se determinó el mejor punto de corte (0.92) y la consistencia de los grupos de aislamientos revelados en el

dendrograma, mostró pocos grupos con baja asociación. El grupo Ib fue el más consistente ya que seis (92590, 9993444, 993445, 01558, 993267 y 01739) de un total de ocho aislamientos procedentes de Argentina se asociaron por arriba de 0.92 (Fig. 10). Al considerar los valores de bootstrap superiores al 50 %, se encontró una estrecha relación entre los aislamientos estudiados apoyada no sólo por la agrupación inicial obtenida por UPGMA, sino también por los datos de r y del punto de corte, los cuales revelaron grupos muy definidos de aislamientos, según el origen geográfico.

Al realizar el análisis comparativo de los perfiles de DNA desarrollados por RAPD-PCR de los aislamientos y/o cepas estudiados, según su procedencia geográfica, por el método de AMOVA (Fig. 11), se encontró una variación genética de 49.7 % entre las poblaciones y dentro de éstas de 50.30 %. La F_{st} promedio fue de 0.497 y estadísticamente significativa ($P < 0.001$). La tabla 7 muestra los valores de F_{st} pareados para el origen geográfico, donde se observó que entre las cepas de EUA y los aislamientos de GT existe una baja diferenciación genética ($F_{st} = 0.0652$), mientras que entre la cepa de PA y los aislamientos de AR la diferenciación genética fue mayor ($F_{st} = 0.8698$). El dendrograma generado para AMOVA mostró que las cepas de EUA y GT forman un grupo al cual se unieron los aislamientos de MX, CO, PA y AR. El coeficiente cofenético de correlación ($r = 0.852$; $P = 0.004$) indicó que el árbol obtenido es una buena representación de la matriz de las F_{st} pareadas.

Los análisis de AMOVA para la forma clínica asociada (Fig. 12), mostraron una variación genética de 14.61 % entre las poblaciones y dentro de las poblaciones de 85.39 %. La F_{st} promedio fue de 0.146 y estadísticamente significativa ($P < 0.0099$). La tabla 8 muestra los valores de F_{st} pareados para la forma clínica, donde se observó que entre los aislamientos procedentes de formas clínicas no determinadas y los de formas pulmonares localizadas no existe diferenciación genética ($F_{st} = 0.00$), mientras que entre las formas clínicas diseminadas y las mucocutáneas la diferenciación genética fue mayor ($F_{st} = 0.1808$). El dendrograma generado para AMOVA mostró que las formas no determinada y pulmonar localizada integraron un grupo semejante al cual se unieron las formas diseminadas y las mucocutáneas. El coeficiente cofenético de correlación ($r = 0.986$; $P = 0.079$) mostró que el árbol obtenido es una buena representación de la matriz de las F_{st} pareadas.

Secuenciación Parcial de Genes de los Aislamientos de H. capsulatum

Se generaron 148 secuencias parciales de los cuatro genes (*arf*, *H-anti*, *ole*, *tub1*) para los 37 aislamientos y/o cepas estudiados, las cuales se alinearon individualmente con las secuencias homólogas de la cepa G-217B depositadas en el GenBank, utilizando el Programa Clustal X. El número de sitios informativos analizados después de cada alineamiento fue de 468 para el gen *arf* (región 411 a 870), de 383 para el gen *H-anti* (región 385 a 790), de 416 para el gen *ole* (región 34 a 460) y de 300 para el gen *tub1* (región 584 a 874).

Los árboles filogenéticos generados de las secuencias parciales de los cuatro genes por el método de NJ con sus respectivos valores de bootstraps e índices de consistencia, de homoplasia y de reescalado de consistencia se muestran en la figura 13.

El árbol generado del fragmento de *arf* reveló dos grupos; el I representado por todos los aislamientos de MX, GT, la mayoría de los aislamientos de CO y tres aislamientos de AR (993267, 01739 y 01558); el II por la mayoría de los aislamientos de AR, por un aislamiento de CO (JG) y la cepa de referencia Downs. Las cepas de referencia de PA (G-186B) y de EUA (G-217B) se unieron de manera independiente a estos dos grupos. Los valores de bootstrap asociados a los nodos de estos grupos estuvieron por arriba del 50 %.

El árbol de la secuencia parcial del gen *H-anti* mostró tres grupos. El I representado por todos los aislamientos de MX, por la mayoría de los de CO y uno de GT. El grupo II lo conformaron todos los aislamientos de AR y el aislamiento JG de CO. El aislamiento de GT (H.1.02.W) mostró un comportamiento independiente (grupo III). Las cepas de referencia se ubicaron en la topología del árbol como independientes de los grupos anteriores.

El árbol filogenético de las secuencias parciales del gen *ole* reveló un sólo grupo integrado por todos los aislamientos, excepto las cepas de referencia. La cepa Downs se integró dentro de este gran grupo. Todos los aislamientos de AR además del aislamiento JG de CO formaron, dentro de este gran grupo, un subgrupo bien definido.

Finalmente, el árbol generado de la secuencia parcial del gen *tub1* mostró también un sólo grupo formado por todos los aislamientos excepto las cepas de referencia. En este grupo se integraron cuatro subgrupos. El subgrupo I representado por seis aislamientos de CO (Gli, MZ2, LA, WE, LF y DS), cinco de MX (EH-319, EH-316, EH-355, EH-356 y EH-357) y uno de GT (H.1.12.96). El subgrupo II con todos los

aislamientos de AR, uno de MX (EH-323) y uno de CO (JG). El subgrupo III con cuatro aislamientos de CO (RG, AP, WCh y GeM) y tres de MX (EH-317, EH-359 y EH-328). Por último, el subgrupo IV se formó con cuatro aislamientos de MX (EH-326, EH-325, EH-327 y EH-324) y un aislamiento de GT (H.1.02.W). Las cepas de referencia se unieron de manera independiente. Los valores de bootstrap asociados a los nodos de los grupos y subgrupos que se describen a partir del análisis de las topologías de estos cuatro genes estuvieron por arriba del 50 %.

Por otro lado, los análisis individuales de los árboles filogenéticos generados de las secuencias parciales de los cuatro genes por el método de MP se muestra en la figura 14, con sus respectivos valores de bootstrap e índices de decaimiento, de homoplasia y de reescalado de consistencia. Los árboles generados por MP son, en lo general, semejantes a los árboles de distancia.

El gen *arf* presentó tres grupos. El grupo I con todos los aislamientos de MX, GT y de CO, a excepción del aislamiento JG. El grupo II con dos aislamientos de AR (01739 y 01558). El grupo III se dividió en dos subgrupos: el IIIa con la mayoría de los aislamientos de AR y uno de CO (JG), el IIIb con un aislamiento de AR (993267) y la cepa de referencia de EUA (Downs). Las cepas de referencia de PA (G-186B) y de EUA (G-217B) se unieron de manera independiente. El árbol filogenético generado de la secuencia parcial del gen *H-anti* presentó tres grupos. El grupo I con cuatro subgrupos: el Ia con la mayoría de aislamientos de CO, con cinco aislamientos de MX (EH-316, EH-359, EH-328, EH-317 y EH-319) y uno de GT (H.1.12.96); el Ib y el Ic sólo con aislamientos de MX; y por último el Id con un aislamiento de CO (LF). El grupo II con todos los aislamientos de AR y uno de CO (JG). El grupo III con un único aislamiento de GT (H.1.02.W). Las cepas de referencia de PA (G-186B) y de EUA (Downs y G-217B) se unieron de manera independiente. Al igual que *H-anti*, el árbol filogenético del gen *ole* presentó un grupo con dos subgrupos y aislamientos con comportamiento independiente. El subgrupo Ia con todos los aislamientos de MX, la mayoría de los de CO y uno de GT (H.1.12.96); el Ib con todos los aislamientos de AR y uno de CO (JG). Un aislamiento de GT (H.1.02.W) y otro de CO (LF) además de la cepa de referencia de EUA (Downs) se comportaron de modo independiente. Las cepas de referencia de PA (G-186B) y de EUA (G-217B) también se unieron de manera independiente. De la misma manera que el gen anterior el árbol filogenético generado de la secuencia parcial de *tub1* mostró un grupo con cuatro subgrupos. El subgrupo Ia con seis aislamientos de CO (LF, MZ2, LA, WE, Gli, DS), cinco de MX (EH-319, EH-

316, EH-355, EH-356, EH-357) y uno de GT (H.1.12.96); el Ib con todos los aislamientos de AR, uno de MX (EH-323), uno de CO (JG) y la cepa de referencia de EUA (Downs); el Ic con tres aislamientos de MX (EH-317, EH-359, EH-328) y cuatro de CO (RG, AP, WCh, GeM); el Id con cuatro aislamientos de MX (EH-326, EH-325, EH-327, EH-324) y uno de GT (H.1.02.W); y por último las cepas de referencia de EUA (G-217B) y de PA (G-186B) se unieron de manera independiente.

Diversidad y divergencia nucleotídica

El análisis de la secuencia de cada gen comparada con su grupo externo mostró una alta homología para los genes estudiados tanto por la determinación del índice de diversidad nucleotídica (π) como por la divergencia nucleotídica. Se obtuvo un alineamiento total de 1607 pb de DNA con 120 sitios informativos distribuidos entre los cuatro genes, como sigue: 35 posiciones para *arf*, 28 para *H-anti*, 26 para *ole* y 31 para *tub1*.

Los valores de π para cada gen de *H. capsulatum* estudiado fueron bajos: $\pi = 0.02794$ para el gen *arf*, $\pi = 0.02143$ para el gen *H-anti*, $\pi = 0.01618$ para el gen *ole*; y $\pi = 0.02740$ para el gen *tub1*. La divergencia nucleotídica entre las secuencias de los aislamientos de *H. capsulatum* también fue baja: el gen *arf* mostró 75 sitios polimórficos de 468; el gen *H-anti* 39 sitios polimórficos de 383; el gen *ole* 45 sitios polimórficos de 416; y el gen *tub1* 43 sitios polimórficos de 300 sitios analizados.

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primero en asociar diferentes características fenotípicas de *H. capsulatum* entre sí, como: termosensibilidad; tiempo de generación; orígenes geográficos y formas clínicas; y complementar esta asociación con el análisis de marcadores genotípicos. Aunque otros investigadores han relacionado el polimorfismo genético del hongo con la procedencia geográfica (Carter *et al.*, 1996; 1997; 2001; Jiang *et al.*, 2000; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Medeiros-Muniz *et al.*, 2001; Poonwan *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004a; Vincent *et al.*, 1986), características de inmunosupresión del huésped (Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Salas-Rios *et al.*, 1998; Spitzer *et al.*, 1990) y termosensibilidad del aislamiento (Spitzer *et al.*, 1990; Keath *et al.*, 1989), sus estudios presentan carencias que van desde el empleo de un número escaso de aislamientos o cepas hasta el uso de aislamientos circunscritos a áreas geográficas muy localizadas. Tales circunstancias limitan, posiblemente, el análisis de similitudes feno- y genotípicas intraespecíficas, puesto que en ocasiones no consideran las fuertes presiones del medio que influyen en el patógeno al inducir comportamientos distintos, según las condiciones de su entorno ambiental.

Para el desarrollo de este estudio se contempló la fenotipificación de los aislamientos clínicos con la fase levaduriforme del hongo, por ser ésta la forma virulenta del patógeno que se encuentra en el huésped parasitado. Además, se conoce que esta morfología de *H. capsulatum* está asociada a genes específicos de fase que definen caracteres fenotípicos propios de ésta (Keath *et al.*, 1992; 1994; Patel *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2003). La determinación fenotípica sólo se realizó con el 70 % de los aislamientos procesados en la genotipificación, debido a la dificultad de algunos aislamientos para alcanzar la transición dimórfica, evento reportado con cierta frecuencia por distintos grupos de investigación. Aunque existen aislamientos que logran la transición de fase con cierta rapidez en condiciones óptimas de cultivo artificial, este comportamiento biológico no se puede uniformar, por lo que hay algunos aislamientos que son de rápida y otros de lenta conversión. Además, existen posibles "mutantes naturales" que a la fecha no han sido convertidas, aun después de varios intentos.

