



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA POR RAPD-
PCR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Histoplasma
capsulatum* DE DIFERENTES ORÍGENES
GEOGRÁFICOS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A
MARIBEL PUEBLA AMADO



**Directora de tesis: Dra. María del Rocío Reyes
Montes**

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 de la Dra. Maria Lucia Taylor

Con la asesoría del Dr. Gerardo Zúñiga del Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México

**Este trabajo fue financiado gracias al apoyo concedido por CONACyT
(Proyecto 34443-M)**

Durante el desarrollo de este trabajo la autora fue becaria del CONACyT (Proyecto 34443-M)

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 15 |
| HIPÓTESIS | 16 |
| OBJETIVO GENERAL | 16 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 16 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| Aislamientos fúngicos | 17 |
| Identificación microscópica de la fase micelial | 19 |
| Prueba de exoantígenos para <i>H. capsulatum</i> | 19 |
| Transición de la fase micelial a la fase levaduriforme | 20 |
| Cultivo micelial de aislamientos y cepas de referencia | 20 |
| Extracción del DNA genómico. | 21 |
| Análisis de la calidad del DNA mediante electroforesis | 22 |
| Determinación de la concentración de DNA | 22 |
| Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) | 22 |
| Programa de amplificación | 23 |
| Electroforesis | 23 |
| Obtención de los porcentajes de las bandas compartidas por los aislamientos de cada grupo geográfico generadas por RAPD-PCR con cada oligonucleótido | 24 |
| Análisis de datos | 24 |
| RESULTADOS | 26 |
| Identificación microscópica de la fase micelial. | 26 |
| Prueba de exoantígenos | 27 |
| Transición dimórfica de fase | 28 |
| Determinación de la concentración del DNA genómico | 28 |
| Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) | 29 |
| Obtención de los porcentajes de las bandas compartidas por los aislamientos de cada grupo geográfico generadas por RAPD-PCR con cada oligonucleótido | 29 |
| Análisis de datos | 35 |
| DISCUSIÓN | 38 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA | 42 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Micromorfología colonial de un aislamiento representativo de <i>H. capsulatum</i> (EH-316) | 26 |
| Figura 2. Producción de exoantígenos de aislamientos de <i>H. capsulatum</i> representativos de cada región geográfica | 27 |
| Figura 3. Determinación de la concentración de DNA genómico de los aislamientos clínicos de <i>H. Capsulatum</i> | 28 |
| Figura 4. Polimorfismo genético de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1253 | 29 |
| Figura 5. Polimorfismo genético de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1281 | 30 |
| Figura 6. Polimorfismo genético de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> empleando el oligonucleótido 1283 | 31 |
| Figura 7. Polimorfismo genético de los aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> empleando la combinación de los oligonucleótidos 1281-1283 | 32 |
| Figura 8. Relación genética de 30 aislamientos y cepas de <i>H. capsulatum</i> | 36 |
| Figura 9. Análisis de componentes principales (ACP) | 37 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Aislamientos y cepas de <i>Histoplasma capsulatum</i> | 18 |
| Tabla 2. Porcentaje de las bandas compartidas con cada oligonucleótido en los grupos geográficos estudiados | 34 |

RESUMEN

La histoplasmosis es una infección causada por el hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, que presenta diversos cuadros clínicos. Es un hongo dimórfico que tiene una fase micelial filamentosa multicelular en la naturaleza, pero cuando infecta un huésped susceptible se convierte en levadura unicelular. Aunque *H. capsulatum* ha sido tipificado por diferentes métodos, su diversidad no ha conducido a una clasificación preferencial y la necesidad de conocer las especificaciones geográficas y clínicas de este hongo sigue vigente. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genotípicamente aislamientos clínicos procedentes de Centroamérica y Sudamérica e identificar y seleccionar un marcador molecular del hongo para estos grupos geográficos. Se utilizaron 27 aislamientos clínicos procedentes de México (MX), Colombia (CO) y Guatemala (GT), además se incluyeron tres cepas de referencia; dos de Estados Unidos de América (EUA) y una de Panamá (PA) que representan las 3 clases propuestas por Vincent *et al.* (1986). Se identificaron los aislamientos/cepas correspondientes a *H. capsulatum* por características fenotípicas como la micromorfología de la fase micelial, producción de exoantígenos y transición de fase del hongo. La caracterización genotípica de los aislamientos/cepas se llevó a cabo utilizando la técnica de RAPD-PCR (Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa) con 3 oligonucleótidos: 1253, 1281, 1283 y la mezcla 1281-1283. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa NTSYS-PC, versión 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System). Como resultado los aislamientos clínicos fueron identificados como *H. capsulatum*, por la observación microscópica de macro y microconidios, característicos del género y especie en su fase micelial, por la producción de exoantígenos y por la transición de fase micelio-levadura de todos los aislamientos. Se obtuvieron cuatro patrones polimórficos, identificando un total de 85 marcadores moleculares bien definidos y repetitivos, con estos datos se construyó una matriz de datos de presencia-ausencia, a partir de la cual se obtuvo una matriz de similitud genética pareada con el índice de Jaccard y se construyó un dendrograma por el método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA), el cual mostró cuatro grupos. El grupo **I**, incluyó dos subgrupos: el subgrupo **Ia** integrado por los aislamientos de MX, GT y la cepa de referencia G-217B de EUA. El subgrupo **Ib** se formó por 10 de los 12 aislamientos procedentes de CO. El grupo **II** sólo incluyó a un aislamiento de CO (GeM). El grupo **III** incluyó sólo la cepa de referencia G-186B de PA y finalmente, en el grupo **IV**, se agruparon dos aislamientos, uno procedente de CO (Hz) y la cepa de referencia Downs de EUA. Se calculó el coeficiente de correlación cofenética para determinar el grado de relación entre la matriz del dendrograma obtenido y la matriz de similitud genética. La agrupación de los aislamientos/cepas de referencia observados en el dendrograma se confirmaron con el Análisis de Componentes Principales (ACP), con la que se estableció multidimensionalmente la relación de los aislamientos clínicos y las cepas de referencia estudiados. Finalmente, en los patrones polimórficos generados con los oligonucleótidos 1253, 1281 y la mezcla 1281-1283 se observó la presencia del fragmento de 1.23 Kb en alto porcentaje por lo que se postula como un buen marcador específico para la identificación y tipificación de *H. capsulatum* para estas regiones geográficas.

INTRODUCCIÓN

Clasificación taxonómica de *Histoplasma*:

Reino Fungae

Phylum Ascomycota

Clase Plectomycetes

Orden Eurotiales

Familia Gymnoascaceae

Género *Histoplasma*

La histoplasmosis es un complejo de tres enfermedades causadas por diversas variedades de *Histoplasma capsulatum*; dos de ellas afectan al hombre: la causada por *H. capsulatum* var. *capsulatum* llamada también “histoplasmosis americana” por presentarse en América el mayor número de casos y la causada por *H. capsulatum* var. *duboisii*, conocida como “histoplasmosis duboisii” o histoplasmosis africana, por confinarse a este continente los casos reportados y la “histoplasmosis equina” que es la causante de la linfagitis epizoótica de equinos como: caballos y mulas, cuyo agente es *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*, Darling 1906, es el agente etiológico de la “histoplasmosis capsulati”, nombre actual de la enfermedad asociada a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, es un hongo patógeno dimórfico que crece en el ambiente o *in vitro* a 25 °C en forma filamentosa multicelular, esta fase micelial presenta abundantes macro y microconidios, estos últimos, junto con pequeños fragmentos de hifas (propágulos) son las estructuras que al ser inhaladas infectan a los huéspedes susceptibles, dando inicio al proceso infeccioso, con posible evolución a la enfermedad. En el huésped infectado el

hongo es un parásito intracelular facultativo del sistema fagocítico mononuclear, y en el laboratorio se desarrolla a 37 °C como una levadura gemante unicelular. La transición de micelio-levadura es un proceso reversible y esta habilidad es muy importante en la patogénesis del hongo, ya que implica que el organismo pueda adaptarse a diferentes condiciones ambientales por la expresión de genes específicos de fase, cuyos productos son críticos para la supervivencia y colonización de un ambiente dado (Medoff *et al.*, 1986; 1987; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Abidi *et al.*, 1998; Vigh *et al.*, 1998).

Aspectos clínicos de la histoplasmosis

Frecuentemente, los síntomas de la infección por *H. capsulatum* son subclínicos y debido a una buena respuesta inmune del hospedero, la infección pasa desapercibida, sin embargo, cuando el sistema inmune falla sobre el control de la infección y no elimina totalmente el hongo, éste puede causar la enfermedad activa con un curso de moderado a agudo o grave, que lleva a una infección pulmonar crónica o incluso una histoplasmosis diseminada, lo que depende del inóculo y sobretodo de la susceptibilidad del hospedero (Kwon-Chun and Bennete, 1992). Ocasionalmente, se conoce que *H. capsulatum* tiene predilección por un sitio determinado en el hospedero parasitado, ya que produce diversos cuadros clínicos localizados como los pulmonares, meningoencefálicos, oculares, cutáneos y mucocutáneos. Durante la enfermedad el hongo produce dos antígenos importantes, el antígeno H que induce anticuerpos durante la enfermedad activa y el antígeno M que es considerado inmunodominante, ya que los anticuerpos contra este antígeno son los que surgen primero en la infección, están presentes durante todas las fases de la enfermedad y pueden ser detectados aún después de resuelta ésta. (Zancopé-Oliveira *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1999; Fisher and Woods, 2000).

En América, predomina el cuadro localizado pulmonar, en México (MX), el pulmonar primario (HPP) es el más importante y se encuentra asociado a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, Este cuadro clínico es la forma epidémica que se encuentra asociada a una elevada letalidad y morbilidad, que cursa frecuentemente como una infección subclínica o asintomática, ya que no todos los pacientes con esta infección pulmonar presentan cambios radiográficos durante el curso de la infección, es diagnosticada principalmente en enfermos adultos y rara vez se le asocia con cavitaciones pulmonares, este cuadro clínico es muy similar al de la tuberculosis pulmonar y por lo tanto puede confundirse y pasar desapercibida (Rippon, 1988; Velasco-Castrejón, 1998). Anteriormente en nuestro país, la histoplasmosis en su forma diseminada era considerada una entidad clínica ocasional, pero a partir de 1980 hubo un aumento de esta forma clínica debido al incremento de individuos inmunosuprimidos (Vaca-Marín *et al.*, 1998). Las personas inmunocomprometidas y en particular las personas que son VIH positivas o que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son las más susceptibles a todo tipo de infecciones, incluyendo las fúngicas (Neubauer and Bodensteiner, 1992; Nightingale *et al.*, 1990). Gracias al auge de la terapia anti-retroviral en pacientes con SIDA, se han reducido las infecciones oportunistas, entre ellas la histoplasmosis, que se presenta con un pronóstico grave y con curso clínico hacia la forma diseminada. En el caso de los pacientes con SIDA y con histoplasmosis sistémica, que residen en regiones donde la histoplasmosis no es endémica, se sugiere que la enfermedad resulta de la reactivación endógena de una infección previa con *H. capsulatum* (Keath *et al.*, 1992). Uno de los mecanismos que puede explicar esta reactivación es el sugerido por Eissenberg *et al.* (1996), donde plantean que el hongo puede mantenerse en forma latente en ambientes intracelulares de células permisivas de algunos tejidos de huéspedes susceptibles y posiblemente al manifestarse una

disminución en la función del sistema inmune debido a circunstancias como edad avanzada, terapia con inmunosupresores o SIDA, puede resultar en una reactivación endógena de la infección, con posible enfermedad sistémica.

