



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE UNA LECTINA DE LEVADURAS DE
***Histoplasma capsulatum* QUE RECONOCE β -GALACTOSA:**
DETERMINACIÓN DE SU PRESENCIA EN AISLADOS FÚNGICOS DE
MURCIÉLAGOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
PRESENTA:

EUGENIA FLORES ROBLES

TUTOR PRINCIPAL

Dra. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Facultad de Medicina

Dr. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Ciudad Universitaria, CDMX

Junio 2017



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 Inmunología de Hongos, Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

DEDICATORIAS

A mis padres Belem Robles García (†) y Darío Flores Pantaleón, por sus consejos y enseñanzas.

A mi familia y en especial a mi hijo Alí Adair por ser el motivo de seguir adelante, a mi esposo Mohamed Alí Pereyra Morales por su apoyo, confianza y porque los tres somos un gran equipo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM por permitirme terminar satisfactoriamente en tiempo y forma la Maestría en Ciencias.

A los miembros del Comité Tutorial, Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello (tutor), Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo y Dr. Francisco Suárez Güemes por sus valiosos aportes al proyecto y por el tiempo que dedicaron para analizar y proporcionar una crítica constructiva a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello por su confianza y apoyo a lo largo de este proyecto.

A los miembros del jurado para el examen de grado: Presidente: Dr. Roberto Olivares Cervantes; Secretario: Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo; Vocal: Dr. Tonathih Alejandro Sánchez Cruz; Suplente: Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes; Suplente: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros. A todos mi sincero agradecimiento por el tiempo que emplearon para analizar esta tesis.

A la Dra. Concepción Agundis Mata por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales por todo el apoyo proporcionado en este trabajo.

A los M. en C. Gabriela Rodríguez Arellanes y José Antonio Ramírez Bárcenas por todo los apoyos brindados en el laboratorio.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Jefe del Departamento de Bioquímica y a la Dra. Rebeca Milán Chávez, Coordinadora de Prácticas y Evaluación de este Departamento, Facultad de Medicina, UNAM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia por todo apoyo recibido, su tiempo y paciencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Gabriela Rodríguez Arellanes, Esperanza Duarte Escalante, Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes, Hortensia Navarro Barranco, Amelia Pérez Mejía, José Antonio Ramírez Bárcenas, Laura Carreto Binaghi, Carolina, Lizania López, Erick Martínez por los apoyos, consejos y momentos de convivencia.

A los integrantes del laboratorio 6 del Departamento de Bioquímica

Dra. Concepción Agundis Mata, Dr. Alí Pereyra Morales, a los M. en C. Monserrat Ruíz Calzada, Oscar Vivanco Rojas, José Luis Sánchez y a la MC Djamila Kara Echanove, por el apoyo recibido en su laboratorio y la grandiosa convivencia.

RESUMEN

Histoplasma capsulatum, agente etiológico de la histoplasmosis, es un hongo dimórfico que desarrolla en el ambiente un morfotipo infectivo constituido por la fase micelial saprobio-geofílica (M), el cual, en el huésped infectado, cambia al morfotipo parasitario-virulento representado por la fase levaduriforme (L) formada por levaduras que, en el huésped infectado, son preferentemente intracelulares. La presencia de una lectina en la superficie de la pared celular de levaduras de *H. capsulatum* con especificidad por β -galactosa fue identificada previamente, sólo en cepas procedentes de casos clínicos. Para este trabajo, se estudiaron aislados y cepas del hongo obtenidos de murciélagos y de humanos infectados. Inicialmente, las 10 muestras fúngicas estudiadas y mantenidas en cultivo de fase M en el laboratorio fueron convertidas a fase L (transición dimórfica, fase M \rightarrow L) en condiciones especiales de cultivo. Las levaduras obtenidas fueron procesadas para ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación con α - o β -galactosa, con el fin de detectar una lectina que reconoce galactosa en la superficie de éstas. Asimismo, a partir de cada cultivo de levaduras en medio RPMI-1640 se recuperaron, por centrifugación, las fracciones F1 (concentrado del medio) y los paquetes de levaduras que generaron las fracciones F2 (material soluble procedente de la sonicación de cada paquete). Sólo las fracciones F1 y F2 de los aislados EH-53 de humano (menor unidad hemaglutinante -UHA) y EH-374 de murciélago (mayor UHA) fueron procesadas para la purificación de la lectina en columnas de estroma de eritrocitos humano. Las fracciones retenidas (FR) y no retenidas (FNR) de F1 y F2, fueron probadas en ensayos de hemaglutinación y, posteriormente, analizadas por electroforesis en SDS-PAGE. Los resultados mostraron que las levaduras de los aislados y cepas de *H. capsulatum* estudiados hemaglutinaron eritrocitos de humano y conejo, variando las UHA según el aislado o la cepa del hongo, independientemente del huésped de origen (murciélago o humano), de la muestra clínica (órgano de aislamiento) y de la procedencia geográfica, así como de la especie filogenética de los aislados y cepas. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación confirmaron la especificidad preferencial de la lectina presente en levaduras de *H. capsulatum* por el anómero β -galactosa. Además, sólo las fracciones retenidas purificadas en estroma de eritrocitos (FR/F1 y FR/F2) desarrollaron hemaglutinación con eritrocitos de humano y conejo. Asimismo, se ha demostrado que la

lectina se solubilizó en el medio de cultivo de las levaduras, ya que fue recuperada en la fracción FR/F1. Los ensayos de SDS-PAGE se realizaron sólo con las fracciones F1 y F2 de los aislados EH-53 y EH-374; los resultados mostraron un perfil similar de proteínas para las fracciones de ambos aislados, evidenciando numerosas bandas, destacando en ambas fracciones la banda de 31 kDa y otras tres que presentaron pesos moleculares cercanos a 45, 66.2 y 97.4 kDa. Las fracciones FR y FNR de F1 y F2 no fueron observadas por electroforesis en SDS-PAGE. Sin embargo, los ensayos de hemaglutinación detectaron la presencia de la lectina en las fracciones FRs de F1 y F2. Los hallazgos reportados sugieren que la lectina de *H. capsulatum*, por su constante presencia en las levaduras de los aislados clínicos humanos y de murciélagos naturalmente infectados y, asimismo, por su actividad hemaglutinante, podría jugar un papel importante en el destino de la relación huésped-parásito en la histoplasmosis.

Palabras Clave: Histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, levaduras, lectina, hemaglutinación, purificación.

Title: Characterization of a lectin from *Histoplasma capsulatum* yeast-phase that recognizes β -galactose: determination of its presence in fungal isolates from bats

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum, the etiologic agent of histoplasmosis, is a dimorphic fungus that develops in the environment an infective morphotype comprised by a saprobe-geophilic mycelial phase (M), which, once inside the infected host, changes to the parasitic-virulent morphotype corresponding to the yeast phase (Y) that is preferentially intracellular. The presence of a lectin on the cell wall of *H. capsulatum* yeasts with specificity to β -galactose was identified previously, only in strains from clinical cases. For this work, we studied isolates and strains of the fungus obtained from infected bats and humans. First, the 10 studied fungal samples, maintained in M-phase cultures in the laboratory were converted to Y-phase (dimorphic transition, M \rightarrow Y) under special culture conditions. The obtained yeasts were processed for the assays, hemagglutination and inhibition of hemagglutination with α - or β -galactose, aimed at detecting the presence, in the yeasts surface of all isolates and/or strains selected, of a lectin that recognizes galactose. Likewise, from each yeast culture in synthetic medium we harvested, by centrifugation, fractions F1 (concentrated culture medium) and yeast-pellet that generated fractions F2 (solubilized material produced after sonication of each pellet). Only fractions F1 and F2 of isolate EH-53 from human (smaller hemagglutinating unit-HAU) and isolate EH-374 from bat (greater HAU) were processed for lectin purification in a column, using the stroma of human erythrocytes as matrix. The retained fractions (RF) and not retained fractions (NRF) of F1 and F2 were tested in hemagglutination assays and further analyzed by SDS-PAGE. Results revealed that yeasts of all studied isolates and strains of *H. capsulatum* hemagglutinated human and rabbit erythrocytes. The hemagglutinating units varied according to the isolate or the strain of the fungus, independently from the host (bat or human), clinical sample (organ of isolation), and the geographical origin, as well as the phylogenetic species of the isolates and strains. The hemagglutination inhibition assays confirmed the preferential specificity of the lectin present in *H. capsulatum* yeasts for the β -galactose anomer. Besides, only the retained fractions

purified on erythrocytes stroma (FR/F1 and FR/F2) developed hemagglutination with human and rabbit erythrocytes. It was also demonstrated that this lectin solubilized into the yeasts culture medium, because it was recovered in fraction FR/F1. SDS-PAGE assays were performed only with F1 and F2 fractions of EH-53 and EH-374 isolates; results revealed a homogeneous proteins profile with several bands, emphasizing in both fractions a 31 kDa band and others three that presented molecular weight near to 45, 66.2 y 97.4 kDa. FR and FNR from F1 and F2 fractions were not revealed by SDS-PAGE. However, hemagglutination assays detected the lectin presence in the FRs fractions of F1 and F2. Reported findings suggest that the lectin from *H. capsulatum*, based on its constant presence in the yeasts of human clinical and naturally infected bat isolates and, by its hemagglutinating activity, could play an important role in the fate of the host-parasite relationship in histoplasmosis.

Key words: Histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, yeasts, lectin, hemagglutination, lectin purification.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE	X
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
<i>Generalidades</i>	1
<i>Aspectos morfológicos de H. capsulatum</i>	1
<i>Ciclo biológico de H. capsulatum</i>	1
<i>Componentes de la pared celular de los morfotipos de H. capsulatum</i>	2
<i>Interacciones de H. capsulatum con carbohidratos</i>	3
<i>Clasificación de H. capsulatum</i>	6
<i>Relación de H. capsulatum con los murciélagos</i>	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS GENERALES	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
<i>Histoplasma capsulatum</i>	12
<i>Transición dimórfica in vitro de fase M a fase L de H. capsulatum</i>	12
<i>Cultivo de fase L en medio sintético</i>	13
<i>Obtención de datos fenotípicos y genotípicos de los aislados y cepas de H. capsulatum seleccionados para el estudio</i>	13
<i>Hemaglutinación mediada por levaduras de H. capsulatum</i>	14
<i>Inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras, utilizando α - o β - galactosa</i>	14
<i>Separación de la fracción soluble del sobrenadante del cultivo (F1) y de la fracción soluble del sonicado (F2) de levaduras de H. capsulatum</i>	15
<i>Purificación de las fracciones F1 y F2 por cromatografía de afinidad a estroma</i>	15

<i>de eritrocitos humano</i>	
<i>Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos</i>	16
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)</i>	16
RESULTADOS	18
<i>Transición dimórfica de fase M a fase L de H. capsulatum</i>	18
<i>Datos fenotípicos y genotípicos de los aislados y cepas de H. capsulatum estudiados</i>	18
<i>Actividad hemaglutinante de levaduras de H. capsulatum</i>	19
<i>Inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras, utilizando α - o β - galactosa</i>	20
<i>Determinación de proteínas y carbohidratos de las fracciones solubles obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo (F1) y del sonicado (F2) de levaduras de H. capsulatum</i>	20
<i>Purificación de las fracciones F1 y F2 por cromatografía de afinidad a estroma de eritrocitos humano</i>	21
<i>Actividad hemaglutinante de las fracciones retenidas (FR) y no retenidas (FNR) de la cromatografía de afinidad de F1 o F2, en matriz de estroma de eritrocitos humano</i>	21
<i>Electroforesis en SDS-PAGE</i>	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	27
PERSPECTIVAS	28
REFERENCIAS	29

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Datos generales de los aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i> seleccionados para el estudio	40
Tabla 2	Datos fenotípicos y genotípicos que apoyan la caracterización de los aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i> seleccionados para el estudio	41
Tabla 3	Estandarización de la hemaglutinación de eritrocitos con levaduras de <i>H. capsulatum</i>	42
Tabla 4	Resultados de la hemaglutinación de eritrocitos con levaduras de <i>H. capsulatum</i>	43
Tabla 5	Resultados de la inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con α y β -galactosa	44
Tabla 6	Determinación de proteínas y carbohidratos de los sobrenadantes del cultivo (F1) y del sonicado (F2) de las levaduras de <i>H. capsulatum</i> estudiadas	45
Tabla 7	Determinación de proteínas de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad en matriz de estroma de eritrocitos	46
Tabla 8	Resultados de la hemaglutinación de eritrocitos de humano y de conejo, utilizando las fracciones retenidas y no retenidas de la cromatografía de afinidad de F1 o F2, en matriz de estroma de eritrocitos	47
Figura 1	Purificación de la lectina por afinidad a estroma de eritrocitos humano, a partir de las fracciones solubles obtenidas de levaduras del aislado EH-53 de <i>H. capsulatum</i>	48-49
Figura 2	Purificación de la lectina por afinidad a estroma de eritrocitos humano, a partir de las fracciones solubles obtenidas de levaduras del aislado EH-374 de <i>H. capsulatum</i>	50-51
Figura 3	SDS-PAGE de los aislados EH-53 y EH-374 de <i>H. capsulatum</i>	52
Figura 4	SDS-PAGE del aislado EH-53 de <i>H. capsulatum</i>	53
Figura 5	Corte de vaso sanguíneo de un murciélago naturalmente infectado con <i>H. capsulatum</i>	54

INTRODUCCIÓN

Generalidades

El agente etiológico de la histoplasmosis es el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* que es considerado un organismo patógeno, capaz de infectar diferentes especies de mamíferos incluyendo el humano. La histoplasmosis tiene una amplia distribución mundial y es la micosis sistémica más importante del continente americano. Casos de histoplasmosis han sido reportados en la mayoría de los continentes y la enfermedad ha sido descrita en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, inicialmente entre los paralelos 45° N y 35° S (Kwon-Chung y Bennett 1992); sin embargo, nuevos brotes han sido referidos en las latitudes 54° N (Anderson *et al.* 2006) y 38.8° S (Calanni *et al.* 2013).

