



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Generación de oligonucleótidos específicos de
Histoplasma capsulatum usando marcadores RAPD-PCR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A
MARIA GUADALUPE FRIAS DE LEON



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos.
Vocal	Prof. José Alexandro Bonifaz Trujillo.
Secretario	Prof. María del Rocío Reyes Montes.
1er. Suplente	Prof. María Antonieta Silva Chávez.
2°. Suplente	Prof. Misael González Ibarra.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. UNAM.

Asesor del tema

Dra. María del Rocío Reyes Montes



Supervisor técnico

M en C. Gabina Arenas López



Sustentante

María Guadalupe Frías De León

Frías De León M.G.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Reyes Montes y en colaboración con la Dra. Maria Lucia Taylor.

Con la supervisión técnica de la M en C. Gabina Arenas López

**Este trabajo fue financiado gracias al apoyo concedido por DGAPA
(IN219703-2)**

**Durante el desarrollo de este trabajo la autora fue becaria de la DGAPA,
en el proyecto IN219703-2**

ÍNDICE

	Página
Lista de Tablas	5
Lista de Figuras	5
Resumen	9
Introducción	11
Planteamiento	16
Justificación	17
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
Materiales y métodos	19
Resultados	28
Discusión	50
Conclusiones	52
Bibliografía	53
Perspectivas	65

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Aislamientos y/o cepas de <i>H. capsulatum</i> de diferentes fuentes y orígenes geográficos con evidencia de la banda de 1.2 Kb.	60
Tabla 2. Aislamientos de <i>S. schenckii</i> probadas con los marcadores SCARs específicos para <i>H. capsulatum</i> .	63
Tabla 3. Aislamientos de <i>A. fumigatus</i> probadas con los marcadores SCARs específicos para <i>H. capsulatum</i> .	64
Tabla 4. Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> probadas con los marcadores SCARs específicos para <i>H. capsulatum</i> .	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del vector pGEM [®] -T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA).	23
Figura 2. Cuantificación de DNA de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> .	29
Figura 3. RAPD-PCR de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de diferentes orígenes geográficos, generado con la combinación de los oligonucleótidos 1281 y 1283.	30
Figura 4. RAPD-PCR de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> procedentes de diferentes orígenes geográficos generado con el oligonucleótido 1253.	31

	Página
Figura 5. Purificación y cuantificación del fragmento de 1.2 Kb.	32
Figura 6. Reamplificación de diferentes concentraciones del fragmento de 1.2 Kb usando el oligonucleótido 1253.	32
Figura 7a. Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio Lb/Amp/X-Gal/IPTG	34
Figura 7b. Selección de clonas positivas y negativas basada en el color desarrollado en el medio Lb/Amp/X-Gal/IPTG.	35
Figura 8. Caracterización de las clonas por PCR en colonia, con oligonucleótidos universales pUC/M13 forward y pUC/M13 reverse.	36
Figura 9. Purificación de plásmidos por métodos alcalino y enzimático.	37
Figura 10. Liberación de los fragmentos clonados por digestión con la enzima <i>EcoRI</i> .	38
Figura 11. Comparación de la secuencia obtenida de la clona Hc-1253 _{0.8} con todas las secuencias de hongos registradas en el GenBank.	39
Figura 12. Comparación de la secuencia obtenida de la clona Hc-1253 _{0.9} con todas las secuencias de hongos depositadas en el GenBank.	40
Figura 13. Amplificación de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos 1253 _{230(Hc)} -a y 1253 _{230(Hc)} -b.	42

	Página
Figura 14. Amplificación de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	42
Figura 15a. Amplificación de aislamientos de <i>S. schenckii</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	43
Figura 15b. Amplificación de aislamientos de <i>S. schenckii</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b.	43
Figura 16a. Amplificación de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos de <i>H. capsulatum</i> 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	44
Figura 16b. Amplificación de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos de <i>H. capsulatum</i> 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b.	45
Figura 17a. Amplificación de aislamientos clínicos de <i>A. fumigatus</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos de <i>H. capsulatum</i> 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	46
Figura 17b. Amplificación de aislamientos clínicos de <i>A. fumigatus</i> y de <i>H. capsulatum</i> con los oligonucleótidos específicos de <i>H. capsulatum</i> 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b.	47
Figura 18a. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b.	48

	Página
Figura 18b. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	48
Figura 19a. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b.	49
Figura 19b. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b.	49

GENERACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DE *Histoplasma capsulatum* USANDO MARCADORES RAPD-PCR**RESUMEN**

La "histoplasmosis capsulati", causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, es una micosis de amplia distribución en el mundo con regiones de alta endemicidad en Estados Unidos de América y en América Latina. En México, la prevalencia de esta micosis es elevada debido al incremento de pacientes con inmunosupresión de varios tipos, incluyendo el SIDA, y por el riesgo ocupacional (histoplasmosis epidémica), ya que existe una gran ubicuidad del hongo, pues ha sido aislado tanto de lugares cerrados (cuevas, minas, etc.) como de lugares abiertos (parques, avenidas, etc.). En el diagnóstico de la histoplasmosis se cuenta con numerosas pruebas de laboratorio para la identificación del patógeno, sin embargo, todas presentan limitaciones, principalmente, en pacientes inmunodeprimidos. Por tal razón, resulta útil contar con métodos de identificación específicos y de alta sensibilidad, tales como marcadores moleculares tipo SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada). Trabajos previos de genotipificación de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de México (MX), Guatemala (GT), Colombia (CO), Panamá (PA), Argentina (AR) y Estados Unidos de América (EUA), por medio de RAPD-PCR, utilizando los oligonucleótidos 1281, 1283 y 1253; revelaron que todos los aislamientos y cepas estudiados comparten una banda de 1.2 Kb, la cual fue sugerida como un candidato idóneo para la identificación del hongo. En el presente trabajo, se empleó la banda de 1.2 Kb como blanco para la generación de marcadores SCAR. Para ello, esta banda generada por RAPD-PCR en 30 aislamientos y cepas de referencia de MX, GT, CO, PA, AR y EUA, fue purificada, y a partir de ella se obtuvieron cuatro fragmentos que se clonaron y secuenciaron por los métodos moleculares tradicionales. Las secuencias se compararon con las secuencias de hongos depositadas en el GenBank con el objetivo de descartar cualquier homología con otros hongos patógenos o no para el humano. Con base en este análisis comparativo, se acotaron las secuencias iniciales de los

fragmentos clonados para eliminar secuencias compartidas y se diseñaron dos pares de oligonucleótidos específicos (1253_{220(Hc)}-a, 1253_{220(Hc)}-b, 1253_{230(Hc)}-a y 1253_{230(Hc)}-b) para *H. capsulatum* los cuales amplifican una banda de 220 y 230 bp, respectivamente. La especificidad de los mismos se determinó por PCR utilizando DNA de *H. capsulatum*, hongos heterólogos y de otros microorganismos relacionados. Así mismo se evaluó la sensibilidad de los marcadores SCAR resultando de 1.0 pg de DNA.

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum, agente etiológico de la “histoplasmosis capsulati”, es un hongo dimórfico que presenta una fase micelial saprobia y una fase levaduriforme parasitaria. La morfología microscópica de la fase micelial muestra abundantes hifas septadas, delgadas e hialinas, con microconidios de 2-4 μm y macroconidios 8-14 μm insertados en conidióforos que forman ángulos de aproximadamente 90° con las hifas. Los macroconidios típicos de la especie son de pared celular gruesa, espiculados, formando proyecciones con la apariencia de dedos (digitiformes) (Tewary *et al.*, 1998). La morfología microscópica de la fase parasitaria del hongo está constituida por levaduras unicelulares que se desarrollan intracelularmente o en cultivos enriquecidos con cisteína a 37 °C. Las levaduras son redondas u ovals y miden de 2-4 μm de diámetro, son uninucleadas, se reproducen por gemación, y representan la fase virulenta del hongo. En el ambiente natural este hongo ha resultado ser más ubicuo de lo que se pensaba ya que su presencia ha sido demostrada en todos los estados de la República Mexicana, no sólo en áreas rurales sino también en áreas urbanas como es el caso de los aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* del parque de Tlalpan en el Distrito Federal, y de una unidad habitacional en Sinaloa (Rodríguez-Arellanes *et al.*, 2000), así como en las dos epidemias que se registraron a principios y a finales del 2001 en un hotel del Puerto de Acapulco, Guerrero, reportándose un polémico brote de histoplasmosis pulmonar aguda, en el que se vieron afectados alrededor de 700 turistas norteamericanos, en este estudio no se encontró la fuente de infección (Morgan *et al.*, 2003). Posteriormente, Taylor *et al.* (2004b) lograron identificar por criterios morfológicos, histopatológicos, antigénicos y moleculares dos aislamientos de *H. capsulatum* a partir de bazo, hígado y pulmón de ratones inoculados con diferentes muestras de tierra de jardineras del hotel, las cuales fueron fertilizadas con material de composta (hojarasca, excretas de aves, animales y material orgánico en descomposición), identificando la fuente de infección. Por estas razones la histoplasmosis representa un problema de salud ambiental y ocupacional, especialmente para las personas que viven, acuden o trabajan en las zonas consideradas de alto riesgo de infección, es decir, lugares con suelos mezclados con excretas de aves y murciélagos (Pedroza-Serés *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994; 1996; 1997a; 2000b; 2000c; Velasco-Castrejón *et al.*, 1998;

Vaca-Marín *et al.*, 1998).

El riesgo a la infección es elevado, principalmente en aquellas personas que padecen inmunosupresión (SIDA, tratamiento con corticosteroides, trasplante de órganos, leucemias, linfomas, alcoholismo crónico). Las personas inmunocomprometidas son los blancos ideales para infecciones fúngicas, entre ellas la histoplasmosis, presentando con frecuencia un pronóstico grave con curso clínico hacia la forma diseminada en particular en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Tewary *et al.*, 1998).

Una gran variedad de pruebas han sido utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico de la histoplasmosis, pero todas tienen limitaciones. El diagnóstico definitivo de esta micosis se realiza de preferencia, por el aislamiento del agente causal en las muestras clínicas, el cual es considerado como “estándar de oro”, pero esto resulta difícil, principalmente, en las primeras etapas de la enfermedad. Tales inconveniencias hacen recurrir a métodos más sensibles que permitan evidenciar la presencia de pequeñas cantidades del agente etiológico o de sus productos en muestras del paciente. Por tal motivo, se han introducido desde hace varios años los procedimientos de inmunodiagnóstico (Gómez *et al.*, 1977; Wheat *et al.*, 1986; 1990; 1994; 2002; 2003; Williams *et al.* 1994), que también presentan limitaciones, como reacciones cruzadas con otras especies de hongos causantes de cuadros clínicos semejantes, sin embargo constituyen una herramienta alterna. El análisis histopatológico de tejido es otra opción diagnóstica, pero su buena interpretación depende del muestreo adecuado, de la experiencia del observador y de la coloración histoquímica apropiada (Lamps *et al.*, 2000; Tewary *et al.*, 1998). Lo anterior, hace necesario pruebas confirmatorias para descartar mimetismo antigénico así como morfológico de la fase micelial y levaduriforme de este organismo con otros similares (Chemaly *et al.*, 2001, Hall *et al.*, 1992, Tewary *et al.*, 1998).

Entre las pruebas confirmatorias se incluyen la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con una sonda adecuada. Actualmente, se cuenta con varias sondas que se han diseñado para la identificación de *H. capsulatum* como las descritas por Spitzer *et al.* (1989) y Keath *et al.* (1989), quienes al tipificar aislamientos del hongo de diferentes

fuentes y orígenes geográficos, mediante el uso de RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) con DNA mitocondrial (mtDNA) y ribosomal (rDNA), y del polimorfismo determinado por hibridación con sondas de mtDNA y del gen *yps3*, clasificaron al hongo en seis clases (Keath *et al.*, 1992), y observaron que estas sondas eran específicas para *H. capsulatum* ya que no hibridaban con DNAs de *Blastomyces dermatitidis*, *Candida sp.*, *Sepedonium chrysospermum*, *Chrysosporium keratinophilum* y *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de baja astringencia, por lo que fueron propuestas como herramientas importantes para la identificación del hongo. A nivel comercial, las primeras sondas de DNA disponibles para la identificación de hongos patógenos del hombre fueron diseñadas por Gen-Probe Inc. (San Diego, CA). Estas sondas quimioluminiscentes son complementarias a una secuencia de rRNA y su utilidad ha sido ampliamente evaluada. Huffnagle and Gander (1993) analizaron la capacidad de dos sondas para la identificación de *H. capsulatum* y *Cryptococcus neoformans* a partir de especímenes clínicos, encontrando una sensibilidad y una especificidad del 100% para ambas sondas. Stockman *et al.* (1993) evaluaron cuatro sondas especie-específicas de *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *Coccidioides immitis* y *B. dermatitidis*. La sensibilidad de las sondas osciló entre 97.3 y 100 % y la especificidad resultó del 100 % en todos los casos, lo cual demuestra la gran utilidad que tienen las sondas moleculares en la identificación acertada de hongos patógenos. Padhye *et al.* (1994) realizaron una evaluación comparativa entre la eficiencia de las sondas de *B. dermatitidis* y *C. immitis* con la prueba de exoantígenos, la cual demostró una sensibilidad del 100 % para ambas sondas pero la especificidad de la sonda para la identificación de *B. dermatitidis* fue menor al 100 % debido a que cruzó con hongos heterólogos como *Paracoccidioides brasiliensis*.