Epidemiología de la “histoplasmosis capsulati”

La histoplasmosis es la micosis sistémica de mayor trascendencia en el mundo ya que se ha referido en aislamientos clínicos, de suelo y de animales infectados de todo el mundo, (Kwon-Chung and Bennet, 1992), sin embargo, las áreas endémicas con mayor número de casos, se localizan en el valle de Ohio y en la región del valle de Mississippi en los Estados Unidos de América (EUA), así como en varias regiones de Latinoamérica (Rippon, 1988). Los escasos reportes de la enfermedad en MX se iniciaron en la década de los cuarenta, aunque existen datos que remontan su probable descripción al siglo pasado (Taylor *et al.*, 1996). El primer reporte del aislamiento del agente etiológico, ocurrió en enero de 1957, cuando el Dr. González-Ochoa aisló el hongo de un estudiante que refería haber visitado una cueva situada entre Monterrey, Nuevo León y Ciudad Victoria, Tamaulipas, dicho estudiante señaló haber observado abundante guano de murciélago en tal sitio (González-Ochoa, 1957).

En el país, resalta por ser la micosis sistémica de más alta prevalencia tanto en su forma endémica como epidémica y también por el alto índice de letalidad observado en la HPP, la cual se encuentra asociada generalmente a brotes epidémicos, dado principalmente por su relación estrecha con actividades laborales específicas que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad y por su frecuente aumento asociado a SIDA (Vaca-Marín *et al.*, 1998, Velasco-Castrejón, 1998). Así mismo, se desconoce el número de casos de histoplasmosis que ocurren por año, pues hasta hace algunos años, tales casos eran referidos

ocasionalmente, originando información con registros parciales y desordenados, también, se debe considerar que por la ubicuidad del hongo, la histoplasmosis endémica puede ser subestimada por la ausencia de registros, ya que anteriormente las enfermedades por hongos no formaban parte de la notificación obligatoria del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por lo que aún permanece subnotificada, esto aunado al desconocimiento del personal médico y paramédico especializado, y al enmascaramiento de la enfermedad, pues los síntomas son muy parecidos al de enfermos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.

En 1988 se iniciaron los primeros registros oficiales de esta micosis, por parte de la Dirección General de Epidemiología (como órgano oficial del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud), refiriendo 1065 casos nuevos hasta 1994, sin embargo datos no oficiales señalan un número mayor, como lo refirió el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas (InDRE), donde se han estudiado 102 epidemias desde 1953 a 1997, reportando 1,444 casos de enfermos infectados con histoplasmosis, lo que pone de manifiesto la gran importancia de esta enfermedad (Contreras *et al.*, 1998). Aunque en los últimos años, se ha observado un aumento de casos clínicos y una mayor frecuencia de brotes epidémicos.

Esta micosis ha sido registrada en todas las entidades federativas del país y representa un problema de salud ambiental y laboral, especialmente para las personas que viven, acuden o trabajan en las zonas consideradas de alto riesgo de infección, donde se encuentran las condiciones ideales que favorecen el desarrollo del agente etiológico como es el caso de suelos mezclados con excretas de aves y murciélagos (Taylor *et al.*, 1996, 2000b; Velasco-Castrejón, 1998; Vaca-Marín *et al.*, 1998).

La prevalencia de la histoplasmosis en diferentes zonas geográficas del país es variable, el conocimiento de este problema dado por esta micosis no sólo se restringe al registro de las epidemias, ya que la infección pasada o presente también puede ser determinada por la reacción cutánea al antígeno del hongo, denominado “histoplasmina”. Las pruebas de reactividad cutánea han puesto de manifiesto a miles de personas infectadas en el país y los estados más afectados se encuentran en el centro, sur y sureste de México (González-Ochoa y Félix, 1971). Más recientemente, para estimar la información actual sobre la distribución de la histoplasmosis en el país, se llevaron a cabo estudios inmunoepidemiológicos evaluados mediante la reacción intradérmica con la histoplasmina y el PPD (derivado proteico purificado), efectuados en zonas de mayor y menor riesgo de infección de distintos municipios dentro de la misma entidad federativa, los resultados revelaron zonas con población de alta y de baja reactividad a la histoplasmina, mientras que la respuesta al PPD presentó una distribución más uniforme; por ejemplo, en poblaciones de Coyuca de Benítez, Guerrero y el estado de Tlaxcala son consideradas de baja endemicidad, mientras que en Bucareli, Querétaro; Juxtlahuaca y Olinalá, Guerrero, son consideradas como áreas de alta endemicidad (Taylor *et al.*, 1996, 1997, 2000a, 2000b; Pedroza-Serés *et al.*, 1994).

En las poblaciones estudiadas, la proporción de respuesta cutánea positiva a la histoplasmina siempre fue más alta en los hombres que en las mujeres, dato que confirma una vez más que existe un riesgo laboral asociado a esta micosis, encontrando un mayor riesgo de primocontacto en los hombres con este patógeno fúngico. De igual modo, se observó que en las zonas endémicas de histoplasmosis, la respuesta cutánea a la histoplasmina está muy relacionada con ciertas actividades laborales, y los más altos porcentajes de pruebas positivas se relacionan con individuos que trabajan como limpiadores de bocaminas, mineros, guías turísticos de cuevas o grutas, recolectores de

guano y en personas que manipulan la pollinaza, gallinaza y/o el complemento alimentario para ganado enriquecido con excretas de aves. En contraste, la ausencia de la reacción cutánea se observó en aquellas personas que realizan actividades laborales no relacionadas con el hábitat del hongo, como la pesca, el comercio ambulante y otros, quizás en parte, esto explique la variación de los porcentajes de reactividad a la histoplasmina dentro de un mismo estado, ya que hay una relación estrecha con la actividad ocupacional de la población de la zona estudiada, y a su vez también se pueda explicar la más alta respuesta de la población masculina a la reacción intradérmica con la histoplasmina, puesto que los hombres, en los sitios estudiados, se dedican a labores de mayor riesgo de infección que las mujeres. Cabe mencionar que experimentalmente en un modelo murino BALB/c se observó que el desarrollo de la enfermedad, con evolución hacia la diseminación y muerte, varía con el sexo del animal, siendo las hembras mucho más resistentes a la infección que los machos (Taylor *et al.*, 1982; Reyes-Montes *et al.*, 1988).

El riesgo de infección se da en individuos susceptibles en cualquier sitio donde se encuentran las condiciones físicas y nutricionales idóneas para el patógeno. En nuestro país, ha sido registrada la presencia del agente etiológico en zonas urbanas tanto por su aislamiento en parques públicos como por la asociación con epidemias adquiridas en las urbes, como las registradas recientemente en un hotel del Puerto de Acapulco, Guerrero, reportándose un polémico brote de histoplasmosis pulmonar aguda ocurrido durante el período marzo-mayo de 2001, en el que se vieron afectados un gran número de turistas norteamericanos, que refirieron no haber participado en actividades que se relacionaran con el hábitat del hongo, en este estudio no se pudo determinar la fuente de infección (Morgan *et al.*, 2003). Posteriormente, Taylor *et al.* (2005a) 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 animales y material orgánico en descomposición), identificando así la fuente de infección.

Epidemiología Molecular de *H. capsulatum*

Hasta hace algún tiempo y como se mencionó anteriormente, los estudios epidemiológicos de la enfermedad estaban restringidos a informes de casos clínicos y datos de intradermoreacción determinados por la prueba cutánea con el antígeno específico histoplasmina, o bien por la obtención de aislamientos del hongo a partir de casos clínicos y de escasas fuentes en la naturaleza.

Actualmente, la epidemiología moderna trata de emplear diferentes métodos de tipificación para el estudio de diversidad, marcaje y distribución geográfica de aislamientos de *H. capsulatum* de la naturaleza o de casos clínicos. Estos métodos deben cumplir ciertos criterios para ser ampliamente utilizados (Pfaller, 1992).

En la epidemiología molecular de *H. capsulatum* se han utilizado tanto los métodos fenotípicos como los genotípicos, que han permitido comprender mejor la distribución y frecuencia de las infecciones causadas por este hongo (Gaur *et al.*, 1981; Hamrick, 1986; Vincent *et al.*, 1986; Spitzer *et al.*, 1990; Keath *et al.*, 1992; Reyes-Montes *et al.*, 2000; Kasuga *et al.*, 1999; 2003).

Dentro de los métodos fenotípicos, el método de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) es usado ampliamente por su eficiencia y costo relativamente bajo, particularmente en estudios de variabilidad intraespecífica (Bowman *et al.*, 1967; Baptist *et al.*, 1969; Spieth, 1975; Ramshaw *et al.*, 1979; Hamrick, 1982; Braude *et al.*, 1983;

Caugant *et al.*, 1986; Selander *et al.*, 1986; Pérez-Nasser y Piñero, 1997). En micología, este método (MLEE) se ha utilizado en hongos patógenos y no patógenos (Hamrick *et al.*, 1986; Brandt *et al.*, 1993; 1995; Vastag *et al.*, 1998; Simpanya *et al.*, 1998; Svidzinsky and Camargo, 1995; Lehmann *et al.* 1989 a y b) pero aún así, la micología es un área poco explorada con esta técnica a pesar de ser bien aceptada y ampliamente usada en otras disciplinas.

Gaur *et al.* (1981), es considerado como el grupo pionero en la fenotipificación de *H. capsulatum* al realizar un estudio con isoenzimas para analizar la variación en 369 aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos a partir de muestras de suelo de cuatro áreas geográficas de EUA. Los autores registraron de 2-10 diferentes fenotipos enzimáticos los cuales difirieron 40.5% del fenotipo predominante y se demostró que habían altos niveles de variación en el perfil electroforético de ocho isoenzimas.