Aspectos morfológicos de H. capsulatum

Es un ascomiceto heterotálico que desarrolla micelio con hifas hialinas y conidios (macro- y microconidios) haploides, representando su estado asexual anamorfo. Este hongo también presenta un estado sexual teleomorfo que constituye la especie conocida como *Ajellomyces capsulatus*, la cual es efímera y resulta del apareamiento de hifas haploides del estado anamorfo que exhiben compatibilidades sexuales o “mating types” distintos, (a) o (+) y (b/alfa) o (-); siendo que la compatibilidad sexual está determinada por el locus *MAT1*. *Histoplasma* y *Ajellomyces* constituyen el mismo hongo holomorfo, término asignado a los hongos con esporulación teleomorfa junto con todos sus estados anamorfos (Guarro *et al.* 1999; Hoog y Guarro 1995; Kwon-Chung 1972a; 1972b).

Ciclo biológico de H. capsulatum

El hongo se encuentra en recintos cerrados como minas, cuevas, pozos, casas u otras construcciones abandonadas, así como en espacios abiertos donde existe acumulación de guano de murciélagos y/o de aves que son ricos en nutrientes como fósforo y nitrógeno necesarios para su crecimiento (Taylor *et al.* 1994; 1999a). La presencia de estos

nutrientes en el guano junto con otros factores bióticos y abióticos como humedad y temperatura, favorecen el desarrollo de su fase micelial-infectiva (morfotipo M) (Eissenberg y Goldman 1994; Tewari *et al.* 1998). En estos ambientes contaminados, se producen aerosoles que contienen los propágulos infectivos del hongo que al ser inhalados producen la infección en huéspedes susceptibles (González-González *et al.* 2012; Reyes-Montes *et al.* 2009; Rosas-Rosas *et al.* 2004). En el huésped infectado, el hongo se convierte en la fase levaduriforme (morfotipo L), su forma parasitaria y virulenta. Las levaduras se localizan de preferencia intracelularmente y pueden sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales como macrófagos y no profesionales como células epiteliales y, si la infección no es controlada, puede evolucionar a enfermedad.

Componentes de la pared celular de los morfotipos de H. capsulatum

El morfotipo L ha sido más estudiado que el M tanto en su relación con el huésped infectado como en su composición química, tal vez por su asociación con el estado parasitario (levaduras intracelulares). Se ha determinado que su pared celular está compuesta en su gran mayoría por polisacáridos, además de proteínas (Maresca y Kobayashi 1989). La pared celular de las levaduras de *H. capsulatum* contiene un 80% de carbohidratos, siendo la quitina (polímero de N-acetil-glucosamina) el mayor componente de ésta, seguido de estructuras poliméricas denominadas glucanas, mananas y/o galactomananas formadas por monosacáridos como glucosa, manosa y galactosa (Azuma *et al.* 1974; Domer 1971; Gómez 1991; Kanetsuna *et al.* 1974; Kanetsuna 1981). Estos componentes se encuentran en diferentes proporciones y presentan una organización espacial distinta en ambas fases M o L (Lara Lemus *et al.* 2014). La presencia de α - y β -glucanas en la pared celular de ambos morfotipos juega diferentes papeles biológicos, entre éstos, son esenciales para la virulencia de *H. capsulatum* (Kügler *et al.* 2000). La α -(1,3)-glucana contribuye a la protección de la levadura de *H. capsulatum* dentro de los fagolisosomas, una vez que la célula fúngica ha sido fagocitada por macrófagos. Además, interfiere en el montaje de la respuesta inmune del huésped ya que la α -(1,3)-glucana de algunas levaduras inhiben la unión del receptor β -glucánico (dectin-1) de macrófagos del huésped a su correspondiente ligando β -(1,3)-glucana,

también presente en la superficie de levaduras ([Eissenberg y Goldman 1991](#); [Rappleye et al. 2007](#)).

Se considera que la presencia de azúcares en la pared celular de ambos morfotipos fúngicos median la interacción con células del huésped, durante las primeras etapas de la infección por *H. capsulatum*. Así, el morfotipo infectivo M es reconocido preferencialmente por receptores β -glucánicos ya que este morfotipo expone β -(1,3)-glucana en su parte más externa de la pared celular. Mientras que este azúcar se encuentra enmascarado en el morfotipo parasitario L por la sobreposición de una capa de α -(1,3)-glucana ([Kanetsuna et al. 1974](#)).

Interacciones de H. capsulatum con carbohidratos

Las interacciones con carbohidratos en los sistemas biológicos implican la participación de moléculas glicoproteicas de origen no inmune que por su actividad de reconocimiento específico y unión reversible a residuos de azúcares forman un grupo químicamente definido y denominado lectinas. Éstas, pueden encontrarse libres o formando parte de estructuras más complejas. Las lectinas presentan al menos dos sitios de unión, ya que pueden unirse en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada ([da Silva y Correia 2014](#); [Lam y Bun 2011](#)).

En la actualidad, las lectinas han adquirido gran importancia por sus actividades antitumorales, antiproliferativas e inmunomoduladoras ([Gallegos et al. 2014](#)).

Se han descrito lectinas en diferentes tipos de hongos, donde éstas han sido clasificadas con base en su estructura, como se menciona en el siguiente cuadro.

Clasificación de algunas lectinas fúngicas con base en su estructura

Familia/ Estructura	Fuente	Características	Referencias
Parecida a β -hélice	<i>Aleuria aurantia</i>	Tiene dos subunidades idénticas de 36 kDa, (α -1,6) y (α -1,3) GlcNAc,	Fujihashi et al. (2003)

		específicas por L-Fucosa	
Tipo actinoporina	<i>Agaricus bisporus</i>	Tetrámero y cada monómero presenta un nuevo plegamiento tipo β -hélice Tiene dos sitios de reconocimiento, uno por GalNAc y otro por GlcNAc	Carrizo <i>et al.</i> (2005)
Galectinas	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Específico por Gal y NeuNAc-lactosa	Ban <i>et al.</i> (2005)
β -Trebol	<i>Clitocybe nebularis</i> <i>Coprino</i> <i>psiscineria</i> <i>Laetiporus sulphureus</i>	Para <i>Clitocybe nebularis</i> es homodimérica, cada monómero consiste de un dominio de tipo ricina	Pohleven <i>et al.</i> (2012)

Algunas lectinas de hongos presentan actividades biológicas que pronostica su posible utilización en la práctica médica como es el caso de la lectina de *Flammulina velutipes*, la cual tiene actividad inmunomoduladora al estimular la mitosis linfocitaria, además de inhibir la anafilaxis (Paaventhana *et al.* 2003).

La importancia de las lectinas de hongos patógenos resalta por la posible participación en los mecanismos de interacción huésped-parásito. La presencia de estas lectinas en patógenos de humanos ha sido referida en *Aspergillus fumigatus*, donde se describió una lectina con un peso molecular de 32 kDa con especificidad para ácido siálico, la cual está involucrada en la fijación del conidio fúngico al epitelio del huésped (Tronchin *et al.* 2002). Otra lectina estudiada en el complejo de especies de *Aspergillus* es la de *A. oryzae* que presenta alta afinidad para azúcares α -(1,6)-fucosilados (Matsumura *et al.* 2007). Se ha reportado en la levadura patógena *Candida glabrata* moléculas que tienen la habilidad de adherirse a células epiteliales (conocidas como “epithelial adhesin”-Epa). Existen

varios miembros de la familia Epa, los cuales son manoproteínas altamente glicosiladas con una región amino terminal que se parece a la familia de las lectinas tipo C que son dependientes de calcio para su actividad de unión al epitelio humano (Maestre-Reyna *et al.* 2012).

En *H. capsulatum* se describieron dos glicoesfingolípidos únicos de la superficie de sus levaduras (Barr y Lester 1984; Barr *et al.* 1984). Asimismo, se ha reportado que levaduras de *H. capsulatum* se une a un glicoesfingolípidio [lactosilceramida (Gal β 1-4Glc1 β 1-1Cer)], presente en receptores de células pulmonares humanas y eritrocitos bovinos (Jiménez-Lucho *et al.* 1990); probablemente esta unión está mediada por los glicoesfingolípidos de la pared celular de las levaduras del hongo (Taylor ML, comunicación personal). Algunos estudios han aportado información de que la proteína Yps3p (20 kDa), codificada por el gen *YPS3* que sólo se expresa en la fase L (Keath y Abidi 1994; Keath *et al.* 1989), tiene actividad tipo lectina. Esta proteína es excretada al medio donde se solubiliza y reconoce quitina de la pared celular de otras cepas del hongo (Bohse y Woods 2005; 2007; Weaver *et al.* 1996). Actualmente, se sabe que la Yps3p es ligando de TLR-2, señalizando por esta vía (Aravalli *et al.* 2008; Sorgi *et al.* 2009). En *H. capsulatum* también se ha descrito una proteína de 50 kDa que se une a un posible componente carbohidrato de matriz extracelular, como la laminina murina, sugiriendo su posible papel en el mecanismo de diseminación tisular del hongo (McMahon *et al.* 1995). En estudios previos, se identificó la presencia de un componente de pared celular de levaduras de *H. capsulatum* con actividad tipo lectina, específica para β -galactosa, y que es capaz de interaccionar con moléculas galactosilados de la superficie de macrófagos murinos (Duarte Escalante *et al.* 2003; Mendes-Giannini *et al.* 2000; Taylor *et al.* 1998). Además, hace algunos años se ha reportado que las levaduras del hongo son capaces de aglutinar eritrocitos humanos, siendo que esta actividad está asociada al reconocimiento de residuos galactosilados y/o sializados presentes en las superficies de eritrocitos humanos del grupo “O” por componentes tipo lectina presentes en la pared celular de la levadura (Mendes-Giannini *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2004).

Datos no publicados, refieren que las levaduras de *H. capsulatum* también aglutinan eritrocitos de otras especies de mamíferos, como conejo, rata, ratón, caballo y

murciélagos (Taylor ML, comunicación personal). Además, se ha sugerido que el componente tipo lectina de las levaduras del hongo está posiblemente relacionado con procesos de diseminación y patogénesis de la histoplasmosis (Pérez-Torres *et al.* 2010).

Clasificación de H. capsulatum

Existen diferentes clasificaciones para este hongo, entre ellas está la clasificación biológica en la que el género *Histoplasma* presenta una sola especie, *H. capsulatum*, y tres variedades taxonómicas: *H. capsulatum* var. *capsulatum* Darling, 1906; *H. capsulatum* var. *duboisii* (Vanbreuseghem, 1957) - Ciferri, 1960; y *H. capsulatum* var. *farciminosum* (Rivolta, 1873) - Weeks, Padhye, et Ajello, 1985, identificadas por micromorfología, distribución geográfica, asociación con el huésped y formas clínicas de la enfermedad que producen. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas moleculares esta clasificación ha sido desplazada y, actualmente, se considera a *H. capsulatum* como un complejo de especies crípticas (Kasuga *et al.* 2003; Taylor y Fisher 2003), aunque en bases de datos reconocidas para hongos, tales como *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org) y Mycobank (www.mycobank.org), aun se clasifica al género *Histoplasma* con las especies *H. capsulatum* (incluyendo las variedades *H. capsulatum* var. *capsulatum* y *H. capsulatum* var. *farciminosum*) y *H. duboisii* (antes *H. capsulatum* var. *duboisii*).

Recientemente, con base en estudios de sistemática molecular se han propuesto clasificaciones filogeográfica de *H. capsulatum* que consideran a éste como un complejo de especies crípticas. De acuerdo con Kasuga *et al.* (2003), el complejo *H. capsulatum* contiene ocho clados (poblaciones genéticas) de los cuales siete son considerados especies filogenéticas [Clase 1 Norte América (NAm 1), Clase 2 Norte América (NAm 2), grupo A de Latino América (LAm A), grupo B de Latino América (LAm B), Australiana, Holandesa y Africana], siendo que la mayoría de los aislados fúngicos obtenidos de murciélagos infectados se ubicaron en el clado o especie filogenética LAm A. Actualmente, se ha considerado una nueva especie filogenética (denominada NAm 3, Taylor ML, comunicación personal) asociada, preferentemente, a la infección de los murciélagos guanero *Tadarida brasiliensis* (Vite-Garín *et al.* 2014). Resultados más

reciente publicados por Teixeira *et al.* (2016) incrementan a 11 el número de especies filogenéticas del complejo *H. capsulatum* [NAm 1, NAm 2, LAm A1, Lam A2 (ambas originadas de LAm A), LAm B1, LAm B2 (originadas de LAm B), Australiana, Holandesa, Africana, y como nuevas especies filogenéticas RJ y BAC1]. El clado BAC1, referido por Teixeira *et al.* (2016), comprende sólo dos aislados fúngicos recuperados de *T. brasiliensis* y uno obtenido del murciélago *Mormoops megalophylla*, mientras que la especie filogenética NAm 3 agrupa estos mismos aislados fúngicos junto con seis nuevos aislados recuperados de *T. brasiliensis* (Taylor ML, comunicación personal).