Haynes *et al.* (1995) emplearon la PCR anidada para la detección e identificación de *Candida albicans*, *C. neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. La primera amplificación se llevó a cabo usando oligonucleótidos universales, derivados de una subunidad larga del rDNA la cual es universalmente conservada dentro del reino de los hongos, permitiendo la detección del DNA de cualquier hongo. La segunda amplificación fue selectiva ya que se hizo el diseño de oligonucleótidos específicos para cada hongo estudiado. Sandhu *et al.* (1995) desarrollaron una estrategia diagnóstica basada en la utilización de oligonucleótidos

altamente específicos. Para ello secuenciaron una región parcial del gen 28S del rRNA (región variable) de aproximadamente 50 hongos de importancia médica, entre ellos se encuentran diferentes especies de *Aspergillus*, *Candida*, *B. dermatitidis*, *C. neoformans*, *Pseudoallescheria boydii*, *H. capsulatum* y *S. schenckii*. Las secuencias fueron utilizadas en el diseño de un par de oligonucleótidos universales capaces de amplificar una región específica de la secuencia parcial del gen en cada uno de los hongos estudiados. Posteriormente, el análisis de la región variable (28S rRNA) de estos hongos condujo a la síntesis de 21 oligonucleótidos especie-específicos.

Reid *et al.* (1999) desarrollaron un método de PCR para la detección de *H. capsulatum* en suelo, la PCR se llevó a cabo en dos etapas: primero emplearon oligonucleótidos específicos del hongo diseñados de la región espaciadora transcrita (ITS) del gen 5.8S del rRNA y posteriormente diseñaron oligonucleótidos específicos anidados de la misma región, este método mostró ser altamente sensible y específico y el límite de detección del método fue de 10 células. Bialek *et al.* (2002) desarrollaron un ensayo de PCR anidada para la identificación de *H. capsulatum* en muestras de tejido humano usando como blanco de amplificación el gen que codifica para una proteína de 100 KDa, el cual tiene un papel esencial en la supervivencia de *H. capsulatum* en células humanas. Aunque la sensibilidad y especificidad del ensayo fue del 100 % para los testigos fúngicos probados, no se sabe si el gen que codifica para la proteína mencionada se encuentra presente en el genoma de otros hongos dimórficos. Bracca *et al.* (2003) desarrollaron una PCR anidada para el diagnóstico de la histoplasmosis utilizando dos sondas diseñadas a partir de la secuencia completa del gen del antígeno H de *H. capsulatum*; los autores probaron su especificidad con DNA de varios hongos y bacterias patógenas asociadas a enfermedades respiratorias. Sus resultados confirmaron que la sonda fue altamente específica y sensible, detecta menos de 10 levaduras en las muestras clínicas, sin presentar reacción cruzada. Matos *et al.* (2003) eligieron regiones del gen que codifica para el antígeno M de *H. capsulatum*, para diseñar oligonucleótidos útiles en la identificación del hongo por PCR. Esta sonda identificó correctamente aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes, animales y de suelo, además de un aislamiento de *H. capsulatum* var. *duboisii*, aunque no identificó aislamientos de *H. capsulatum* var. *farciminosum*. La especificidad de

la PCR con los oligonucleótidos diseñados de la sonda fue confirmada por la ausencia de amplificación con el DNA de *P. brasiliensis*, *Candida* spp., *S. schenkii*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *A. niger* y *A. fumigatus*. Finalmente, Martagon-Villamil *et al.* (2003), diseñaron una PCR tiempo real para *H. capsulatum*, la cual identificó correctamente 34 aislamientos del hongo de una batería de 107 aislamientos fúngicos y también detectaron *H. capsulatum* en muestras clínicas de tres pacientes que presentaron cultivo positivo para este hongo. Ueda *et al.* (2003) introdujeron el uso de la PCR anidada en el diagnóstico de la histoplasmosis canina en Japón. Los oligonucleótidos que emplearon para la amplificación fueron diseñados con base en las secuencias parciales del gen 5.8S-ITS e ITS1-5.8S-ITS del rRNA de *H. capsulatum* depositadas en el GenBank, logrando así la identificación del hongo en muestras biológicas conservadas en parafina y la diferenciación de hongos como *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*.

Con el objetivo de identificar aislamientos fúngicos con aplicación diagnóstica y epidemiológica, además de estudiar la variación genética y estructura de poblaciones, se requieren marcadores moleculares específicos de este hongo. Entre las estrategias utilizadas con este fin está el RAPD (Amplificación al Azar del Polimorfismo del DNA) que emplea oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria que se alinean a regiones múltiples del DNA, produciendo patrones de identificación molecular. Recientemente, el RAPD-PCR ha sido utilizado para generar marcadores SCAR, los cuales difieren de los RAPD en que sus oligonucleótidos son específicos, ya que son diseñados con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio y pueden representar un solo locus en el genoma. Los marcadores SCAR resultan útiles en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico para estudiar la persistencia de cepas en el campo, en la identificación de híbridos en plantas; además permiten el desarrollo de ensayos sensibles capaces de relacionar el grado de enfermedad con el nivel de inóculo. Por lo tanto este método es una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica de DNA de mezclas de hongos (Abbasi *et al.*, 1999). En diferentes áreas de la investigación se han utilizado este tipo de marcadores. Entre los que destacan los trabajos de Li *et al.* (1999) quienes obtuvieron un marcador SCAR de *Verticillium dahliae* con el objetivo de diseñar oligonucleótidos específicos que

les permitieran el establecimiento de un ensayo competitivo y cuantitativo para la detección de este hongo por PCR. Abbasi *et al.* (1999) eligieron tres marcadores RAPD-PCR del hongo *Trichoderma hamatum*, utilizado en control biológico, con el objetivo de convertirlos en marcadores SCARs para la identificación y monitoreo de este organismo directamente en composta adicionada con dicho agente, sin necesidad de aislar previamente al hongo. Weber *et al.* (2002) también generaron este tipo de marcadores para utilizarlos en la identificación y evaluación de la progenie de la cepa *Laccaria bicolor* en micorrizas establecidas dentro de plantíos de abeto, así como la tipificación de cepas americanas y europeas. De la misma manera, Castrillo *et al.* (2003) consiguieron detectar y estimar la densidad de UFC (unidades formadoras de colonia) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en muestras de campo. Para este fin diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de marcadores SCAR obtenidos de RAPDs, los cuales detectaron hasta 100 pg de DNA genómico de dicho hongo. Xu *et al.* (2001, 2003) obtuvieron marcadores SCAR a partir de marcadores AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), estrechamente ligados al gen *Vf* de la manzana, el cual le confiere resistencia a la roña causada por el hongo *Venturia inaequalis*. De todos los marcadores que generaron, tres fueron inseparables al gen *Vf*, uno se localizó corriente abajo y siete permanecieron corriente arriba del gen *Vf*, por lo que esto les permitió construir un mapa basado en la clonación y secuenciación de dichos marcadores, además les permitirán seleccionar cultivos de manzana resistentes a la roña. De ahí que estos marcadores sean una herramienta útil en la identificación de microorganismos.

PLANTEAMIENTO

En estudios previos realizados en México, se genotipificaron aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes con o sin SIDA, así como de murciélagos naturalmente infectados, además de aquellos recuperados de guano, tanto de murciélagos como de aves (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 1997b; 2000a; 2000c; 2002; 2004a). En estos trabajos se encontraron similitudes entre aislamientos de México de diferentes fuentes biológicas, con cepas de otras regiones geográficas (cepas de referencia de Centro, Sudamérica y de EUA al utilizar el RAPD-PCR empleando

individualmente o de manera combinada tres oligonucleótidos arbitrarios 1253, 1281, 1283 que previamente habían sido estandarizados para el hongo por Kersulyte *et al.* (1992) y por Woods *et al.* (1993). Los resultados obtenidos a la fecha por este grupo de investigación, con base en los marcadores generados y en el análisis de similitud, sugieren que los aislamientos de México forman un grupo diferente al de las cepas de los países estudiados, a pesar de que comparten dos bandas distintivas o diagnósticas, la primera de 1.2 Kb revelada con el oligonucleótido 1253 y la combinación 1281-1283; y la segunda banda de 0.158 Kb revelada sólo con los oligonucleótidos 1281 y 1283. Estas bandas, por su especificidad son candidatas para marcadores de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de México y de los países estudiados.

Es necesario enfatizar la utilidad de sondas específicas de *H. capsulatum*, ya que se ha observado una gran variabilidad genotípica entre aislamientos de diferentes regiones geográficas (Carter *et al.*, 2001; Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Keath *et al.*, 1992; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 1997b; 2000a; 2000c; Spitzer *et al.*, 1989; 1990; Vincent *et al.*, 1986).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se cuenta con numerosas pruebas de laboratorio para la identificación del hongo *H. capsulatum*, todas presentan limitaciones principalmente en pacientes inmunosuprimidos, por lo que resulta necesario contar con métodos de identificación más específicos, como los marcadores moleculares tipo SCARs que son una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica de DNA de mezclas de hongos. Asimismo, es de gran importancia contar con esta herramienta biológica en nuestro país, ya que a la fecha, no hay métodos que permitan confirmar la identificación rápida y certera del hongo; además nos permitiría ofrecerla a distintos laboratorios intra-hospitalarios para un diagnóstico micológico, y contribuir en estudios epidemiológicos definiendo áreas endémicas y epidémicas de mayor o menor riesgo de infección.

HIPÓTESIS

Los oligonucleótidos diseñados a partir del marcador de 1.2 Kb generado por RAPD-PCR de aislamientos y cepas de *H. capsulatum* procedentes de distintas regiones geográficas, son específicos para la identificación del hongo.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar marcadores SCAR de *H. capsulatum* con base en la secuencia del amplicón de 1.2 Kb generado por RAPD-PCR.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Clonar los fragmentos obtenidos de la banda de 1.2 Kb, a partir del patrón polimórfico de *H. capsulatum* generado por RAPD-PCR.
- 2.- Secuenciar los fragmentos clonados y diseñar oligonucleótidos específicos para *H. capsulatum*.
- 3.- Confirmar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, por medio de PCR utilizando DNA de *H. capsulatum*, hongos heterólogos y otros microorganismos relacionados.
- 4.- Determinar la sensibilidad de los marcadores SCAR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos fúngicos

Se trabajó con 80 DNAs obtenidos de cepas y/o aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de la Colección de cepas de *H. capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos, Facultad de Medicina, UNAM, (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>). 25 DNAs fueron proporcionados por la Bioquímica Cristina Canteros del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina; 27 fueron obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto. de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, los cuales han sido reportados por Taylor *et al.* 2004a, 2004b y Sahaza-Cardona, 2004. Los 28 DNAs restantes se extrajeron para la realización de este trabajo. La procedencia y fuente de las cepas incluidas en el presente estudio se relacionan en la tabla 1.

Para determinar la especificidad de los marcadores SCAR se ensayaron los hongos relacionados *S. schenckii* y *A. fumigatus*, obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto. de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina. Además de DNAs de *Mycobacterium tuberculosis* proporcionados por la Dra. Miriam Bobadilla del Valle del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” S.S.

Extracción del DNA genómico

Se obtuvo la biomasa de 28 aislamientos de *H. capsulatum*, en el medio y condiciones de cultivo apropiadas. La biomasa fúngica se obtuvo preferentemente de la fase micelial. La biomasa de cada aislamiento se cosechó por filtración según lo descrito por Reyes-Montes *et al.* (1999). Para confirmar la identidad inmunológica de cada biomasa se realizaron pruebas de IDG (inmunodifusión en gel) con el filtrado de cultivo concentrado originario de cada biomasa, frente a sueros testigos positivos y negativos (voluntario sano); sólo las biomásas con filtrados capaces de desarrollar reacción de precipitación en IDG con el suero testigo positivo se utilizaron en la extracción de DNA. Cada biomasa se transfirió a un mortero y se trituroó con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adicionaron 600 µL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM a pH

8.0, EDTA 62.5 mM, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 10 %) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 14000 rpm, a 4 °C, por 15 min y al sobrenadante se le adicionó proteinasa K (GIBCO Laboratories, Grad Island, NY, USA) a una concentración final de 200 µg/mL y se incubó a 56 °C por 2 h. Enseguida, se agregó RNAsa A (Qiagen GmbH Hilden, Germany) a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó toda la noche. Los ácidos nucleicos se extrajeron con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) igual al sobrenadante recuperado, hasta obtener una fase acuosa superior transparente. Los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de sodio 3 M, y se incubó cada mezcla a -20 °C hasta el día siguiente. Posteriormente, se centrifugó cada mezcla para obtener los botones de DNA, los cuales se lavaron con etanol al 70 %. Finalmente, el DNA se disolvió en agua grado milliQ y se determinó la concentración del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, comparando 2 µL de DNA con soluciones de 50, 100 y 150 ng/µL de fago λ (GIBCO). Cada muestra se mezcló con 2 µL de regulador de corrida 10X (azul de bromofenol 0.25 %, xilen cianol 25 % y ficoll 400 25 %) antes de colocarse en el gel.