Mediante el uso de las técnicas moleculares (Eisenstein, 1990) y el subsecuente empleo de éstas en la epidemiología de la histoplasmosis, se han logrado mayores aportaciones y un incremento importante en la información sobre esta enfermedad, tanto en la ubicación de nuevas zonas endémicas como en la relación paciente-fuente de infección, surgiendo así la epidemiología molecular. En las últimas dos décadas, la mayoría de los investigadores han utilizado de preferencia los métodos genotípicos (Electroforesis en gel de campo pulsado, Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de DNA por Southern blot, Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR), Microsatélites y Secuenciación del DNA) para clasificar *H. capsulatum*, ya que han proporcionado herramientas poderosas para el estudio de la diversidad genética de éste y otros patógenos. Estos estudios han revelado que *H. capsulatum* lejos de ser una especie bien resuelta, ésta consiste de grupos distintos o clases

que frecuentemente se correlacionan con el origen geográfico, a la fecha, *H. capsulatum* aún se agrupa en 6 distintas clases y 4 subclases (Vincent *et al.*, 1986; Spitzer *et al.*, 1989; 1990; Keath *et al.*, 1992). De estas clases, en Norteamérica se ha encontrado un grupo predominante definido como clase 2 y otro grupo clasificado como clase 1, que consiste de un aislamiento especial, de baja virulencia y termosensible, conocido como cepa “Downs” (aislada de úlcera vaginal de una paciente diabética) (Gass and Kobayashi, 1969), así como un pequeño número de aislamientos clínicos asociados a SIDA que están estrechamente relacionados con este grupo.

Los aislamientos de Centro y Sudamérica se agrupan en la clase 3, las tres clases adicionales (4, 5 y 6) son pequeñas, la clase 4 incluye un aislamiento de suelo de Florida, las clases 5 y 6 la integran un pequeño número de aislamientos de pacientes con SIDA de New York y Panamá, respectivamente. Por otro lado, Carter *et al.* (1996) analizaron poblaciones de *H. capsulatum* usando marcadores bialélicos y multialélicos, éstos últimos funcionaron adecuadamente para distinguir aislamientos a nivel individual tanto de EUA como de Sudamérica, por lo que son considerados como una herramienta importante en estudios epidemiológicos del hongo. Posteriormente Carter *et al.* (1997) utilizando marcadores multialélicos y microsatélites, encontraron una importante diversidad en los aislamientos de *H. capsulatum*, sugiriendo distintas estructuras de población para este hongo.

Con el propósito de resolver la relación entre las clases mayores y las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum*, Kasuga *et al.* (1999), llevaron a cabo un estudio filogenético con 46 aislamientos de *H. capsulatum*, de diferentes orígenes geográficos que incluyeron representantes de las tres variedades. La relación filogenética de estos aislamientos se llevó a cabo mediante la detección de secuencias parciales del DNA de 4

genes (*arf*, *H-anti*, *ole* y *tub1*) que codifican para proteínas específicas. El análisis identificó seis clados diferentes, donde se incluyó la clase 1 y 2 de Norteamérica, dos grupos genéticamente distintos de Sudamérica (A y B), uno de Panamá y otro que incluye *H. capsulatum* var. *duboisii*. Los autores demostraron recombinación genética en uno de los dos grupos de Sudamérica (grupo A), ya que la secuencia de datos resolvió 33 genotipos multilocus dentro de los 46 aislamientos estudiados, observándose que todos los que muestran diversidad intraespecífica caen dentro de los aislamientos de Sudamérica. Por otro lado, se observó muy poca diversidad genética entre los aislamientos de la clase 2 de Norteamérica, a pesar de que estos aislamientos provenían de diferentes orígenes geográficos, localizados entre el norte y centro de Indiana hasta Arkansas y Georgia en el sur de EUA. Kasuga *et al.* (2003), posteriormente ampliaron el número de muestras al estudiar un total de 137 aislamientos de *H. capsulatum* de diferentes fuentes y orígenes geográficos, proponiendo actualmente que *Histoplasma* tiene ocho clados, de éstos, siete pueden ser reconocidos como especies filogenéticas: 1- población de la clase 1 de Norteamérica, 2- población de la clase 2 de Norteamérica 3- población del grupo A de Latinoamérica, 4- población del grupo B de Latinoamérica, 5- población australiana, 6- población holandesa que incluye una población de Indonesia, 7- población eurasiática, 8- población africana.

En la última década, trabajos pioneros sobre la tipificación molecular de aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de MX han aportado información actualizada y apoya una distribución geográfica de éstos (Taylor *et al.*, 1997; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; 2000) con base en la caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de diferentes fuentes y orígenes geográficos. Reyes-Montes *et al.* (1998, 1999), observaron que los polimorfismos del DNA obtenidos por RAPD-PCR, permitieron ubicar la mayoría de los

aislamientos clínicos de *H. capsulatum* procedentes de MX en un sólo grupo, particularmente los obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA, que referían una residencia definida. Asimismo se observó, que los casos clínicos de Guatemala (GT) se relacionan estrechamente con los aislamientos de MX. Los aislamientos procedentes de pacientes mexicanos se relacionan con los casos clínicos de Guatemala (GT) mientras que resalta el comportamiento distinto de los aislamientos procedentes de pacientes de Argentina (AR), Colombia (CO), Panamá (PA) y EUA. Los resultados obtenidos con RAPD-PCR lograron discriminar entre algunos aislamientos que no fueron detectados por el método de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Sin embargo, la electroinmunotransferencia permitió relacionar con mayor precisión a los aislamientos estudiados, mostrando buena correlación con el método genotípico, además se detectaron 3 bandas comunes de 43, 28 y 18 kDA en todos los aislamientos que podrían ser usadas como marcadores genotípicos del hongo (Reyes-Montes *et al.*, 1998). Salas-Ríos *et al.* (1998), al caracterizar 31 aislamientos obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA por RFLP, observaron 10 perfiles distintos entre los aislamientos estudiados, aunque la mayoría se distribuyeron de manera homogénea en dos grupos. Los autores refieren la detección de dos posibles aislamientos con tipificación similar a la “cepa Downs” (cepa termosensible de baja virulencia prototipo de la clase 1, según la tipificación por RFLP de las cepas de EUA). Sin embargo, hay que destacar que entre los aislamientos procedentes de MX no se encontró ningún perfil que correspondiera a la clase 2, que encierra la mayoría de las cepas de EUA. La presencia de “cepas tipo Downs” en pacientes mexicanos sugiere dos posibles explicaciones, una que los pacientes mexicanos fueron infectados en el país vecino, considerando la gran migración de trabajadores hacia EUA, y la otra es que este prototipo de cepa está asociada a una presión

selectiva de ciertos hospederos inmunocomprometidos y su distribución no está restringida a territorio americano.

Por otro lado, Ríos-Rosas *et al.* (2002) determinaron la relación entre diferentes formas clínicas de la histoplasmosis y sus orígenes geográficos mediante características fenotípicas y genotípicas; utilizaron aislamientos clínicos procedentes de MX, GT, AR y EUA, además de aislamientos obtenidos de murciélagos infectados. Se realizó el estudio de las características fenotípicas reveladas por la termosensibilidad a 40°C y el tiempo de generación de la fase levaduriforme de los aislamientos y de sus características genotípicas reveladas por RAPD-PCR. La cepa Downs (EUA) y sólo dos aislamientos de pacientes mexicanos asociados a SIDA (EH-316 y EH-317) fueron termosensibles, a diferencia de los demás aislamientos estudiados que se comportaron como termotolerantes. Los tiempos de generación (Tg) de la mayoría de los aislamientos estudiados variaron en un rango de 3 a 6.5 h, a excepción de la cepa de referencia Downs que presentó un Tg muy largo de 14.5 h. Las observaciones de estas características fenotípicas de los aislamientos/cepas estudiados permitieron corroborar una diversidad relacionada a la histoplasmosis asociada a pacientes inmunosuprimidos. El análisis de los perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR y analizados por SPSS/PC+ expresados en un dendrograma de similitud permitió reconocer tres grupos. El grupo I integró sólo a los aislamientos procedentes de casos clínicos argentinos. El grupo II incluyó a los aislamientos de casos clínicos mexicanos, de murciélagos naturalmente infectados capturados en Morelos, así como el aislamiento de GT y la cepa de referencia G-217B de EUA. El grupo III fue formado exclusivamente por la cepa Downs. El grupo I se relacionó con los grupos II y III en 75% de similitud, y estos últimos a su vez se relacionaron entre sí en 76%. En este trabajo el análisis de similitud,

demuestra que los grupos polimórficos obtenidos entre los aislamientos, están más asociados a patrones geográficos que a formas clínicas de la histoplasmosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del creciente número de estudios moleculares que se han llevado a cabo en la genotipificación de *H. capsulatum*, aun es escasa la información en la tipificación de aislamientos en Latinoamérica, donde existen áreas endémicas importantes de histoplasmosis; los pocos estudios realizados en Latinoamérica se han enfocado principalmente a dar opciones en el diagnóstico molecular, pero no a estudiar variabilidad genética y asociar el genotipo de los aislamientos con su origen geográfico. Por esta razón, en el presente trabajo se tipificaron por RAPD-PCR, aislamientos de *H. capsulatum* de diferentes fuentes y orígenes geográficos de Latinoamérica (MX, CO, GT) y cepas de referencia de EUA y PA, que representan la clase 1, 2 y 3, de *Histoplasma capsulatum*, tipificadas por RFLP (Vincent *et al.*, 1986; Spitzer *et al.*, 1990; Keath *et al.*, 1992). Asimismo, debido a la gran variabilidad genotípica que existe entre los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de diferentes zonas geográficas (Keath *et al.*, 1992; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 2000c; Pounder *et al.*, 2006), es necesario contar con marcadores moleculares específicos regionales que nos permitan detectar e identificar al patógeno en muestras clínicas y ambientales de diferentes regiones, de manera rápida e inequívoca. Por ello, también consideramos en este trabajo identificar un marcador molecular específico para *H. capsulatum*, a partir de los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR.

HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de MX, CO y GT presentan patrones polimórficos de DNA, que se correlacionan con el origen geográfico y comparten un marcador molecular.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genóticamente por RAPD-PCR, aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de MX, CO, GT y cepas de referencia e identificar y seleccionar un marcador molecular del hongo para estos grupos geográficos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar fenotípicamente por criterios morfológicos, antigénicos y de transición de fase, los aislamientos/cepas de *H. capsulatum*.
2. Obtener los patrones polimórficos de los aislamientos/cepas estudiados por RAPD-PCR.
- 3.-Seleccionar un marcador molecular para *H. capsulatum* de los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR para los aislamientos procedentes de MX, CO, GT, PA y EUA.
4. Analizar y comparar los patrones de DNA polimórficos de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* estudiados por métodos de agrupación y ordenación.