Relación de H. capsulatum con los murciélagos

H. capsulatum coexiste con murciélagos de varias especies en diferentes hábitats que varían desde edificios viejos, construcciones y minas abandonadas, bajo copas de árboles, gallineros, patios caseros, grutas, cavernas, etcétera. En estos ambientes, el hongo crece favorablemente en presencia de guano de murciélagos y aves que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de su fase M infectiva. El hongo es capaz de infectar varias especies de mamíferos, incluyendo el murciélago. Se sugiere que este mamífero volador puede esparcir el hongo a grandes distancias, razón por la cual es considerado su principal dispersor en la naturaleza (Taylor *et al.* 2012).

La investigación sobre el curso de la histoplasmosis en murciélagos, ha sido poco informativa. Se desconoce como la enfermedad daña a las poblaciones de murciélagos, aunque se han descrito altos porcentajes de infección en estos animales, dependiendo principalmente de las condiciones de su refugio (Taylor *et al.* 1999a). Observaciones histopatológicas en animales naturalmente infectados han revelado que estos mamíferos, aunque presenten diseminación a diferentes órganos, no desarrollan reacciones granulomatosas y los tejidos con presencia del patógeno no indican reacción inflamatoria evidente (Taylor *et al.* 1999a; Taylor ML, comunicación personal).

El hecho de ser un agente patógeno, le permitió a *H. capsulatum* adaptarse a un nuevo nicho ecológico como es el huésped infectado, donde pudo desarrollarse y sobrevivir en su fase parasitaria. Aunque se desconoce en qué momento el hongo adquirió el estado de parásito, sin duda, los primeros huéspedes candidatos fueron los murciélagos al

manifestar la infección y posible enfermedad. La convivencia de millones de años en hábitats naturales pudo haber favorecido una historia evolutiva entre el *Histoplasma* y los murciélagos, posiblemente asociada a una co-evolución. Esta co-evolución está respaldada por compartir ambos organismos el mismo nicho ecológico, desde hace millones de años como se puede inferir por los datos de la historia evolutiva de cada uno de ellos. La radiación de *Histoplasma* en el mundo inicio en Latinoamérica hace 3.2-13 millones de años (Mioceno-Plioceno), según Kasuga *et al.* (2003), mientras que la historia evolutiva de algunas especies de estos mamíferos voladores proviene desde Plioceno tardío (Morgan y Ridgway 1987). En particular, es posible que la interacción entre el hongo patógeno *H. capsulatum* y el murciélago *T. brasiliensis* podría haberse iniciado desde el Pleistoceno, ya que el primer fósil reportado para esta especie de murciélago procede del Pleistoceno tardío, según Morgan (1985). La migración de *T. brasiliensis* hacia Norteamérica empezó hace 5000 años BP (del inglés, before present), donde posiblemente empezó la mezcla de poblaciones de *T. brasiliensis* procedentes del sur del continente (Aikens 1983; Russell *et al.* 2005).

Los datos referidos justifican la utilización de aislados fúngicos de murciélagos para el estudio de moléculas de *H. capsulatum* que actúan en esta interacción huésped-parásito.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que los datos publicados apoyan la existencia de una molécula con actividad tipo lectina específica para β -galactosa, en la pared celular de levaduras de *H. capsulatum*, es necesaria la purificación y caracterización química de ésta para conocer sus posibles interacciones biológicas con componentes de huéspedes mamíferos y, así, entender su papel en la etiopatogénesis de la histoplasmosis.

Tomando en cuenta que hasta la fecha esta lectina sólo ha sido descrita en levaduras de tres cepas clínicas de humano y considerando la variabilidad fenotípica y la gran diversidad genética de este patógeno, es importante determinar su presencia en un mayor número de especímenes de *H. capsulatum* con aislamientos procedentes de distintos orígenes, muestras, procedencias geográficas y especies filogenéticas, particularmente, los obtenidos del principal reservorio del hongo en la naturaleza como es el murciélago, con el cual *H. capsulatum* tiene una estrecha historia evolutiva. La evidencia de esta lectina en aislados fúngicos de murciélagos permitirá inferir que tan conservada es esta molécula.

HIPÓTESIS

La lectina de levaduras de *Histoplasma capsulatum* que reconoce β -galactosa está presente en diferentes especímenes fúngicos aislados de murciélagos (huésped reservorio y dispersor del hongo) y de humanos (huésped accidental), obtenidos de distintas fuentes, procedencias geográficas y especies filogenéticas.

OBJETIVOS GENERALES

Demostrar la presencia de la lectina con especificidad para β -galactosa en levaduras de *H. capsulatum*, a partir de aislados obtenidos de humanos y murciélagos naturalmente infectados, así como de cepas de referencia de humano.

Purificar y caracterizar químicamente la lectina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener la transición dimórfica de los diferentes aislados y cepas de *H. capsulatum* estudiados.

Identificar la lectina en los aislados y cepas de *H. capsulatum* estudiados.

Purificar la lectina de *H. capsulatum* a partir de algunos aislados y cepas estudiados.

Determinar el perfil electroforético por SDS-PAGE de las fracciones purificadas de la lectina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Histoplasma capsulatum- Se utilizaron aislados y cepas del hongo depositados en colecciones registradas a nivel internacional (Tabla 1), siendo que los aislados procedentes de México forman parte de la Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos (LIH), Facultad de Medicina, UNAM, la cual puede ser consultada a través de la página electrónica <http://www.histoplas-mex.unam.mx>. Esta colección está registrada en la base de datos del “World Data Centre for Microorganisms (WDCM)” con el número [LIH-UNAM WDCM817](#) y las cepas de referencia de Estados Unidos de América y Panamá, están depositadas en la “American Type Culture Collection” (ATCC) (Tabla 1). Los datos de los aislados y cepas seleccionados para este estudio vienen registrados en la Tabla 1. Todos los aislados y cepas son mantenidos en su fase micelial (M) en el laboratorio, según el protocolo recomendado por la Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum* del LIH.

Transición dimórfica in vitro de fase M a fase L de H. capsulatum- Partiendo de un cultivo puro de fase M de cada aislado y cepa del hongo, se disgregó el micelio en mortero de porcelana estéril con PBS (amortiguador salino de fosfato) 150 mM, pH 7.2. El material disgregado fue incubado en baño con agitación a 37°C, utilizando el medio sintético de Tewari y Kugel (1971), el cual está constituido por: glucosa 5.0 g, clorhidrato de L-cisteína 0.1 g, L-glutamina 0.1 g, cloruro de amonio 0.5 g, sulfato de amonio 0.5 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0.1 g, fosfato dibásico de potasio 2.5 g y cloruro férrico 0.001 g, para 1 litro de agua bidestilada. Se realizaron resiembras sucesivas, cada 72 h, hasta que se obtuvo la transición dimórfica. Una vez lograda ésta, la fase L fue sembrada en caldo-BHI (infusión cerebro-corazón) (Bioxón, Becton-Dickinson, CDMX, MX) suplementado con L-cisteína 0.1% y glucosa 1% y se incubó a 37°C, durante 24 h. Las levaduras de cada aislado y cepa fueron centrifugadas a 800 g-15 min, se lavaron con caldo-BHI fresco y se centrifugaron nuevamente. Al paquete de levaduras

se adicionó 1 ml de la mezcla de suero fetal de ternera (GIBCO BRL, Gran Island, Biological Co., NY, US) y dimetilsulfóxido, en una relación 9:1. Finalmente, se distribuyeron las levaduras en criotubos estériles, los cuales se congelaron a -80°C. Para usos subsecuentes, se trasladaron los criotubos con levaduras a temperatura ambiente para descongelarlas y se transfirieron éstas a caldo-BHI suplementado, seguido de incubación a 37°C.

Cultivo de fase L en medio sintético- Las levaduras de cada aislado y cepa procedentes de cultivos en caldo-BHI fueron sembradas en medio líquido sintético RPMI-1640 libre de suero (Sigma Chemical, St. Louis, MO, US) y suplementado con glutamina, por 24-48 h/37°C, hasta alcanzar la fase-logarítmica de crecimiento. Post-cultivo, las levaduras fueron inactivadas con timerosal (1:5000) y, después de 3-5 días, se realizaron pruebas de viabilidad por siembra de un inóculo en agar-BHI suplementado con L-cisteína 0.1% y glucosa 1% , con incubación a 37°C. Una vez comprobada la muerte de las levaduras inactivadas, por la ausencia de crecimiento en agar-BHI suplementado, éstas fueron cosechadas por centrifugación. Los paquetes de levaduras muertas, de cada aislado y cepa, fueron lavados con PBS 150 mM, pH 7.2, para las pruebas subsecuentes.

Obtención de datos fenotípicos y genotípicos de los aislados y cepas de H. capsulatum seleccionados para el estudio- Para los diez aislados y cepas del estudio se identificaron las macro y micromorfologías correspondientes al patógeno *H. capsulatum*, se realizaron los ensayos de dimorfismo fúngico como se describió en el inciso anterior y se obtuvieron otros datos fenotípicos adicionales previamente estandarizados en el laboratorio para la caracterización de *H. capsulatum*, como: ensayo-inmuno-enzimático (ELISA) utilizando levaduras de cada aislado y cepa de *H. capsulatum* como antígeno y anticuerpos específicos ([modificado de Voller et al. 1979](#)); virulencia por ensayos de DL50% registrados en el “Catálogo de Colección de Cepas de *H. capsulatum*” ([Taylor et al. 1999b](#)); y determinación de la compatibilidad sexual por la identificación molecular de los idiomorfos del locus *MAT1*, según lo referido por Rodríguez-Arellanes et al.

(2013). La caracterización genotípica se realizó por la amplificación por PCR de un fragmento génico de 210 pares de base (pb) del gen *Hcp100*, único de *H. capsulatum*, la cual se realizó de acuerdo con los descrito por Bialek *et al.* (2002). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en el High-Throughput Genomics Center (University of Washington, Seattle, WA, US). Se realizó un análisis de BLASTn según Altschul *et al.* (1990), a partir de las secuencias del marcador Hcp100 obtenidas de cada aislado y cepa, utilizando como referencia la secuencia de la cepa G-217B (ATCC-26032) reportada en el GenBank.

Hemaglutinación mediada por levaduras de H. capsulatum- Este procedimiento se realizó para las levaduras de cada aislado y cepa crecidos en medio RPMI, las cuales fueron cosechadas por centrifugación a 800 g-10 min. Cada paquete de levaduras fue lavado con amortiguador PBS y ajustado a una concentración inicial de 3 densidades ópticas (D.O.) conteniendo 2×10^8 levaduras/ml en PBS, a partir de la cual se realizaron diluciones en placa correspondientes a 2 D.O. (1×10^8) y 1 D.O. (5×10^7), para ser utilizadas en ensayos de estandarización de la prueba. Las levaduras de cada D.O. fueron diluidas de forma seriada con PBS en placas especiales para hemaglutinación. Se obtuvo sangre de humano tipo “O” de un donador sano previo consentimiento, así como se procesaron eritrocitos de conejo macho joven Nueva Zelanda. Los eritrocitos fueron cosechados en presencia de anticoagulante y separados de la serie blanca por gradiente de densidad en Histopaque-1077 (Sigma) y centrifugación a 400 g-30 min. La fracción de eritrocitos lavada con PBS fue ajustada a una concentración de 2% en PBS, para todas las pruebas. A cada pozo de la placa se adicionó 25 μ l de la suspensión de eritrocitos al 2%, incubando la placa a 37°C por 1 h, previo a la lectura de la prueba. Se empleó hemolinfa de camarón como testigo de hemaglutinación y PBS sin levaduras como testigo no hemaglutinación, según Taylor *et al.* (2004). Los resultados fueron expresados como unidades de hemaglutinación (UHA).

Inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras, utilizando α - o β -galactosa- Las muestras de las levaduras probadas de cada aislado y cepa fueron tratadas con diferentes

concentraciones de α - o β -galactosa. Cada muestra (100 μ l), resuspendida en PBS y ajustada a una concentración de trabajo de 2×10^8 levaduras/ml (3 D.O.), fue dispensada en cada pozo de la placa de hemaglutinación. Se adicionó (100 μ l) del anómero a probar a una concentración inicial de 200 mM en PBS en el primer pozo de la placa, seguido de diluciones seriadas. Se incubó cada placa a 4°C por 1 h, se centrifugó a 800 g-20 min y se lavó gentilmente dos veces con PBS. Para esta prueba se manejaron sólo eritrocitos de conejo al 2% en PBS (25 μ l), los cuales fueron adicionados a cada pozo de la placa y se incubó a 37°C por 1 h. Como testigo de no inhibición se utilizaron levaduras sin previo tratamiento con cada anómero. La inhibición fue expresada como la concentración mínima del anómero requerida para inhibir 4 UHA.

Separación de la fracción soluble del sobrenadante del cultivo (F1) y de la fracción soluble del sonicado (F2) de levaduras de H. capsulatum- A partir de los cultivos en medio RPMI se separó el sobrenadante y el paquete de levaduras por centrifugación a 800 g-10 min de cada aislado y cepa. Cada fracción fue procesada independientemente, para la purificación de la lectina. Cada sobrenadante de RPMI fue concentrado 10 X (F1), mientras que cada paquete de levaduras fue resuspendido en 500 μ l de PBS y sonicado en un equipo Soniprep 150 (Henserson Biomedical, UK) utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml, durante 2 min, con intervalos de 20 s. Enseguida, se centrifugó a 2200 g-10 min para obtener una fracción con todo el material soluble intra- y extracelular de las levaduras sonicadas (F2) y se descartó el residuo de paredes celulares y células no rotas. Previa utilización en ensayos subsecuentes, se determinaron las concentraciones de proteínas y carbohidratos de ambas fracciones. Se adicionó inhibidor de proteasas a cada fracción, las cuales se conservaron a -20°C hasta su uso.