Aunque no se consiguió la transición dimórfica del 100 % de los aislamientos, el número de éstos en fase levaduriforme es relevante y hasta el momento, se cuenta con los resultados de termosensibilidad y tiempo de generación de 25 aislamientos y/o

cepas. Los datos obtenidos a la fecha son fehacientes ya que expresan el resultado de dos procedimientos distintos de medición, uno por el cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento y el otro por la cinética de la curva de crecimiento a 37 y 40 °C (tabla 4, Figs. 1-4); además, muestran que todos los aislamientos fueron termotolerantes y el único comportamiento termosensible se asoció con la cepa de referencia Downs, corroborando su prototipo de termosensibilidad. Un hallazgo novedoso fue detectado en un aislamiento de un paciente de AR con lesiones mucocutáneas (993444), el cual presentó un tiempo prolongado de fase-lag, tanto a 37 como a 40 °C, lo que sugiere un probable retardo en el proceso de adaptación a las condiciones experimentales utilizadas. El hecho de que el aislamiento 993444 proceda de una lesión mucocutánea y que comparta a 37 °C una fase-lag prolongada con la cepa prototipo de termosensibilidad y de baja virulencia Downs, aislada de una lesión de mucosa vaginal de una paciente inmunocomprometida (Gass & Kobayashi, 1969), lo destaca entre los demás como un candidato idóneo para investigar con mayores detalles sus características tanto fenotípicas como genotípicas, con el objeto de extrapolar posibles asociaciones clínicas. La cepa Downs presenta un intervalo de temperatura para el cambio dimórfico más bajo (25-34 °C) que las cepas termotolerantes (25-37 °C) (Maresca & Carratù, 1992), por lo que aunque el aislamiento 993444 no se comportó como termosensible a 40 °C sería interesante determinar su conversión dimórfica a 34 °C, para identificar si comparte otros parámetros fenotípicos con la cepa Downs.

Los análisis fenotípicos finales asociados al tiempo de generación de la fase levaduriforme confirman que *H. capsulatum* es un microorganismo de crecimiento lento y que tiene diferentes intervalos de Tg, según los aislamientos estudiados. Los Tg variaron de 2:30 h (el más corto) a 12:45 h (el más largo), predominando en 15 aislamientos el intervalo de Tg de 5:30–9:45 h, siendo el primer valor de este intervalo asociado a las cepas de referencia de PA (G-186B) y de EUA (G-217B) y el último valor a otra cepa de EUA (Downs). Los Tg encontrados para las cepas de referencia y para la mayoría de los aislamientos estudiados concuerdan con el descrito por Berliner (1973) en condiciones artificiales de cultivo. Cabe destacar que los Tg más largos >9:45 h fueron registrados en la cepa Downs y en dos aislamientos, uno de MX (EH-359) y otro de CO (MZ 2) obtenidos de formas mucocutáneas con datos de inmunosupresión no asociada a VIH. Por otro lado, en un aislamiento de GT (H.1.02.W) y en la cepa de referencia de PA (G-186B), ambos procedentes de formas localizadas pulmonares no asociadas a VIH se desarrollaron bajos Tg (tabla 5).

Todos los datos anteriores sugieren una posible asociación entre los marcadores fenotípicos de los aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados con formas clínicas y distintos tipos de inmunosupresión, aunque no discrimina la procedencia geográfica de los mismos. Sin embargo, hay que tomar con cierta reserva las informaciones contenidas en las historias clínicas de los pacientes, al considerar que existen sesgos involuntarios en el momento de la captura y manejo de la información clínica.

El polimorfismo genético de los aislamientos y cepas de *H. capsulatum* estudiados fue determinado tanto por RAPD-PCR como por el análisis de las secuencias parciales de cuatro genes que codifican proteínas. La selección del RAPD sobre otros métodos de genotipificación previamente ensayados para *H. capsulatum* se debió a la amplia experiencia en este método por nuestro grupo de investigación, aunado a las bondades del mismo como, el requerir de pequeñas cantidades de DNA (nanogramos), no necesitar que el DNA sea exageradamente puro y ser de rápido procesamiento en el laboratorio. Se suman a sus ventajas el hecho de que bajo condiciones bien estandarizadas es muy reproducible. Los antecedentes favorables de este método fueron aportados por Kersulyte *et al.* (1992) quienes probaron 20 oligonucleótidos diferentes como iniciadores y posteriormente por Woods *et al.* (1993) quienes seleccionaron del trabajo anterior aquellos oligonucleótidos que produjeron suficientes bandas polimórficas para *H. capsulatum*, los cuales sirvieron para agrupar aislamientos del hongo y obtener resultados reproducibles. Por tal motivo, el RAPD-PCR es en el momento el método molecular de selección para discriminar diferencias sutiles entre grupos de aislamientos y cepas afines.

Para el desarrollo del RAPD se eligieron algunos oligonucleótidos de los probados con éxito por Kersulyte *et al.* (1992) y por Woods *et al.* (1993). Además estos oligonucleótidos y sus diferentes combinaciones han sido sistemáticamente utilizados en nuestro laboratorio con buenos resultados en la caracterización de aislamientos de distintas procedencias (Reyes-Montes *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Los resultados en diferentes ensayos mostraron la presencia predominante de una banda de 1.2 Kb en la mayoría de los aislamientos estudiados, con la particularidad de que no se reveló en los aislamientos de AR cuando se utilizó el iniciador 1281, lo que la convierte en un posible marcador regional. El análisis de los resultados de la genotipificación de los diferentes aislamientos por RAPD generados por UPGMA (Fig. 10), reveló que los aislamientos procedentes de MX, AR, CO y GT comparten similitudes genéticas que

permitieron su ubicación en una agrupación única (grupo I) aunque los discrimina claramente en subgrupos geográficamente definidos. Las cepas de referencia de PA y EUA forman grupos totalmente aparte. Los escasos aislamientos que no se agrupan de acuerdo con su origen geográfico provienen, posiblemente, de áreas geográficas no identificadas en sus respectivas historias clínicas. La confiabilidad de la agrupación se demostró por el valor de r cercano a 1.0, demostrando que el análisis generado no fue producto del azar, sino un fenómeno biológico real. La prueba del mejor punto de corte mostró que seis de los ocho aislamientos de AR, incluidos en el subgrupo Ib, presentaron una baja variabilidad genética entre ellos.

El análisis de AMOVA para el origen geográfico reveló que el 50.30 % de los aislamientos y cepas comparten características genéticas independientes de su origen geográfico y que la separación geográfica de los grupos ha facilitado la aparición de cambios genéticos dentro de cada grupo o población geográfica de aislamientos. Además, reveló que los aislamientos de Centro y Norteamérica (GT, EUA) están más relacionados entre sí, y a partir de ellos se relacionan los aislamientos de MX, CO, PA y AR, los cuales se encuentran más cercanos y se comportan como subpoblaciones. Por otro lado, el análisis por AMOVA de las formas clínicas destaca que el 85.39 % de información genética es compartida entre las poblaciones de aislamientos de *H. capsulatum*, independiente de su procedencia clínica. Este dato permite inferir que la manifestación clínica de *H. capsulatum* está más asociada a un mecanismo de presión del huésped (factores genéticos y/o adquiridos, entorno ambiental) que a una característica propia del patógeno.

Se observó entre los genes *H-anti* y *tub1* gran similitud como resultado de sus respectivos análisis, tanto por NJ como por MP. Asimismo, entre los genes *arf* y *ole* se detectaron pocas diferencias por ambos métodos. Es importante señalar que a pesar de que los análisis de NJ y MP presentaron variaciones en la estructura de grupos dentro de los árboles, destaca la alta consistencia y estrecha relación entre los aislamientos de AR con los cuatro genes estudiados. Estos hallazgos son sustentados además por el análisis del punto de corte, lo que permitió inferir que los aislamientos de AR son monomórficos para los caracteres analizados y posiblemente representan una estructura de población clonal. Tal planteamiento conduce a sugerir que el grupo de aislamientos de AR ha surgido recientemente en un pequeño punto evolutivo donde los alelos se fijaron casi totalmente en todos los loci. Una posible explicación práctica para la mayor homología entre los aislamientos procedentes de AR sería una relación

distinta del patógeno con su ambiente en esta zona geográfica (ambiente más seco, climas extremos), posiblemente asociado a áreas abiertas en donde se supone se infectaron la mayoría de los pacientes argentinos. En áreas abiertas, *H. capsulatum* estaría menos expuesto a presiones ambientales y de huéspedes silvestres, a diferencia de áreas cerradas donde prevalecen las condiciones más favorables para su desarrollo y esporulación. Un hecho bien conocido del estudio de la filogenia de poblaciones de *H. capsulatum* procedentes de EUA, es la observación de que tanto las cepas de la clase I como las de la clase II tienen origen clonal, lo que apoya lo antes referido ya que en los EUA prevalece la histoplasmosis endémica, asociada a adquisición en espacios abiertos (parque públicos y bosques).

Sin embargo, una estructura de población recombinante de *H. capsulatum* sería más factible de detectarse en áreas cerradas, donde prevalecen ambientes saturados con el patógeno y éste, estaría además bajo presión de una micro- y macrobiota asociada; factores que podrían favorecer mecanismos de recombinación genética que conducirían a una mayor diversidad del hongo.

Con base en el análisis de fragmentos de los cuatro genes, los aislamientos de MX, CO y GT no discriminaron subgrupos geográficos como se observó en la agrupación de los perfiles de RAPD-PCR generada por UPGMA. Aunque estos aislamientos formaron un grupo único, esta agrupación única hay que tomarla con reserva, al considerar el valor de punto de corte que reveló gran diversidad entre ellos.

El análisis de las topologías de los cuatro genes estudiados por NJ y MP, reveló concordancia sólo en los aislamientos de AR aunado a uno de CO. Se observó además que la cepa Downs y los aislamientos EH-323, 01739 y 01558, se unieron al grupo de AR de manera independiente en algunas de sus topologías para los cuatro genes. En cambio, los aislamientos de MX, CO y GT no presentaron concordancia entre sus topologías.

El comportamiento independiente de las cepas de referencia apoya el concepto de que los grupos estudiados se encuentran en clados distintos a estas cepas.

De acuerdo con los bajos valores de diversidad y divergencia nucleotídicas obtenidos del análisis de los cuatro genes secuenciados, se sugiere que éstos son conservados, aunque fueron útiles para discriminar diferencias genéticas entre aislamientos y cepas. Asimismo, los bajos valores de π apoyan la existencia de una población homogénea de *H. capsulatum* revelada entre los aislamientos estudiados, siendo el gen *ole* el que presenta menor polimorfismo por lo que es el más conservado,

y lo apoya como candidato para estudios de distancia evolutiva, mientras que los genes *arf* y *tub1* asociados a valores más incrementados de π serían los posibles candidatos para estudios de microevolución. La posibilidad de encontrar genes más polimórficos debería ser la opción recomendable además de aquellos que sean especie-específicos, como el gen *H-anti* que codifica para un antígeno proteico del hongo asociado a la infección activa. Recientemente, se está utilizando para analizar aislamientos de *H. capsulatum* la secuencia de una clona de cDNA (Hcp 100) que se expresa por la adherencia de las levaduras del hongo a macrófagos murinos, con la reserva de que esta clona está asociada a una proteína co-activadora de 100 kDa importante para el desarrollo de mamíferos y del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Colona-Romano *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2004b).

El presente estudio ha aportado información relevante en el conocimiento de aislamientos fúngicos de distintos orígenes geográficos y procedencias clínicas y tiene el mérito de haber considerado un número importante de aislamientos. Esperamos que la secuencia del genoma de *H. capsulatum* con base en las cepas G-217B y G-186AR permita avanzar más en el entendimiento y conocimiento de las diferentes manifestaciones fenotípicas y genotípicas del patógeno asociadas con su entorno.

CONCLUSIONES

Todos los aislamientos se comportaron como termotolerantes a excepción de la cepa de referencia Downs, lo que confirmó su prototipo de termosensibilidad.

Un aislamiento de AR (993444), presentó una fase-lag prolongada tanto a 37 como a 40 °C, hecho sólo compartido por la cepa Downs a 37 °C. Esta observación sugiere un proceso de adaptación lento para ambos especímenes, en las condiciones experimentales utilizadas.

Los análisis fenotípicos asociados al tiempo de generación de la fase levaduriforme, confirman que *H. capsulatum* es un microorganismo de crecimiento lento y que tiene diferentes intervalos de Tg, dependiendo de los aislamientos estudiados.

El iniciador 1281 evidenció una banda particular de 1.2 Kb, en la mayoría de los aislamientos estudiados con excepción de los aislamientos de AR, lo que convierte a esta banda en un posible marcador regional.

Los perfiles de RAPD-PCR de los aislamientos procedentes de MX, AR, CO y GT analizados por métodos de agrupación revelaron similitudes genéticas entre ellos al generar una agrupación única (grupo I), aunque los separó en subgrupos geográficamente muy definidos. La prueba del mejor punto de corte mostró que seis de los ocho aislamientos de AR incluidos en el subgrupo Ib presentaron una baja variabilidad genética entre ellos y que los aislamientos de MX, CO y GT revelaron alta variabilidad genética.