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR)

Se utilizó 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 trabajó con tres oligonucleótidos de 10 nt, 1253 (5'-GTTTCCGCC-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), Reyes-Montes *et al.* (1999) y Taylor *et al.* (2000a), tanto para la variante de RAPD con simple o doble oligonucleótidos. Inicialmente, se utilizaron en la reacción 10 ng de DNA genómico, 100 pmoles de cada oligonucleótido, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), y *Taq* DNA polimerasa 1 U (Applied Biosystems) en amortiguador 10X, en un volumen final de reacción de 25 µL. Los reactivos se ajustaron hasta obtener las condiciones óptimas de reacción.

Se utilizó el siguiente programa en un termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA): un ciclo de 7 min a 94 °C; seguido por 45 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 35 °C y 1 min a 72 °C, se llevó a cabo una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). Para visualizar las bandas, los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración de 10 µg/mL. El gel se corrió usando el mismo amortiguador a 80V. El estándar de tamaño molecular empleado fue el 123 bp DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge) y se imprimieron en una impresora térmica Sony 650, (Sony Electronics Inc., Park Ridge, N.J.). El tamaño de los fragmentos amplificados se calculó de la siguiente manera: a partir de la fotografía impresa de cada uno de los patrones polimórficos obtenidos, se determinó la movilidad relativa (Rf) de las bandas de la escalera del tamaño molecular 123 DNA Ladder y de los fragmentos amplificados con cada uno de los oligonucleótidos. La movilidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia del DNA que ha migrado desde el origen (cm)}}{\text{Distancia total (migración del colorante) (cm)}}$$

Con estos datos se graficó el valor de Rf (abscisa) contra los tamaños moleculares del marcador 123 DNA Ladder (ordenada). A partir de esta curva calibrada se estimó el tamaño molecular de los fragmentos de interés.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por RAPD-PCR

De los patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* se eligió la banda de 1.2, la cual se cortó del gel. El fragmento se purificó usando el QIAquick PCR purification Kit (Qiagen GmbH Hilden, Germany), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. El fragmento de DNA eluido se concentró al vacío (Instrumental Speed Vac System AES1010) durante 2 h y se diluyó en 30 µL de agua milliQ. La pureza y concentración del fragmento se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5 %. La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, la concentración del fragmento de DNA se definió por comparación con

concentraciones conocidas de 10, 20, 50 y 100 ng/μL del fago λ (GIBCO).

El fragmento de 1.2 Kb purificado se amplificó nuevamente utilizando el oligonucleótido que generó su presencia, utilizando las condiciones descritas anteriormente para RAPD-PCR. Al final de la amplificación se adicionó 1.5 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) a la mezcla que contenía los amplicones y se incubó en el termociclador a 70 °C por 10 min. Este paso se llevó a cabo con el objetivo de adicionar una adenina a la terminal 3' de cada uno de los amplicones y favorecer la ligación de los mismos al vector de clonación (Fig. 1). Posteriormente, los productos de esta segunda amplificación se purificaron por columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), según la metodología descrita por el fabricante.

Clonación de los fragmentos purificados

Los amplicones finales recuperados se concentraron al vacío y se ajustaron a un volumen final de 5 μL, 1 μL de éste se ligó al vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo con las indicaciones descritas en el protocolo del manual de la casa comercial (Fig. 1). Los productos de la ligación, que incluyen los fragmentos amplificados en el vector pGEM[®]-T Easy Vector (plásmidos), se transformaron en células competentes *E. coli* JM109 (método descrito posteriormente). Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina (marcador de selección) se sembraron en medio Luria líquido con ampicilina (100 μg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. A partir de estos cultivos, los plásmidos se purificaron por el método alcalino (ver más adelante). La comprobación de la clonación se demostró liberando el fragmento clonado por medio de la digestión con la enzima *EcoRI* (2 U/μg de DNA plasmídico) y por amplificación del fragmento clonado con oligonucleótidos universales.

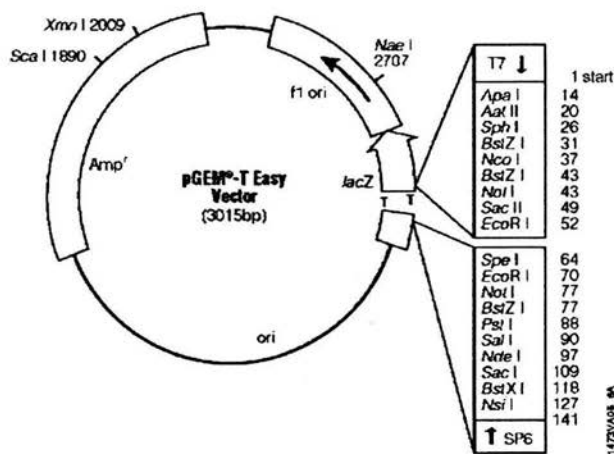


Figura 1. Representación esquemática del vector pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA), el cual tiene adicionado una timina en la terminal 3' de ambas hebras, lo que impide la circularización del vector e incrementa la eficiencia de la ligación del fragmento de interés. Los amplicones adicionados con las adeninas se introdujeron en el vector en el sitio donde se observan las timinas en el esquema.

Preparación de células competentes

La cepa JM109 se sembró por estría en medio Luria (triptona 3 %, extracto de levadura 3 % y cloruro de sodio 1 %) sin antibiótico y se incubó durante 24 h a 37 °C. Se seleccionó una colonia perfectamente aislada y se inoculó en un tubo de ensayo con 5 mL de medio Luria; se incubó a 37 °C, a 3000 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se transfirieron 400 µL del cultivo a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio Luria fresco y se incubó a 37 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Los cultivos se centrifugaron en tubos de 50 mL a 2500 rpm, durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 30 mL de solución TfbI (Acetato de potasio 0.29 %, MnCl₂ 0.99 %, KCl 0.75 %, CaCl₂ 0.15 % y glicerina 12 %, pH 5.8) esta suspensión celular se incubó en hielo durante 90 min. Después de la incubación, las células

de *E. coli* se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min a 4 °C y el paquete celular se resuspendió en 3 mL de la solución TfbII (Ácido 4-morfolinpropansulfónico (MOPS) 2.1 %, CaCl₂ 1.1 %, KCl 0.07 % y glicerina 12 %, pH 7.0). Finalmente, se colocaron alicuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70 °C hasta su uso.

Previo a la clonación de los fragmentos de interés, se verificó la eficiencia de transformación de las células competentes de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial.

Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109

La eficiencia de las células competentes se obtuvo después de tratar las células de la cepa *E. coli* JM109 con las soluciones TbfI y TbfII, y se transformaron con 0.1 ng del vector pGEM[®]-T Easy no digerido, posteriormente se sembraron por duplicado en medio LB. Se contaron las colonias y se obtuvo el promedio. La eficiencia de transformación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Eficiencia = Promedio de UFC/ 0.001 ng de DNA plasmídico.

Transformación de *E. coli*

Las células competentes JM109 se descongelaron sobre hielo, y se les adicionó 1 μL del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min e inmediatamente se dió un choque térmico a 42 °C por 90 s, y se regresaron las células al hielo por 2 min. Se agregaron 900 μL de medio Luria a las células competentes y se incubaron a 37 °C en agitación por 1 h. Se centrifugaron las células a 5000 rpm/1 min, se eliminó el sobrenadante hasta la décima parte del volumen inicial. La cantidad total (100 μL) se sembró en cajas Petri con medio de selección [Luria adicionado de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) 0.1 M, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) 50 mg/mL] y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las posibles clonas recombinantes (colonias blancas). La caracterización de las clonas recombinantes se realizó por PCR en colonia y posteriormente se llevó a cabo la purificación de los plásmidos.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia

Para poner de manifiesto la presencia de insertos y verificar su tamaño, se tomó una asada de cada una de las clonas recombinantes previamente seleccionadas y se resuspendió en 500 μL de agua milliQ. Se calentó a ebullición en baño de agua durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se tomaron 5 μL del sobrenadante para llevar a cabo la PCR en colonia (Güssow and Claxton, 1989), utilizando oligonucleótidos universales (pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μL conteniendo un volumen del plásmido de 5 μL , MgCl_2 1.5 mM, dNTPs 250 μM , mezcla de oligonucleótidos 10 pmol y *Taq* polimerasa 2.5 U en amortiguador 1X. El programa de amplificación consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 55 °C. Finalmente, 5 μL del producto de reacción se analizaron electroforéticamente en agarosa al 1.5 %.

Purificación de plásmidos por método alcalino

De acuerdo con el procedimiento estándar (Birboim and Doly, 1979), la clonas

seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria y se incubaron a 37 °C por 24 h. El cultivo se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 μ L de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se homogenizó suavemente. Posteriormente, se agregaron 400 μ L de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1 %) y se mezcló por inversión hasta observar la aparición de hebras de DNA. Se adicionaron 300 μ L de solución III (acetato de potasio 5 M 60 % V/V, ácido acético glacial 11.5 % V/V, agua desionizada 28.5 % V/V) manteniendo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 15000 rpm durante 1min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -40 °C por 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se lavó el botón con etanol al 70 % y se secó por vacío durante 2 h. El material seco se resuspendió en 20 μ L de agua milliQ. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1 %. Los plásmidos se conservaron a -20 °C.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*

La liberación de los fragmentos ligados se llevó a cabo en tubos de 0.2 mL, colocando 10 μ L de plásmido, 2 μ L de regulador H (*EcoRI* 10X) (Roche), 1 μ L de *EcoRI* (50 U/ μ L) (Roche), 1 μ L de RNasa A 100 μ g/ μ L (Qiagen) y 6 μ L de agua desionizada estéril. Se incubó a 37 °C durante 5 h y se conservó a 4 °C.

Para verificar la liberación de los fragmentos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TBE teñida con bromuro de etidio (10 ng/mL), se colocaron en cada carril 2 μ L de muestra más 2 μ L de amortiguador de corrida y se condujo la electroforesis a 90 V durante 90min. Para detectar los fragmentos de alto peso molecular se utilizó el marcador de peso molecular λ /*HindIII* (Roche)/*EcoRI* (Roche), el cual se preparó de la siguiente manera: 10 μ L de λ /*HindIII* (500 μ g/ μ L) se digirieron con 2 μ L de *EcoRI* (50 U/ μ L) en el amortiguador adecuado, en un volumen final de 70 μ L a 37 °C durante 24 h. Las bandas se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Secuenciación y diseño de oligonucleótidos

Los fragmentos clonados fueron secuenciados en el Instituto de Fisiología Celular,

UNAM en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA) utilizando oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') y pUC/M13 derecho (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega, Madison, WI. USA)). Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos clonados se editaron, alinearon y compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997), con el propósito de descartar homologías con genes de hongos patógenos relacionados. Posteriormente se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos para *H. capsulatum*.

Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos generados a partir de los fragmentos clonados, fueron utilizados en la amplificación por PCR del DNA plasmídico y el DNA genómico de *H. capsulatum*. Para la estandarización se hicieron curvas de MgCl₂ (0.5-3.0 mM), de dNTPs (150-200 μM), de DNA (1 ng-20 ng) y oligonucleótidos (100-150 pmol/μL). Se realizaron ensayos utilizando diferentes aditivos como son: albúmina sérica bovina (50 ng/25 μL), dimetilsulfóxido (1 % V/V) y glicerol (1 % V/V). Se ensayaron dos programas de amplificación: el primero consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. El segundo consistió en un ciclo de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. La temperatura de alineamiento para estos dos programas varió entre 55 °C y 63 °C. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 %. Con las condiciones óptimas de amplificación para *H. capsulatum*, se evaluó la especificidad con *S. schenckii*, *A. fumigatus*, y *M. tuberculosis*.

Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectada por PCR con los oligonucleótidos 1253₂₂₀(He)-a y 1253₂₂₀(He)-b; 1253₂₃₀(He)-a y 1253₂₃₀(He)-b. La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas, utilizando DNAs de un aislamiento clínico y un aislamiento de la naturaleza de *H. capsulatum*, los cuales se cuantificaron y

posteriormente se hicieron diluciones que contenían las siguientes concentraciones: 5, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 ng/ μ L.

RESULTADOS

Aislamientos fúngicos

Se trabajó con un total de 80 DNAs de cepas y aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, obtenidos de diversas fuentes biológicas (humano, murciélagos infectados y guano) procedentes de MX, GT, CO, AR, PA y EUA. (Tabla 1).