Purificación de las fracciones F1 y F2 por cromatografía de afinidad a estroma de eritrocitos humano- Se obtuvo sangre tipo "O" como fuente de eritrocitos, los cuales fueron lavados tres veces con PBS 150 mM con centrifugación a 1600 g-15 min, seguido de la lisis por choque osmótico y posterior centrifugación en las mismas condiciones. El estroma obtenido de la centrifugación se incubó con glutaraldehído 1%, durante toda la

noche a 4°C, con agitación leve. Se lavó el estroma hasta eliminar el glutaraldehído y, enseguida, se incubó con glicina 1 M durante toda la noche a 4°C, con agitación leve. Por último, se lavó el estroma para retirar la glicina y se adicionó Sephadex G-25 (Pharmacia Chemicals, Upsala, Sweden) como soporte para cada columna montada con matriz de estroma de eritrocitos, correspondiente a los aislados EH-53 y EH-374. Se equilibraron las columnas con 2 mg de ASB (albúmina sérica bovina) en PBS y, de modo independiente, se adicionó la fracción F1 o F2 a sus respectivas columnas, las cuales fueron cargadas seis veces. La fracción retenida, en cada columna, fue eluída con ácido acético al 3% (Vázquez *et al.* 1993) y recolectada en volúmenes de 1 ml. De inmediato, para cada fracción, se leyeron por espectrofotometría sus respectivas D.O. a 280 nm. Se recuperaron, de cada aislado, las fracciones retenidas (FR) y no retenidas (FNR) de F1 (FR/F1 y FNR/F1) así como de F2 (FR/F2 y FNR/F2), las cuales fueron almacenadas a -20°C, previa determinación de proteínas e incorporación de inhibidor de proteasas. Las fracciones FR/F1 y FNR/F1 así como FR/F2 y FNR/F2, de ambos aislados, fueron dializadas contra PBS y se les determinaron sus respectivas actividades hemaglutinantes en eritrocitos de humano o de conejo.

Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos- La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando ASB como estándar.

La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método de Dubois *et al.* (1956), utilizando glucosa como estándar.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)- Se realizó por el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS en condiciones reductoras. Se prepararon los geles: separador en condiciones reductoras [acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%, Tris 1.5 M, pH 8.8, persulfato de amonio 100 mg/ml, urea 8 M y TEMED (N,N, N'N'-tetrametiletilendiamina) al 0.4%]; concentrador (acrilamida 5%, Tris 0.5 M, pH 6.8, persulfato de amonio 100 mg/ml y TEMED 0.4%). Una vez preparados y ensamblados

ambos geles, de inmediato éstos fueron estabilizados con una corrida previa de 15 min sin muestras, utilizando las mismas condiciones para la corrida final con muestras. Para la corrida final, se adicionaron 20 µl de cada muestra diluida 1:1 con amortiguador (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8). Las muestras utilizadas para este ensayo fueron las fracciones F1 y F2 así como las FRs y FNRs de F1 y F2, de los aislados EH-53 y EH-374 de *H. capsulatum*. Además, también se utilizó una proteína (Yps3p) que sólo se expresa en fase L de *H. capsulatum* que tiene actividad de tipo lectina con especificidad para quitina como referencia para los perfiles electroforéticos. Estas muestras, antes de la aplicación en el gel, fueron previamente sometidas a ebullición en baño María por 15 min. La migración electroforética se realizó aplicando a la cámara electroforética 100 V, en amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%, pH 8.3). Se utilizó un estándar de peso molecular conocido de amplio rango. Para visualizar las bandas de los geles, éstos fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.25% o con plata al 3%. Los geles fueron fotografiados para el registro de los resultados.

RESULTADOS

Los aislados y cepas seleccionados para este estudio fueron obtenidos de muestras clínicas de humano (hígado, sangre y vagina) y de muestras de murciélagos infectados capturados al azar (intestino, bazo, hígado y pulmón). Siete de los aislados provienen de México y dos cepas de referencia proceden de Estados Unidos de América y una de Panamá. Todos pertenecen a una especie filogenética o a una linaje definida ([ver Tabla 1](#)).

Transición dimórfica de fase M a fase L de H. capsulatum- Todos los aislados y cepas estudiados convirtieron de fase M a fase L ([ver Tabla 2](#)). Los tiempos de dimorfismo *in vitro* variaron de 2-3 semanas en promedio, según las resiembras realizadas. Para los diferentes ensayos, las levaduras de cada aislado y cepa fueron inactivadas con timerosal y los cultivos de éstas en agar-BHI suplementado no desarrollaron crecimiento después del tratamiento.

Datos fenotípicos y genotípicos de los aislados y cepas de H. capsulatum estudiados- Todos los aislados y cepas presentaron la macro y micromorfología típica de la especie, caracterizadas por colonias albinas y textura vellosa (aislados EH-46, EH-53, EH-315, EH-672H, EH-696P y cepas de referencia G-186B, G-217B, Downs) o colonias beige-café con textura pulverulenta (aislados EH-374 y EH-378). Asimismo, todos los especímenes fúngicos estudiados presentaron micelio con hifas hialinas, producción de abundantes microconidios (aislado EH-53) o escasos microconidios (aislados EH-46, EH-315, EH-374 y EH-378) y abundantes macroconidios tuberculados típicos de la especie (aislados EH-46, EH-53, EH-315, EH-696P) o ausencia de éstos (cepas de referencia G-186B, G-217B, Downs).

Las caracterizaciones fenotípicas y genotípicas utilizadas en este estudio vienen registradas en la [Tabla 2](#). Las pruebas de ELISA revelaron títulos con el anticuerpo específico que variaron desde 1:640 para el aislado EH-53 hasta 1:2560 para los aislados EH-46 y EH-315. Los datos de virulencia *in vivo* (DL50%) y la identificación del locus

MAT1, referidos en la presente tesis, fueron recopilados de Taylor *et al.* (1999b) y de Rodríguez-Arellanes *et al.* (2013). Así, entre los aislados y cepas estudiados, la virulencia más alta correspondió al aislado de murciélago EH-315 seguido del aislado clínico EH-46, mientras que los aislados y cepas menos virulentos correspondieron a dos aislados de murciélagos (EH-374 y EH-672H) y a la cepa de referencia Downs (ver Tabla 1 y Tabla 2). Los idiomorfos MAT1-1 y MAT1-2 del locus *MAT1*, detectados por PCR, fueron discriminados entre los aislados y cepas estudiados, siendo MAT1-1 dos aislados de murciélagos (EH-315 y EH-696P) y una cepa de referencia (G-217B) y MAT1-2 tres aislados de murciélagos (EH-374, EH-378 y EH-672H) y dos aislados clínicos (EH-46 y EH-53), además de dos cepas de referencia (G-186B y Downs) (Tabla 2).

Con respecto a los datos genotípicos, los 10 aislados y cepas utilizados en esta tesis amplificaron el marcador Hcp100 (específico para *H. capsulatum*) generando las secuencias correspondientes para cada aislado y cepa, como se reporta en la Tabla 2. El análisis de BLASTn de las secuencias obtenidas para este trabajo encontró una similitud entre 93% (G-186B) y 99% (EH-46 y EH-315) con respecto a la mayoría de las secuencias de *H. capsulatum* reportadas en las bases de datos.

Actividad hemaglutinante de levaduras de H. capsulatum- Los ensayos preliminares de estandarización de la concentración óptima de levaduras para realizar la hemaglutinación demostraron que 2×10^8 levaduras/ml, correspondiente 3 DO, fue la concentración que alcanzó más altos valores de UHA (Tabla 3). Se utilizaron levaduras de cada aislado y cepa ajustadas a 3 DO para los ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de humano o de conejo y los resultados fueron reportados como UHA, en la Tabla 4. Las más altas UHA correspondieron a los aislados de murciélagos, EH-374 y EH-315, para ambos tipos de eritrocitos; mientras que los valores de UHA más bajos se asociaron al aislado de murciélago EH-696P y a los aislados clínicos EH-46 y EH-53, así como a la cepa clínica de referencia G-186B (ver Tabla 4). No obstante, las UHA variaron según el tipo de eritrocitos usados (Tabla 4). En todos los ensayos los testigos funcionaron según lo esperado.

Inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras, utilizando α - o β -galactosa- Para este ensayo sólo se emplearon eritrocitos de conejo. Los resultados obtenidos (Tabla 5) mostraron que las levaduras de todos los aislados y cepas del estudio tratadas con α - o β -galactosa presentaron inhibición de la hemaglutinación, destacando la inhibición con β -galactosa. Las levaduras de los aislados (EH-315, EH-378, EH-696P) y de la cepa de referencia Downs fueron las que más inhibieron la hemaglutinación después del tratamiento con la β -galactosa, según sus concentraciones mínimas inhibitorias de 1.562 mM; mientras que las levaduras de los aislados EH-53, EH-672H y de la cepa de referencia G-217B desarrollaron concentraciones mínimas inhibitorias de 50 mM; el aislado EH-374 produjo una concentración mínima inhibitoria de 100 mM; y el aislado EH-46 y la cepa de referencia G-186B presentaron concentraciones mínimas inhibitorias de 200 mM.

Por otro lado, la α -galactosa también inhibió la hemaglutinación con las levaduras de todos los aislados y cepas, aunque con valores de inhibición más bajos. Sin embargo, un único aislado (EH-46) presentó mayor inhibición con α -galactosa a 1.562 mM que la alcanzada con la β -galactosa (200 mM). Los aislados EH-53, EH-374, EH-672H, EH-696P y las cepas G-186B y G-217B fueron los que menos inhibieron la hemaglutinación con 200 mM.

Finalmente, las levaduras de los aislados EH-315 y EH-378, así como de la cepa Downs alcanzaron la concentración mínima inhibitoria de 1.562 mM, para ambos anómeros.

Determinación de proteínas y carbohidratos de las fracciones solubles obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo (F1) y del sonicado (F2) de levaduras de H. capsulatum- Las fracciones solubles F1 y F2 obtenidas de todos los aislados y cepas, según el procedimiento descrito en materiales y métodos, fueron sometidas a la determinación de proteínas y carbohidratos (ver Tabla 6).

Las concentraciones de proteínas para la fracción F1 variaron en todos los aislados y cepas, en un rango de 0.06 - 1.765 mg/ml para los aislados EH-46 y EH-315, respectivamente. Asimismo, las concentraciones de carbohidratos variaron en un rango de 0.260 - 0.983 mg/ml para los aislados EH-696P y EH-53, respectivamente.

Con respecto a las concentraciones de proteínas y carbohidratos de las fracciones F2 de cada aislado y cepa, los valores de proteínas variaron de 0.215 - 1.255 mg/ml para los aislados EH-374 y EH-672H, respectivamente; mientras que los valores de carbohidratos se detectaron en un rango de 0.310 - 0.595 mg/ml para los aislados EH-696P y EH-374, respectivamente (Tabla 6).

Cabe destacar que los valores de las fracciones F1, de la mayoría de los aislados y cepas, fueron mayores tanto para proteínas como para carbohidratos que los referidos en la fracción F2 (Tabla 6).

Purificación de las fracciones F1 y F2 por cromatografía de afinidad a estroma de eritrocitos humano- Para la purificación de las fracciones F1 y F2 se procesaron sólo dos aislados de *H. capsulatum*, los cuales se seleccionaron por la menor UHA (aislado EH-53) y por la mayor UHA (aislado EH-374). Para F1 se consideraron las concentraciones iniciales de proteínas de 0.374 y 0.299 mg/ml, para los aislados EH-53 y EH-374, respectivamente; mientras que para F2 las concentraciones utilizadas fueron de 0.562 y 0.215 mg/ml para los mismos aislados, respectivamente (ver Tabla 6).

Las curvas de purificación de cada aislado se muestran en las Figs. 1 y 2, donde se señalizan las fracciones retenidas (FR) y no retenidas (FNR) obtenidas a partir de las fracciones F1 y F2 de los aislados EH-53 y EH-374, muestran buena recuperación de ambos FRs y FNRs. Para el ensayo subsecuente, se determinaron las concentraciones de proteínas de las FRs de F2 de ambos aislados resaltando sus mayores concentraciones de proteínas que las FRs de F1 (Tabla 7).

Actividad hemaglutinante de las fracciones retenidas (FR) y no retenidas (FNR) de la cromatografía de afinidad de F1 o F2, en matriz de estroma de eritrocitos humano- Los resultados de los ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de humano y de conejo empleando las fracciones FR y FNR procedentes de las cromatografías de afinidad de F1 o F2 se presentan en la Tabla 8, donde la fracción FR/F1 del aislado EH-53 produjo 8 UHA con eritrocitos de humano y 4 UHA con eritrocitos de conejo, mientras que la fracción FR/F2 del mismo aislado produjo 4 UHA con ambos tipos de eritrocitos. En

relación con el aislado EH-374, la fracción FR/F1 generó 4 UHA con eritrocitos de humano y conejo, mientras que la fracción FR/F2 presentó 4 UHA al utilizar eritrocitos de humano y la lectura más baja con 2 UHA al utilizar eritrocitos de conejo. Todas las fracciones no retenidas (FNR/F1 y FNR/F2), de los dos aislados fúngicos utilizados en este ensayo, no presentaron hemaglutinación para ninguno de los eritrocitos probados.