El análisis por AMOVA del perfil de RAPD-PCR mostró que entre los aislamientos estudiados no hay una relación entre la forma clínica de la enfermedad por lo que se sugiere que la manifestación clínica de *H. capsulatum* podría estar más asociada a un mecanismo de presión del huésped (factores genéticos y/o adquiridos, entorno ambiental) que a una característica propia del patógeno.

La alta consistencia y estrecha relación entre los aislamientos de AR con los cuatro genes estudiados y en los dos análisis realizados (NJ y MP), permitió inferir que estos

aislamientos son monomórficos y posiblemente representan una estructura de población clonal. Por otro lado no existe concordancia en la topología de los cuatro genes para los aislamientos de MX, CO y GT.

De acuerdo con los bajos valores de diversidad y divergencia nucleotídicas obtenidos del análisis de los cuatro genes secuenciados, se sugiere que éstos son bastante conservados. Asimismo, los bajos valores de π apoyan la existencia de una población homogénea de *H. capsulatum* revelada entre los aislamientos estudiados.

PERSPECTIVAS

Con el propósito de optimizar la resolución entre los resultados se procederá a combinar los datos para las cuatro secuencias de genes estudiados mediante una prueba de congruencia, analizando los datos separadamente antes de combinarlos, con el fin de definir la estructura de población de los aislamientos estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

Amaral D, Costa SOP, Schwab A, De Oliveira ENS, Branco CL, Cury A, Travassos LR. 1967. Fisiología de microorganismos. Crecimiento de microorganismos, p. 59-83. In: *Experimentos de Microbiología Geral*. Ministério da Educação e Cultura e Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Berliner, MD. 1973. *Histoplasma capsulatum*: effects of pH on the yeast and mycelial phases *in vitro*. *Sabouraudia* **11**:267-270.

Bremer K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* **42**:795-803.

Canteros C, Zuiani F, Perrotta D, Reyes-Montes MR, Granados J, Zuñiga G, Taylor ML, Davel G. 2004. Electrophoretic karyotypes of several clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Latin America. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (Submitted).

Carr J, Shearer JR. 1998. Genome size, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* **24**:6697-6703.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. 1997. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* **18**:1047-1053.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. 1996. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2577-2584.

Carter D, Kasuga T, White T, Bui T, Taylor J. 2000. *Histoplasma* and molecular typing, p. 67. In: Abstract's book 14th ISHAM 2000 Argentina, May 8 – 12, Buenos Aires.

Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. 2001. Amplified single-nucleotide polymorphisms and (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genet. Biol.* **34**:37-48.

Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1998. 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. Mex.* **11**:187-191.

Chick EW, Compton SB, Pass HT, Mackey B, Hernández C, Austin JRE, Pitzer FR, Flanagan C. 1981. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. *Chest* **80**:434-438.

Donoghue MJ, Olmstead RG, Smith JF, Palmer JD. 1992. Phylogenetic relationships of Dipsacales base on *rbcl* sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **79**:333-345.

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

Eissenberg LG, Goldman WE. 1994. The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* **1**:265-283.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491.

Farris SJ, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**:315-319.

Gass M, Kobayashi GS. 1969. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch. Dermatol.* **100**:724-727.

Gaur P, Lichtwardt RW, Hamrick JL. 1981. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Environ. Mycol.* **5**:69-77.

González-Ochoa A. 1963. Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Méx.* **23**:81-86.

Hasegawa M, Kishino H, Yano TA. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**:160-174.

Higgins DG, Sharp PM. 1988. Clustal: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**:237-244.

Hu J, Van-Eysden J, Quiros CF. 1995. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions, p. 346-351. In: *PCR Methods and Applications*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hwang L, Hocking-Murray D, Bahrami AK, Andersson M, Rine J, Sil A. 2003. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using genomic shotgun microarray. *Mol. Biol. Cell.* **14**:2314-2326.

Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, Lee CH. 2000. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **38**:241-245.

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

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva-Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negrone R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* **12**:3383-3401.

- Keath EJ, Abidi FE. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of *yps-3*, a yeast-phase-specific gene in the dimorphic pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Microbiol.* **140**:759-767.
- Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1992. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2104-2107.
- Keath EJ, Paiter AA, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in the thermotolerance and virulence. *Infect. Immun.* **57**:1384-1390.
- Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* **174**:7075-7079.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. *Medical Mycology*. 3th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Manly JF. 1997. Randomization bootstrap and montecarlo. In: *Methods in Biology*. Chapman and Hall, London.
- Maresca B, Carratù L. 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol. Today*. **8**:260-266.
- McKinsey DS, Spiegel RA, Hutwagner L, Stanford J, Driks MR, Brewer J, Gupta MR, Smith DL, O'Connor MC, Dall L. 1997. Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: Incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clin. Infect. Dis.* **24**:1195-1203.
- Medeiros-Muniz M, Vera-Pizzini C, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira R. 2001. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4487-4494.
- Nei M, Li W-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* **76**:5269-5273.
- Nybom H, Bartish IV. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **32**:99-114.
- Ouchterlony O, Nilsson. LA. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, p.19.1-19.44. In: Weir DM (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Patel JB, Batanghari JW, Goldman WE. 1998. Probing the yeast phase-specific expression of the *CBP1* gene in *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* **180**:1786-1792.

Pavliček A, Hrdá Š, Flegr J. 1999. FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jack knife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frankelia*. *Folia Biologica* **45**:97-99.

Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y. 1998. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3073-3076.

Retallack DM, Woods JP. 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Microbes Infect.* **1**:817-825.

Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1998. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **11**:195-201.

Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1999. 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.* **37**:1404-1408.

Rohlf FJ. 1998. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter Software Inc., New York.

Romero-Martínez R, Canteros C, Taylor ML. 2004. Variabilidad cromosómica intraespecífica en hongos patógenos de humanos: aportaciones en el modelo *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* (Submitted).

Salas-Ríos MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML. 1998. Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **11**:202-207.

Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Taxonomic structure, p. 188-305. In: *Numerical Taxonomy*. WH Freeman and Co., San Francisco.

Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **57**:1409-1412.

Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. 1990. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* **162**:258-261.

Steele PE, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **9**:983-987.

Strauss RE. 1982. Statistical significance of species clusters in association analysis. *Ecology* **63**:634-669.

Tamura M, Kasuga T, Watanabe K, Katsu M, Mikami Y, Nishimura K. 2002. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **43**:11-19.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* **30**:207-212.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Zúñiga G. 2004a. Genetic polymorphism patterns of the pathogen *Histoplasma capsulatum* recovered from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (Submitted).

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. 1999a. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**:914-919.

Taylor ML, Granados J, Toriello C. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* **39**:375-379.

Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montañón-Ortiz G, Pedroza-Serés M. 2000b. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gac. Méd. Méx.* **123**:441-448.

Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. 1997a. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* **138**:137-141.

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

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. 1997b. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* **23**:58-63.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. 1999b. In: *Catálogo de Cepas de Histoplasma capsulatum*. Editorial Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>).

Taylor ML, Ruíz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Alvarez RO, Roldán Y, Romero-Martínez R, Sahaza J, Sifuentes-Osornio J, Soto-Román L, Peña-Sandoval GR, Uribe AJ, Rodríguez-Soria LJ. 2004b. Identification of the infection source

of an unusual histoplasmosis outbreak, in a hotel of Acapulco, GR, Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (Submitted).

Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C. 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. *Rev. Mex. Mic.* **10**:49-62.

Templeton A. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution* **37**:221-244.

Tewari RP, Kegel H. 1971. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* **44**:231-240.

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

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876-4882.

Vargas-Yáñez R, Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML. 1998. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* **11**:192-194.

Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. 1986. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J. Bacteriol.* **165**:813-818.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction based epidemiological and clinical studies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:463-464.

Tabla 1

Datos de los aislamientos y cepas de *H. capsulatum* estudiados

N°	Registro en la colección	Acrónimo	Año de aislamiento	País de origen	Forma clínica	Inmuno-compromiso
1	EH-303	H.1.02.W	1995	GT	PL	
2	EH-316	EH-316	1993	MX	D	VIH +
3	EH-317	EH-317	1992	MX	D	VIH +
4	EH-319	EH-319	1991	MX	D	VIH +
5	EH-323	EH-323	1993	MX	D	VIH +
6	EH-324	EH-324	1994	MX	D	VIH +
7	EH-325	EH-325	1996	MX	D	VIH +
8	EH-326	EH-326	1996	MX	D	VIH +
9	EH-327	EH-327	1991	MX	D	VIH +
10	EH-328	EH-328	1991	MX	D	VIH +
11	EH-331	G-186B	1967	PA	PL	ND
12	EH-335	G-217B		EUA		ND
13	EH-336	Downs	1969	EUA	MC	Diabetes
14	EH-355	EH-355		MX	ND	VIH +
15	EH-356	EH-356		MX	ND	VIH +
16	EH-357	EH-357	1996 o antes	MX	D	VIH +
17	EH-359	EH-359	1995	MX	MC	ND
18	EH-364	H.1.12.96	1996	GT	MC	ND
19	EH-417	92590	1992	AR	MC	VIH +
20	EH-419	951814	1999 o antes	AR	MC	VIH +
21	EH-420	993444	1999 o antes	AR	MC	VIH +
22	EH-421	993445	1999 o antes	AR	MC	VIH +
23	EH-422	993446	1999 o antes	AR	MC	VIH +
24	EH-424	993267	1999 o antes	AR	MC	VIH +
25	EH-536	LA	1996	CO	D	VIH +
26	EH-537	WCh	1997	CO	MC	VIH +
27	EH-538	GLI	1999	CO	MC	VIH +
28	EH-539	DS	1997	CO	D	ND
29	EH-540	AP		CO	D	ND
30	EH-541	LF		CO	D	ND
31	EH-542	RG		CO	PL	VIH +
32	EH-543	WE	1996	CO	PL	VIH +
33	EH-544	JG		CO	MC	VIH +
34	EH-547	MZ 2	1995 o antes	CO	MC	LES
35	EH-548	01558	2001	AR	MC	VIH +
36	EH-550	01739	2001	AR	MC	VIH +
37	EH-551	GeM	2001 o antes	CO	ND	ND

GT = Guatemala; MX = México; PA = Panamá; EUA = Estados Unidos de América; AR = Argentina; CO = Colombia; PL = Pulmonar localizada; D = Diseminada; MC = Mucocutánea; ND = No determinado; LES = Lupus eritematoso sistémico.

Tabla 2

Registro de lecturas de DO a 37 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum*