0.....

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos Fúngicos. Se utilizaron 27 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* procedentes de MX, CO, GT y tres cepas de referencia; dos de EUA y uno de PA (**Tabla 1**). Los aislamientos/cepas, pertenecen a la “Colección de Cepas de *H. capsulatum*” del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>). De los 13 aislamientos de MX, 10 provienen de pacientes mexicanos con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA, dos aislamientos también asociados a SIDA carecían de datos clínicos y el último aislamiento obtenido corresponde a un paciente con histoplasmosis mucocutánea sin inmunosupresión alguna. Los 12 aislamientos de CO procedían de casos clínicos de histoplasmosis obtenidos del Instituto Nacional de Enfermedades de Colombia, seis de ellos asociados a SIDA, cinco sin inmunosupresión alguna y sólo uno estaba asociado a lupus eritematoso sistémico. Se incluyeron también dos aislamientos procedentes de GT con histoplasmosis no asociada a SIDA. Finalmente, se incluyeron tres cepas de referencia; dos de EUA (Downs y G-217B) y una de PA (G-186B), todas procedentes de casos clínicos diseminados no asociados a SIDA, obtenidas por cortesía del Dr. G. S. Kobayashi de la Universidad de Washington, St. Louis, MO, EUA. Todos los aislamientos/cepas se preservaron en cultivo en fase micelial a una temperatura de 25-28 °C en agar-BHI (infusión cerebro-corazón agar -Bioxón, Becton-Dickinson, MX).

Tabla 1. Aislamientos/cepas de *Histoplasma capsulatum*

| Nº | Registro en la colección | Acrónimo | Forma clínica | Inmunodeficiencia | País de origen |
|----|--------------------------|-----------|----------------|---------------------|----------------|
| 1 | EH-316 | EH-316 | Diseminada | VIH + | MX |
| 2 | EH-317 | EH-317 | Diseminada | VIH + | MX |
| 3 | EH-319 | EH-319 | Diseminada | VIH + | MX |
| 4 | EH-323 | EH-323 | Diseminada | VIH + | MX |
| 5 | EH-324 | EH-324 | Diseminada | VIH + | MX |
| 6 | EH-325 | EH-325 | Diseminada | VIH + | MX |
| 7 | EH-326 | EH-326 | Diseminada | VIH + | MX |
| 8 | EH-327 | EH-327 | Diseminada | VIH + | MX |
| 9 | EH-328 | EH-328 | Diseminada | VIH + | MX |
| 10 | EH-355 | EH-355 | No determinada | VIH + | MX |
| 11 | EH-356 | EH-356 | No determinada | VIH + | MX |
| 12 | EH-357 | EH-357 | Diseminada | VIH + | MX |
| 13 | EH-359 | EH-359 | Mucocutánea | No Inmunocompromiso | MX |
| 14 | EH-536 | LA | Diseminada | VIH + | CO |
| 15 | EH-537 | WCh | Mucocutánea | VIH + | CO |
| 16 | EH-538 | GLI | Mucocutánea | VIH + | CO |
| 17 | EH-539 | DS | Diseminada | No Inmunocompromiso | CO |
| 18 | EH-540 | AP | Diseminada | No Inmunocompromiso | CO |
| 19 | EH-541 | LF | Diseminada | No Inmunocompromiso | CO |
| 20 | EH-542 | RG | Pulmonar | VIH + | CO |
| 21 | EH-543 | WE | Pulmonar | VIH + | CO |
| 22 | EH-544 | JG | Mucocutánea | VIH + | CO |
| 23 | EH-547 | MZ2 | Mucocutánea | LES | CO |
| 24 | EH-551 | GeM | No determinada | No Inmunocompromiso | CO |
| 25 | EH-553 | HZ | No determinada | No Inmunocompromiso | CO |
| 26 | EH-303 | H.1.02.W | Pulmonar | No Inmunocompromiso | GT |
| 27 | EH-364 | H.1.12.96 | Mucocutánea | No Inmunocompromiso | GT |
| 28 | EH-331 | G-186B * | Pulmonar | No Inmunocompromiso | PA |
| 29 | EH-335 | G-217B * | Diseminada | No Inmunocompromiso | EUA |
| 30 | EH-336 | Downs * | Mucocutánea | Diabetes | EUA |

*: Cepas de referencia

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

MX-México, CO-Colombia, GT-Guatemala, PA-Panamá y EUA-Estados Unidos de América

Identificación microscópica de la fase micelial. Para la identificación microscópica de *H. capsulatum* se empleó el método de microcultivo. La técnica se realizó en condiciones de esterilidad y consistió en cortar un cuadro de agar micobiótico (Bioxón) de 1 cm² con 4 mm de profundidad, éste se colocó sobre un portaobjetos y se depositó dentro de una caja de Petri conteniendo glicerol al 10%. El cuadro de agar se inoculó con la fase micelial del hongo en las cuatro caras laterales, por el método del punto y se hizo un tipo “sandwich” cuando se colocó otro portaobjetos sobre éste. Se incubó de 2 a 3 semanas a 28 °C, después de este tiempo se separaron los portaobjetos inactivando cada uno con formol al 10%; el bloque de agar se desechó en solución de cloro al 10% y esterilizó posteriormente. Para la observación de las estructuras del hongo en el portaobjetos, se colocó una gota de azul de algodón con lactofenol de Amman, después se cubrió con un cubreobjetos y finalmente se observó al microscopio a 100X (Olympus Optical, Japan) para describir su morfología.

Prueba de exoantígenos de *H. capsulatum*. Este método se llevó a cabo de acuerdo con Standard y Kaufman (1976), con el propósito de demostrar la identidad antigénica de todos los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* que se usaron en este estudio. La fase micelial de cada aislamiento/cepa se inoculó en caldo BHI (Bioxón), incubándose en baño María a 28 °C con agitación constante (120 rpm) durante 8-10 días, se inactivó cada cultivo con timerosal 1:5000 y se separó la masa micelial por filtración. Para la prueba inmunológica se utilizaron sueros positivos, así como el antígeno de referencia de la cepa EH-53 del Banco de Sueros y Antígenos del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. La reacción se realizó mediante el método de inmunodifusión en gel (IDG) (Ouchterlony and Nilsson, 1978). La

identificación inmunológica de los aislamientos/cepas se efectuó con base en la aparición de las bandas de identidad, comparadas con la cepa de referencia.

Transición de la fase micelial a levaduriforme. A partir de la fase micelial de los diferentes aislamientos/cepas de *H. capsulatum* estudiados, se inoculó cada micelio en medio sintético de Tewari and Kegel (1971) y se incubó a 37 °C en baño María con agitación constante. Se resembró cada 72 h, hasta obtener la conversión dimórfica. Una vez obtenida la fase levaduriforme del hongo, se cultivó a 37 °C en caldo BHI (Bioxón), adicionado con cisteína 0.1% y glucosa 1%, posteriormente fueron cosechadas en fase logarítmica de crecimiento y por centrifugación se lavaron dos veces con caldo BHI y se almacenaron en criotubos a -80 °C, en presencia de suero fetal de ternera al 90% (GIBCO BRL, Gran Island, Biological Co. N.Y.) y dimetilsulfóxido al 10% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), para su criopreservación.

Cultivo micelial de aislamientos/cepas de referencia de *H. capsulatum*. Se cultivó la fase micelial de 27 aislamientos y tres cepas de *H. capsulatum* en medio GYE (glucosa 2% y extracto de levadura 1%), se incubó a 28 °C en baño María con agitación constante durante 2-3 semanas. Después de este tiempo se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislamiento/cepa, por filtración en un embudo Büchner con papel filtro Whatman No. 1, posteriormente, se lavaron los micelios seleccionados con amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) para eliminar componentes del medio, a continuación se secó la masa micelial con papel filtro estéril y se conservó en un recipiente estéril en congelación a -80 °C hasta su uso. Para verificar la identidad del hongo, se realizó la prueba de exoantígenos en IDG con el filtrado concentrado de cada cultivo, frente

a suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum*, utilizando como control positivo un exoantígeno de la cepa de referencia EH-53 y como testigo negativo solución salina, sólo los micelios que desarrollaron IDG (+) se utilizaron para la extracción de DNA.

Extracción del DNA genómico. Para extraer el DNA de cada hongo seleccionado por IDG, se utilizó el micelio previamente almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se transfirió a un mortero estéril, al cual se agregó nitrógeno líquido para macerarlo con la ayuda del pistilo, se repitió este proceso agregando constantemente nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se recuperó aproximadamente 0.4 mL del polvo micelial de cada aislamiento y se depositó en viales eppendorf estériles de 1.5 mL. Se adicionó 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min y al sobrenadante se le adicionó proteinasa K (GIBCO, BRL) a una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Enseguida, se agregó RNAsa A (Qiagen GmbH Hilden, Germany) a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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, posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min para obtener una fase acuosa superior transparente en la que se encuentran los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10 μL de acetato de sodio 3 M, cada mezcla se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

Análisis de la calidad del DNA mediante electroforesis. Para verificar la calidad del DNA genómico que se obtuvo de los diferentes micelios, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% adicionado con bromuro de etidio en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). En cada pozo del gel se cargó la mezcla consistente de 2 μ L de DNA y 2 μ L de amortiguador de muestra 10 X (azul de bromofenol 0.25 %, xilen cianol 25 % y ficoll 400 25 %). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante 30 min. Este proceso se llevó a cabo con el propósito de observar la presencia y purificación de los diferentes DNAs, en caso contrario se repetía el método de extracción y/o purificación antes mencionado.

Determinación de la concentración de DNA. Para determinar la concentración de DNA se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1%, con 2 μ L de bromuro de etidio, se corrieron diferentes concentraciones de DNA del fago λ (100 150 y 200 ng/ μ L) (GIBCO-BRL) y 2 μ L de los DNAs problemas mezclados con 2 μ L de regulador de muestra de corrida 10X. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante 30 min, después se registró la concentración de cada muestra al comparar las concentraciones de DNA del fago λ con los DNA problemas y estos se ajustaron a una concentración de 5 ng/ μ L.

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Para la genotipificación de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* se utilizó el método de RAPD-PCR empleando tres oligonucleótidos de 10 nucleótidos cada uno: 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3'), 1281 (5'-AACGCGCAAC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) que han sido probados con

excelentes resultados para *H. capsulatum* por Kersulyte *et al.* (1992) y Woods *et al.* (1993), se utilizó también una mezcla de dos oligonucleótidos 1281 y 1283 (Hu *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 2000c). Se establecieron las condiciones óptimas de trabajo, utilizando curvas con diferentes concentraciones de cada reactivo. La mezcla de reacción se preparó como sigue: el volumen total de reacción fue de 25 μ l, conteniendo 10 ng de DNA genómico, 100 pmol de cada oligonucleótido, 2.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1 U de *Taq* DNA polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) y amortiguador 10X.