Extracción de DNA genómico

Se extrajo el DNA de las cepas y aislamientos de *H. capsulatum* de acuerdo con el método descrito. Posteriormente, se determinó la concentración del mismo comparando 2 μ L de cada DNA con 50, 100 y 150 ng/ μ L de fago λ (Fig. 2). Después de determinar la concentración, se realizaron las correspondientes diluciones para ajustar cada DNA a 5 ng/ μ L para la amplificación. La figura 2 muestra un ejemplo de la determinación de las concentraciones obtenidas de 10 aislamientos clínicos procedentes de MX, un aislamiento de PA, dos aislamientos de EUA, un aislamiento de GT, tres aislamientos de CO y tres aislamientos de AR. De acuerdo con la concentración determinada se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración de 5ng/ μ L para posteriormente utilizarse en RAPD-PCR.

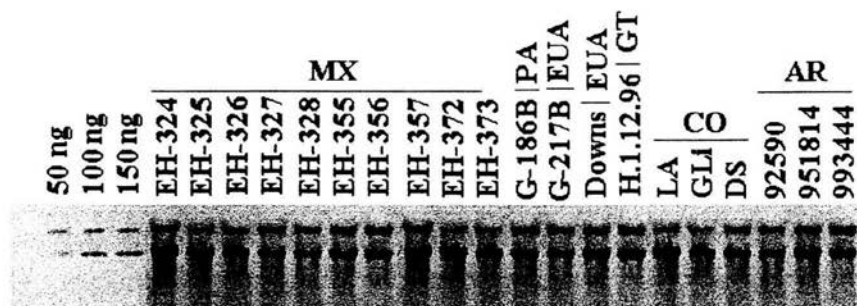


Figura 2. Cuantificación de DNA de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de MX, GT, AR, PA, CO y EUA. La cuantificación se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio, a 80 V por 45 min. Los primeros tres carriles corresponden a diferentes concentraciones de fago λ .

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).

Fueron analizadas los DNAs obtenidos de cepas y aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* por RAPD-PCR (Tabla 1), utilizando la mezcla de los oligonucleótidos 1281/1283 y el oligonucleótido 1253.

El perfil RAPD-PCR generado con la mezcla de oligonucleótidos 1281 y 1283 nos muestra un polimorfismo comprendido entre 0.123 y 1.2 Kb (Fig. 3). Cada una de las cepas y aislamientos analizados muestra un patrón polimórfico particular según la región geográfica de la que proceden, pero tienen en común dos bandas de 0.158 y 1.2 Kb las cuales pueden ser diagnósticas para la identificación del hongo *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Es importante destacar que en los aislamientos procedentes de AR las dos bandas se perciben débilmente lo cual no impide que sean utilizadas como marcadores moleculares en la identificación de aislamientos de AR.

Bajo las mismas condiciones de amplificación, el perfil polimórfico generado con el oligonucleótido 1253 (Fig. 4) nos muestra un polimorfismo comprendido entre 1.47 y

0.25 Kb, en este caso todas las cepas y aislamientos presentan en común la banda de 1.2 Kb. La banda de 0.158 Kb no se presenta con este oligonucleótido. Por lo que consideramos que la banda de 1.2 Kb es un buen marcador molecular para la identificación de *H. capsulatum*, ya que es posible detectarlo con diferentes oligonucleótidos. Por esta razón decidimos trabajar únicamente con este fragmento.

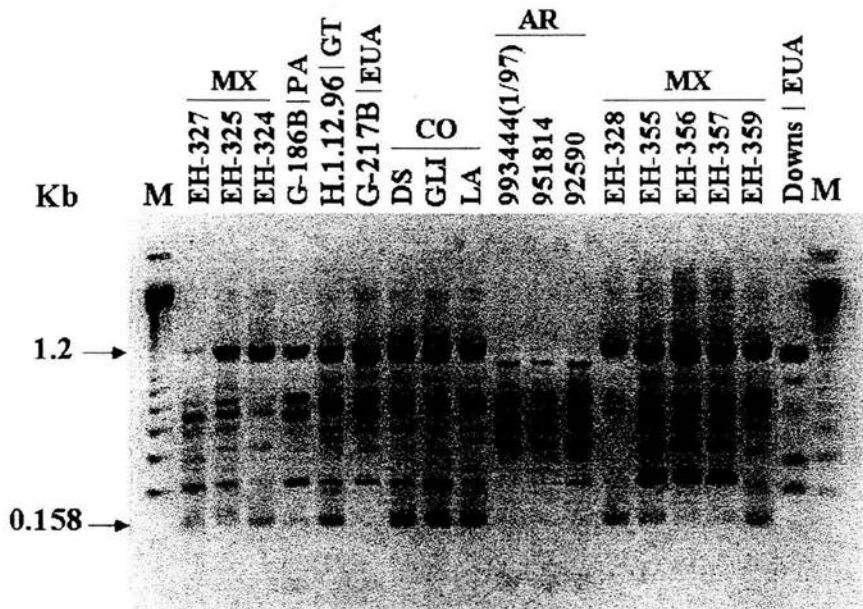


Figura 3. RAPD-PCR de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de distintos orígenes geográficos, generado con la combinación de los oligonucleótidos 1281 (5'-AACGCGCAAC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3'). Las flechas indican los dos amplicones diagnósticos de 1.2 y 0.158 Kb. M: 123 bp DNA Ladder.

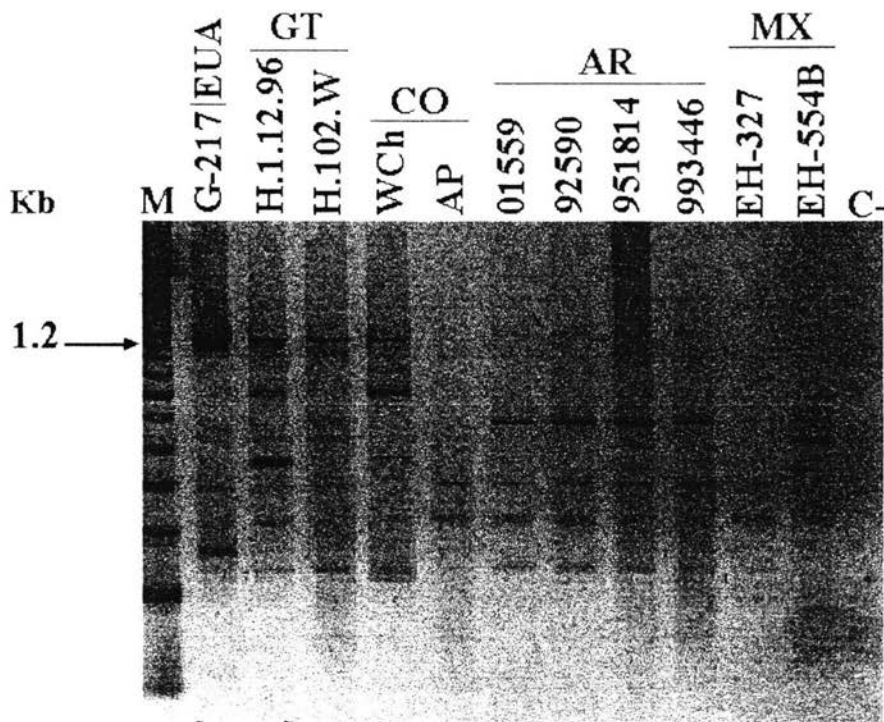


Figura 4. RAPD-PCR de aislamientos de EUA, GT, CO, AR y MX generado con el oligonucleótido 1253 (5'-GTTTCCGCC-3'). El marcador de tamaño molecular de 1.2 Kb indica el amplicón diagnóstico. M: 123 bp DNA Ladder.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por RAPD-PCR

En la figura 5 podemos observar la electroforesis en gel de agarosa, en la que se confirmó el tamaño molecular de la banda purificada y al mismo tiempo se cuantificó por comparación con diferentes concentraciones del fago λ . La concentración de la banda fue de 10ng/2 μ L. Para la reamplificación del fragmento de 1.2 Kb se eligió el oligonucleótido 1253, ya que la combinación de los oligonucleótidos 1281-1283 nos generó 7 amplicones, mientras que el 1253 sólo generó 4 amplicones (0.4, 0.6, 0.8 y 0.9 Kb). La figura 6 nos muestra la reamplificación de diferentes concentraciones del fragmento de 1.2 Kb, en

donde se observa que la concentración de 15 ng es la adecuada para visualizarlos. Estos amplicones fueron purificados y ligados al vector de clonación pGEM-T Easy® (Promega) para su posterior clonación.

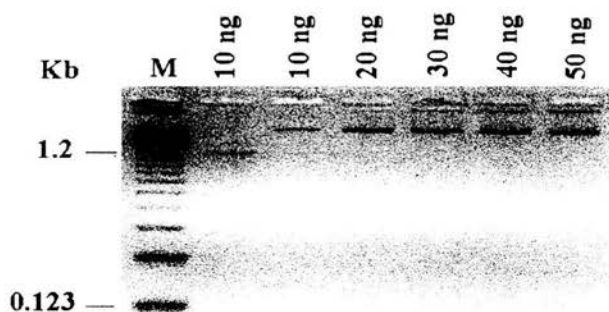


Figura 5. Purificación y cuantificación del fragmento de 1.2 Kb para la clonación. M: 123 DNA Ladder.

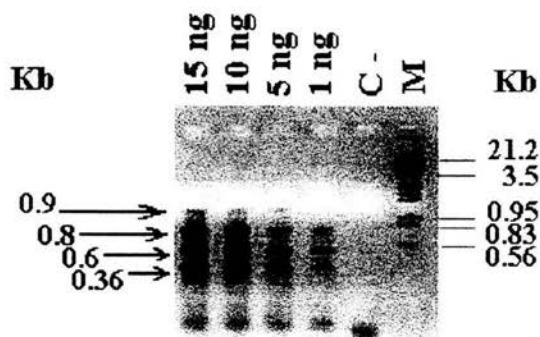


Fig. 6. Reamplificación de diferentes concentraciones del fragmento de 1.2 Kb usando el oligonucleótido 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3') bajo las condiciones iniciales de amplificación por RAPD-PCR. El tamaño de los cuatro amplicones obtenidos (0.3, 0.6, 0.8 y 0.9 Kb) fue estimado de la comigración del marcador de peso molecular (M) λ /HindIII digerido con la enzima *Eco*RI. C-: control negativo.

Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109

El promedio de las colonias obtenidas fue de 139, por lo que la eficiencia de transformación resultó ser de 139 UFC/0.001 ng DNA, la cual nos da una eficiencia de 1.39×10^5 UFC/ng ó 1.39×10^8 UFC/ μ g de DNA, ésta fue adecuada para la transformación, ya que la eficiencia de transformación mínima requerida es de 1×10^8 UFC/ μ g DNA (cantidad recomendada por la casa comercial).

Clonación de los fragmentos purificados

Los cuatro amplicones (0.9, 0.8, 0.6 y 0.36 Kb), resultantes de la reamplificación del fragmento de 1.2 Kb, se visualizaron en un gel de agarosa al 3 % en el que se probó 2 μ L del producto de reamplificación, posteriormente se ligaron al vector de clonación y el producto de éstos se utilizó para la transformación de las células competentes. La selección de clonas recombinantes se basó en el color que desarrollaron las colonias en el medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas recombinantes presentan color blanco debido a que la secuencia del gen que codifica para la β -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de DNA, por lo que las células pierden la capacidad de degradar el X-Gal presente en el medio. Por otro lado, las clonas que no tienen ningún fragmento de DNA integrado, conservan intacta la secuencia de la β -galactosidasa y por lo tanto tienen la capacidad de degradar el X-Gal presente en el medio, desarrollando una pigmentación azul. Figura 7 a y b.

Todas las clonas recombinantes elegidas se sembraron en medio LB/Ampicilina para conservarlas y analizarlas posteriormente.

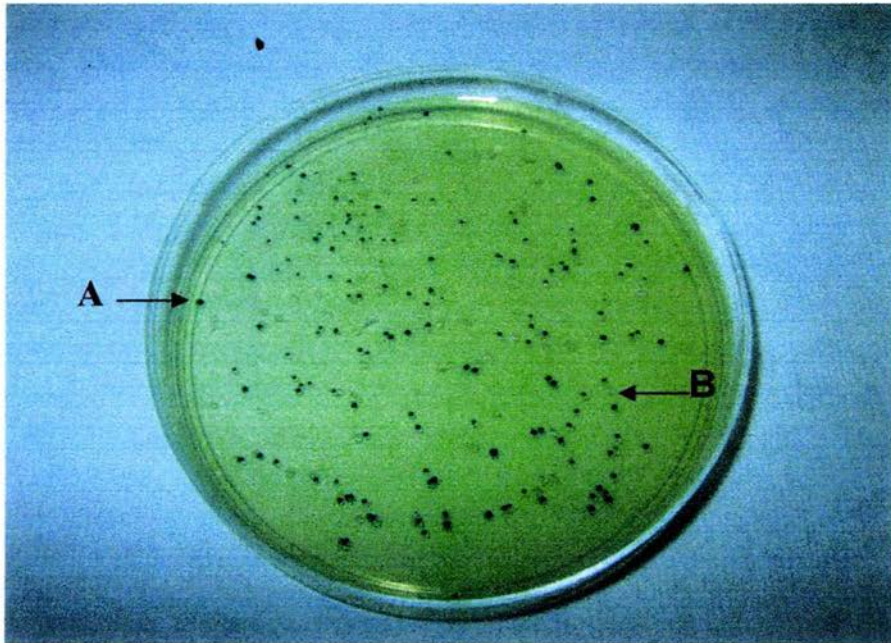


Figura. 7a. Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio Lb/Amp/X-Gal/IPTG. Las clonas que no tienen un fragmento de DNA de *H. capsulatum* integrado degradaron el X-Gal desarrollando una pigmentación azul (A). Las clonas que no desarrollaron pigmentación son las contienen alguno de los fragmentos de interés (B).