Electroforesis en SDS-PAGE- Los perfiles electroforéticos de las fracciones F1 y F2 de los aislados EH-53 y EH-374 pueden ser observados en la [Fig. 3](#). Éstos mostraron hasta 20 bandas proteicas en el rango de 37 a 116.6 kDa. Se destacan las bandas que comparten tanto las fracciones F1 y F2 de ambos aislados, con pesos moleculares cercanos a 45, 66.2 y 97.4 kDa. También resaltan, las bandas de aproximadamente 31 kDa presentes en las fracciones F1 de ambos aislados y en la fracción F2 del aislado EH-53, aunque esta banda no fue observada en la fracción F2 del aislado EH-374 en tres ensayos consecutivos. Hasta la fecha, en los ensayos realizados no se han logrado evidenciar los perfiles electroforéticos de las fracciones FRs y FNRs de ambos aislados. La proteína Yps3p, utilizada como referencia de una lectina de *H. capsulatum* no fue revelada en el ensayo de la [Fig. 3](#), aunque se apreció en otro ensayo la banda de 20 kDa propia de esta proteína, en el carril correspondiente a ésta ([Fig. 4](#)). En la [Fig. 4](#) también se observó la banda de la proteína Yps3p en las fracciones F1 y F2 del aislado EH-53.

DISCUSIÓN

H. capsulatum al igual que otros hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Talaromyces marneffe* y *Sporothrix schenckii* crecen en la naturaleza como micelio y en el huésped pasan a la fase levaduriforme (Nemecek *et al.* 2006). En el caso de una infección exitosa y siendo la primera línea de defensa contra *H. capsulatum* las mucosas del tracto respiratorio superior e inferior del mamífero infectado, la transición dimórfica M → L debe ocurrir en el menor tiempo posible ya que la fase L es virulenta y es capaz de soslayar los mecanismos de defensa del huésped y diseminarse (Sahaza *et al.* 2014). Dada la importancia de las levaduras en los huéspedes infectados y debido a que éstas son las que persisten en la enfermedad y producen distintos factores de virulencia, los cuales están asociados a condiciones intrínsecas del proceso dimórfico del hongo así como de la especie filogenética a que pertenecen (Durkin *et al.* 2004; Sepúlveda *et al.* 2014), mucho de los ensayos experimentales con *H. capsulatum* utilizan el morfotipo L para estudiar moléculas expresadas por el hongo que pueden intervenir en la relación huésped-parásito. Por tal motivo, para este trabajo seleccionamos aislados y cepas con datos previos de virulencia y especie filogenética bien definidas, además de bien caracterizados el tipo de huésped y su procedencia geográfica, así como la muestra de aislamiento, con el fin de conocer si algunos de estos datos registrados en la [Tabla 1](#) se asocian con la presencia o ausencia de la lectina descrita para *H. capsulatum* en todos los especímenes fúngicos estudiados.

Dado el carácter pleomórfico de *H. capsulatum*, que se presenta tanto en el morfotipo como en la expresión de moléculas de su ciclo biológico, para iniciar este estudio fue recomendable seleccionar aislados que manifestaran aspectos fenotípicos de la especie y complementar esta información con la amplificación por PCR de un marcador genotípico único del hongo. En este estudio, se utilizaron tres cepas del ATCC (G-217B, G-186B y Downs), mundialmente consideradas como referencia para *H. capsulatum*; aunque éstas presentan pleomorfismo macro y microscópico, genéticamente son compatibles con *H. capsulatum*. Los datos recolectados de las caracterizaciones fenotípicas de todos los

aislados y cepas, tales como macromorfología colonial, morfología microscópica, obtención del dimorfismo fúngico *in vitro*, reactividad inmunológica de la fase L determinada por ELISA con anticuerpo específico, determinación de la virulencia por DL50% en el modelo murino y caracterización de la compatibilidad sexual del hongo por identificación de los idiomorfos del locus *MATI*, mostraron que los especímenes estudiados cumplieron ampliamente con los criterios de selección de *H. capsulatum* con mínimos cambios fenotípicos. Además, estos datos fueron fortalecidos con los resultados generados por la PCR específica para *H. capsulatum* y el subsecuente análisis informático de las secuencias obtenidas por BLASTn que confirmó una alta homología genética entre los aislados y cepas del estudio. Así, se confirmó que los aislados y cepas seleccionados son perfectamente aptos para este tipo de investigación.

Cabe destacar que la presencia de una lectina en la superficie del morfotipo virulento de *H. capsulatum* adquiere mayor importancia al considerar la posible actividad biológica de esta molécula en condiciones de la progresión de la enfermedad en el huésped infectado. Pérez-Torres *et al.* (2010) han propuesto que la interacción de la lectina expuesta en la superficie de levadura de *H. capsulatum* puede conducir *in vivo* a la aglutinación de eritrocitos de pacientes que desarrollan coagulopatías generalizada, durante una histoplasmosis diseminada. En un hallazgo al azar, se observó que levaduras de *H. capsulatum* se encontraban adheridas a eritrocitos de murciélagos, posiblemente, iniciando un proceso de aglutinación de éstos (Fig. 5, donada por Taylor ML), aunque no se puede generalizar que este hecho sea frecuente en murciélagos. Por lo que, se propone que la lectina de *H. capsulatum* podría desempeñar un papel de cofactor para la formación de coágulos que pueden estar asociados a la patogénesis de la histoplasmosis. Entre los hallazgos aportados por esta tesis a la ya descrita actividad hemaglutinante de la lectina de levaduras de *H. capsulatum* que reconoce β -galactosa, destaca el que ésta puede ser una molécula evolutivamente conservada ya que su presencia fue detectada en un mayor número de aislados y cepas, independientemente del huésped, del tipo de muestra y de la filogeografía del hongo. Otro hecho relevante del estudio fue el haber constatado que las levaduras y sus fracciones obtenidas de aislados fúngicos procedentes de diferentes especies de murciélagos naturalmente infectados, presentaron actividad

hemaglutinante a pesar de una relación estrecha de miles de años entre el huésped silvestre murciélago y el patógeno *H. capsulatum*, ha permitido un posible proceso co-evolutivo entre ambos.

Es importante aclarar que para evitar riesgo de trabajo, previo a los ensayos con levaduras de *H. capsulatum*, éstas fueron tratadas con timerosal, el cual inhibió su crecimiento sin alterar la actividad hemaglutinante de las mismas, lo que sugiere que ni el timerosal *per se* ni las levaduras muertas alteraron la lectina del hongo.

Algunos de los ensayos de hemaglutinación con levaduras de los aislados y cepas de esta tesis se realizaron con eritrocitos de humano del grupo “O” y con eritrocitos de conejo, siendo que las UHA, en muchos casos, fueron más altas para los eritrocitos de conejo. Este hecho, puede deberse a una mayor cantidad de galactosa expuesta en la membrana de los eritrocitos de conejo a diferencia de los eritrocitos de humano, según lo referido por Honma *et al.* (1981). Por tal motivo, para los ensayos subsecuentes de inhibición de la actividad hemaglutinante utilizando levaduras tratadas con los anómeros de galactosa, sólo se emplearon eritrocitos de conejo, los cuales presentaron los mayores valores de concentraciones mínimas inhibitorias con el anómero β -galactosa (Tabla 5). El reconocimiento para este anómero en modelos fúngicos no es exclusivo de *H. capsulatum* ya que ha sido descrito en otros hongos micromicetos como son varias especies del género *Fusarium* (Bhari *et al.* 2016).

De los ensayos de inhibición de la hemaglutinación para determinar la especificidad de la lectina de las levaduras de *H. capsulatum*, al utilizar levaduras tratadas con galactosa, se identificó que los aislados de murciélagos EH-315 y EH-378 así como la cepa clínica de referencia Downs presentaron afinidad para los anómeros α - y β -galactosa, lo que indica que la lectina de estos aislados y de la cepa Downs reconoce al OH axial del C4 de la galactosa y, además, sugiere que la posición del hidroxilo anomérico de la galactosa no es relevante para esta interacción, ya que indistintamente reconoce a la α - y β -galactosa. Este hecho no puede asociarse al origen de aislamiento, a la procedencia o a la relación filogenética de estos aislados y de la cepa Downs. En el futuro, sería interesante revisar otros factores que pudieran explicar estos resultados, como el tiempo de generación en

cultivo, ya que en cultivos de larga duración las levaduras podrían modificar la expresión de moléculas de *H. capsulatum*.

Un hecho interesante en *H. capsulatum* es la expresión del gen *YPS3* que codifica una proteína de 20 kDa, específica de la fase L del hongo, denominada Yps3p (Keath y Abidi 1994; Keath *et al.* 1989), la cual ha sido localizada en la pared celular de la levadura del hongo. La Yps3p tiene actividad tipo lectina por su habilidad de unirse a quitina (Bohse y Woods 2005; 2007; Weaver *et al.* 1996). Además, tiene la característica de solubilizarse en el medio de cultivo (Bohse y Woods 2005), hecho compartido con la lectina con afinidad para los anómeros de galactosa descrita en esta tesis. Por esta razón, la Yps3p fue utilizada en los ensayos de SDS-PAGE del presente estudio como referencia de otra lectina asociada al hongo.

Los ensayos SDS-PAGE, mostraron que las fracciones F2 generadas de los aislados EH-53 y EH-374 presentaron un perfil electroforético más abundante que las F1. La mayor concentración de proteínas en F2 era de esperarse, ya que esta fracción procede del sonificado de las levaduras cultivadas, las cuales al ser rotas por sonicación liberaron moléculas de su pared y de su contenido celular. Esto no ocurre con F1, cuyas moléculas proteicas del hongo fueron, paulatinamente, excretadas al medio sintético de cultivo.

Por otro lado, en los SDS-PAGEs con las fracciones FR y FNR obtenidas por cromatografía de afinidad en estroma de eritrocitos humano a partir de F1 y F2, no se observaron los perfiles proteicos de los dos aislados utilizados en estos ensayos. Aunque las fracciones FR y FNR fueron ajustadas en sus respectivas concentraciones de proteínas previo a la electroforesis, este resultado se repitió en al menos seis ensayos consecutivos. Sin embargo, llama la atención que las fracciones FRs de F1 y F2, desarrollaron actividad hemaglutinante. Esto sugiere que la prueba de hemaglutinación tiene muy alta sensibilidad para detectar la lectina presente en las FRs de cada uno de los aislados probados, sea en los componentes fúngicos solubilizados en el medio de cultivo (F1) como en el material sonificado de las levaduras (F2).

CONCLUSIONES

- 1) La detección de la lectina en levaduras de *H. capsulatum* fue independiente del huésped de origen (murciélago o humano), de la muestra clínica (órgano de aislamiento) y de la procedencia geográfica del aislamiento fúngico.
- 2) Las levaduras de los 10 aislados y cepas de *H. capsulatum* propuestos para el estudio hemaglutinaron eritrocitos de humano y de conejo, independientemente de la especie filogenética a que pertenecen, lo que apoya la presencia de una lectina en la superficie de levaduras del hongo y que ésta puede ser una molécula conservada evolutivamente.
- 3) La concentración de la lectina en las levaduras de *H. capsulatum* varió según los aislados y cepas, como lo demuestran los diferentes valores de UHA.
- 4) Los ensayos de inhibición de hemaglutinación con levaduras de los 10 aislados y cepas de *H. capsulatum* confirmaron la afinidad de la lectina por la galactosa, particularmente por el anómero β -galactosa, corroborando los hallazgos reportados previamente.
- 5) La purificación de la lectina por matriz de estroma de eritrocitos humanos mostró por ensayos de hemaglutinación la presencia de la lectina tanto en la fracción concentrada del sobrenadante del cultivo de levaduras como en la fracción soluble de levaduras sonicadas.
- 6) La detección de la lectina en la fracción concentrada del sobrenadante del cultivo de levaduras sugiere que ésta es capaz de solubilizarse en el medio.
- 7) Los hallazgos mencionados apoyan que la lectina de levaduras de *H. capsulatum*, por su constancia, especificidad y actividad hemaglutinante podría jugar un papel importante en el destino de la relación huésped-parásito en la histoplasmosis.

PERSPECTIVAS

Mejorar el rendimiento en los procesos de purificación de la lectina de *H. capsulatum*.

Confirmar la especificidad de la lectina purificada por secuencias de oligosacáridos.

Eluir la lectina de *H. capsulatum* del perfil de SDS-PAGE de las fracciones FRs de F1 y F2 y probarla en ensayos de hemaglutinación a la par con la Yps3p, determinando sus respectivas actividades específicas.

Identificar isoformas de la lectina de *H. capsulatum* por electroforesis en dos dimensiones.

Caracterizar la lectina de *H. capsulatum* por espectrometría de masas.

Localizar la lectina de *H. capsulatum* en la estructura celular de la levadura y asociar su papel biológico en la levadura misma así como en el huésped infectado.

Asociar la actividad hemaglutinante de la lectina, presente en cada aislado de *H. capsulatum* estudiado, como un factor adicional de virulencia del hongo, discriminando aislados clínicos y de murciélagos.

REFERENCIAS

[Aikens CM](#). 1983. *Late-Quaternary Environments of the United States*. Wright HE (ed.). University of Minnesota Press, Minneapolis.

[Altschul SF](#), Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10, 1990.

[Anderson H](#), Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuk C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. Histoplasmosis cluster, golf course. *Canada Emerg Infect Dis* 12:163-5, 2006.

[Aravalli RN](#), Hu S, Woods J, Lokensgard JR. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *J Neuroinflammation* 5:1-7, 2008.

[Azuma I](#), Kanetsuna F, Tanaka Y, Yamamura Y, Carbonell LM. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopath Mycol Appl* 54:111-25, 1974.

[Ban M](#), Yoon HJ, Demirkan E, Utsumi S, Mikami B, Yagi F. Structural basis of a fungal galectin from *Agrocybe cylindracea* for recognizing sialoconjugate. *J Mol Biol* 351:695-706, 2005.

[Barr K](#), Laine RA, Lester RL. Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23:5589-96, 1984.