Aislamientos	$\bar{X} \pm SD t_0$	$\bar{X} \pm SD t_3$	$\bar{X} \pm SD t_6$	$\bar{X} \pm SD t_{12}$	$\bar{X} \pm SD t_{24}$	$\bar{X} \pm SD t_{30}$
EH-316	0.258 ± 0.010	0.292 ± 0.009	0.546 ± 0.011	1.074 ± 0.004	1.085 ± 0.011	1.079 ± 0.006
EH-317	0.218 ± 0.004	0.227 ± 0.001	0.314 ± 0.002	0.710 ± 0.007	0.934 ± 0.005	0.957 ± 0.006
EH-319	0.186 ± 0.021	0.611 ± 0.028	1.084 ± 0.019	1.142 ± 0.014	1.128 ± 0.012	1.173 ± 0.021
EH-323	0.207 ± 0.009	0.356 ± 0.011	0.653 ± 0.010	0.878 ± 0.006	0.958 ± 0.009	0.956 ± 0.010
EH-324	0.164 ± 0.002	0.169 ± 0.002	0.247 ± 0.002	0.669 ± 0.007	0.932 ± 0.005	0.947 ± 0.006
EH-325	0.255 ± 0.006	0.421 ± 0.005	0.704 ± 0.004	0.893 ± 0.003	0.957 ± 0.004	0.951 ± 0.005
EH-326	0.167 ± 0.002	0.413 ± 0.005	0.645 ± 0.007	0.851 ± 0.010	0.966 ± 0.006	0.959 ± 0.009
EH-328	0.167 ± 0.002	0.170 ± 0.002	0.225 ± 0.002	0.641 ± 0.003	0.917 ± 0.006	0.940 ± 0.006
EH-355	0.235 ± 0.003	0.420 ± 0.007	0.716 ± 0.005	0.925 ± 0.003	1.004 ± 0.005	0.993 ± 0.005
EH-356	0.216 ± 0.002	0.223 ± 0.005	0.256 ± 0.004	0.397 ± 0.010	1.027 ± 0.007	0.918 ± 0.004
EH-359	0.230 ± 0.013	0.354 ± 0.032	0.525 ± 0.037	0.671 ± 0.125	0.781 ± 0.046	0.819 ± 0.049
993444	0.212 ± 0.008	0.219 ± 0.012	0.219 ± 0.015	0.220 ± 0.012	0.927 ± 0.028	1.043 ± 0.037
993445	0.225 ± 0.019	0.463 ± 0.032	0.678 ± 0.086	0.959 ± 0.070	0.976 ± 0.080	1.031 ± 0.039
993267	0.220 ± 0.012	0.285 ± 0.021	0.399 ± 0.015	0.783 ± 0.049	0.932 ± 0.034	1.000 ± 0.017
993446	0.224 ± 0.016	0.317 ± 0.014	0.494 ± 0.043	0.814 ± 0.094	0.959 ± 0.072	1.009 ± 0.036
01739	0.286 ± 0.001	0.448 ± 0.007	0.548 ± 0.007	0.714 ± 0.007	0.804 ± 0.010	0.804 ± 0.012
LA	0.228 ± 0.007	0.312 ± 0.008	0.650 ± 0.015	0.924 ± 0.017	1.005 ± 0.064	1.074 ± 0.065
AP	0.176 ± 0.036	0.213 ± 0.013	0.476 ± 0.011	0.866 ± 0.024	0.972 ± 0.031	0.983 ± 0.022
WE	0.252 ± 0.007	0.492 ± 0.010	0.756 ± 0.013	0.927 ± 0.018	1.055 ± 0.031	1.038 ± 0.016
MZ 2	0.282 ± 0.002	0.427 ± 0.003	0.516 ± 0.007	0.705 ± 0.015	0.777 ± 0.007	0.795 ± 0.039
GeM	0.200 ± 0.002	0.366 ± 0.005	0.512 ± 0.009	0.678 ± 0.011	0.771 ± 0.011	0.772 ± 0.011
H.1.02.W	0.234 ± 0.002	0.251 ± 0.002	0.436 ± 0.004	0.698 ± 0.009	0.693 ± 0.015	0.805 ± 0.010
G-186B	0.236 ± 0.007	0.364 ± 0.010	0.780 ± 0.008	0.872 ± 0.008	0.951 ± 0.083	0.988 ± 0.066
G-217B	0.184 ± 0.005	0.249 ± 0.015	0.425 ± 0.007	0.932 ± 0.011	1.066 ± 0.019	1.079 ± 0.015
Downs	0.215 ± 0.015	0.214 ± 0.016	0.214 ± 0.017	0.209 ± 0.018	0.683 ± 0.038	0.903 ± 0.026

$\bar{X} \pm SD$ = Promedio de 12 lecturas ± desviación estándar.

Tabla 3

Registro de lecturas de DO a 40 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum*

Aislamiento s	$\bar{X} \pm SD t_0$	$\bar{X} \pm SD t_3$	$\bar{X} \pm SD t_6$	$\bar{X} \pm SD t_{12}$	$\bar{X} \pm SD t_{24}$	$\bar{X} \pm SD t_{30}$
EH-316	0.266 ± 0.008	0.292 ± 0.006	0.552 ± 0.008	0.978 ± 0.022	1.046 ± 0.028	0.959 ± 0.020
EH-317	0.220 ± 0.002	0.229 ± 0.002	0.361 ± 0.005	0.777 ± 0.010	0.900 ± 0.010	0.913 ± 0.017
EH-319	0.207 ± 0.005	0.620 ± 0.008	0.951 ± 0.016	1.054 ± 0.027	1.001 ± 0.025	0.860 ± 0.025
EH-323	0.215 ± 0.003	0.416 ± 0.005	0.731 ± 0.006	0.899 ± 0.007	0.946 ± 0.011	0.959 ± 0.023
EH-324	0.164 ± 0.001	0.174 ± 0.002	0.299 ± 0.007	0.750 ± 0.012	0.887 ± 0.022	0.913 ± 0.028
EH-325	0.264 ± 0.002	0.477 ± 0.010	0.775 ± 0.009	0.925 ± 0.012	0.946 ± 0.010	0.963 ± 0.033
EH-326	0.165 ± 0.003	0.539 ± 0.006	0.690 ± 0.009	0.854 ± 0.007	0.913 ± 0.012	0.913 ± 0.021
EH-328	0.173 ± 0.001	0.173 ± 0.002	0.288 ± 0.009	0.741 ± 0.010	0.888 ± 0.014	0.939 ± 0.023
EH-355	0.234 ± 0.002	0.474 ± 0.020	0.762 ± 0.007	0.922 ± 0.005	0.966 ± 0.011	0.994 ± 0.026
EH-356	0.218 ± 0.002	0.236 ± 0.002	0.280 ± 0.004	0.574 ± 0.016	1.061 ± 0.017	1.124 ± 0.019
EH-359	0.255 ± 0.008	0.407 ± 0.010	0.548 ± 0.013	0.634 ± 0.013	0.630 ± 0.023	0.675 ± 0.017
993444	0.210 ± 0.013	0.208 ± 0.009	0.209 ± 0.012	0.229 ± 0.010	0.807 ± 0.028	0.803 ± 0.041
993445	0.230 ± 0.017	0.456 ± 0.023	0.701 ± 0.044	0.775 ± 0.037	0.867 ± 0.023	0.841 ± 0.031
993267	0.277 ± 0.012	0.340 ± 0.009	0.434 ± 0.021	0.747 ± 0.058	0.854 ± 0.074	0.933 ± 0.081
993446	0.243 ± 0.010	0.356 ± 0.012	0.463 ± 0.021	0.666 ± 0.033	0.766 ± 0.058	0.819 ± 0.114
01739	0.288 ± 0.001	0.487 ± 0.009	0.549 ± 0.007	0.639 ± 0.017	0.675 ± 0.011	0.696 ± 0.015
LA	0.230 ± 0.007	0.370 ± 0.012	0.755 ± 0.017	0.851 ± 0.020	0.910 ± 0.048	0.880 ± 0.041
AP	0.129 ± 0.006	0.275 ± 0.018	0.680 ± 0.020	0.939 ± 0.026	0.872 ± 0.050	0.918 ± 0.036
WE	0.244 ± 0.013	0.571 ± 0.007	0.817 ± 0.008	0.950 ± 0.008	1.027 ± 0.009	1.016 ± 0.017
MZ 2	0.279 ± 0.002	0.461 ± 0.011	0.526 ± 0.013	0.627 ± 0.012	0.650 ± 0.016	0.649 ± 0.016
GeM	0.205 ± 0.002	0.421 ± 0.009	0.501 ± 0.012	0.602 ± 0.018	0.670 ± 0.014	0.676 ± 0.014
H.1.02.w	0.235 ± 0.001	0.280 ± 0.004	0.550 ± 0.006	0.668 ± 0.021	0.637 ± 0.020	0.706 ± 0.021
G-186B	0.237 ± 0.006	0.501 ± 0.014	0.842 ± 0.016	0.837 ± 0.037	0.915 ± 0.043	0.975 ± 0.038
G-217B	0.188 ± 0.005	0.285 ± 0.007	0.637 ± 0.027	0.968 ± 0.014	0.998 ± 0.059	1.036 ± 0.037
Downs	0.235 ± 0.012	0.223 ± 0.008	0.223 ± 0.008	0.213 ± 0.007	0.205 ± 0.017	0.224 ± 0.030

$\bar{X} \pm SD$ = Promedio de 12 lecturas ± desviación estándar.

Tabla 4

Resultado de la Inhibición del crecimiento de levaduras de los aislamientos de *H. capsulatum* a 40 °C

Aislamientos y cepas	% Inhibición				
	t3	t6	t12	t24	t30
EH-316	23.5	0.7	12.7	5.7	15.6
EH-317	0.0	0.0	41.4	5.0	6.2
EH-319	2.8	17.1	11.4	15.7	33.8
EH-323	0.0	0.0	0.0	2.7	0.7
EH-324	0.0	0.0	0.0	5.9	4.3
EH-325	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0
EH-326	0.0	0.0	0.0-	6.4	5.6
EH-328	-	0.0	0.0-	4.7	0.9
EH-355	0.0	0.0	0.3	4.8	0.0
EH-356	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EH-359	0.0	0.7	14.1	31.9	28.7
993444	-	-	-	16.5	28.6
993445	5.0	-	25.7	15.2	24.2
993267	3.1	12.3	16.5	19.0	15.9
EH-424	0.0	18.5	28.3	28.8	26.6
01739	0.0	0.4	18.0	25.3	21.2
LA	0.0	0.0	10.8	12.5	23.2
AP	0.0	0.0	0.0	6.7	2.2
WE	0.0	0.0	0.0	2.5	1.8
MZ 2	0.0	0.0	17.7	25.1	27.9
GeM	0.0	5.1	16.9	18.6	17.7
H.1.02.w	0.0	0.0	6.7	12.4	17.5
G-186B	0.0	0.0	5.7	5.2	1.9
G-217B	0.0	0.0	0.0	8.2	5.3
Downs	-	-	-	100.0	100.0

El % I se calculó con base en la fórmula descrita en materiales y métodos.

(-) = no se alcanza a expresar el porcentaje de I por ausencia de crecimiento en ambas temperaturas.

Tabla 5

Tiempos de generación (Tg) a 37 °C para la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum*

Aislamientos y cepas	Tg (h)	Aislamientos y cepas	Tg (h)
EH-316	5:00	993445	7:45
EH-317	5:30	993267	6:30
EH-319	2:30	01739	8:00
EH-323	7:00	LA	5:30
EH-324	5:45	AP	5:30
EH-325	8:00	WE	9:30
EH-326	8:30	MZ2	12:45
	10:15		7:45
EH-328		GeM	
EH-355	7:30	H.1.02.W	4:45
EH-356	7:30	G-186B	5:30
EH-359	11:15	G-217B	5:30
	6:45		9:45
993444		Downs	

El cálculo del Tg se realizó con base en los procedimientos descritos en materiales y métodos.

Tabla 7

Matriz de Fst pareadas para el origen geográfico

	MX	CO	PA	EUA	GT	AR
MX	0.0					
CO	0.4063	0.0				
PA	0.4267	0.6034	0.0			
EUA	0.2548	0.3277	0.25	0.0		
GT	0.3139	0.3196	0.7111	0.0652	0.0	
AR	0.5198	0.6502	0.8698	0.6703	0.7463	0.0

MX- México; CO- Colombia; PA- Panamá; EUA- Estados Unidos de América; GT- Guatemala; AR- Argentina.