Programa de amplificación. Para la amplificación se siguió el programa estandarizado por Reyes-Montes *et al.* (1999), un ciclo inicial de 7 min a 94 °C (activación de la *taq* DNA polimerasa), seguido por 45 ciclos de 1 min a 92°C (desnaturalización); 1 min a 35°C (alineación) y 1 min a 72°C (extensión), se concluyó con una extensión final de 5 min a 72 °C, para asegurar la amplificación total de los productos. Se utilizó un termociclador Cyler (Bio-Rad, Hercules, CA).

Electroforesis. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5 X con bromuro de etidio. El gel se corrió con el mismo amortiguador a 70 V hasta que el colorante avanzó casi al final del gel. Se utilizó como estándar de pares de bases una escalera de DNA de 123 pb (DNA Ladder, GIBCO, BRL). La imagen de los geles se capturó con un Fotodocumentador Synoptics (GeneCam, Syngene, Cambridge, UK) y se imprimió en una impresora térmica (Sony 650). La imagen

de los geles se invirtió con el programa GeneSnap™ (Syngene) para una resolución óptima.

Obtención de los porcentajes de las bandas compartidas por los aislamientos de cada grupo geográfico generadas por RAPD-PCR con cada oligonucleótido

El tamaño de los fragmentos amplificados se obtuvo de la siguiente manera: a partir de la fotografía impresa de cada uno de los patrones polimórficos obtenidos, se determinó la movilidad relativa (Rf) del marcador de peso 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 pesos moleculares del marcador 123 DNA Ladder (ordenada). A partir de esta curva calibrada se estimó el peso molecular de los fragmentos. Posteriormente se calculó el porcentaje de las bandas compartidas generadas con cada oligonucleótido.

Análisis de datos. Los tamaños moleculares de los fragmentos amplificados en el DNA genómico de los 27 aislamientos y tres cepas de *H. capsulatum*, se codificaron como datos binarios y se construyó una matriz de presencia (1) y ausencia (0) concentrando todos los marcadores generados por los oligonucleótidos 1253, 1281, 1283 y 1281-1283, a partir de esta matriz total se calculó el grado de similitud de la matriz utilizando el índice de Jaccard

(Real and Vargas, 1996) obteniendo una matriz de similitud genética pareada entre los aislamientos. A partir de esta última matriz se construyó un dendrograma utilizando el método de promedios aritméticos no ponderados (Unweighted Pair Group Method Analysis, UPGMA). Posteriormente se calculó el coeficiente de correlación cofenética (r), (Sneath and Sokal, 1973) para determinar el grado de relación entre la matriz del dendrograma obtenido y la matriz de similitud original. Se estableció multidimensionalmente la relación entre los aislamientos estudiados usando el Análisis de Componentes Principales (ACP). Los análisis anteriores se llevaron a cabo utilizando el programa NTSYS-PC, versión 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 1998).

RESULTADOS

Identificación microscópica de la fase micelial. En todos los aislamientos/cepas del hongo se observaron hifas septadas, hialinas y delgadas; con escasos microconidios de formas piriformes o redondos, sésiles o unidos a la hifa por conidióforos cortos o en algunas ocasiones ausentes, también presentaron macroconidios característicos de la especie de 8-15 μm de diámetro, redondos o piriformes, de pared gruesa con proyecciones irregulares (digitiformes). La figura 1 muestra la micromorfología típica de la fase micelial de este hongo.



Figura 1. Micromorfología colonial de un aislamiento representativo de *H. capsulatum* (EH-316). Se observan estructuras de la fase micelial del hongo (100X). MA- macroconidio con proyecciones digitiformes, MI-microconidio piriforme sésil.

Prueba de exoantígenos. Para demostrar la identidad antigénica de todos los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* incluidas en este estudio se utilizó el método de identificación rápida de exoantígenos de Standard y Kaufman (1976). Se observaron las bandas específicas del hongo en los ensayos de inmunodifusión en gel, al probar los exoantígenos obtenidos de cada uno de los aislamientos/cepas estudiados y suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (Figura 2).

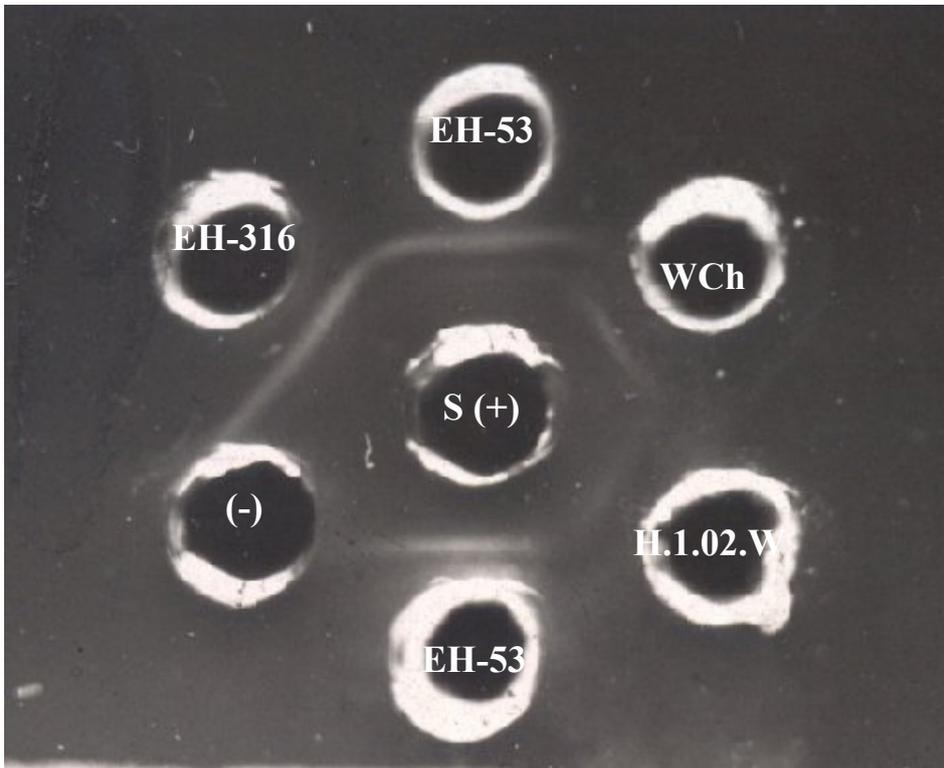


Figura 2. Producción de exoantígenos de aislamientos de *H. capsulatum* representativos de cada región geográfica. Se obtuvieron exoantígenos por el método de Standard and Kaufman (1976) y se probaron por doble inmunodifusión en gel. Exoantígenos: EH-316, WCh, H.1.02.W. Se utilizó suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (S) y como testigo positivo de antígeno el obtenido de la cepa EH-53 (+) y solución salina como testigo negativo (-).

Transición dimórfica de fase. Se corroboró la identificación de los aislamientos/cepas estudiados mediante la transición dimórfica de la fase micelial a la levaduriforme de todos los micelios. El tiempo de transición fue de 1 a 3 semanas, con un tiempo promedio de 2 semanas en la mayoría de los aislamientos, las levaduras obtenidas presentaron formas ovaladas con diámetros promedio de $1.3-2 \times 2-4 \mu\text{m}$ en las condiciones de cultivo.

Determinación de la concentración del DNA genómico. Se obtuvo el DNA genómico de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum*. La cantidad de DNA purificado fue cuantificada al realizar una comparación con diferentes concentraciones de DNA del fago lambda (GIBCO). En la figura 3 se observa el análisis electroforético de diferentes DNAs obtenidos de los aislamientos de *H. capsulatum*, observándose que la concentración de éstos variaba entre 100 y 500 ng/ μL . En general, la extracción de DNA de todos los aislamientos/cepas fue de buena calidad.

Figura 3. Determinación de la concentración de DNA genómico de los aislamientos clínicos de *H. capsulatum*. Los carriles 1 a 3 corresponden a diferentes concentraciones del fago Lambda. Las condiciones de la electroforesis se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Con tres oligonucleótidos y la mezcla de dos de ellos, se obtuvieron cuatro patrones polimórficos de los DNAs de aislamientos/cepas de *H. capsulatum*.

Con el oligonucleótido 1281 se encontró el mayor número de marcadores RAPD-PCR con un total de 28 bandas, con la mezcla de los dos oligonucleótidos (1281-1283) se obtuvieron 25 bandas diferentes, mientras que con los oligonucleótidos 1253 y 1283, se obtuvieron 22 marcadores en los dos casos.

Obtención de los porcentajes de las bandas compartidas por los aislamientos de cada grupo geográfico generadas por RAPD-PCR con cada oligonucleótido

El patrón polimórfico del DNA de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* generado por RAPD-PCR con el iniciador 1253 se muestra en la **figura 4**.

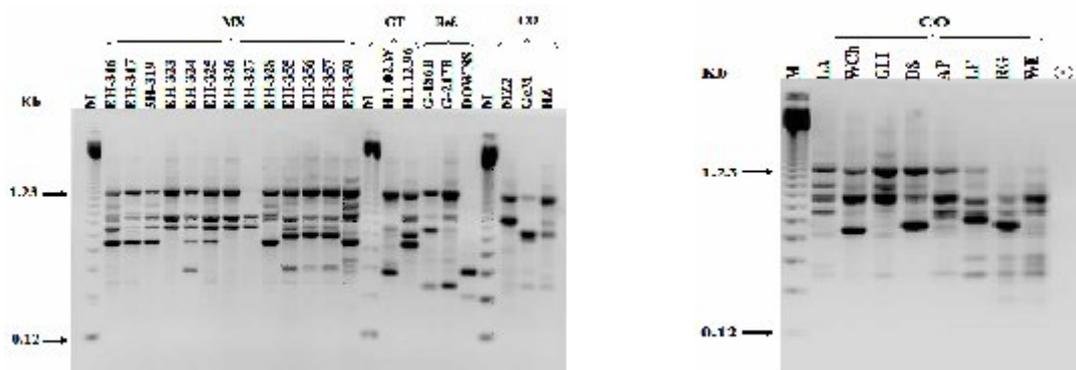


Figura 4. Polimorfismo genético de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1253. Aislamientos representativos de México (MX), Guatemala (GT), Colombia (CO) y cepas de referencia (Ref). Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 6 h. Tinción con bromuro de etidio. M= escalera de DNA de 123 pb. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una resolución óptima.