- [Barr K](#), Lester RL. Occurrence of novel antigenic phosphoinositol-containing sphingolipids in the pathogenic yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23:5581-8, 1984.
- [Bhari R](#), Bhawanpreet K, Singh RS. Lectin activity in micelial extracts of *Fusarium* species. *Braz J Microbiol* 47:775-80, 2016.
- [Bialek R](#), Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 40:1644-7, 2002.
- [Bohse ML](#), Woods JP. Surface localization of the Yps3p protein of *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell* 4:685-93, 2005.
- [Bohse ML](#), Woods JP. Expression and interstrain variability of the *YPS3* gene of *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell* 6:609-15, 2007.
- [Bubnick M](#), Smulian AG. The *MAT1* locus of *Histoplasma capsulatum* is responsive in a mating type-specific manner. *Eukaryot Cell* 6:616-21, 2007.
- [Calanni LM](#), Pérez R, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, Negroni R, Finkelievich J, Canteros CE: Brote de histoplasmosis en la Provincia de Neuquén, Patagonia Argentina. *Rev Iberoam Micol* 3:193-9, 2013.
- [Carrizo ME](#), Perduca M, Irazoqui FJ, Nores GA, Monaco HL. The anti-neoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimerichydroxyl. *J Biol Chem* 280:10614-23, 2005.

da Silva LCN, Correia MTS. Plants lectins and toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol* 5:1-3, 2014.

Domer JE. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol* 107:870-7, 1971.

Duarte Escalante E, Zenteno E, Taylor ML. Interaction of *Histoplasma capsulatum* yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. *Arch Med Res* 34:176-83, 2003.

Dubois MKA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28:350-6, 1956.

Durkin MM, Connolly PA, Karimi K, Wheat E, Schnizlein-Bick C, Allen SD, Alves K, Tewari RP, Keath E. Pathogenic differences between North American and Latin American strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in experimentally infected mice. *J Clin Microbiol* 42: 4370-3, 2004.

Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 4:411-21, 1991.

Eissenberg LG, Goldman WE. The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. *Clin Infect Dis* 1:265-83, 1994.

Fujihashi M, Peapus DH, Kamiya N, Nagata Y, Miki K. Crystal structure of fucose specific lectin from *Aleuria aurantia* binding ligands at three of its five sugar recognition sites. *Biochemistry* 42:11093-9, 2003.

Gallegos B, Martínez R, Pérez L, Pina MS, Pérez E, Hernández P. Lectins in human pathogenic fungi. *Rev Iberoam Micol* 31:72-5, 2014.

Gómez AM, Rhodes JC, Deepe Jr GS. Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. *Infect Immun* 59:330-6, 1991.

González-González AE, Aliouat CM, Denis T, Carreto-Binaghi LE, Ramirez JA, Rodriguez-Arellanes G, Demancge C, Chabé M, Aliouat EM, Dei-Cas E. An *Hcp 100* gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. *Epidemiol Infect* 140: 1955-63, 2012.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 12:454-500, 1999.

Honma K, Manabe H, Tomita M, Hamada A. Isolation and partial structural characterization of macroglycolipid from rabbit erythrocyte membranes. *J. Biochem* 90:1187-96, 1981.

Hoog GS, Guarro G. 1995. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn and Delft, The Netherlands/Universitat Rovira i Virgili, Reus.

Jimenez-Lucho V, Ginsburg V, Howard CK. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal β 1-4Glc β 1-lCer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect Immun* 7:2085-90, 1990.

Kanetsuna F. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia* 19:275-86, 1981.

[Kanetsuna F](#), Carbonell LM, Gil F, Azuma I. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath Mycol Appl* 54:1-13, 1974.

[Kasuga T](#), White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negrori R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12:3383–401, 2003.

[Keath EJ](#), Abidi FE. Molecular cloning and sequence analysis of yps-3, a yeast-phase-specific gene in the dimorphic fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Microbiology* 140:759-67, 1994.

[Keath EJ](#), Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect Immun* 57:1384–90, 1989.

[Kügler S](#), Schurtz-Sebghati T, Eissenberg LG, Goldman WE. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *PNAS* 97:8794-8, 2000.

[Kwon-Chung KJ](#). Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 175:326, 1972a.

[Kwon-Chung KJ](#). *Emmonsiiella capsulata*: perfect state of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 177: 368-9, 1972b.

[Kwon-Chung KJ](#), Bennett JE. 1992. Histoplasmosis. En: *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 305-41.

[Laemmli UK](#). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5, 1970.

Lam SK, Bun NT. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:45-55, 2011.

Lara Lemus R, Alvarado Vásquez N, Zenteno E, Gorocica P. Effect of *Histoplasma capsulatum* glucans on host innate immunity. *Rev Iberoam Micol* 31:76-80, 2014.

Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol* 1:487-94, 2003.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75, 1951.

Maestre-Reyna M, Diderrich R, Veelders MS, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Mösch H-U, Essen L-O. Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *PNAS* 109(42):16864-9, 2012.

Maresca B, Kobayashi GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol Rev* 53:186-209, 1989.

Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*. *J Biol Chem* 282:15700-8, 2007.

McMahon JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin II WJ. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J Clin Invest* 96:1010-7, 1995.

[Mendes-Giannini MJ](#); Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VE, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38 Suppl 1:113-23, 2000.

[Morgan GS](#). Fossil bats (Mammalia: Chiroptera) from the late Pleistocene and Holocene vertebrate fauna, Indian river county, Florida. *Brimleyana* 11:97–117, 1985.

[Morgan GS](#), Ridgway RB. Late Pliocene (late Blancan) vertebrates from the St. Petersburg times site, Pinellas county, Florida, with a brief review of Florida Blancan faunas. *Paleontology* 1:1–22, 1987.

[Nemecek JC](#), Wüthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312:583-8, 2006.

[Paaventhana P](#), Joseph JS, Voon Seow S, Vaday S, Robinson H, Yan Chua K, Kolatkar PR. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J Mol Biol* 332:461-70, 2003.

[Pérez-Torres A](#), Zenteno E, Taylor ML. Pathogenic role of hemagglutination induced by *Histoplasma capsulatum* in human and animals. *LABORAT-acta* 22:5-8, 2010.

[Pohleven J](#), Renko M, Magister S, Smith DF, Künzler M, Strukelj B, Turk D, Kos J, Sabotic J. Bivalent carbohydrate binding is required for biological activity of *Clitocybe nebularis* lectin (CNL), the N,N'-diacetyllactosamine (GalNAc β 1-4GlcNAc, LacdiNAc)-specific lectin from basidiomycete *C. nebularis*. *J Biol Chem* 287:10602-12, 2012.

Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. PNAS 104:1366-70, 2007.

Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. Identification of histoplasmosis infection source from two captive maras (*Dolichotis patagonum*) of the same colony by using molecular and immunologic assays. Rev Argent Microbiol 41(2):102-4, 2009.

Rodríguez-Arellanes G, Nascimento de Sousa C, de Medeiros-Muniz M, Ramírez JA, Pizzini CV, de Abreu-Almeida M, Evangelista de Oliveira MM, Fusco-Almeida AM, Vite-Garín T, Pitangui NS, Estrada-Bárceñas DA, González-González AE, Mendes-Giannini MJS, Zancopé-Oliveira RM, Taylor ML. Frequency and genetic diversity of the *MAT1* locus of *Histoplasma capsulatum* isolates in Mexico and Brazil. Eukaryot Cell 12:1033-8, 2013.

Rosas-Rosas A, Juan-Sallés C, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Garner MM. Disseminated *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection in a captive mara (*Dolichotis patagonum*). Vet Rec 155(14):426-8, 2004.

Russell AL, Medellín RA, McCracken GF. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). Mol Ecol 14:2207-22, 2005.

Sahaza JH, Pérez-Torres A, Zenteno E, Taylor ML. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. CIMID 37:143-52, 2014.

Sepúlveda VE, Williams CL, Goldman WE. Comparison of phylogenetically distinct *Histoplasma* strains reveals evolutionarily divergent virulence strategies. mBio 5(4):e01376-14, 2014.

Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belangér C, de Medeiros AL, Kashima S, Marleau S, Covas DT, Bozza PT, Faccioli LH. *Histoplasma capsulatum* cell wall β -glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 182:4025-35, 2009.

Taylor ML, Chávez-Tapia C.B, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *Am J Trop Med Hyg* 61:914-9, 1999a.

Taylor ML, Duarte-Escalante E, Pérez A, Zenteno E, Toriello C. *Histoplasma capsulatum* yeast cells attach and agglutinate human erythrocytes. *Med Mycol* 42:287-92, 2004.

Taylor ML, Duarte Escalante E, Reyes Montes MR, Elizondo N, Maldonado G, Zenteno E. Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol* 113:423-8, 1998.

Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing: it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:351-6, 2003.

Taylor ML, Hernández García L, Estrada-Bárceñas D, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García de la Cruz S, Galvão-Dias M.A, Curiel-Quesada E, Canteros C.E, Bojórquez-Torres G.; Bogard-Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol* 116:308-17, 2012.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. 1999b. *Catálogo de cepas de Histoplasma capsulatum*. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

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

Teixeira M de M, Patané JSL, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, Engelthaler DM, Zancopé-Oliveira RM, Felipe MSS, Barker BM. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6):e0004732, 2016.

Tewari RP, Kugel HI. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathol Mycol Appl* 44:231-40, 1971.

Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis. En: Ajello L, Hay RJ (eds.). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology*, Arnold and Oxford University Press, Inc., New York, pp. 373-407.

Tronchin G, Esnault K, Sanchez M, Larcher G, Agnes M-L, Bouchara J-P. Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 70:6891-5, 2002.

Vázquez L, Masso F, Rosas P, Montaña LF, Zenteno E. Purification and characterization of a lectin from *Macrobachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda) hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 105B:617-23, 1993.

Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas D, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular

analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. *Rev Iberoam Micol* 31:11-15, 2014.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *A guide with abstracts of microplate applications*. Dynatech Europe Laboratories Inc, London, pp. 35-41.

Weaver CH, Kathleen CF, Sheehan KCF, Keath EJ. Localization of a yeast-phase-specific gene product to the cell wall in *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 64:3048–54, 1996.

Tabla 1. Datos generales de los aislados y cepas de *H. capsulatum* seleccionados para el estudio

Aislado y cepa	Huésped	Muestra clínica	Procedencia geográfica País/Estado	Clasificación filogenética
EH-46 ¹	Humano	Hígado	México/GR	LAm A*
EH-53 ¹	Humano	Sangre	México/HG	LAm A*
EH-315 ¹	<i>Mormoops megalophylla</i>	Intestino	México/GR	Nuevo Clado** (NAm 3)***
EH-374 ¹	<i>Artibeus hirsutus</i>	Bazo	México/MS	LAm A*
EH-378 ¹	<i>Artibeus hirsutus</i>	Pulmón	México/MS	LAm A*
EH-672H ¹	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Hígado	México/HG	Linaje EH-672B/EH-672H***
EH-696P ¹	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pulmón	México/NL	Nuevo linaje** (Linaje H153/EH-696P)***
G-186B ² (referencia)	Humano	ND	Panamá/PA	Linaje G-184A/G-186A/G-186B*
G-217B ² (referencia)	Humano	ND	US/LO	NAm 2*
Downs ² (referencia)	Humano	Vagina	US/IL	NAm 1*

¹Aislados registrados en la WDCM ([LIH-UNAM WDCM817](#)) y ²Cepas de referencia depositadas en el ATCC: G-217B (ATCC-26032) y Downs (ATCC-38904), ambas de US; G-186B (ATCC-26030) de Panamá. Clasificación filogenética de *H. capsulatum*, según *Kasuga *et al.* (2003). **Vite-Garín *et al.* (2014) y ***Taylor ML, comunicación personal. US= Estados Unidos de América; HG= Hidalgo; IL=Illinois; Hongos; LO=Louisiana; MS= Morelos; NL= Nuevo León; PA= Panamá; LAm A= grupo A de Latino América; NAm 3= Clase 3 Norte América; NAm 2= Clase 2 Norte América; NAm 1= Clase 1 Norte América; ND= No determinado.

Tabla 2. Datos fenotípicos y genotípicos que apoyan la caracterización de los aislados y cepas de *H. capsulatum* seleccionados para el estudio

Aislado y cepa	Dimorfismo ¹	ELISA ¹	DL50% ¹ Número de levaduras X 10 ⁵ /ml	Idiomorfos de <i>MAT1</i> ¹	PCR de Hcp100 ²
EH-46	M→L	1:2560	16	MAT1-2 (-/ α)	+
EH-53	M→L	1:640	472	MAT1-2 (-/ α)	+
EH-315	M→L	1:2560	3	MAT1-1 (+/a)	+
EH-374	M→L	ND	>1000	MAT1-2 (-/ α)	+
EH-378	M→L	ND	231	MAT1-2 (-/ α)	+
EH-672H	M→L	ND	>1000	MAT1-2 (-/ α)	+
EH-696P	M→L	ND	ND	MAT1-1 (+/a)	+
G-186B	M→L	ND	167	MAT1-2 (-/ α)*	+
G-217B	M→L	ND	34.3	MAT1-1 (+/ a)	+
Downs	M→L	1:1280	>1000	MAT1-2 (-/ α)	+

Marcadores ¹fenotípicos y ²genotípicos de *H. capsulatum* considerados para el estudio (detalles en Materiales y Métodos). El locus *MAT1* está representado por sus idiomorfos, en paréntesis se expresan los signos correspondientes a la compatibilidad sexual de cada idiomorfo. *El idiomorfo MAT1-2 de la cepa silvestre G-186B fue identificado en la mutante G-186AR, según lo descrito por Bubnick y Smulian (2007). + = Obtención del producto de 210 pb procedente de la amplificación del marcador molecular Hcp100. ND= No determinada. M → L= Transición dimórfica de fase micelial a levaduriforme.