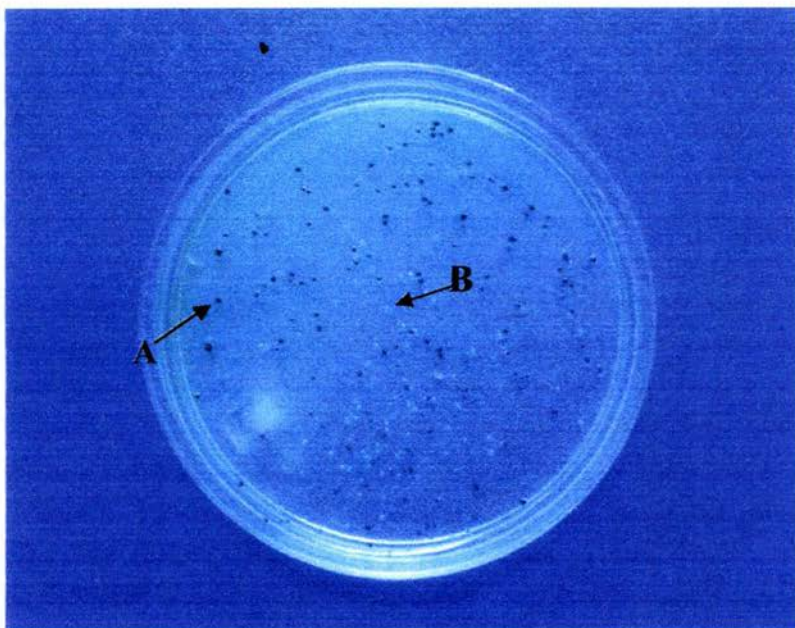


Figura 7b. Selección de clonas positivas (B) con base en el color desarrollado en el medio Lb/Amp/X-Gal/IPTG.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia

Para verificar que las clonas elegidas realmente contienen uno de los amplicones, se llevó a cabo una PCR con el material genómico de cada clona, el cual fue liberado calentando a ebullición una muestra de la colonia blanca. Se utilizaron oligonucleótidos universales: el oligonucleótido pUC/M13 izquierdo y el oligonucleótido pUC/M13 derecho (Promega). El producto de la amplificación nos reveló tres tipos de clonas (Fig. 8). Las que tienen integrado el fragmento de 0.6 Kb; las que tienen integrado el fragmento de 0.8 Kb y las que tienen integrado el fragmento de 0.9 Kb. En ninguna de las clonas analizadas se encontró el fragmento de 0.36 Kb. Es importante mencionar que el tamaño que se observa en la figura es ligeramente mayor al observado en la reamplificación debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, que es de aproximadamente de 0.25 Kb, lo cual incrementa el tamaño del producto de amplificación.

Después de verificar la transformación, se eligió sólo una clona representativa de cada tipo, dichas clonas se nombraron de la siguiente manera: Hc-1253_{0.6}, Hc-1253_{0.8} y Hc-1253_{0.9}. En donde Hc corresponde a *H. capsulatum*, 1253 indica el oligonucleótido empleado para la reamplificación y los números 0.6, 0.8 y 0.9 representan el tamaño de cada fragmento clonado.

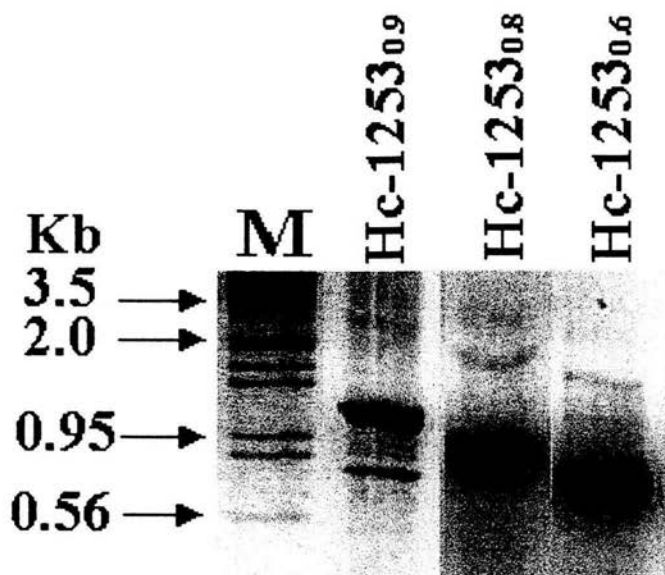


Figura 8. Caracterización directa de las clonas por PCR en colonia, con oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho. M tamaño de fragmentos del fago λ cortados con *HindIII/EcoRI*.

Purificación de plásmidos por método alcalino

Los plásmidos de las tres clonas seleccionadas Hc-1253_{0.6}, Hc-1253_{0.8} y Hc-1253_{0.9} fueron liberados y purificados por el método alcalino como se encuentra especificado en la metodología. Se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, observando que

se encuentran entre los 3.5 y 4.2 Kb (Fig. 9). El aumento en el tamaño del vector pGEM-T-Easy® (3015 pb), coincide con el tamaño de los fragmentos que se detectaron por PCR en colonia (3600-3900 pb).

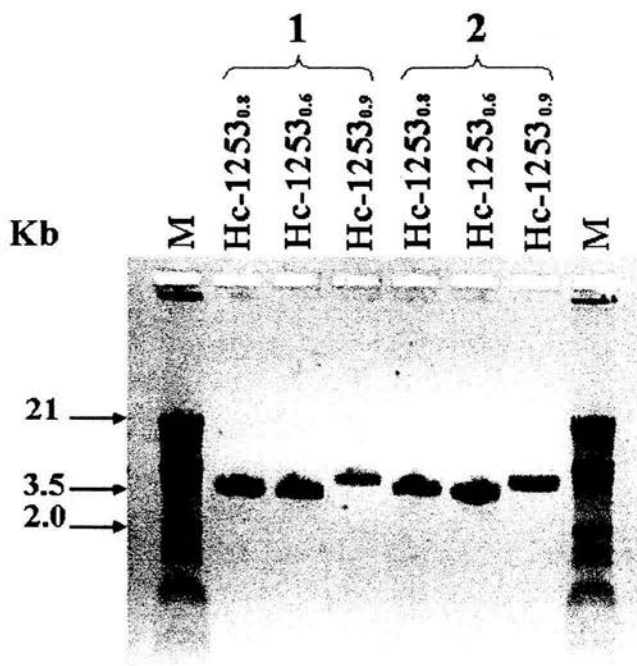


Figura 9. Purificación de plásmidos por método alcalino (1) y enzimático (2), de las clonas seleccionadas Hc-1253_{0.6}, Hc-1253_{0.8} y Hc-1253_{0.9}. M: tamaño de fragmentos del fago λ cortados con *HindIII/EcoRI*.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*

Los plásmidos obtenidos a partir de las clonas Hc-1253_{0.6}, Hc-1253_{0.8} y Hc-1253_{0.9} fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*. El producto de la digestión se observó por electroforesis con el propósito de verificar que el tamaño de los fragmentos era el mismo (0.6, 0.8 y 0.9). (Fig. 10). Como se había mencionado antes, el producto de

amplificación, ya sea a partir de colonia o plásmido, es ligeramente mayor al de la digestión por *EcoRI*.

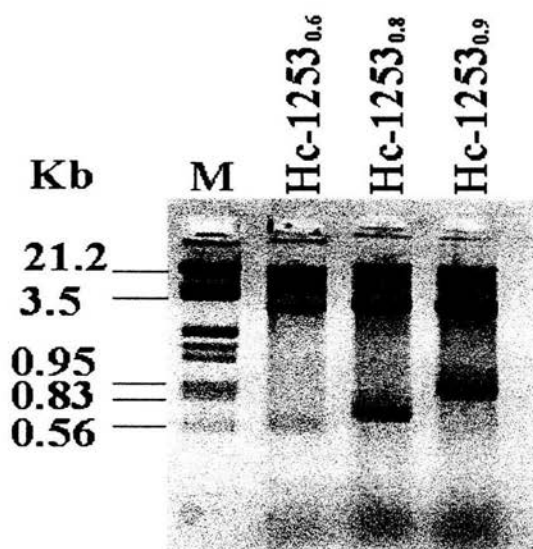


Figura 10. Liberación de los fragmentos clonados por digestión con la enzima *EcoRI*. M: tamaño de fragmentos del fago λ cortados con *HindIII/EcoRI*

Secuenciación

De las clonas Hc-1253_{0.6}, Hc-1253_{0.8} y Hc-1253_{0.9} se realizaron mini preparaciones para obtener suficiente plásmido para la secuenciación de los fragmentos. Los plásmidos se purificaron con el FastPlasmid Kit (Eppendorf) y se cuantificaron en un Biophotometer (Eppendorf) a una longitud de onda de 260 nm. Las concentraciones obtenidas fueron de 42.8, 47.1 y 39.6 mg/ml respectivamente. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa CHROMAS Versión 1.48 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y se alinearon con el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997) con las secuencias de todos los hongos registradas hasta la fecha, en el GenBank, incluyendo aquellas donde se

ha reportado reacción cruzada por métodos inmunológicos, como son: *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *S. schenkii* y *M. tuberculosis*, con el fin de descartar homologías. Se encontró que las secuencias de *H. capsulatum* comparten ciertas regiones de menos de 60 pb con varios hongos como son: *Pneumocystis carinii*, *Neurospora crassa*, *A. niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus shirousamii*, *Botrytis cinerea*, *Giberella zeae*, *Schizosacharomyces pombe*, *S. cerevisiae* y *Microspora spp.* Por tal motivo, las secuencias obtenidas de *H. capsulatum* se acotaron hasta eliminar las regiones compartidas con estos hongos. La secuencia clonada en el plásmido Hc-1253_{0.6} se redujo considerablemente al acotarla, por lo que ya no se tomó en cuenta. Las otras dos secuencias de 0.8 y 0.9 Kb se acotaron hasta 520 y 495 pb, respectivamente.

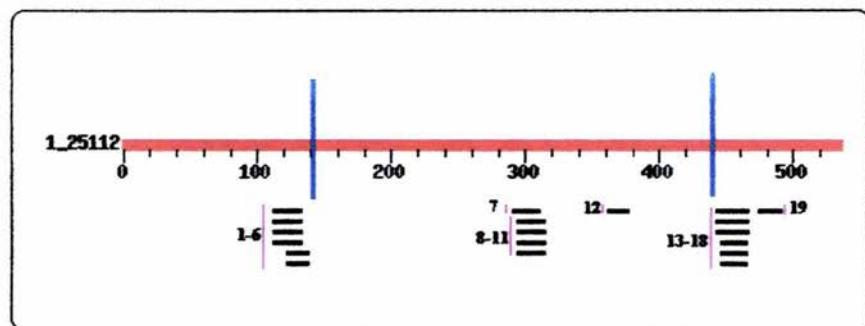


Figura 11. Comparación de la secuencia de la clona obtenida Hc-1253_{0.6} con todas las secuencias de hongos registradas en el GenBank. Las líneas negras indican las regiones compartidas con otros hongos: 1-6 y 13-18 *S. cerevisiae*. 7 y 12. *G. zeae* 8-11. *B. cinerea*. 13-18. 19. *S. pombe*. Las líneas azules indican la secuencia que se utilizó para el diseño de los oligonucleótidos para *H. capsulatum*.

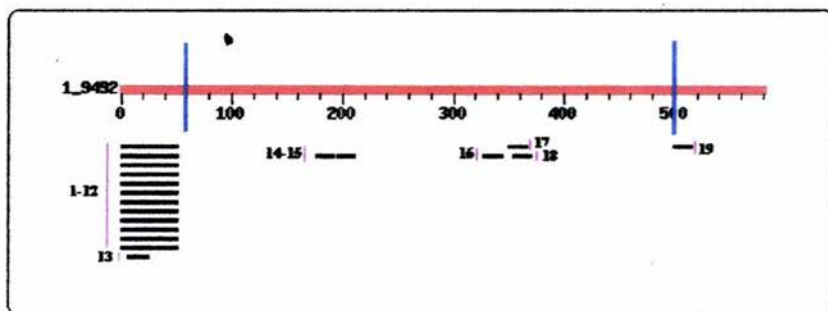


Figura 12. Comparación de la secuencia obtenida de la clona Hc-1253_{0.9} con todas las secuencias de hongos depositadas en el GenBank. Las líneas negras indican las regiones compartidas entre *H. capsulatum* y hongos como: 1-12. *A. awamori*, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. orizae*, *A. flavus*, *A. shirousamii*. 13 y 18. *N. crassa*. 14-15, 19. *G. zeae*. 16. *S. pombe*. 17. *Microspora*. Las líneas azules indican la acotación que se hizo de la secuencia para diseñar los oligonucleótidos específicos.