Oligonucleótido 1253

MX. Los aislamientos procedentes de MX con el iniciador 1253, presentaron 7 fragmentos que son compartidos en alta proporción, siendo la banda de 1.23 Kb la que se encontró con mayor porcentaje (92.3%) (**Tabla 2**).

GT. Entre los dos aislamientos de GT sólo se comparten tres bandas, la de 1.23, 0.37 y 0.31 Kb (**Tabla 2**).

CO. En este grupo destacaron seis bandas: 1.23, 0.84, 0.8, 0.67, 0.37, y 0.31 Kb. La banda de 0.67 Kb se encontró en un porcentaje de 100% (**Tabla 2**).

Cepas de Ref. En cuanto a las cepas G-186B (PA) y G-217B (EUA), compartieron los siguientes marcadores: 1.23, 0.8, 0.67, 0.37 y 0.31 Kb.

La cepa Downs (EUA) mostró sólo dos bandas de 0.37 Kb y de 0.27 Kb, ésta última sólo se presentó en esta cepa (**Tabla 2**).

El patrón polimórfico del DNA de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* encontrado por RAPD-PCR con el iniciador 1281 se muestra en la **figura 5**

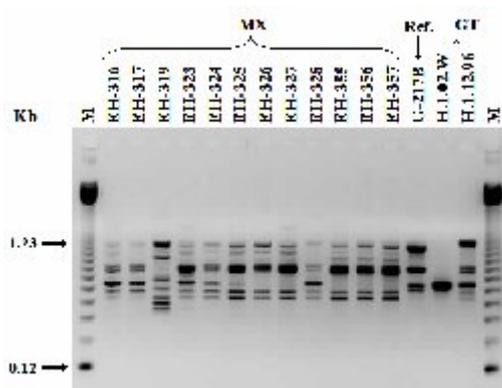


Figura 5. Polimorfismo genético de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1281. Aislamientos representativos de México (MX), Guatemala (GT), Colombia (CO) y cepas de referencia (Ref). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 6 h. Tinción con bromuro de etidio. M= escalera de DNA de 123 pb. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una resolución óptima.

Oligonucleótido 1281

MX. En este grupo se encontró un polimorfismo genético muy homogéneo, ya que la mayoría de los aislamientos comparten 8 bandas: de 1.23, 1.07, 0.84, 0.81, 0.79, 0.62, 0.55 y de 0.48 Kb en un rango de 53.8-92.3% de presencia (**Tabla 2**).

GT. Los dos aislamientos de GT comparten dos bandas, una de 0.79 y otra de 0.62 Kb (**Tabla 2**).

CO. Los aislamientos de CO también presentaron bandas características de este grupo, la mayoría de los aislamientos compartieron 7 bandas: 1.23, 1.14, 0.76, 0.71, 0.54; 0.47 y de 0.41 Kb, a excepción de la banda de 1.23 Kb los demás marcadores no se encontraron en los grupos anteriores (**Tabla 2**).

Cepas de Ref. La cepa G-217B (EUA) presentó seis marcadores en total y la cepa G-186B (PA) sólo presentó dos bandas de 1.23 y 0.68 Kb, compartiendo entre ellas sólo la de 1.23 Kb. La cepa Downs (EUA) presentó dos bandas de 0.92 y de 0.44 Kb, esta última sólo se presentó en esta cepa (**Tabla 2**).

El patrón polimórfico del DNA de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* encontrado por RAPD-PCR con el iniciador 1283 se muestra en la **figura 6**.

Figura 6. Polimorfismo genético de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* empleando el oligonucleótido 1283. Aislamientos representativos de México (MX), Guatemala (GT), Colombia (CO) y cepas de referencia (Ref). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 6 h. Tinción con bromuro de etidio. M= escalera de DNA de 123 pb. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una resolución óptima.

Oligonucleótido 1283

MX. Los aislamientos de México presentaron 6 bandas compartidas de: 0.84, 0.74, 0.62, 0.51, 0.48 y de 0.41 Kb, que se encuentran en un rango de 69.23-92.3% de presencia (**Tabla 2**).

GT. En este grupo se encontraron dos bandas que fueron compartidas por los aislamientos: de 0.62 y 0.48Kb (**Tabla 2**).

CO. En este grupo, seis bandas fueron comunes entre los aislamientos: 0.78, 0.74, 0.62 Kb 0.6, 0.48 y 0.37 Kb con un rango de 58.3-91.7% de presencia (**Tabla 2**).

Cepas de Ref. La cepa G-186B (PA) tuvo dos marcadores, de 0.51 y 0.48 Kb, compartidas con la cepa G-217B (EUA) la que además presentó seis bandas adicionales. Mientras que la cepa Downs (EUA) tuvo tres bandas de 0.84, 0.65 y 0.27 Kb ésta última sólo se encontró en esta cepa (**Tabla 2**).

El patrón polimórfico del DNA de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* encontrado por RAPD-PCR con la mezcla de los oligonucleótidos 1281-1283 se muestra en la **figura 7**.

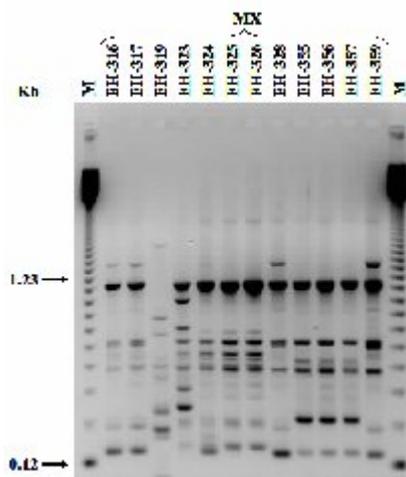


Figura 7. Polimorfismo genético de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum* empleando la mezcla de los oligonucleótidos 1281-1283. Aislamientos representativos de México (MX), Guatemala (GT), Colombia (CO) y cepas de referencia (Ref). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 6 h. Tinción con bromuro de etidio. M= escalera de DNA de 123 pb. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una resolución óptima.

Mezcla de los oligonucleótidos 1281-1283

MX. En el patrón polimórfico de los aislamientos de MX, se detectaron ocho bandas compartidas: 1.44, 1.23, 0.65, 0.55, 0.53, 0.48, 0.46 y 0.15 Kb, en un rango de 61.5-92.3% de presencia (**Tabla 2**).

GT. En los aislamientos de GT se observaron cuatro bandas compartidas: 1.23, 0.67, 0.48 y 0.15Kb (**Tabla 2**).

CO. En este grupo se compartieron seis bandas: 1.23, 0.63, 0.59, 0.55, 0.48 y 0.15 Kb con un rango de presencia de 75-91.7% (**Tabla 2**).

Cepas de Ref. La cepa G-217B (EUA), presentó 5 marcadores, cuatro de ellos se compartieron con la cepa G-186B (PA): 1.23, 0.67, 0.55 y 0.48 Kb. La cepa Downs (EUA) también presentó cuatro bandas: de 1.23, 0.74, 0.63 y 0.59 Kb. La banda de 0.74 Kb sólo se encontró en esta cepa (**Tabla 2**).

Al concentrar los datos de los cuatro patrones polimórficos de los grupos geográficos estudiados, se obtuvo una tabla de datos que muestra el porcentaje de las bandas compartidas con cada oligonucleótido (**Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje de las bandas compartidas con cada oligonucleótido en los grupos geográficos estudiados

| | 1253 (22) | 1281 (28) | 1283 (22) | MEZCLA (25) |
|---------------------------------------|--|---|--|--|
| FRAGMENTOS EN TODOS LOS GRUPOS | Kb 1.23 (27/30) 90% 0.84 (13/30) 43.3 % 0.8 (26/30) 86.7 % 0.67 (26/30) 86.7 % 0.55 (10/30) 33.3% 0.37 (21/30) 70 % 0.31 (23/30) 76.7% | Kb 1.23 (22/30) 73.3% 0.84 (19/30) 63.3% 0.55 (19/30) 63.3% | Kb 0.84 (15/30) 50 % 0.74 (20/30) 66.7 % 0.62 (21/30) 73.3% 0.48 (27/30) 90 % 0.41 (13/30) 43.3 % | Kb 1.23 (27/30) 90 % 0.59 (14/30) 46.7% 0.55 (19/30) 63.3% 0.48 (24/30) 80% 0.15 (22/30) 73.3% |
| MX | 1.23 (12/13) 92.3% 0.84 (7/13) 53.8% 0.8 (12/13) 92.3% 0.67 (11/13) 84.6% 0.55 (7/13) 53.8% 0.37 (10/13) 76.9% 0.31 (9/13) 69.23% | 1.23 (12/13) 92.3% 1.07 (9/13) 69.23% 0.84 (12/13) 92.3% 0.81 (9/13) 69.23% 0.79 (11/13) 84.6% 0.62 (7/13) 53.84% 0.55 (9/13) 69.23% 0.48 (11/13) 84.6% | 0.84 (9/13) 69.23% 0.74 (11/13) 84.6% 0.62 (9/13) 69.23% 0.51 (11/13) 84.6% 0.48 (12/13) 92.3% 0.41 (11/13) 84.6% | 1.44 (8/13) 61.5% 1.23 (12/13) 92.3% 0.65 (12/13) 92.3% 0.55 (8/13) 61.5% 0.53 (10/13) 76.9% 0.48 (11/13) 84.6% 0.46 (8/13) 61.5% 0.15 (10/13) 76.9% |
| GT | 1.23 (2/2) 100% 0.8 (1/2) 50% 0.67 (1/2) 50% 0.55 (1/2) 50% 0.37 (2/2) 100% 0.31 (2/2) 100% | 1.23 (1/2) 50% 0.84 (1/2) 50% 0.79 (2/2) 100% 0.62 (2/2) 100% | 0.62 (2/2) 100% 0.48 (2/2) 100% | 1.23 (2/2) 100% 0.67 (2/2) 100% 0.48 (2/2) 100% 0.15 (2/2) 100% |
| CO | 1.23 (11/12) 91.7% 0.84 (7/12) 58.3% 0.8 (11/12) 91.7% 0.67 (12/12) 100% 0.55 (2/12) 16.7% 0.37 (6/12) 50% 0.31 (10/12) 83.3% | 1.23 (7/12) 58.3% 1.14 (7/12) 58.3% 0.76 (9/12) 75% 0.71 (9/12) 75% 0.54 (9/12) 75% 0.47 (9/12) 75% 0.41 (10/12) 83.3% | 0.78 (8/12) 66.7 % 0.74 (9/12) 75% 0.62 (11/12) 91.7% 0.6 (9/12) 75% 0.48 (11/12) 91.7% 0.37 (7/12) 58.3% | 1.23 (10/12) 83.3% 0.63 (11/12) 91.7% 0.59 (9/12) 75% 0.55 (9/12) 75% 0.48 (9/12) 75% 0.15 (10/12) 83.3% |
| Cepas de Referencia. | G-217B y G-186B 1.23 0.8 0.67 0.37 0.31 Downs 0.37 0.27 | G-217B y G-186B: 1.23 Downs: 0.92 0.44 | G-217B 1.23 0.84 0.78 0.74 0.6 0.51 0.48 0.41 G-186B 0.51 0.48 Downs 0.84 0.65 0.27 | G-217B y G-186B 1.23 0.67 0.55 0.48 G-217B 0.63 Downs 1.23 0.74 0.63 0.59 |