Tabla 3. Estandarización de la hemaglutinación de eritrocitos con levaduras de *H. capsulatum*

Aislado y cepa	Huésped	D.O.*		
		1 5 x 10 ⁷ lev/ml	2 1 x 10 ⁸ lev/ml	3 2 x 10 ⁸ lev/ml
		UHA	UHA	UHA
EH-46	Humano	0	0	2
EH-53	Humano	0	0	2 UHA
EH-315	Murciélago	2 UHA	4 UHA	16 UHA

*Se utilizaron diferentes densidades ópticas (D.O.) que correspondieron a las concentraciones de levaduras especificadas en la tabla. Los ensayos se realizaron con eritrocitos humano al 2% y se procesaron aislados de distintos orígenes. UHA= Unidades de hemaglutinación.

Tabla 4. Resultados de la hemaglutinación de eritrocitos de humano y conejo con levaduras de *H. capsulatum*

Aislado y cepa	Eritrocitos	
	Humano	Conejo
	UHA	UHA
EH-46	2	2
EH-53	2	4
EH-315	8	16
EH-374	32	32
EH-378	4	4
EH-672H	4	4
EH-696P	2	2
G-186B	2	2
G-217B	8	8
Downs	4	16
Testigo de hemaglutinación (hemolinfa de camarón)	128	256
Testigo de no hemaglutinación (PBS)	0	0

Se ajustaron las levaduras a 3 D.O. y los eritrocitos al 2%. UHA= Unidades de hemaglutinación.

Tabla 5. Resultados de la inhibición de la actividad hemaglutinante de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con α y β -galactosa

Aislado y cepa	Huésped	Concentración mínima inhibitoria de α -gal (mM)	Concentración mínima inhibitoria de β -gal (mM)
EH-46	Humano	1.562	200
EH-53	Humano	200	50
EH-315	Murciélago	1.562	1.562
EH-374	Murciélago	200	100
EH-378	Murciélago	1.562	1.562
EH-672H	Murciélago	200	50
EH-696P	Murciélago	200	1.562
G-186B	Humano	200	200
G-217B	Humano	200	50
Downs	Humano	1.562	1.562
Testigo de inhibición (EH-374)	Murciélago	200	100

Se ajustaron las levaduras a 3 D.O., los eritrocitos de conejo al 2% y la concentración inicial de cada anómero a 200 mM (ver detalles en Materiales y Métodos). La inhibición está expresada por la concentración mínima del anómero requerida para inhibir 4 UHA. Como testigo de no inhibición se utilizaron levaduras del aislado EH-374 no tratadas con α - y β -galactosa, los cuales en este ensayo generaron 16 UHA.

Tabla 6. Determinación de proteínas y carbohidratos de los sobrenadantes del cultivo (F1) y del sonicado (F2) de las levaduras de *H. capsulatum* estudiadas

Aislado y cepa	F1		F2	
	Proteínas mg/ml	Carbohidratos mg/ml	Proteínas mg/ml	Carbohidratos mg/ml
EH-46	0.06	0.457	0.335	0.475
EH-53	0.374	0.983	0.562	0.402
EH-315	1.765	0.573	0.845	0.398
EH-374	0.299	0.292	0.215	0.595
EH-378	1.363	0.430	0.703	0.390
EH-672H	1.303	0.530	1.255	0.331
EH-696P	0.382	0.260	0.240	0.310
G-186B	0.277	0.391	0.482	0.390
G-217B	1.303	0.530	0.469	0.356
Downs	0.268	0.687	0.302	0.428

La determinación de proteínas y carbohidratos se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951) y Dubois *et al.* (1956), respectivamente.

Tabla 7. Determinación de proteínas de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad en matriz de estroma de eritrocitos

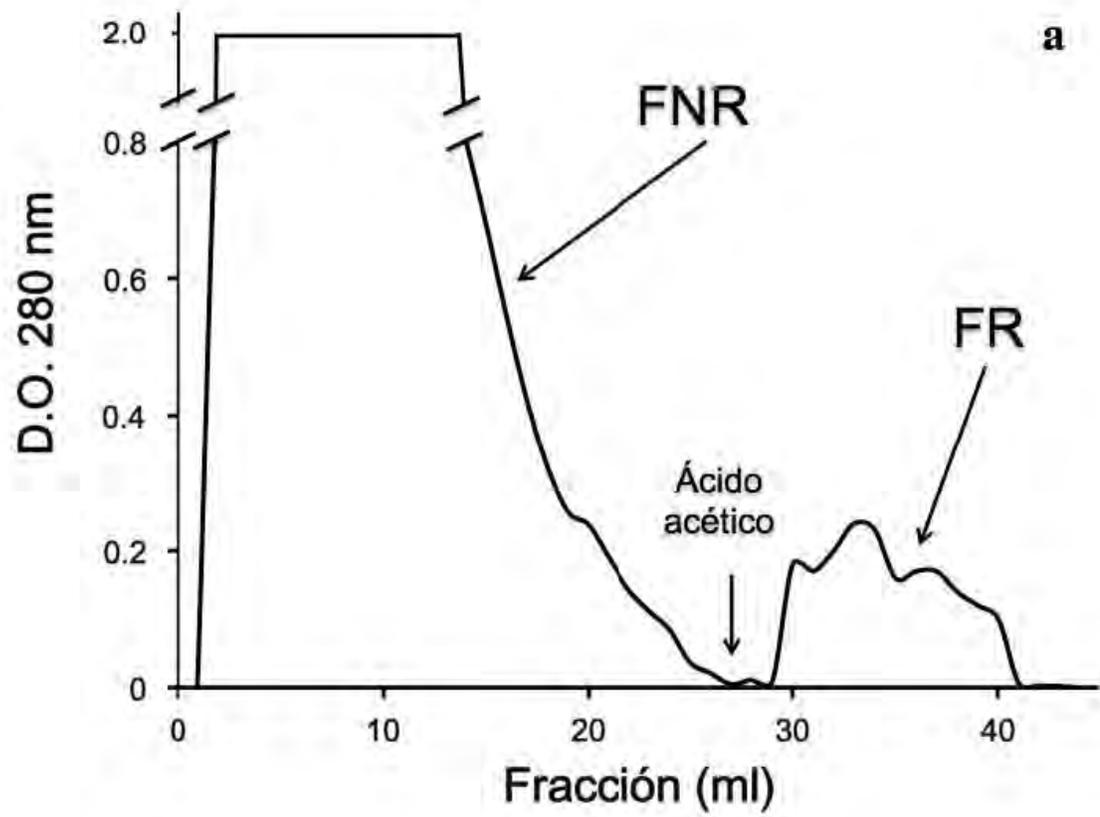
Aislado y cepa	FR/FNR de F1			FR/FNR de F2		
	Proteínas mg/ml			Proteínas mg/ml		
	Original	FR	FNR	Original	FR	FNR
EH-53	0.374	0.04	0.280	0.562	0.08	0.156
EH-374	0.299	0.02	0.182	0.215	0.06	0.13

F1 y F2 y sus respectivas FR y FNR, fueron obtenidas sólo de las levaduras de dos aislados de *H. capsulatum*. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951). F1: fracción del sobrenadante del cultivo de levaduras; F2: fracción del sobrenadante del sonicado de levaduras; FR: fracción retenida / FNR: fracción no retenida de la cromatografía de afinidad.

Tabla 8. Resultados de la hemaglutinación de eritrocitos de humano y de conejo, utilizando las fracciones retenidas y no retenidas de la cromatografía de afinidad de F1 o F2, en matriz de estroma de eritrocitos humanos

Aislado y cepa	Fracción	Eritrocitos	
		Humano	Conejo
		UHA	UHA
EH-53	FR/F1	8	4
	FNR/F1	0	0
	FR/F2	4	4
	FNR/F2	0	0
EH-374	FR/F1	4	4
	FNR/F1	0	0
	FR/F2	4	2
	FNR/F2	0	0
Testigo de hemaglutinación (hemolinfa de camarón)		128	256
Testigo de no hemaglutinación (PBS)		0	0

Se ajustaron las levaduras a 3 D.O. y los eritrocitos de humano o conejo al 2%. F1: fracción concentrada del sobrenadante del cultivo de levaduras; F2: fracción soluble de levaduras sonicadas; FR: fracción retenida; FNR: fracción no retenida; UHA= Unidades de hemaglutinación; PBS: amortiguador salino de fosfato.



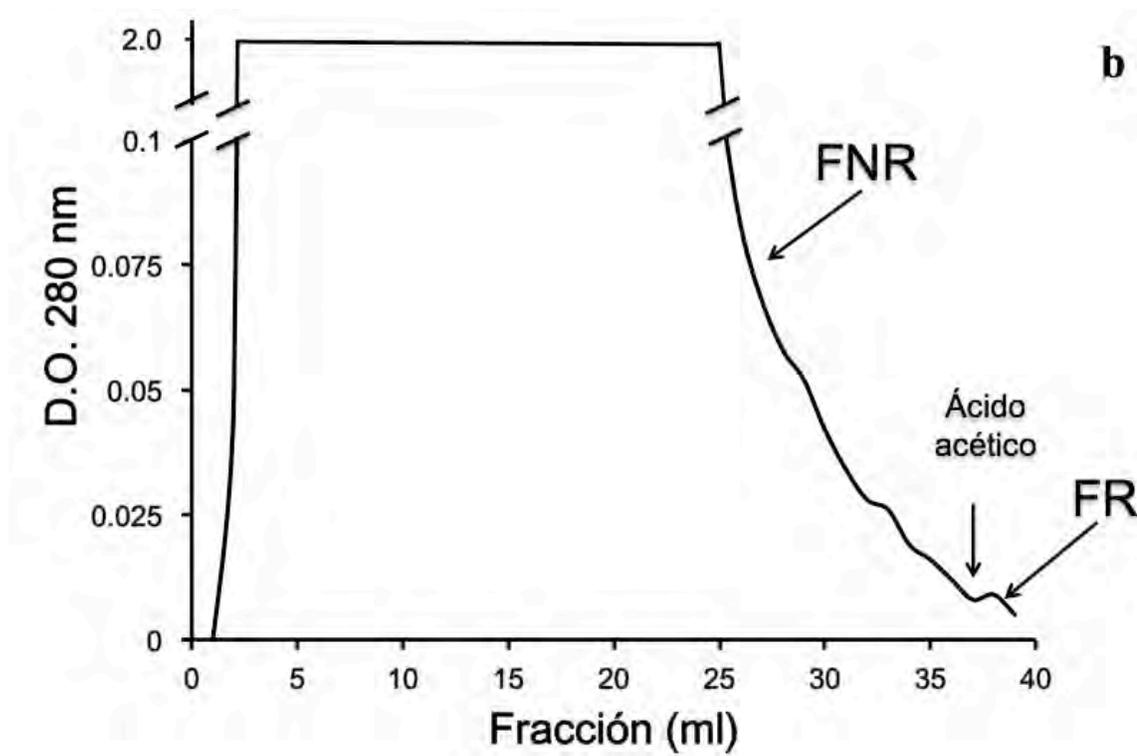
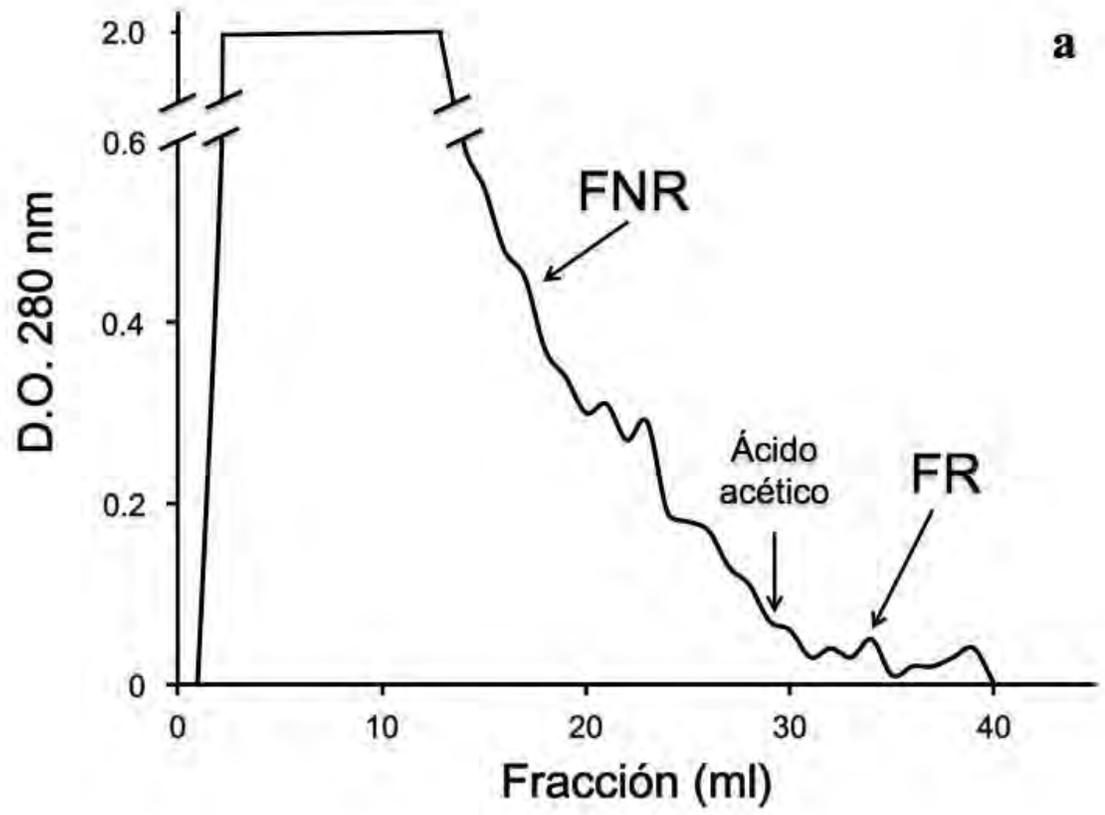


Figura 1. Purificación de la lectina por afinidad a estroma de eritrocitos humano, a partir de las fracciones solubles obtenidas de levaduras del aislado EH-53 de *H. capsulatum*. **a)** Fracción soluble del sobrenadante del cultivo (F1); **b)** Fracción soluble del sonicated (F2). La molécula de lectina unida a la matriz de estroma de eritrocitos fue eluída de la columna con ácido acético (ver detalles en Materiales y Métodos).