Tabla 8

Matriz de Fst pareadas para la forma clínica

	D	ND	MC	PL
D	0.0			
ND	0.0765	0.0		
MC	0.1808	0.1625	0.0	
PL	0.1029	0.0	0.1584	0.0

D- diseminada; ND- no determinada; PL- pulmonar localizada; MC- mucocutánea

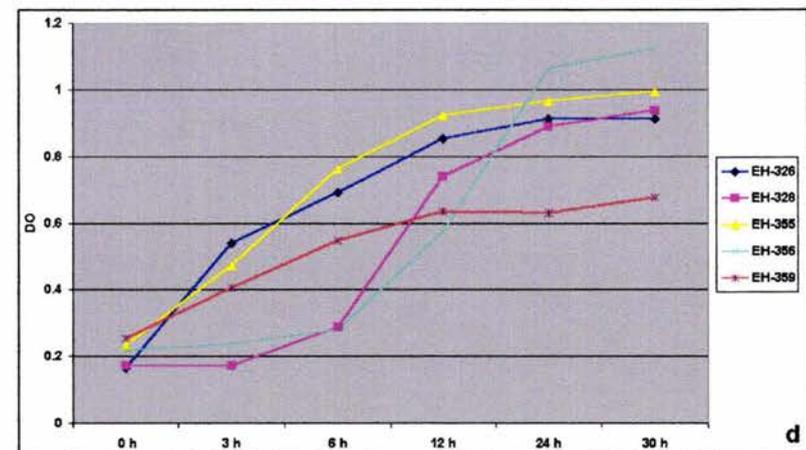
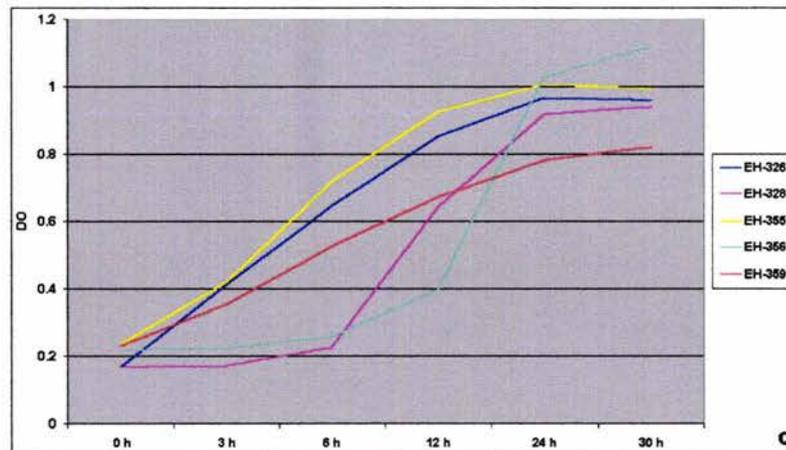
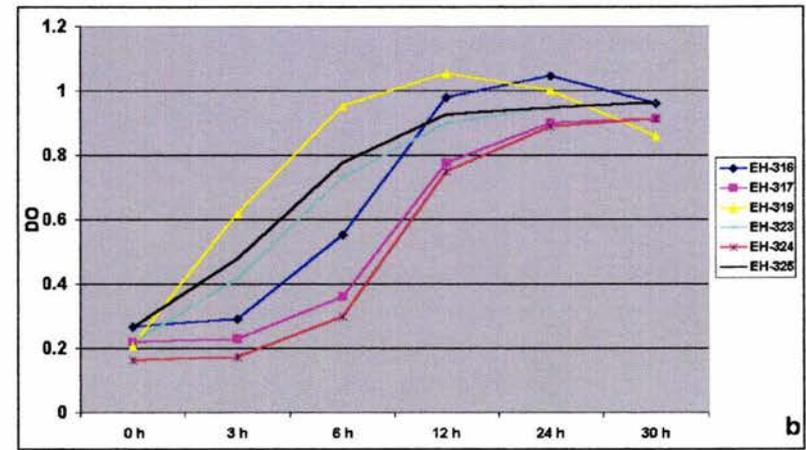
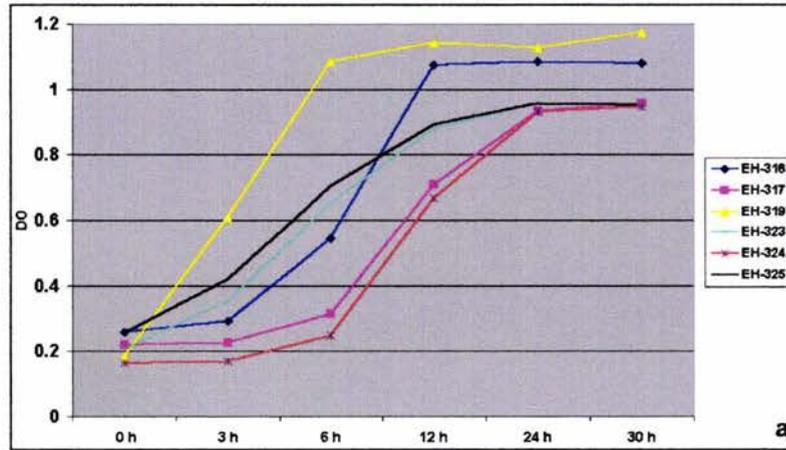


Figura 1 (a - d). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de México. Para la obtención de las curvas de crecimiento se siguieron los procedimientos descritos en materiales y métodos. a y c) curvas a temperatura de incubación de 37 °C; b y d) curvas a temperatura de incubación de 40 °C.

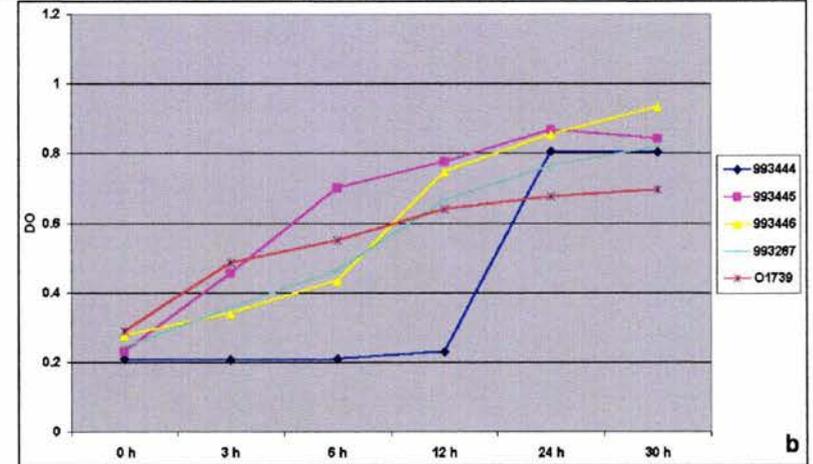
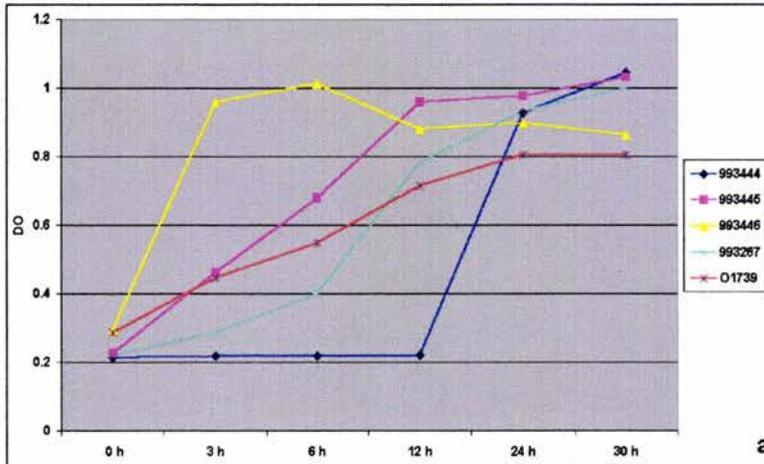


Figura 2 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de Argentina. Para la obtención de las curvas de crecimiento se siguieron los procedimientos descritos en materiales y métodos. a) curvas a temperatura de incubación de 37 °C; b) curvas a temperatura de incubación de 40 °C.

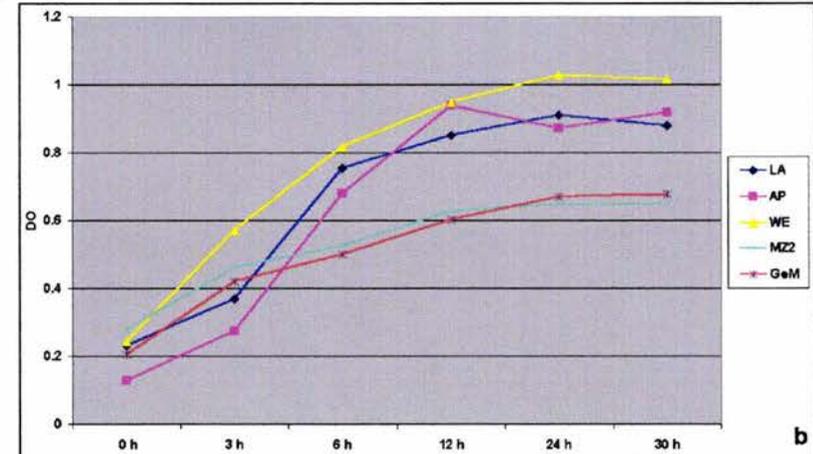
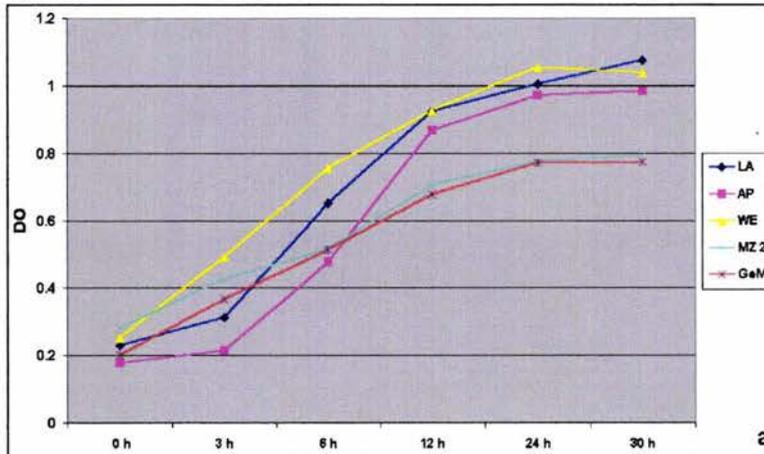


Figura 3 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de Colombia. Para la obtención de las curvas de crecimiento se siguieron los procedimientos descritos en materiales y métodos. a) curvas a temperatura de incubación de 37 °C; b) curvas a temperatura de incubación de 40 °C.

Relación Genética Entre Aislamientos de *H. capsulatum*

Asociados a Diferentes Formas Clínicas y Distribución Geográfica

Jorge H. Sahaza

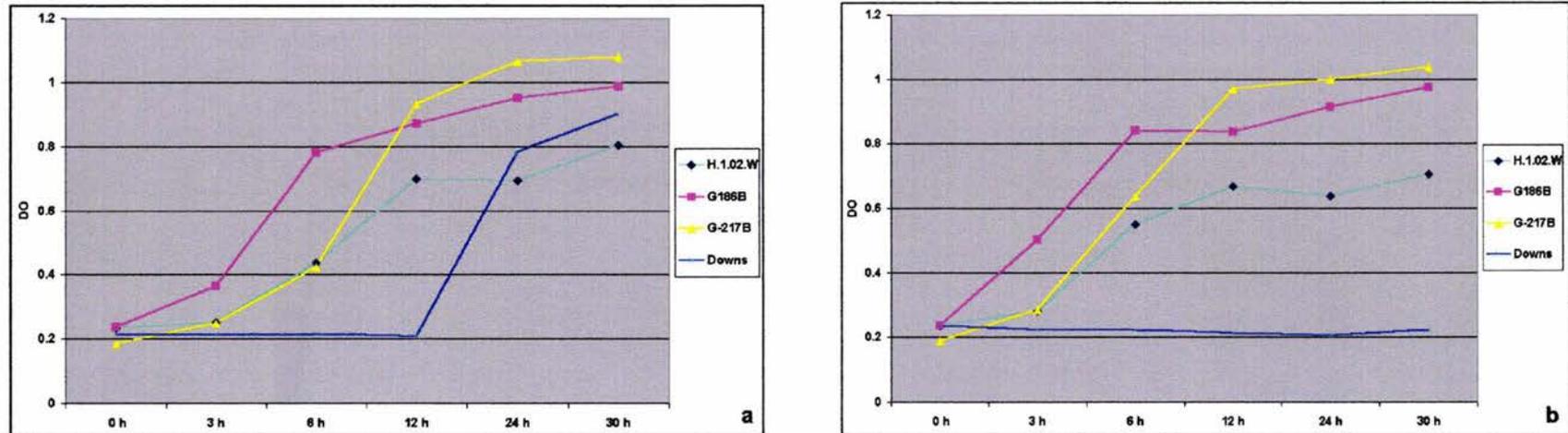


Figura 4 (a, b). Curvas de crecimiento de la fase levaduriforme de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de Guatemala y de las cepas de referencia. Para la obtención de las curvas de crecimiento se siguieron los procedimientos descritos en materiales y métodos. a) curvas a temperatura de incubación de 37 °C; b) curvas a temperatura de incubación de 40 °C.