Análisis de datos. Los tres oligonucleótidos y la mezcla de dos de ellos amplificaron marcadores bien definidos y repetitivos de los DNAs genómicos de aislamientos/cepas de *H. capsulatum*. Estos marcadores se utilizaron para construir una matriz de presencia-ausencia (1-0), obteniéndose un total de 85 marcadores. A partir de la matriz de presencia-ausencia se calculó la matriz de similitud con el índice de Jaccard (Real y Vargas, 1996) utilizando el método de UPGMA, y se obtuvo un dendrograma donde se observa la agrupación de los aislamientos/cepas de referencia en 4 grupos (figura 8). El grupo **I** incluyó dos subgrupos: el subgrupo **Ia** lo integraron los 13 aislamientos de MX, los dos aislamientos de GT y la cepa de referencia G-217B de EUA. El subgrupo **Ib** incluyó 10 de los 12 aislamientos procedentes de CO. El grupo **II** sólo incluyó a un aislamiento de CO (GeM). El grupo **III** se integró por la cepa de referencia G-186B de PA y finalmente, el grupo **IV**, incluyó dos aislamientos, uno procedente de CO (Hz) y la cepa de referencia Downs de EUA. El coeficiente de correlación cofenético para el método de agrupación fue de $r=0.955$ con una $P<0.001$, estos datos apoyan que la agrupación obtenida por UPGMA no es producto del azar sino que se trata de un evento biológico definido.

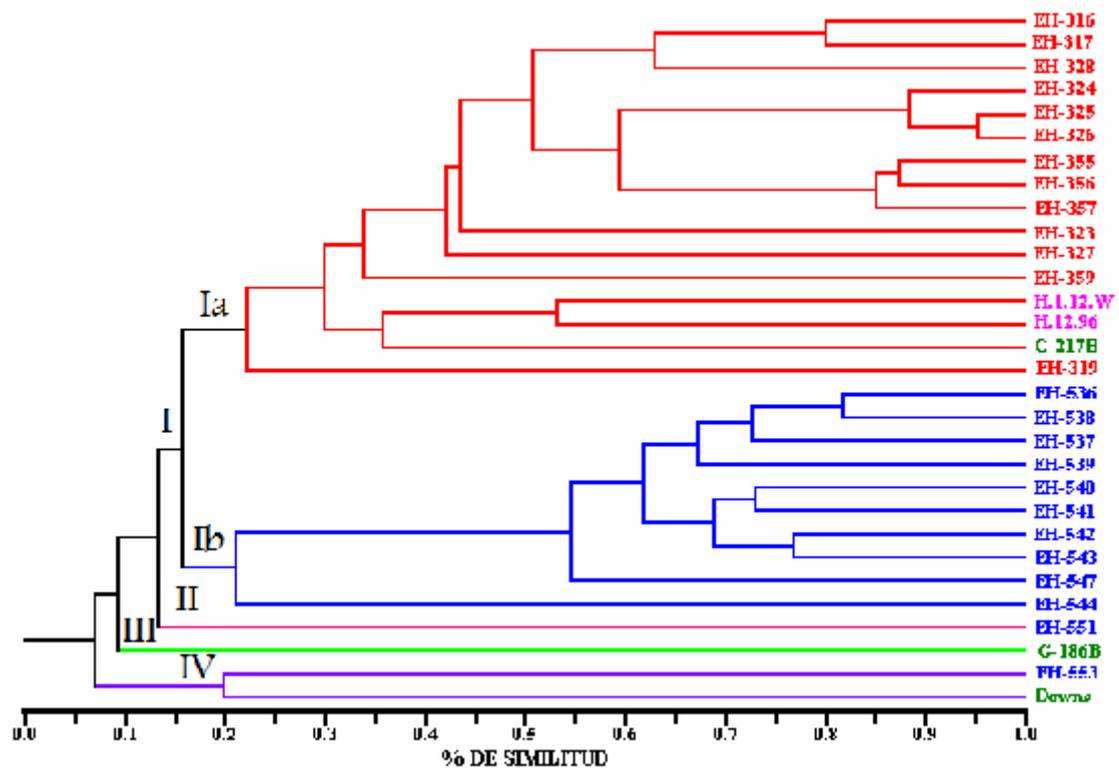


Figura 8. Relación genética de los aislamientos/cepas de *H. capsulatum*. El dendrograma fue generado por el coeficiente de similitud genética obtenido de la matriz de presencia y ausencia de un total de 85 bandas de DNA, con base en el método de UPGMA.

La agrupación de los aislamientos/cepas de referencia observados en el dendrograma se confirmaron con el ACP, en este plano tridimensional se aprecia como se agrupan en el espacio los aislamientos/cepas de referencia (**Figura 9**), de manera similar al dendrograma, se forman grupos bien definidos. El aislamiento procedente de CO (JG), confirma su bajo porcentaje de similitud con respecto al resto del conjunto que integra a los aislamientos de CO comportándose como un individuo independiente.



Figura 9. Análisis de componentes principales (ACP). Representación de la agrupación tridimensional de los aislamientos/cepas de referencia, donde se agrupa a los aislamientos de CO (azul), los aislamientos procedentes de MX (rojo), los aislamientos de GT (rosa) y cepas de referencia (verdes).

DISCUSIÓN

La identificación de los aislamientos miceliales estudiados, fueron reconocidos como *H. capsulatum* por sus características morfológicas, por su transición de fase y por la producción de exoantígenos. Para llevar a cabo la genotipificación se volvió a confirmar la identificación del hongo con el exoantígeno obtenido del cultivo para la extracción del DNA y así descartar cualquier contaminación durante el proceso de cultivo.

Kersulyte *et al.* (1992) y Woods *et al.* (1993) mostraron que el RAPD-PCR es una herramienta importante para la caracterización genotípica de *H. capsulatum*, siempre y cuando los resultados sean repetitivos. La estandarización de la técnica fue necesaria para obtener resultados reproducibles, ya que pequeñas diferencias de procedimiento pueden conducir a alguna variación en la aparición o eliminación de alguna(s) banda(s), además. cada reacción se tiene que llevar a cabo por duplicado y probar con diferentes concentraciones de DNA, para asegurarse que los perfiles RAPD-PCR obtenidos sean solamente dependientes del aislamiento fúngico y no de la casualidad. Por lo que consideramos que bajo estas condiciones esta técnica funcionó adecuadamente para la tipificación de aislamientos de *H. capsulatum*.

La genotipificación de los aislamientos se llevó a cabo utilizando tres oligonucleótidos y la mezcla de dos de ellos, estos presentaron diferentes patrones polimórficos. Con el oligonucleótido 1253, la mayoría de los aislamientos se asociaban de acuerdo a su origen geográfico; con el oligonucleótido 1281, los aislamientos de MX se relacionaban con los aislamientos de GT y EUA y los aislamientos de CO se relacionaban entre ellos, mientras que con el oligonucleótido 1283 los de GT se asociaban con los aislamientos de CO y los aislamientos de MX se asociaban entre ellos, finalmente con la mezcla de los dos oligonucleótidos se observó que los aislamientos no se relacionaban de acuerdo al origen

geográfico (como sucedió con el oligonucleótido 1253). Con el propósito de obtener una mejor agrupación se construyó un dendrograma con todos los marcadores generados con los oligonucleótidos 1253, 1281, 1283 y 1281-1283, dando como resultado que en su mayoría se agruparan de acuerdo a su origen geográfico y no se observó agrupación de acuerdo a su forma clínica, este hecho nos muestra la importancia de utilizar varios oligonucleótidos para llevar a cabo una buena tipificación, ya que generar mayor cantidad de marcadores, el análisis estadístico da una agrupación más precisa de los aislamientos. No obstante que los aislamientos se agruparon de acuerdo a su origen geográfico, puede observarse que a este nivel de análisis cada grupo presenta variabilidad genética intraespecífica, ésta posiblemente se puede deber a mutaciones y/o mecanismos de recombinación sexual y parasexual, considerando que *H. capsulatum* es solo el anamorfo de *Ajellomyces capsulatus* (Kwon-Chung and Bennett, 1992).

En lo que respecta al grupo de GT, éste mostró mayor similitud genética con el grupo de MX debido quizás a la proximidad geográfica entre estos países ya que esta situación favorece el flujo genético del hongo. La relación entre aislamientos de MX, GT y EUA en el subgrupo Ia, posiblemente se deba a la presencia de una clona común que se ha adaptado en diferentes regiones geográficas y por lo tanto han adquirido otras características en respuesta a la presión del ambiente, lo que las hace ligeramente diferentes quizás a la dispersión y adaptación del hongo *H. capsulatum*. La diseminación de esta clona se puede deber a diferentes causas, aunque, los mecanismos involucrados en la dispersión de *H. capsulatum* en la naturaleza no están bien establecidos, se propone que el viento puede ser uno de ellos en espacios abiertos, en espacios cerrados, los mamíferos infectados, particularmente los murciélagos cavernícolas, son considerados diseminadores del hongo, ya que se ha reportado una estrecha asociación entre éstos y el hongo, debido a que *H.*

capsulatum crece en el guano de estos animales, el cual es rico en nitrógeno y fósforo, elementos que favorecen el crecimiento de la fase micelial e infectiva del patógeno (Tewary *et al.*, 1998). En consecuencia, *H. capsulatum* es capaz de infectar diferentes especies de mamíferos, particularmente, los de hábitos cavernícolas. Los murciélagos constituyen uno de los grupos de mamíferos de más amplia distribución en la naturaleza por lo que se ha propuesto que éstos juegan un papel importante en la dispersión de *H. capsulatum* (Hoff and Bigler, 1981; Klite and Diercks, 1965). Sin embargo, la dispersión del hongo por murciélagos infectados y/o enfermos, a otros sitios favorables para su crecimiento, ha sido mejor sostenida por los estudios de marcadores moleculares del hongo recuperado de animales capturados en diferentes sitios del país, como lo refieren Taylor *et al.* (2000c; 2005b). Sin lugar a dudas, los hábitos coloniales de los murciélagos cavernícolas y su capacidad de vuelo son parámetros importantes para explicar la dispersión del patógeno fúngico (Gaisler, 1979; Taylor 2005b).