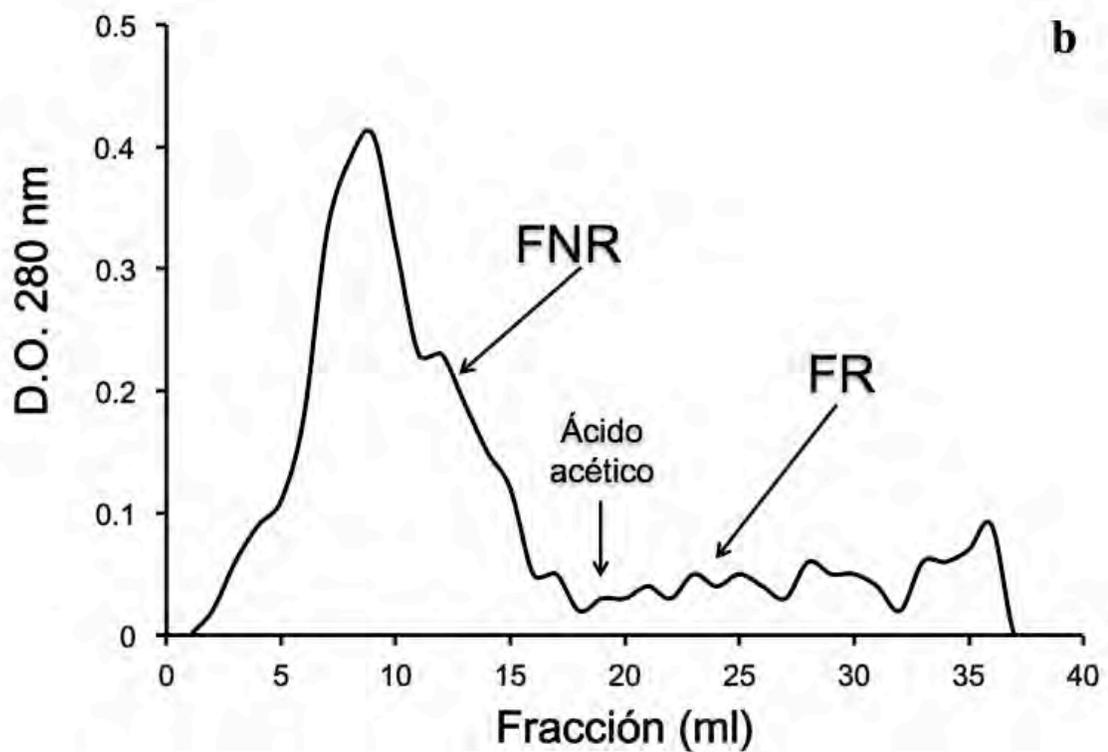


Figura 2. Purificación de la lectina por afinidad a estroma de eritrocitos humano, a partir de las fracciones solubles obtenidas de levaduras del aislado EH-374 de *H. capsulatum*. **a)** Fracción soluble del sobrenadante del cultivo (F1); **b)** Fracción soluble del sonificado (F2). La molécula de lectina unida a la matriz de estroma de eritrocitos fue eluída de la columna con ácido acético (ver detalles en Materiales y Métodos).

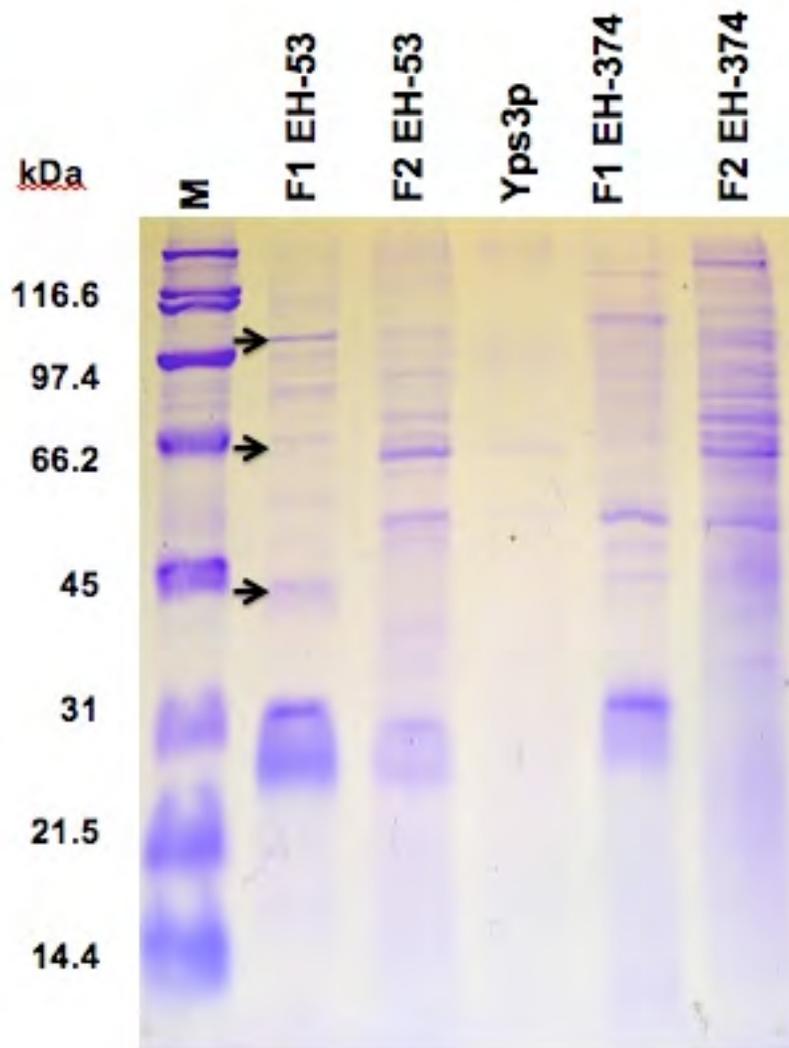


Figura 3. SDS-PAGE de los aislados EH-53 y EH-374 de *H. capsulatum*. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y utilizando poliacrilamida al 12.5 %; fue teñido con azul de Coomassie (ver detalles en Materiales y Métodos). M: Marcador de peso molecular; F1: fracción concentrada del sobrenadante del cultivo de levaduras; F2: fracción soluble de levaduras sonicadas; FR: fracción retenida en la columna de estroma de eritrocitos humano; FNR: fracción no retenida en la columna; Yps3p: proteína clonada de aproximadamente 20 kDa del aislado EH-53 (donada por Quesada C. y González-González E). Las flechas indican las bandas de 45, 66.2 y 97.4 kDa.

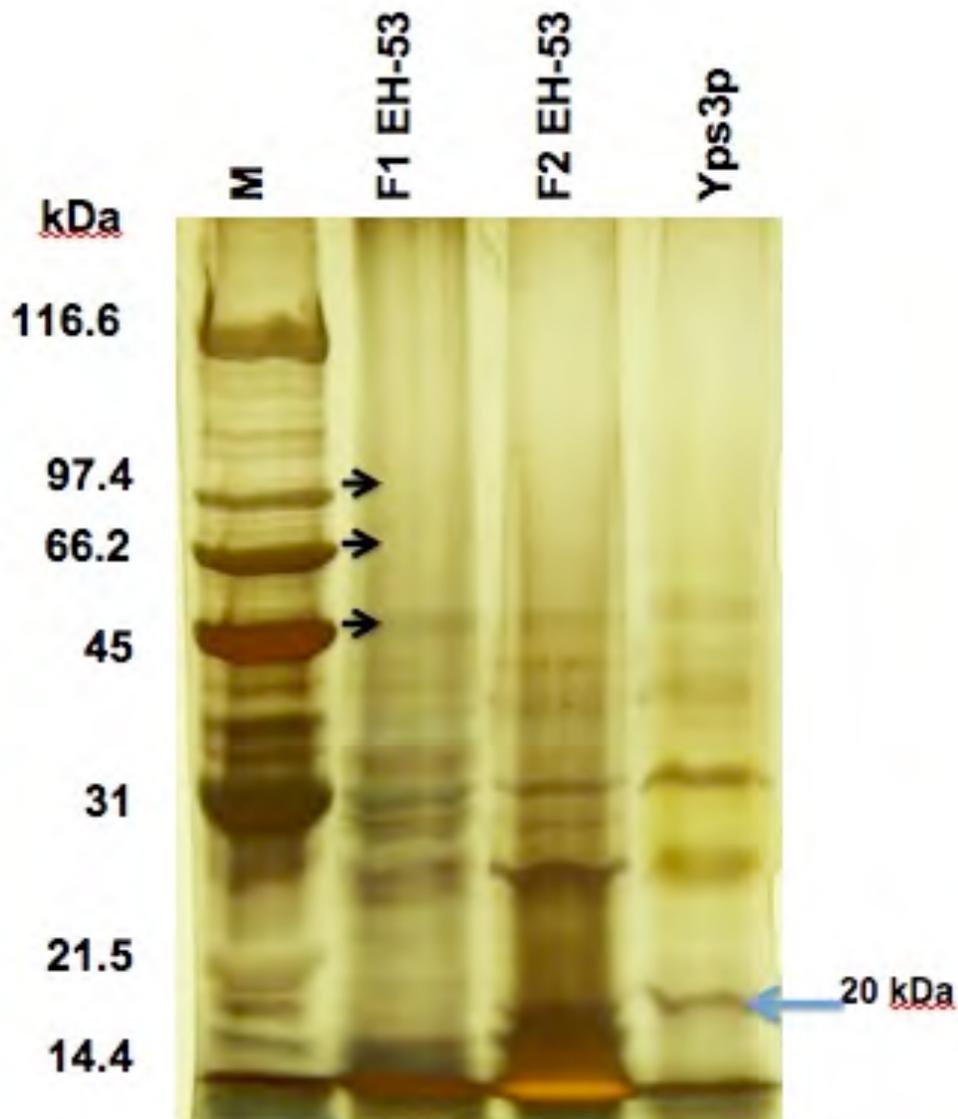


Figura 4. SDS-PAGE del aislado EH-53 de *H. capsulatum*. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y utilizando poliacrilamida al 12.5 %; fue teñido con plata (ver detalles en Materiales y Métodos). M: Marcador de peso molecular; F1: fracción concentrada del sobrenadante del cultivo de levaduras; F2: fracción soluble de levaduras sonicadas; Yps3p: proteína de 20 kDa del aislado EH-53. Las flechas indican las bandas de 20, 45, 66.2 y 97.4 kDa.

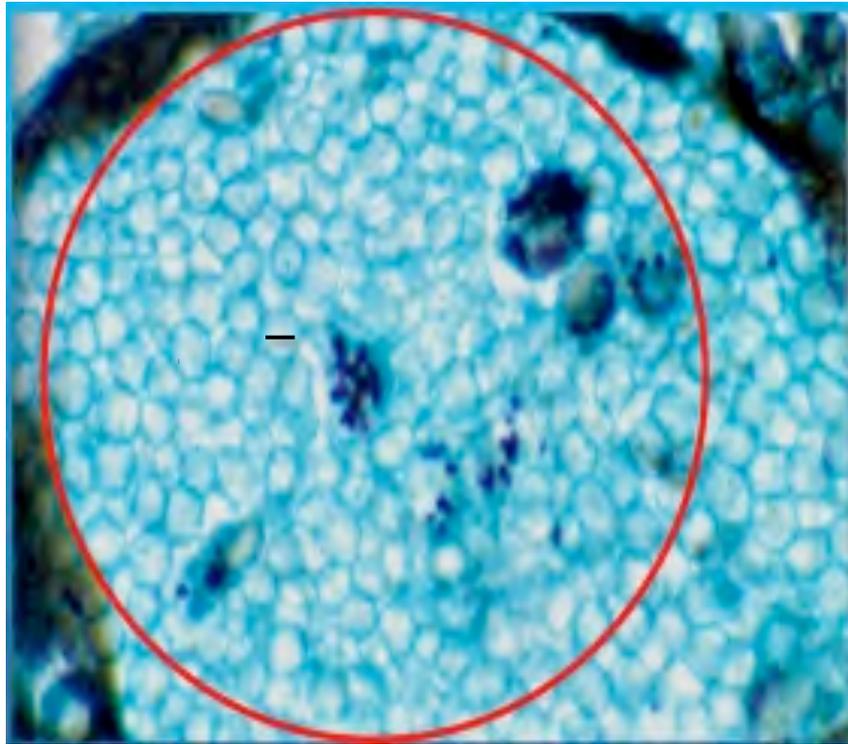


Figura 5. Corte de vaso sanguíneo de un murciélago naturalmente infectado con *H. capsulatum*. Se observan levaduras adheridas a los eritrocitos del murciélago. Para las levaduras se utilizó la tinción de Grocott, plata-metenamina; el corte fue contrateñido con verde luz. Barra= 7 μm (foto gentilmente proporcionada por Taylor ML).