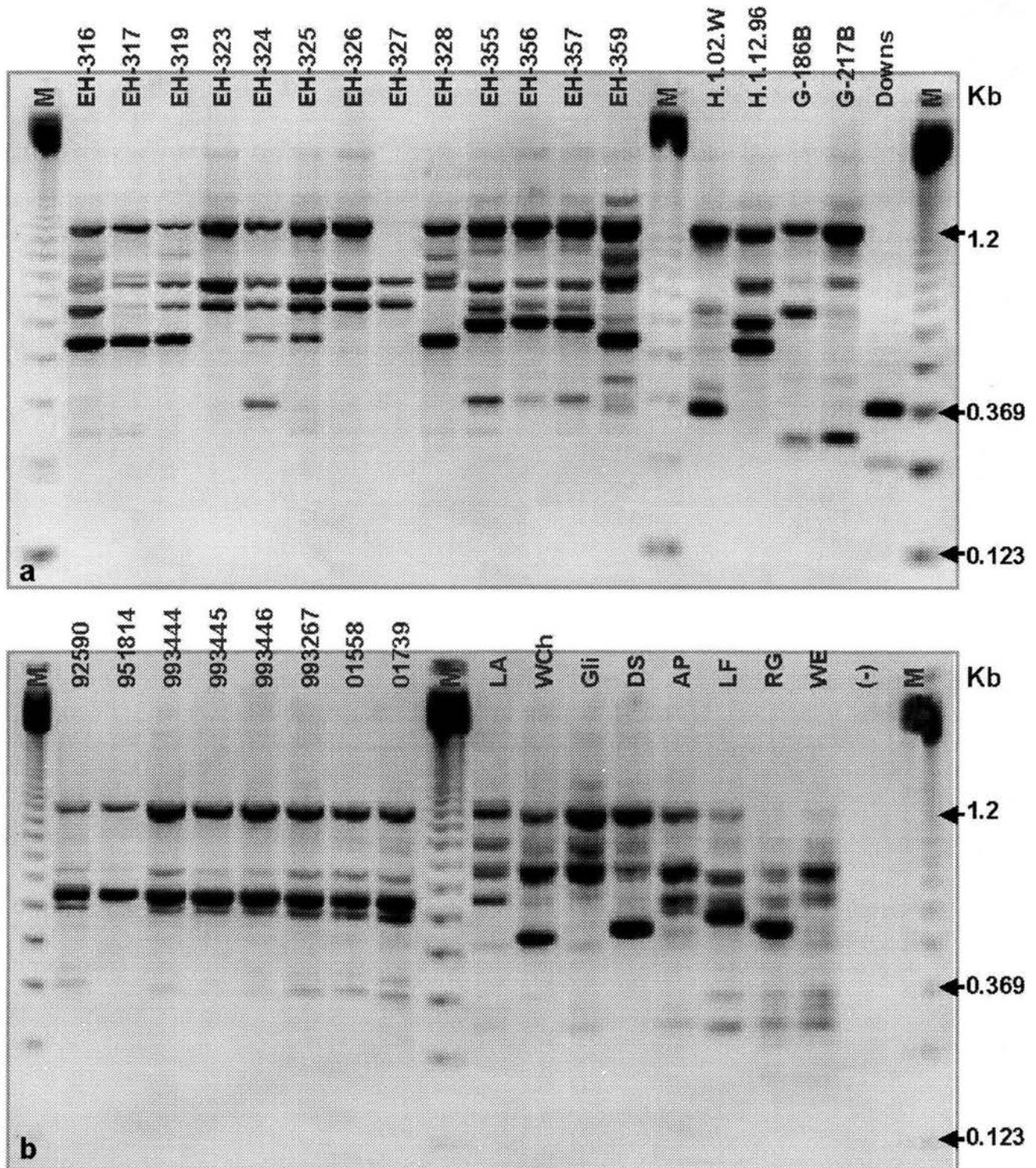


Figura 6. RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1253. Detalles del procedimiento vienen descritos en materiales y métodos. a) Aislamientos de México (carriles 2-14), aislamientos de Guatemala (carriles 16 y 17); b) Aislamientos de Argentina (carriles 2-8), aislamientos de Colombia (carriles 10 y 17). M-estándar de pares de bases (123 bp DNA Ladder).

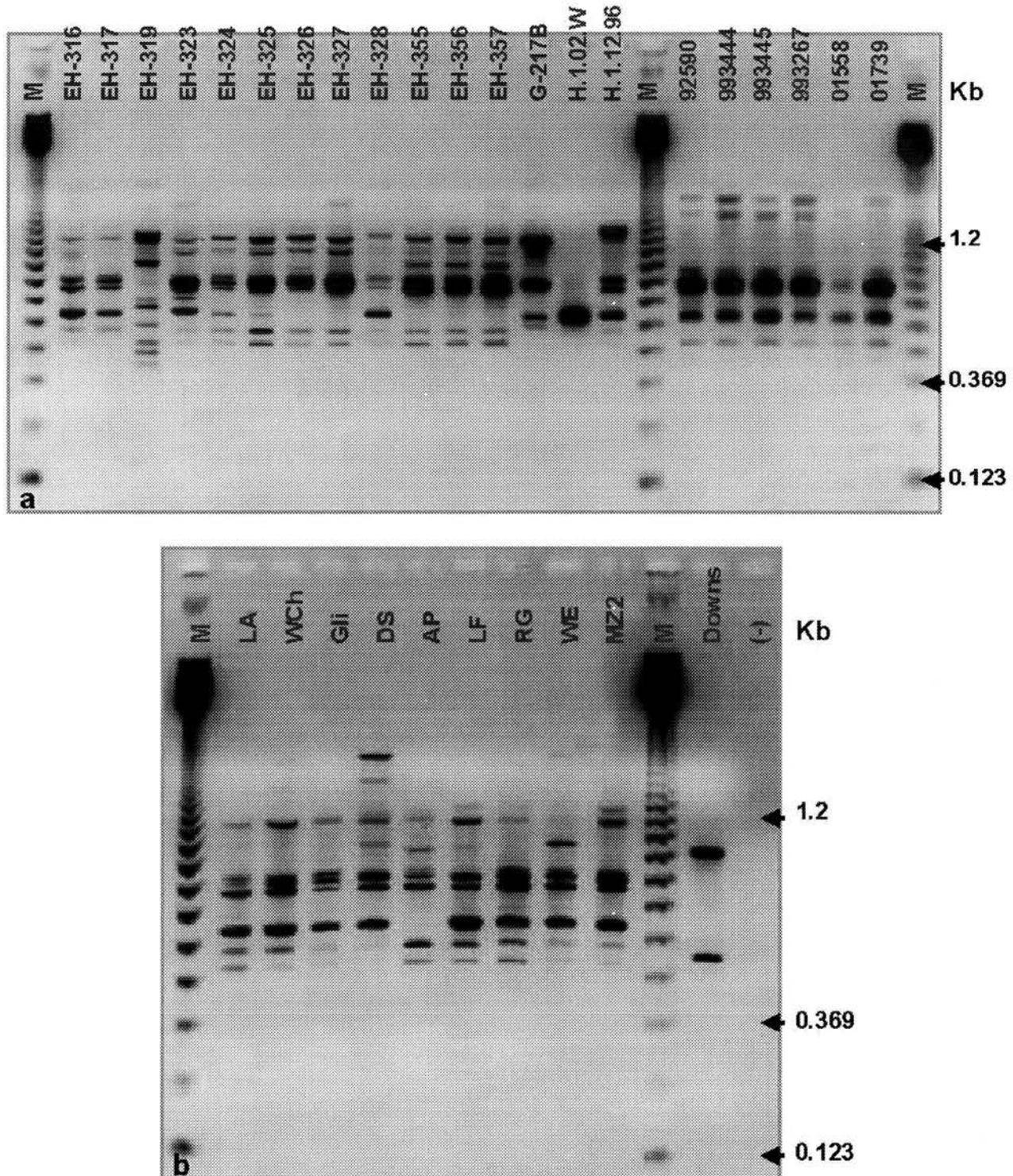


Figura 7. RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1281. Detalles del procedimiento vienen descritos en materiales y métodos. a) Aislamientos de México (carriles 2-13), cepa de referencia carril 14, aislamientos de Guatemala (carriles 15 y 16), aislamientos de Argentina (carriles 18-23); b) Aislamientos de Colombia (carriles 2-9), cepa de referencia Downs carril 10. M-estándar de pares de bases (123 bp DNA Ladder).

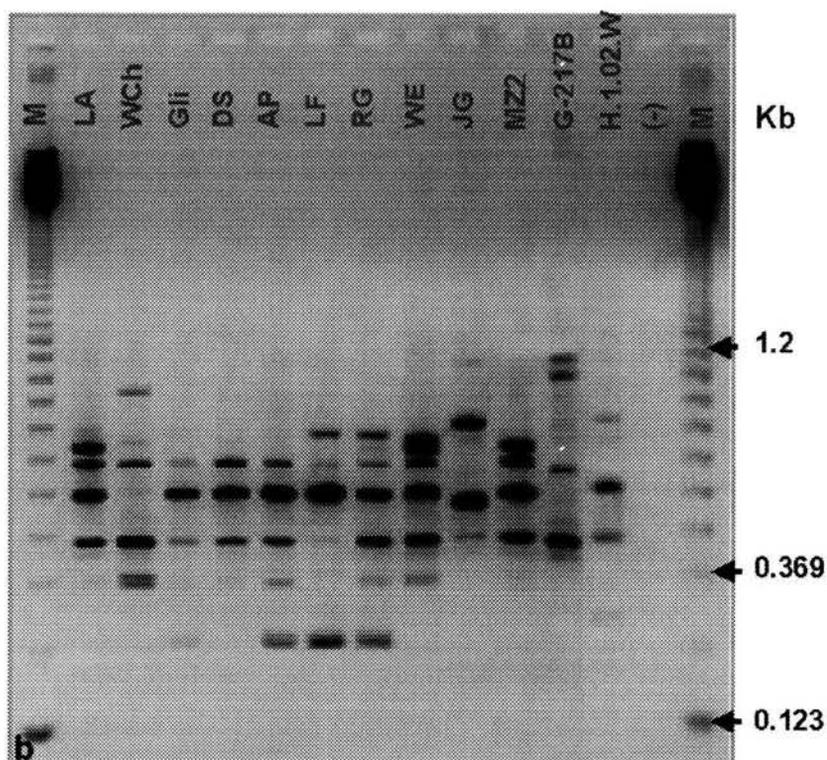
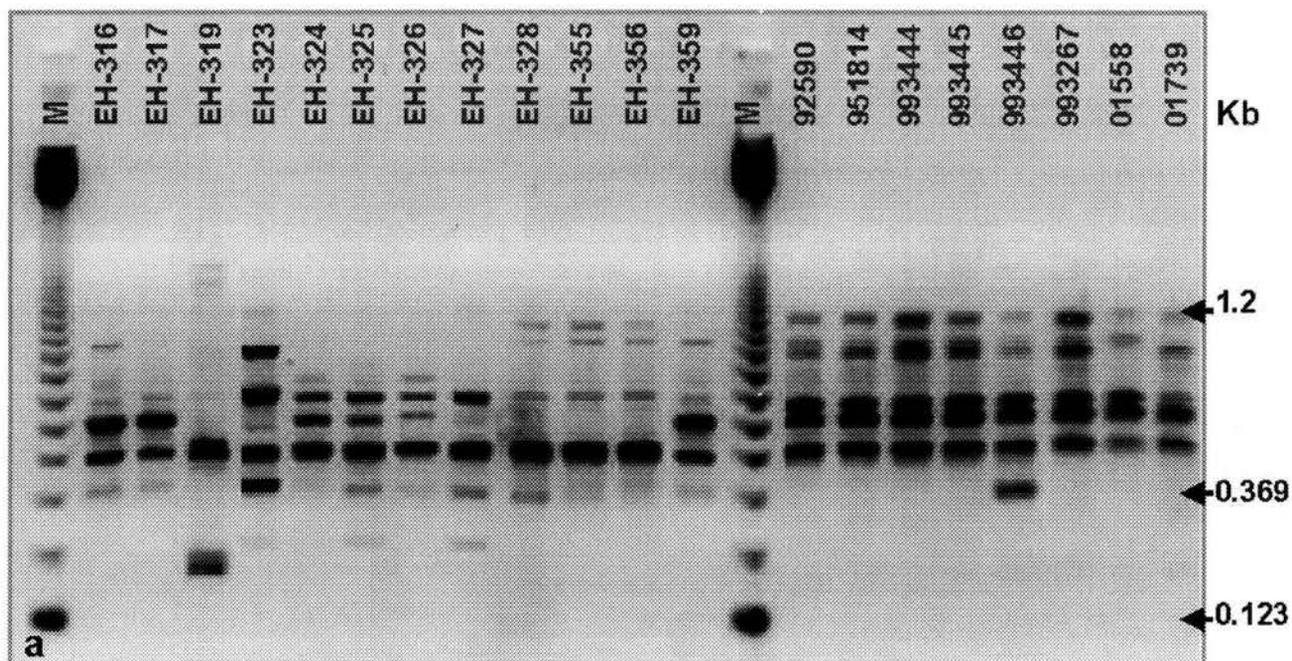


Figura 8. RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1283. Detalles del procedimiento vienen descritos en materiales y métodos. a) Aislamientos de México (carriles 2-11), aislamientos de Argentina (carriles 13-19); b) Aislamientos de Colombia (carriles 2-11), cepa de referencia carril 12, aislamientos de Guatemala (carriles 13 y 14). M-estándar de pares de bases (123 bp DNA Ladder).