Para el diseño de los oligonucleótidos de estas secuencias, se introdujeron en el programa Primer3 Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), que toma como base para el diseño de los oligonucleótidos los siguientes parámetros: la longitud ideal de los oligonucleótidos (18 y 25 pb), el porcentaje de guanina-citosina (40 y 60 %), la temperatura de alineamiento (T_m) (55 y 65 °C), además deben ser 100 % complementarios al DNA molde, no autocomplementarse, ni formar estructuras secundarias que impidan el alineamiento de los oligonucleótidos al DNA molde. Obteniendo como resultado los siguientes pares de oligonucleótidos: El oligonucleótido 1253_{220(Hc)}-a 5'-CATTGTTGGAGGAACCTGCT-3' con una T_m = 64.0 °C y 50 % GC y el oligonucleótido 1253_{220(Hc)}-b 5'-GAGCTGCAGGATGTTTGTG-3' con una T_m =63.4 °C y 50 % GC que amplifican una región de 220 pb; el otro par de oligonucleótidos, el 1253_{230(Hc)}-a 5'-GGAGCCATGACGTTAAATGG-3' con una T_m =64.1 °C y 50 % GC y el 1253_{230(Hc)}-b 5'-TATTGCCAATGGTTTGTCA-3' con una T_m =63.6 °C y 40 % GC que amplifican una región de 230 pb. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX). La concentración de los cuatro oligonucleótidos se ajustó a 100 pmol/ μ L.

Las condiciones óptimas de la PCR para los dos pares de oligonucleótidos fueron las siguientes: un volumen final de reacción de 25 μ L con 10 ng de DNA genómico, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 2.5 mM, oligonucleótido 100 pmoles de cada uno y *Taq* DNA polimerasa I U en amortiguador de PCR 1X. El programa de amplificación óptimo consistió de un ciclo de 5 min a 94 °C; 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Estas condiciones de reacción para la PCR fueron las ideales para la amplificación selectiva de los DNAs de *H. capsulatum*, ya que sólo se amplificó la banda específica de 220 pb con los oligonucleótidos 1253_{220(He)}-a y 1253_{220(He)}-b (Fig. 15). De la misma manera los oligonucleótidos 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b amplificaron también la banda específica de 230 pb con los DNAs genómicos de *H. capsulatum* (Fig.16).

Para probar la especificidad de estos oligonucleótidos se utilizaron DNAs de microorganismos relacionados y no relacionados, mostrando que no hay amplificación inespecífica con ninguno de los microorganismos probados. La figura 17a y b muestran la PCR de 18 aislamientos de *S. schenckii* y seis aislamientos de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos 1253_{220(He)}-a y 1253_{220(He)}-b, 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b respectivamente, resultando amplificación sólo con los aislamientos de *H. capsulatum*. La figura 18a y b muestran la PCR de cinco aislamientos de *M. tuberculosis* y seis aislamientos de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos 1253_{220(He)}-a y 1253_{220(He)}-b, 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b respectivamente, resultando amplificación sólo con los aislamientos de *H. capsulatum*. La figura 19a y b muestran la PCR de siete aislamientos de *A. fumigatus* y seis aislamientos de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos 1253_{220(He)}-a y 1253_{220(He)}-b, 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b respectivamente, resultando amplificación sólo con los aislamientos de *H. capsulatum*.

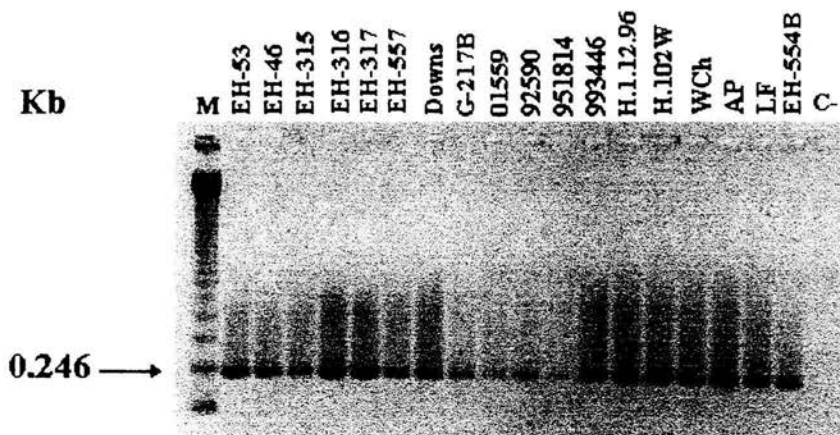


Figura 13. Amplificación de aislamientos de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b. M: 123 bp DNA Ladder.

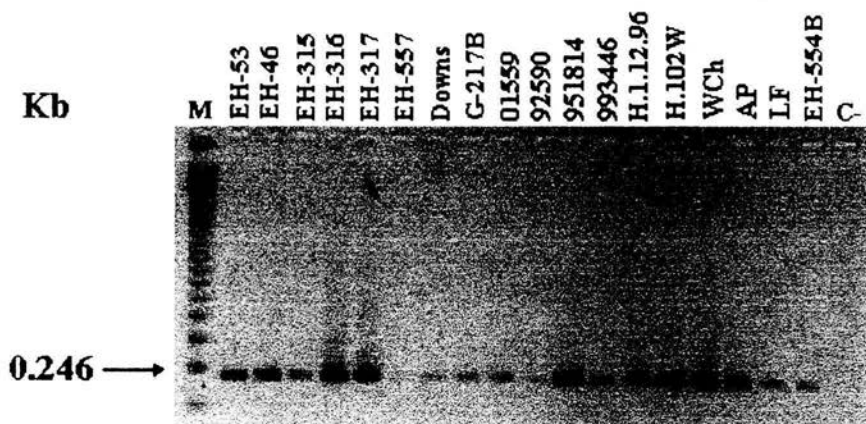


Figura 14. Amplificación de aislamientos de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b. M: 123 bp DNA Ladder.

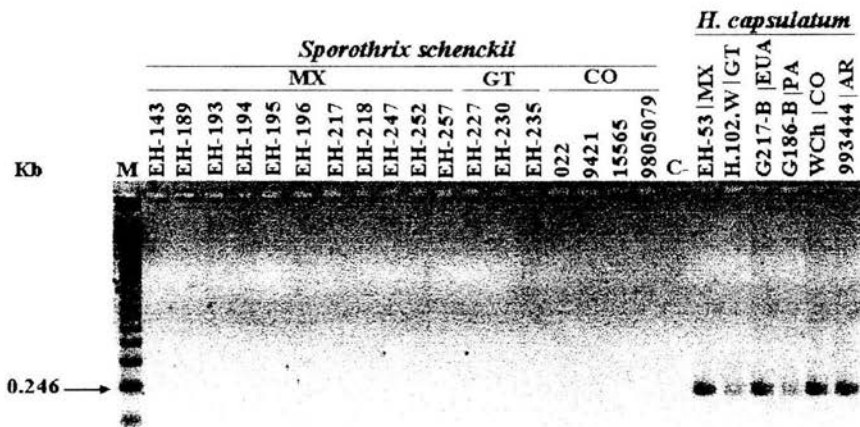


Figura 15a. Amplificación de aislamientos de *S. schenckii* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos 1253220(1c)-a y 1253220(1c)-b. M: 123 bp DNA Ladder.

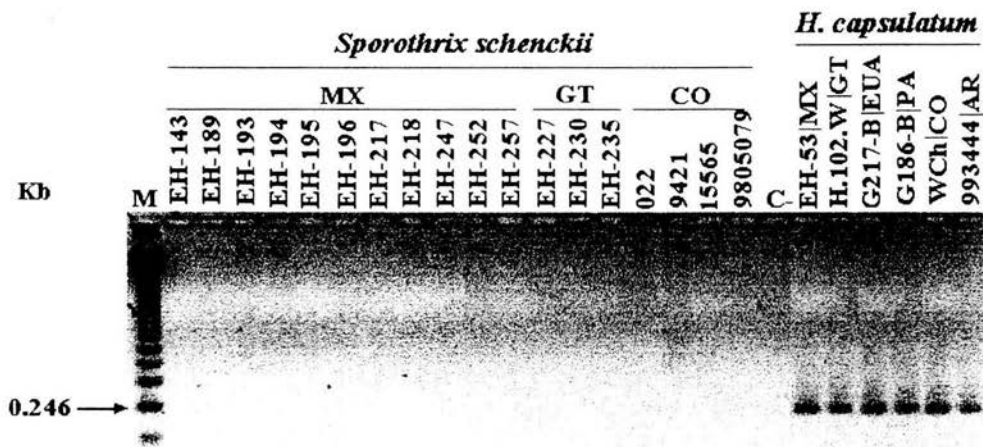


Figura 15b. Amplificación de aislamientos de *S. schenckii* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos 1253230(1c)-a y 1253230(1c)-b. M: 123 bp DNA Ladder.

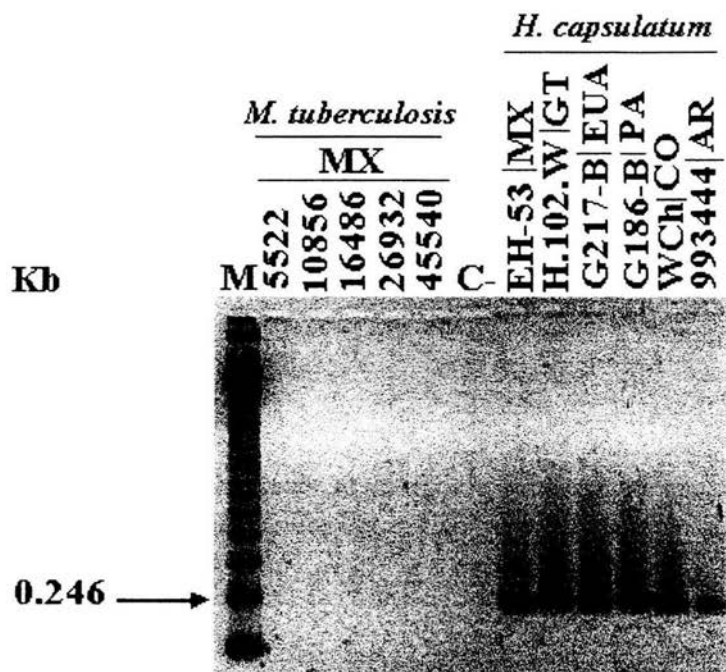


Figura 16a. Amplificación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos de *H. capsulatum* 1253_{220(Hc)-a} y 1253_{220(Hc)-b} C-: control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

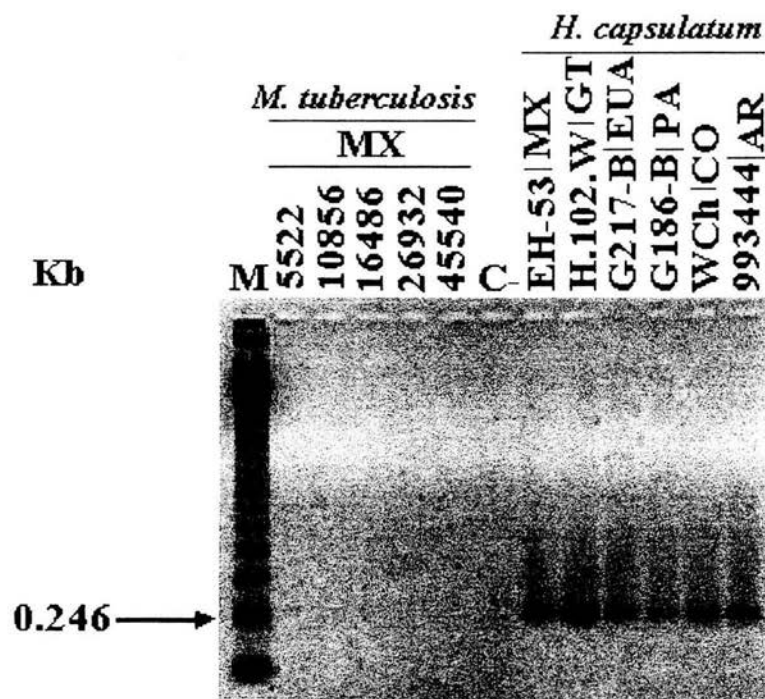


Figura 16b. Amplificación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos de *H. capsulatum* 1253230(11c)-a y 1253230(11c)-b. C-: control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

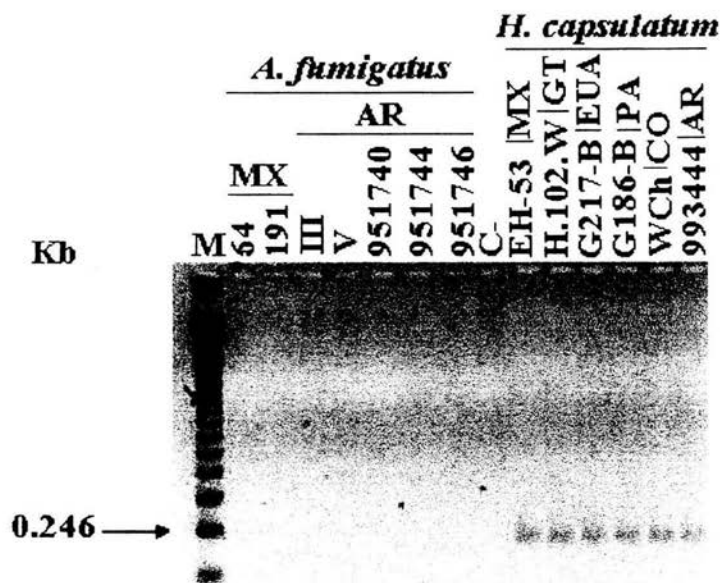


Figura 17a. Amplificación de aislamientos clínicos de *A. fumigatus* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos de *H. capsulatum* 1253220(11c)-a y 1253220(11c)-b M: 123 bp DNA Ladder.