Por otro lado, en los perfiles RAPD-PCR obtenidos de todos los aislamientos se identificaron diferentes marcadores que fueron compartieron entre ellos. Con el propósito de encontrar cual banda era el que se presentaba con mayor frecuencia en todos los aislamientos se calculó el porcentaje de ellos y encontramos que con el oligonucleótido 1253 se observaron tres marcadores moleculares en alta proporción: 1.23 Kb se presentó en el 90% de los aislamientos, los fragmentos de 0.8 y 0.67 Kb en un 86.7% (**Tabla 2**).

La banda de 1.23 Kb también fue de alta proporción con el oligonucleótido 1281 con un 73.3% de presencia en los aislamientos, con la mezcla de los oligonucleótidos 1281-1283 también se generó la banda de 1.23 Kb en un 90%, mientras que con el oligonucleótido 1283 no se localizó esta banda (**Tabla 2**), por lo que proponemos que la banda de 1.23 Kb es un buen marcador para la identificación del hongo en estos grupos regionales.

Este fragmento es idóneo para la obtención de marcadores SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada), que se obtienen a partir de patrones polimórficos obtenidos de diferentes técnicas, como RAPD-PCR y AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), en los que se elige un marcador y a partir de su secuencia se diseñan oligonucleótidos para la identificación específica del organismo a estudiar (Abbasi *et al.*, 1999). Los marcadores SCARs resultan útiles en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico para estudiar la persistencia de cepas en el campo y en la identificación de híbridos en plantas. Además permiten detectar el nivel de inóculo que persiste en el ambiente después de su aplicación (Castrillo *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

1. Todos los aislamientos fueron identificados por criterios morfológicos, antígenicos y de transición de fase como *H. capsulatum*.
2. Los aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de MX, CO, GT y cepas de referencia (representativas de la clase I, II y III reportadas por Vincent *et al.* 1986), se agruparon de acuerdo a su origen geográfico y no se agruparon de acuerdo a su forma clínica.
3. Los aislamientos de MX, CO y GT presentan una gran variabilidad genética, a pesar de agruparse de acuerdo a su origen geográfico.
4. Se identificó un marcador molecular para *H. capsulatum* de 1.23 Kb, que está presente en los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR con los oligonucleótidos 1281, 1253 y la mezcla 1281-1283 , en los aislamientos de MX, CO, GT, PA y EUA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi P**, Miller S, Meulia T, Hoiting H, 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.
- Abidi FE**, Roh H, Keath EJ. 1998. Identification and characterization of a phase-specific, nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 66: 3867-73.
- Baptist JN**, Shaw CR, Mandel M. 1969. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. 99: 180-188.
- Bowman JE**, Brubaker RR, Frischer H, Carson PE. 1967. Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 94: 544-551.
- Brandt ME**, Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner RW. 1995. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1890-1895.
- Brandt ME**, Bragg SL, Pinner RW. 1993. Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2819-2823.
- Braude AI**, McCutchan JA, Ison C, Sargeant PR. 1983. Differentiation of *Neisseriaceae* by isoenzyme electrophoresis. *Infect. Dis.* 147: 247-251.
- Castrillo L**, Vandenberg J, Wraight S. 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.

- Carter DA**, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. 1996. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2577-2584.
- Carter DA**, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. 1997. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis.* 18: 1047-1053.
- Caugant DA**, Bevre K, Gaustad P, Bryn K, Holten E, Hoiby EA, Froholm LO. 1986. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J. Gen. Microbiol.* 132: 641-652.
- Colonna-Romano S**, Porta A, Franco A, Kobayashi GS, Maresca B. 1998. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophage infection. *Microb. Pathog.* 25: 55-66.
- Contreras PC**, Shibayama H, Gutiérrez P. 1998. Aportaciones del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos a la histoplasmosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 216-220.
- Eisenstein BI**. 1990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.* 161: 595-602.
- Eissenberg LG**, Poirier S, Goldman WE. 1996. Phenotypic Variation and Persistence of *Histoplasma capsulatum* Yeasts in Host Cells. *Infect. Immun.* 64: 5310-5311.
- Fisher KL**, Deepe GS Jr, Woods JP. 1999. *Histoplasma capsulatum* strain variation in both H antigen production and beta-glucosidase activity and overexpression of HAG1 from a telomeric linear plasmid. *Infect. Immun.* 67: 3312-3316.

- Fisher KL** and Woods JP. 2000. Determination of beta-glucosidase enzymatic function of the *Histoplasma capsulatum* H antigen using a native expression system. *Gene*. 18: 247: 191-197.
- Gaisler J**. 1979. Ecology of bats. In: Stoddart, M. (ed.), *Ecology of Small Mammals*. Chapman & Hall, Londres. Pp: 281-334.
- Gass M** and Kobayashi GS. 1969. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch. Dermatol.* 100: 724-727.
- Gaur PK**, Lichtwardt RW, Hamrick JL. 1981. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Exp. Mycol.* 5: 69-77.
- González-Ochoa A**. 1957. Histoplasmosis pulmonar aguda primaria. *Gac. Med. Mex.* 87: 733-744.
- González-Ochoa A** y Félix D. 1971. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. (Méx.)*. 31: 74-77.
- Hamrick JL**. 1982. Plant population genetics and evolution. *Am. J. Bot.* 69: 1685-1693.
- Hamrick JL**, Lichtwardt RW, Lan C. 1986. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 89: 49-56.
- Hoff GL** and Bigler WJ. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wildl. Dis.* 17: 191-196.
- Hu J**, van Eysden J, Quiros CF. 1995. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions. In: *PCR Methods and Applications*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Pp. 346-351.
- 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, Zhenyu Q, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, 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.
- 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.
- Klite PD** and Diercks FH. 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the canal zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14:433-439.
- Kwon-Chung KJ** and Bennett JE. 1992. *Medical Mycology*. Lea and Febiger (eds). Philadelphia. Pp. 464-513
- Lehmann PF**, Hsiao CB, Salkin IF. 1989a. Protein and enzyme electrophoresis profiles of selected *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 27: 400-404.
- Lehmann PF**, Kemker BJ, Hsiao CB, Dev S. 1989b. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2514-2521.
- Medoff G**, Kobayashi GS, Painter A, Trevis S. 1987. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 55:1355-1358.
- Medoff G**, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, Carratu L. 1986. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science.* 231: 476-479.

- Morgan J**, Cano M, Feikin D, Phelan M, Velásquez MO, Carpenter J, Weltman A, Spitzer PG. 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.
- Neubauer MA** and Bodensteiner DC. 1992. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *South. Med. J.* 85: 1166-1170.
- Nightingale SD**, Parks JM, Pounders SM, Burns DK, Reynolds J, Hernandez JA. 1990. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *South. Med. J.* 83: 624-630.
- Ouchterlony O** and Nilsson LA. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 19.1-44.
- Pedroza-Serés M**, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. 1994. The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in México: A preliminary study. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 83-92.
- Pérez-Nasser N** y Piñero D. 1997. Isoenzimas. *Bol. Soc. Bot.* 60: 77-84.
- Pfaller MA**. 1992. Epidemiological typing methods for mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 14: S4-S10.
- Pounder JI**, Hansen D, Woods GL. 2006. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides* species by Repetitive-Sequence-Based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44:2977-2982.
- Ramshaw JAM**, Coyne JA, Lewontin RC. 1979. The Sensitivity of Gel Electrophoresis as a Detector of Genetic Variation. *Genetics.* 93: 1019-1037.
- Real R** and Vargas JM. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Syst. Biol.* 45: 380-385.

Reyes-Montes MR, García-Camacho MP, Casasola J, Taylor ML. 1988. Immunosuppression transfer by spleen cells from young to adult mice previous to *Histoplasma capsulatum* infection. *Mycopathologia*. 101: 69-75.

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

Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osorio 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.

Reyes-Montes MR, Taylor ML, Curiel-Quesada E, Mesa A. 2000. Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: Una revisión de los hallazgos. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 7-12.

Ríos-Rosas C, Reyes-Montes MR, Canteros C, Taylor ML. 2002. RAPD-PCR y secuenciación de genes como métodos de genotipificación para aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum*. IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, México. Mayo 13-17, p. 462.

Rippon JW. 1988. Medical Mycology. W.B. Saunders Co (eds). Philadelphia.. Pp. 381-424.

Rohlf FJ. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Applied Biostatistics, New York, USA.

- Salas-Ríos** MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML. 1998. Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 11: 202-207.
- Selander** RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. 1986. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for bacterial Population Genetics and Systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51: 873-884.
- Simpanya** MF, Jarvis BDW, Baxter M. 1998. Isozyme variation within and among populations of *Microsporium* species. Mycoses. 41: 501-508.
- Sneath** PHA and Sokal RR. 1973. Taxonomic structure. In: Numerical Taxonomy. Freeman, WH and Co (eds). San Francisco. Pp. 188-305.
- Spieth** PT. 1975. Population genetics of allozyme variation in *Neurospora intermedia*. Genetics. 80: 785-805.
- Spitzer** DE, Keath, EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Meddoff 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.
- Standard** PG and Kaufman L. 1976. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. J. Clin. Microbiol. 3: 191-199.
- Svidzinsky** IE and Camargo ZP. 1995. Isoenzyme profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. 33: 281-285.

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

Taylor, ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Zúñiga G. 2005b. 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. 45: 451-458.

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

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

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

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G. Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. 2000b. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum* in Mexico. In: Benedik, M. Research Advances in Microbiology. Global Research Network. Kerala. 1: 29-35.

Taylor ML, Reyes-Montes MR, González GR, Casasola J, Hernández-Ramírez A. 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection. En: Baxter, M. Proceeding WIII Congress of ISHAM Palmerston North (New Zealand): Massey University. Pp. 260-264.

- Taylor** ML, Ruíz-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 R, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. 2005a. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 45: 435-441.
- Tewari** RP and Kegel H. 1971. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 44: 231-240.
- Tewary** R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis. In: *Medical Mycology*. Ajello L, Hay RJ (eds.). Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections. Arnold and Oxford University Press, Inc., Nueva York. Pp. 373-407.
- Vaca-Marín** MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. 1998. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 11: 208-215.
- Vastag** MT, Papp Z, Kasza C, Vágvölgyi C. 1998. Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2153-2156.
- Velasco-Castrejón** O. 1998. Micosis Profundas. In: García-García ML, Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino-Gómez JL. *Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas*. INDRE, Secretaría de Salud. Pp. 231-243.
- Vigh** LB, Maresca B, Harwood JL. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *TIBS.* 23: 369-374.

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

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

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM. 1994. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1:563-8.