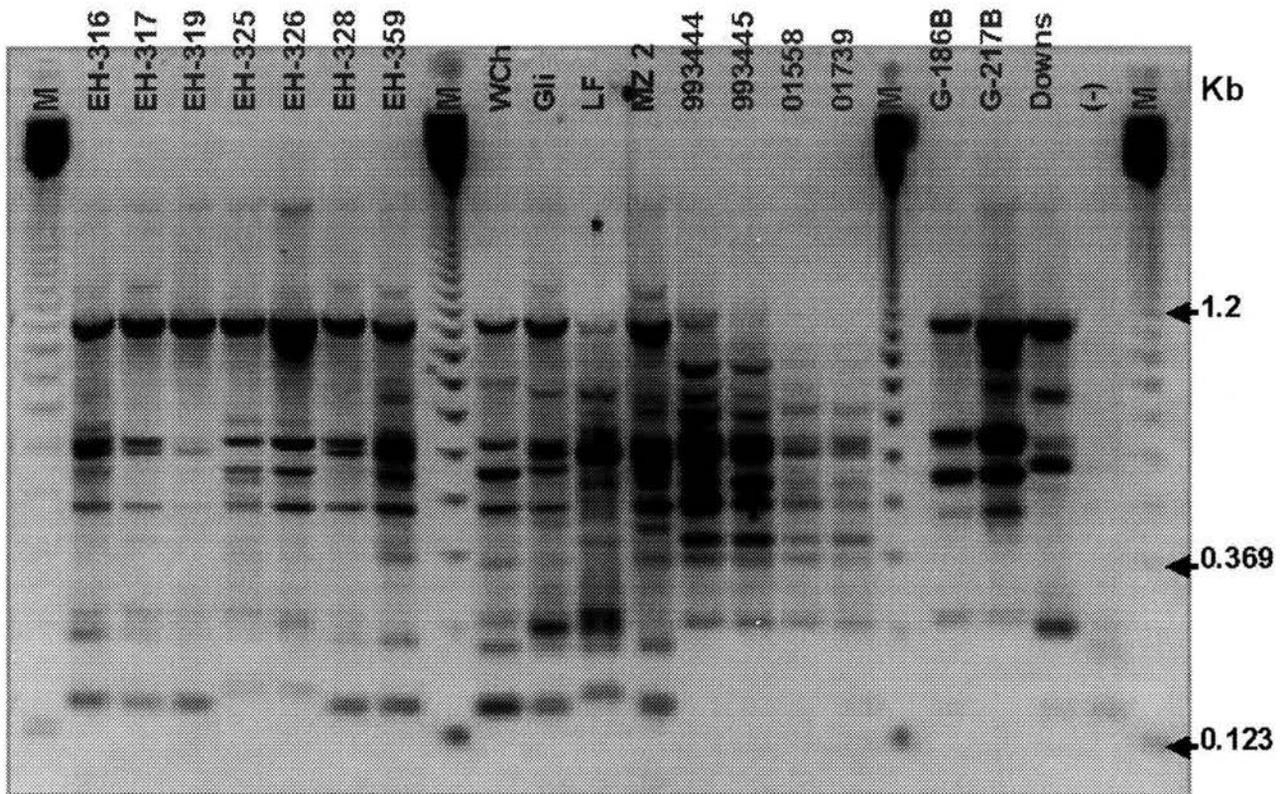


Figura 9. RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* empleando la mezcla de oligonucleótidos 1281-1283. Detalles del procedimiento vienen descritos en materiales y métodos. Aislamientos de México (carriles 2-8), aislamientos de Colombia (carriles 10-13), aislamientos de Argentina (carriles 14-17), cepas de referencia de PA y EUA (carriles 19-21), testigo negativo carril 22. M-estándar de pares de bases (123 bp DNA Ladder).

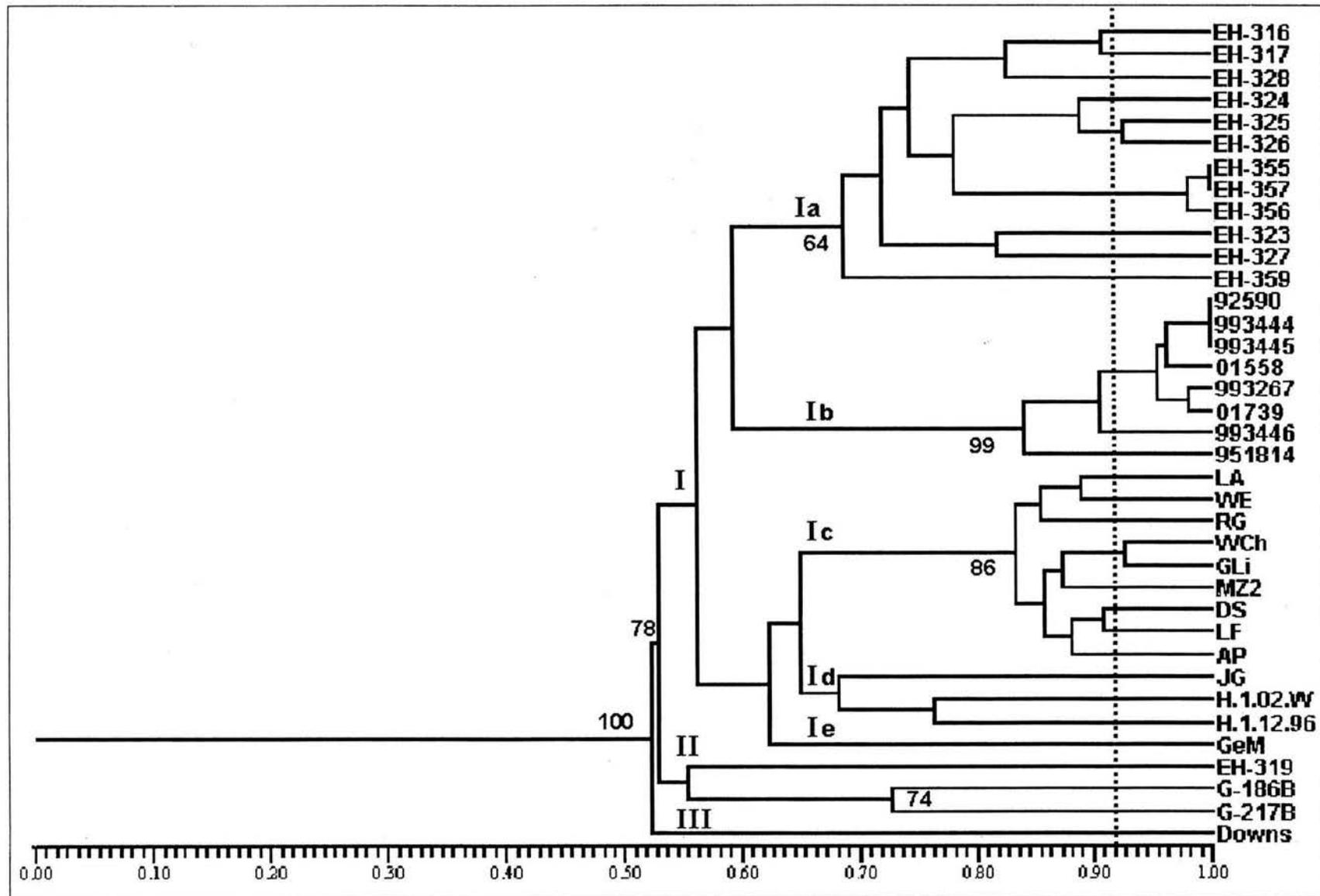


Figura 10. Dendrograma de los aislamientos y cepas de *H. capsulatum* estudiados. El dendrograma se generó a partir de la matriz similitud, utilizando el método de UPGMA. El mejor punto de corte se representa por una línea vertical discontinua. Valores de bootstrap inferiores a 50 % no se muestran. Ver detalles en materiales y métodos.

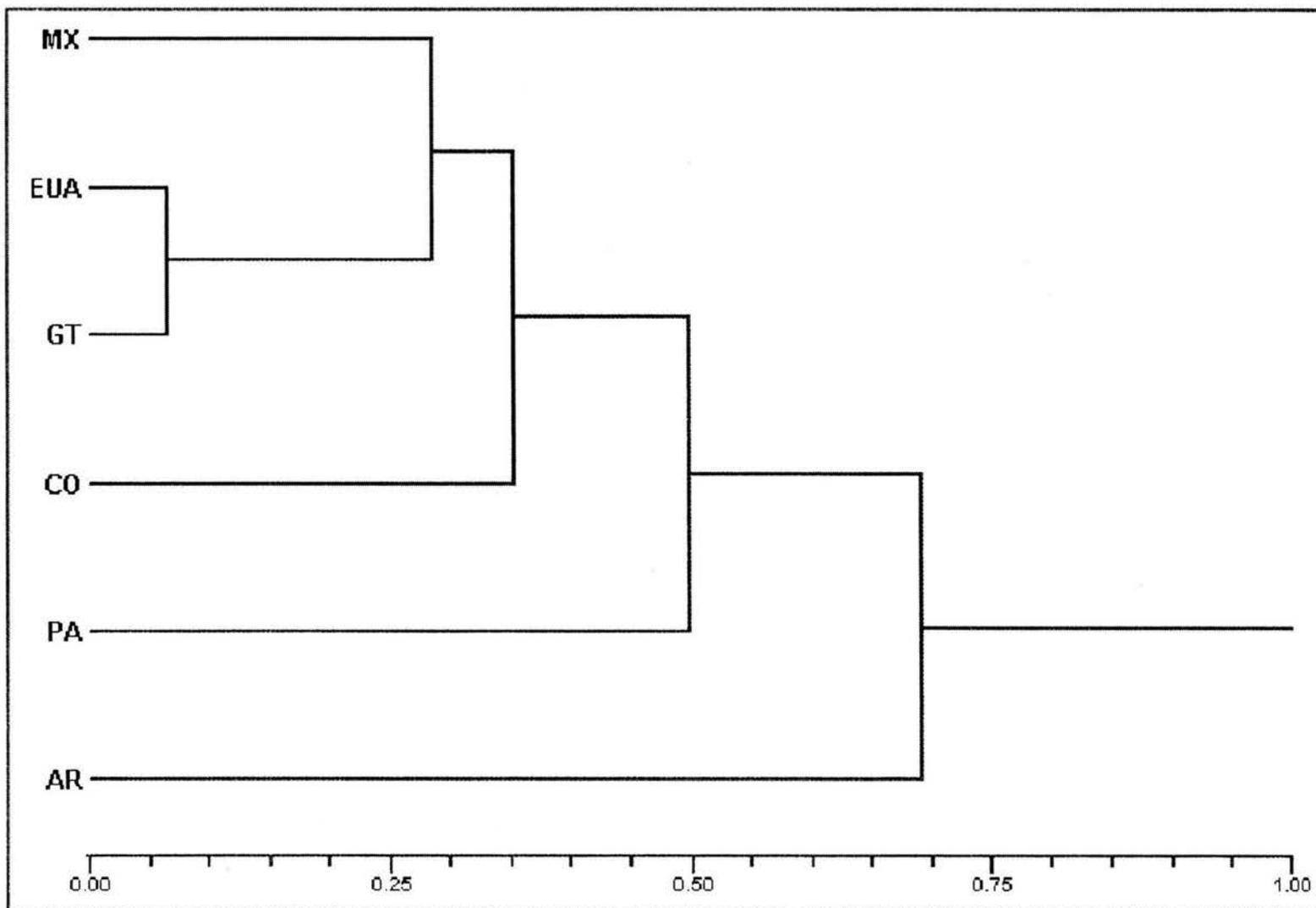


Figura 11. Relación entre los perfiles de bandas del RAPD-PCR con la procedencia geográfica de los aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Se utilizó un análisis varianza molecular (AMOVA). Los análisis fueron realizados con el programa NTSYS-PC versión 2.0. Ver detalles en materiales y métodos. MX- México; EUA- Estados Unidos de América; GT- Guatemala; CO- Colombia; PA- Panamá; AR- Argentina.