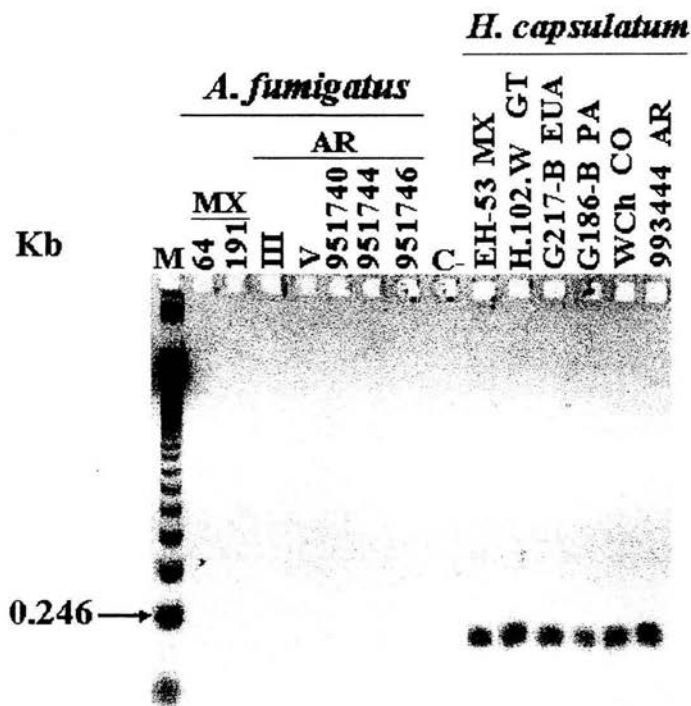


Figura 17b. Amplificación de aislamientos clínicos de *A. fumigatus* y de *H. capsulatum* con los oligonucleótidos específicos de *H. capsulatum* 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b M: 123 bp DNA Ladder.

Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR

Los dos pares de oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones clonadas (0.8 y 0.9 Kb), amplificaron su DNA blanco hasta la cantidad mínima de 1 pg/μL. En las figuras 20a y b se observa la amplificación del DNA obtenido de un aislamiento clínico (EH-317) con los dos pares de oligonucleótidos (1253_{220(He)}-a y 1253_{220(He)}-b; 1253_{230(He)}-a y 1253_{230(He)}-b) respectivamente. En las figuras 21a y b se observa la amplificación del DNA

obtenido de un aislamiento de la naturaleza (EH-554B) con los dos pares de oligonucleótidos (1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b; 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b) respectivamente

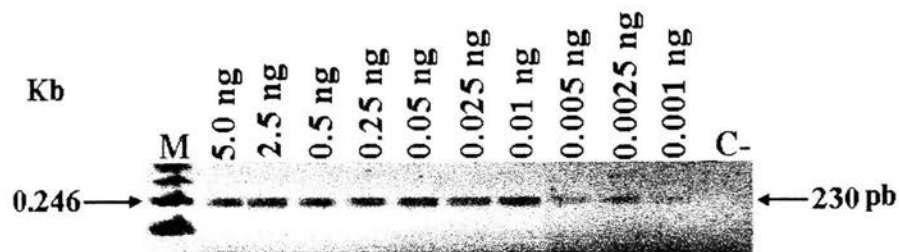


Figura 18a. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253230(Hc)-a y 1253230(Hc)-b utilizando concentraciones variables del DNA de un aislamiento clínico (EH-317) procedente de MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La cantidad mínima detectada fue de 0.001 ng/μL. C- control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

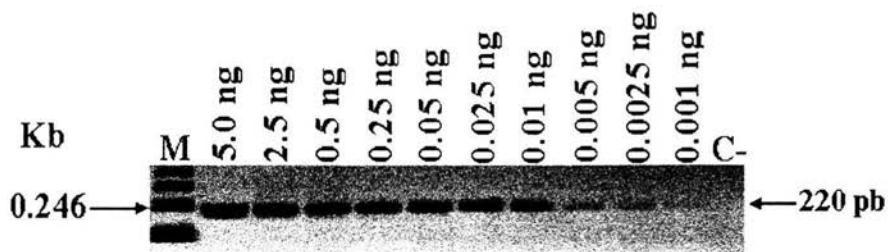


Figura 18b. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253220(Hc)-a y 1253220(Hc)-b utilizando concentraciones variables del DNA de *H. capsulatum* aislado de un paciente (EH-317) procedente de MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La cantidad mínima detectada fue de 0.001 ng/μL. C-: control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

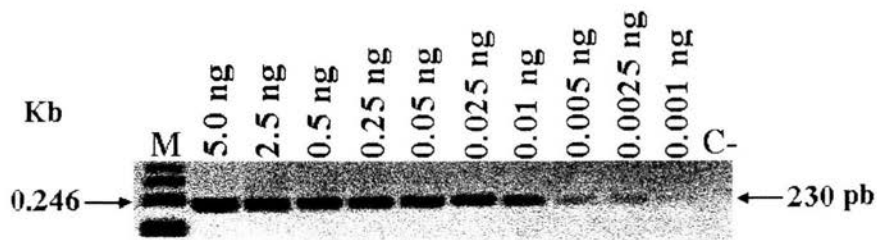


Figura 19a. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253_{230(EH)}-a y 1253_{230(EH)}-b utilizando concentraciones variables del DNA de un aislamiento de la naturaleza (EH-554B) procedente de MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La cantidad mínima detectada fue de 0.001 ng/ μ L. C- Control negativo. M 123 bp DNA Ladder.

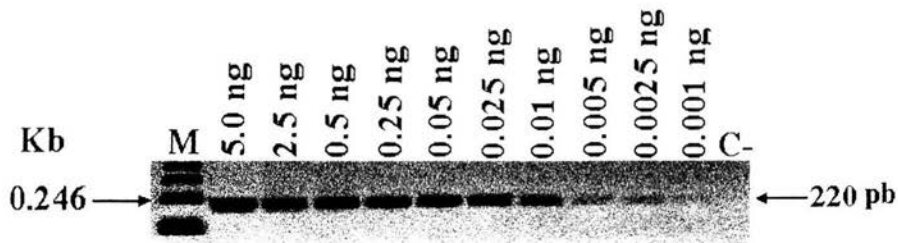


Figura 19b. Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos 1253_{220(EH)}-a y 1253_{220(EH)}-b utilizando concentraciones variables del DNA de *H. capsulatum* aislado de la naturaleza (EH-554B) en MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La cantidad mínima detectada fue de 0.001 ng/ μ L. C- control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

DISCUSIÓN

El RAPD-PCR es una herramienta molecular que permite estudiar el polimorfismo del DNA en organismos fúngicos, entre otros, sin tener previo conocimiento de la secuencia del genoma; y actualmente ha sido utilizado para generar marcadores SCAR (Abbasi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Castrillo *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002). En este trabajo se obtuvieron marcadores tipo SCARs a partir del análisis de marcadores RAPDs de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de MX, CO, GT, AR, EUA y PA, los cuales presentaron dos bandas comunes de 1.2 Kb y 0.158 Kb la primera, obtenida con la mezcla de oligonucleótidos arbitrarios 1281-1283, y con el oligonucleótidos 1253, y la segunda, únicamente con el oligonucleótidos 1253. En este trabajo se eligió la banda de 1.2 Kb, considerando que se mantiene constante durante las amplificaciones con los tres oligonucleótidos. Para llevar a cabo la clonación de este fragmento fue necesario reamplificarlo, con el propósito de obtener mayor número de moléculas y además adicionar colas de adeninas en la terminal 3' de este fragmento para favorecer la ligación al vector de clonación pGEM®-T Easy. Al reamplificar el fragmento con la mezcla de oligonucleótidos 1281-1283, se generaron siete amplicones y cuatro amplicones con el 1253 con las mismas condiciones de amplificación que generó la banda de 1.2 Kb, por lo que se intentó ajustar las condiciones de reacción de la PCR (temperatura de alineamiento, tiempo de extensión, concentración de DNA y de magnesio) en ambos casos, sin embargo, no se obtuvo la banda de 1.2 Kb. La aparición de estos amplicones probablemente se debió a que la temperatura de alineamiento fue de baja astringencia (35 °C), lo que condujo a un alineamiento poco específico del oligonucleótido, dando como resultado la amplificación de diferentes regiones dentro del mismo fragmento. Cuando se clonaron estas regiones, se caracterizaron 70 clonas recombinantes (blancas) por el método de purificación de plásmido y por PCR en colonia, ambos métodos resultaron eficientes, ya que con los dos se identificaron sólo tres clonas correspondientes a los fragmentos de 0.9, 0.8 y 0.6 Kb, el más pequeño de 0.36 Kb no se detectó, probablemente a que sólo se analizaron las colonias bacterianas blancas, cuyo color indica la inactivación insercional en la secuencia del α -péptido de la enzima β -galactosidasa. Sin embargo, se ha reportado que en colonias azules

pueden encontrarse fragmentos clonados hasta de 2 Kb, porque, a pesar de que se clonan dentro del gen *lacZ*, tienen la peculiaridad de que su tamaño es múltiplo de tres pares de bases incluyendo las colas de adenina en la terminal 3' y no tiene codón de paro, lo que da como resultado que no se interrumpa la secuencia que codifica para la β -galactosidasa, produciendo colonias de color azul (Robles and Doers, 1994). En este caso, no se analizaron las clonas azules en las que probablemente se encontraba el fragmento pequeño. Posteriormente, al comparar la secuencia de estos tres fragmentos con las secuencias de todos los hongos depositadas en el GenBank se encontró que las secuencias que presentaban menos homología con hongos de importancia médica, son las obtenidas de las clonas Hc-1253_{0,8} y Hc-1253_{0,9}, no obstante que compartían ciertas regiones con *P. carinii*, *A. Niger* y *A. flavus*, se eliminaron estas regiones para el diseño de los oligonucleótidos específicos. La secuencia obtenida de la clona Hc-1253_{0,6}, también presentó homología con estos hongos, de tal manera que cuando se eliminaron estas regiones el fragmento se acortó hasta aproximadamente 100 pb, por lo que fue eliminado. Se obtuvieron dos pares de oligonucleótidos específicos para *H. capsulatum* que generan fragmentos de 220 y 230 bp, los que al ser probados en condiciones de alta astringencia (55 °C) mostraron una especificidad del 100 % con todos los aislamientos del hongo utilizados en este estudio y no se observó producto de amplificación con DNAs de *A. fumigatus*, *M. tuberculosis* y *S. schenckii*. La sensibilidad del ensayo se determinó amplificando diferentes concentraciones del DNA de *H. capsulatum* encontrando que la cantidad mínima detectada es de 1.0 pg. Consideramos que los marcadores SCARs generados en este trabajo serán de gran utilidad en el proceso de monitoreo y detección del hongo en aislamientos típicos y atípicos (variación morfológica o imposibilidad de transición dimórfica) (Sandín *et al.*, 2003). No obstante que varios investigadores han desarrollado sondas moleculares para la detección de *H. capsulatum*, algunas carecen de especificidad, como las que utilizan copias de un gen o genes ribosomales, estos ensayos han mostrado alta sensibilidad, sin embargo, la naturaleza conservada de estos genes puede causar amplificaciones no específicas, esto fue demostrado por Bialek *et al.* (2002) quienes encontraron inespecificidad, aún a alta astringencia de su PCR. Existen otras sondas con buena sensibilidad y especificidad, como la PCR basada en la secuencia nucleotídica del antígeno H de *H. capsulatum* (Bracca *et al.*,

2003), otra es la PCR anidada que amplifica una región del gen que codifica para una proteína de 100 kDa (Bialek *et al.*, 2002). Estas sondas muestran ser herramientas importantes en la identificación del hongo, sin embargo han sido obtenidas a partir de cepas aisladas en Norteamérica por lo que se requiere una validación con aislamientos de nuestro país o como se propone en este trabajo, utilizar sondas específicas generadas a partir de aislamientos autóctonos, ya que existe una gran variabilidad genética entre aislamientos de distintas regiones geográficas, demostrada por RAPD-PCR y secuencias parciales de genes (Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Sahaza-Cardona, 2004).

CONCLUSIONES

1. El RAPD (no obstante que utiliza condiciones de baja astringencia) es una técnica útil para la generación de marcadores moleculares especie-específicos.
2. Los marcadores SCARs 1253220(1c)-a, 1253220(1c)-b, 1253230(1c)-a y 1253230(1c)-b seleccionados, amplifican una sola banda específica de *H. capsulatum* de 220 y 230 pb respectivamente.
3. Los marcadores SCARs obtenidos, detectan aislamientos de MX, CO, AR, GT, PA, EUA.
4. Los marcadores SCARs obtenidos para *H. capsulatum* no amplifican DNAs de *S. schenckii*, *A. fumigatus* y *M. tuberculosis*.
5. Los marcadores SCAR detectan hasta 1.0 pg de DNA de *H. capsulatum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi PA, Miller SA, Meulia T, Hoiting HA, Kim J. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5421-5426.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robetson VJ, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 40:1642-1647.
- Bimboim HC, and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1522.
- Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. 2003. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:1753-1755.
- Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. 2001. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genet. Biol.* 34:37-48.
- Castrillo LA, Vandenberg JD, Wraight SP. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J. Invertebr. Pathol.* 82:75-83.
- 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. Nac. Enf. Resp. Méx.* 11:187-191.
- Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Procop GW. 2001. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using AccProbe on an excised valve. *J. Clin.*

Microbiol. 39: 2640-2641.

Gómez B, Figueroa J, Hamilton A, Ortiz B. 1997. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 35:2618-2622.

Güssow D, and Clackson T. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase reaction. Nucleic Acids Res. 17: 4000.

Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. 1992. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. J. Clin. Microbiol. 30:3003-3004.

Haynes K, Westerneng T, Fell J, Moens W. 1995. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. J. Med. Vet. Mycol. 33:319-325

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, N.Y.

Huffnagle K, and Gander R. 1993. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* Accuprobes. J. Clin. Microbiol. 31:419-421.

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, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Kamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol. 12:3383-3401.

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, Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. J. Clin. Microbiol. 27:2369-2372.

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.
- Lamps LW, Molina CP, West AB, Haggitt RC, Scott MA. 2000. The pathologic spectrum of gastrointestinal and hepatic histoplasmosis. Am. J. Clin. Pathol. 113: 64-72.
- Li KN, Rouse DI, Eyestone EJ, German TL. 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. Mycol. Res. 11:1361-1368.
- Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 41:1295-1298.
- Matos Guedes HL, Jefferson Guimaraes A, Medeiros Muniz M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, Deepe GS Jr, Zancopé-Oliveira RM. 2003. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J. Clin. Microbiol. 41:535-539.
- Morgan J, Cano M, Feikin D, Phelan M, Velásquez MO, Carpenter J, Weltman A, Spitzer PG, Liu HH, Mirza SA, Bronstein DE, Morgan DJ, Kirkman LA, Brandt ME, Iqbal N, Lindsly MD, Warnock DW, Hajjeh RA. 2003. A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, México, Spring 2001. Am. J. trop. Med. Hyg. 69:663-669.
- Padhye A, Smith G, Standard P, McLaughlin D, Kaufman L. 1994. Comparative evaluation of chemiluminiscent DNA Probe Assays and Exoantigen Test for Rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. J. Clin. Microbiol. 32:867-870.
- Pedroza-Serés M, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. 1994. The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: A preliminary study. J. Med. Vet. Mycol. 32:83-92.
- Reid TM, Schafer MP. 1999. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. Mol. Cell. Probes. 13:269-273.
- Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osorio J, Taylor ML. 1998. Tipificación de aislados clínicos

- de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Méx. 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.
- Robles J, and Doers M. 1994. pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. Promega Notes 45,19.
- Rodríguez-Arellanes G; Loza-Taylor T, Duarte-Escalante E, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en zonas urbanas de México. En: VII Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro, 2000, 175.
- Sahaza-Cardona JH. 2004. Relación genética entre aislamientos de *Histoplasma capsulatum* asociados a diferentes formas clínicas y distribución geográfica. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. 1995. Molecular Probes for diagnosis of fungal infections. J. Clin. Microbiol. 33:2913-2919.
- Sandin RL, Isada CM, Hall GS, Tomfor JW, Rutherford I, Rogers AL, Washington JA. 1993. Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA Probe. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 17:235-238.
- 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.
- 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.
- Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts G. 1993. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of

Blastomyces dermatitidis, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Microbiol.* 31:845-850.

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. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (Submitted).

Taylor ML; Granados J; Toriello C. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses.* 39:375-37.

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.* 136:441-448.

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. Nuevas aportaciones sobre la epidemiología de la histoplasmosis en México: avances en el conocimiento de aspectos inmunológicos y moleculares y de la distribución geográfica del agente etiológico. *VITAE Academia Biomédica Digital.* 10:1-3, 1-4, 1, 1-2, 2002.

<http://caibco.ucv.vt/vitae/VitaeDiez/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/ArchivosHTML/Antecedentes.htm>

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

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, Ruiz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Álvarez RO, Roldán-Aragón YA, Romero-Martínez M, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osomio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. 2004b Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, México. 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.

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, 9° ed. Arnold and Oxford University Press, Inc. New York, N.Y.

Ueda Y, Sano A, Tamura M, Inomata T, Kamei K, Yokoyama K, Kishi F, Ito J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K. 2003. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. Vet. Microbiol. 94: 219-224.

Vaca-Marín MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. 1998. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Méx. 11:208-215.

Velasco-Castrejón O. 1998. Micosis Profundas, p.231-243. En: García-García ML, Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino-Gómez JL (eds.). Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. INDRE, Secretaria de Salud. México, D.F.

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.

Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations: Mycorrhiza. 12:19-27.

Wheat LJ, 1994. Histoplasmosis recognition and treatment. Clin. Infect. Dis. 19:19-27.

Wheat LJ. 2003. Current diagnosis of histoplasmosis. Trends in Microbiology. 11: 488-

494.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Baker RL. 1990. Disseminated histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome clinical findings, diagnosis and treatment. *Medicine*. 69:361-374.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. 2002. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43:29-37.

Wheat LJ, Kohler R, Tewari R. 1986. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N. Engl. J. Med.* 314:83-88.

Williams B, Fojtasek M, Connolly-Stringfield P, Wheat LJ. 1994. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118:1205-1208.

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.

Xu M, Huaracha E, Korban SS. 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome*. 44:63-70.

Xu M, and Korban SS. 2003. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in apple genome. *Plant Mol. Biol.* 50:803-818.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 1. Aislamientos y/o cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de diferentes fuentes y orígenes geográficos con evidencia de la banda de 1.2 Kb.

Número de Registro	Acronimo	Origen	Fuente de aislamiento
EH-46*	5037	México	Humano
EH-53*	5033	Guatemala	Humano
EH-303*	H.102.W	Guatemala	Humano
EH-316*	6006	México	Humano
EH-317*	396	México	Humano
EH-318*	788	México	Humano
EH-319*	6027	México	Humano
EH-323*	6010	México	Humano
EH-324*	6023	México	Humano
EH-325*	6032	México	Humano
EH-326*	1176	México	Humano
EH-327*	6064	México	Humano
EH-328*	6059	México	Humano
EH-329*	MZ	Colombia	Humano
EH-331*	G-186B	Panamá	Humano
EH-333*	L-100-91	Guatemala	Guano/ave
EH-335*	G-217B	Estados Unidos de América	Humano
EH-336*	Downs	Estados Unidos de América	Humano
EH-355*	EH-91	México	Humano
EH-356*	EH-92	México	Humano
EH-357*	EH-94	México	Humano
EH-359*	1443	México	Humano
EH-362*	Cepa 2	Guatemala	Guano/ave
EH-363*	Cepa 3	Guatemala	Humano
EH-364*	H.1.12.96	Guatemala	Humano
EH-372**	M-237	México	Murciélago

EH-373**	M-234	México	Murciélago
EH-374**	M-236	México	Murciélago
EH-375**	M-238	México	Murciélago
EH-376**	M-245	México	Murciélago
EH-377**	M-243	México	Murciélago
EH-378**	M-235	México	Murciélago
EH-383H**	M-254H	México	Murciélago
EH-383P**	M-254P	México	Murciélago
EH-383I**	M-254I	México	Murciélago
EH-384H**	M-267H	México	Murciélago
EH-391**	M-256	México	Murciélago
EH-393**	M-305B	México	Murciélago
EH-408B**	M-349B	México	Murciélago
EH-408H**	M-349H	México	Murciélago
EH-409*	JB	México	Humano
EH-410*	GV	México	Humano
EH-417***	92590	Argentina	Humano
EH-418***	951539	Argentina	Humano
EH-419***	951814	Argentina	Humano
EH-420***	993444(1/97)	Argentina	Humano
EH-536***	LA	Colombia	Humano
EH-537***	WCh	Colombia	Humano
EH-538***	GLi	Colombia	Humano
EH-539***	DS	Colombia	Humano
EH-540***	AP	Colombia	Humano
EH-541***	LF	Colombia	Humano
EH-542***	RG	Colombia	Humano
EH-548****	01558	Argentina	Humano
EH-549****	01559	Argentina	Humano
EH-554B*	S-164(RB)	México	Suelo/guano

EH-557*	2003032	México	Humano
EH-560****	01733	Argentina	Humano
EH-561****	01734	Argentina	Humano
EH-571****	90455	Argentina	Humano
EH-578****	01731	Argentina	Humano
EH-579****	01732	Argentina	Humano
EH-580****	01735	Argentina	Humano
EH-581****	01736	Argentina	Humano
EH-582****	01737	Argentina	Humano
EH-584****	01740	Argentina	Humano
EH-590****	01747	Argentina	Humano
EH-591****	01752	Argentina	Humano
EH-592****	01753	Argentina	Humano
EH-593****	01754	Argentina	Humano
EH-594****	01755	Argentina	Human
EH-596****	01766	Argentina	Humano
EH-598****	01862	Argentina	Humano
EH-601****	01893	Argentina	Humano
EH-608****	02929	Argentina	Humano
EH-609****	02930	Argentina	Humano
EH.611****	02932	Argentina	Humano
EH-614****	02935	Argentina	Humano
EH-616****	02937	Argentina	Humano
EH-617****	02938	Argentina	Humano

*Los DNAs de estos aislamientos fueron extraídos para el trabajo y reportados en Reyes-Montes *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2004b.

** Los DNAs de estos aislamientos fueron obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM (Taylor *et al.*, 2004a).

***Los DNAs de estos aislamientos fueron obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM (Sahaza-Cardona, 2004).

****Los DNAs de estos aislamientos fueron proporcionados por la Bioquímica Cristina Canteros del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina.

Tabla 2. Aislamientos de *S. schenckii* probadas con los marcadores SCARs específicos para *H. capsulatum*.

Número de registro	Origen	Fuente de aislamiento
022	Colombia	Humano
EH-143	México	Humano
EH-189	México	Humano
EH-193	México	Naturaleza
EH-194	México	Naturaleza
EH-195	México	Naturaleza
EH-196	México	Naturaleza
EH-217	México	Humano
EH-218	México	Humano
EH-227	Guatemala	Humano
EH-230	Guatemala	Humano
EH-235	Guatemala	Humano
EH-247	México	Humano
EH-252	México	Naturaleza
EH-257	México	Naturaleza
9421	Colombia	Humano
15565	Colombia	Humano
9805079	Colombia	Humano

DNAs obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM

Tabla 3. Aislamientos de *A. fumigatus* probadas con los marcadores SCARs específicos para *H. capsulatum*.

Número de registro	Origen	Fuente de aislamiento
III	Argentina	Humano
V	Argentina	Humano
951740	Argentina	Humano
951744	Argentina	Humano
951746	Argentina	Humano
191	México	Humano
64	México	Humano

DNAs obtenidos del banco de DNAs del Laboratorio de Micología Molecular, Depto de Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM

Tabla 4. Aislamientos de *M. tuberculosis* probadas con los marcadores SCARs específicos para *H. capsulatum*.

Número de registro	Origen	Fuente de aislamiento
5522	México	Humano
45540	México	Humano
10856	México	Humano
16486	México	Humano
26932	México	Humano

DNAs donados por la Dra. Miriam Bobadilla del Valle. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán S.S.

PERSPECTIVAS

Para comprobar la elevada especificidad encontrada de estos marcadores se valorará en muestras clínicas sospechosas y con histoplasmosis confirmada, además de muestras de la naturaleza. También se plantea la caracterización genética y molecular del gen completo de los marcadores SCARs.