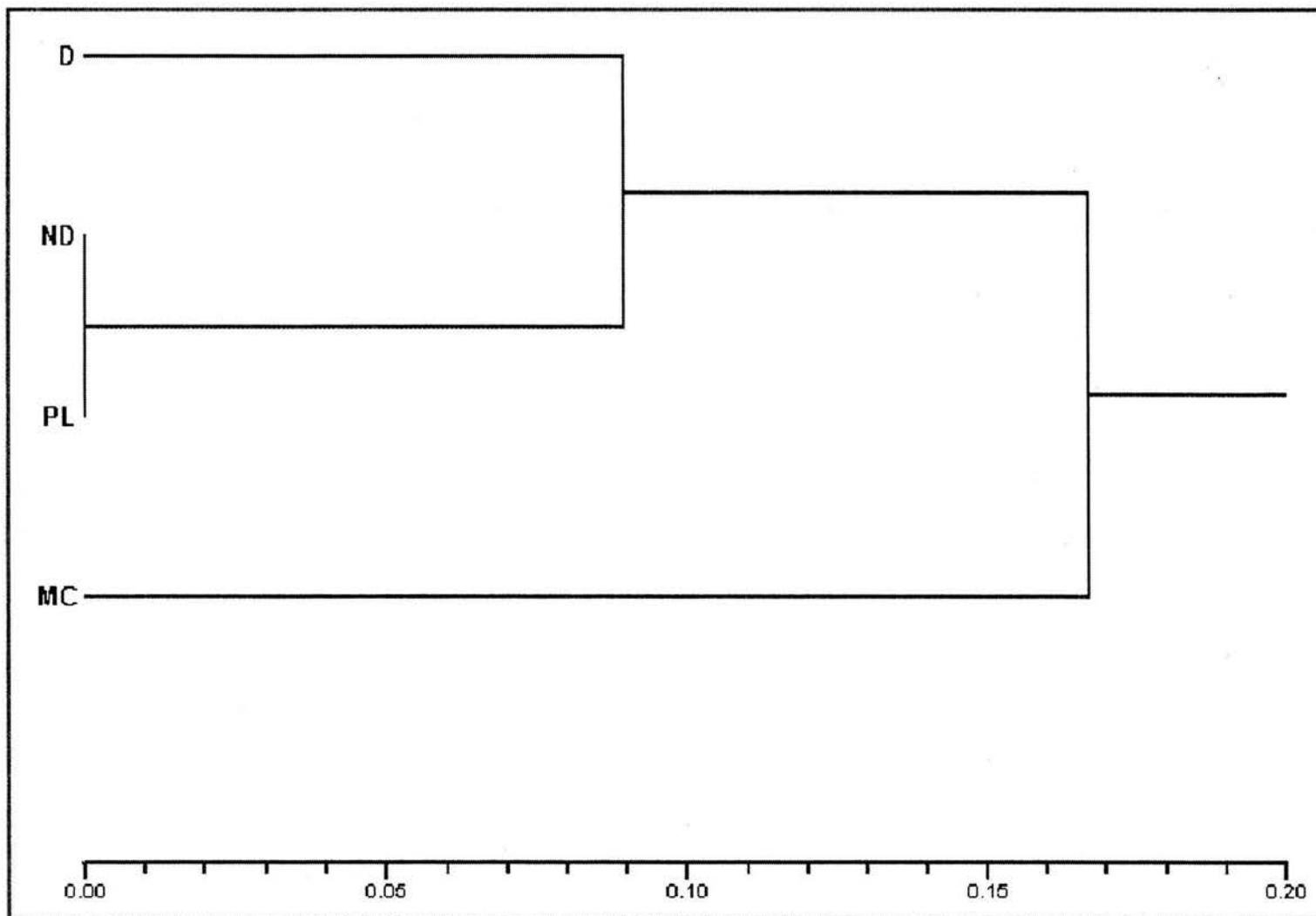


Figura 12. Relación entre los perfiles de bandas del RAPD-PCR con la forma clínica de los aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Se utilizó un análisis varianza molecular (AMOVA). Los análisis fueron realizados con el programa NTSYS-PC versión 2.0. Ver detalles en materiales y métodos. D- diseminada; ND- no determinada; PL- pulmonar localizada; MC- mucocutánea.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

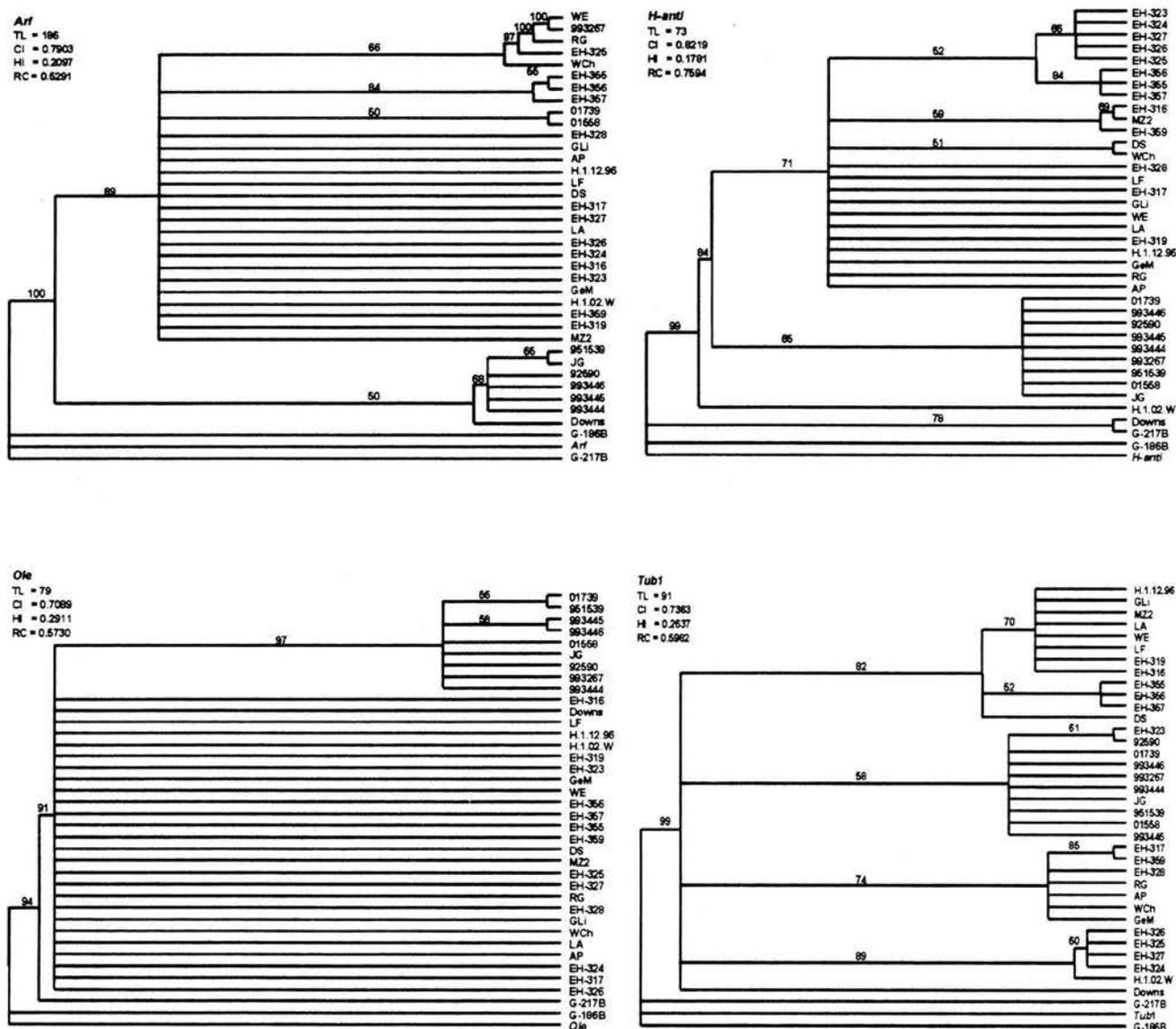


Figura 13. Árboles consenso por Neighbor-Joining de los aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Las secuencias parciales de los genes *H-anti*, *ole* y *tub1* fueron analizadas a través del 2-parámetro de Kimura, mientras que el gen *arf* se analizó con el parámetro HKY85. Se utilizaron como grupos externos las secuencias para cada gen, de la cepa G-217B, depositadas en el GenBank. Los valores de bootstrap más bajos del 50 % no se muestran. Para detalles ver materiales y métodos. TL, longitud del árbol; CI, índice de consistencia; HI, índice de homoplasia; RC, índice reescalado de consistencia.

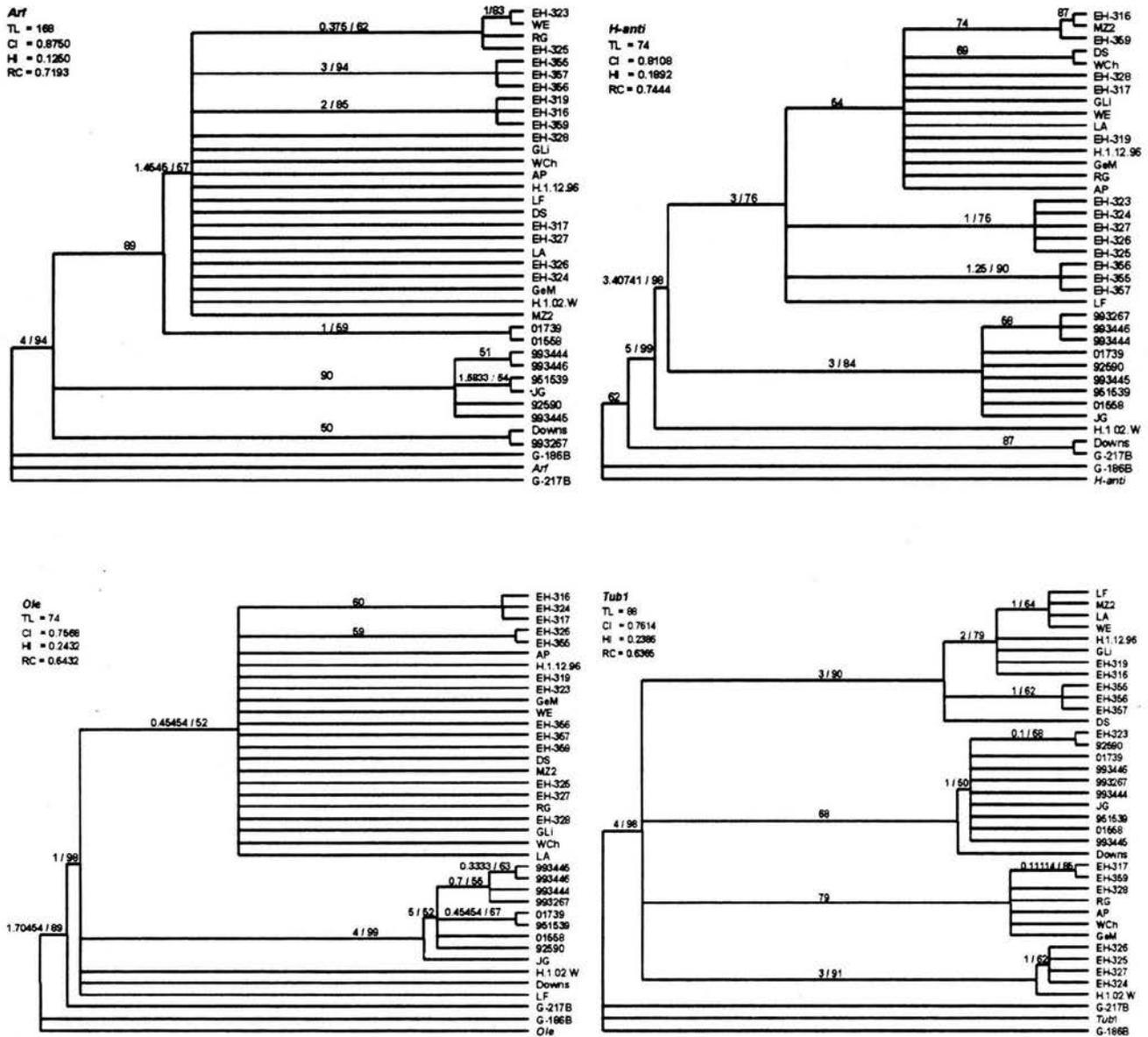


Figura 14. Árboles consenso de Máxima Parsimonia de los aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* estudiados. Las secuencias parciales de los genes *arf*, *H-anti*, *ole* y *tub1* fueron analizadas a través de una búsqueda heurística. Se realizaron 1000 réplicas para analizar la confiabilidad de los árboles a través del método de bootstrap. Se calculó el índice de decaimiento para determinar la confiabilidad de las agrupaciones. Se utilizaron como grupos externos las secuencias, de cada gen de la cepa G-217B, depositadas en el GenBank. Los valores de bootstrap más bajos de 50 % no se muestran. Para detalles ver materiales y métodos. TL, longitud del árbol; CI, índice de consistencia; HI, índice de homoplasia; RC, índice reescalado de consistencia.