

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

8
2es.

“ESTUDIO DEL DESPLAZAMIENTO DE CEPAS MEXICANAS DE *Histoplasma capsulatum* EN LA NATURALEZA, POR IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL DNA GENÓMICO”

26.000

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (MICROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A BIOL. JOSE JAVIER FLORES ESTRADA

DIRECTOR DE TESIS: Dra. MARIA LUCIA TAYLOR da CUNHA e MELLO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

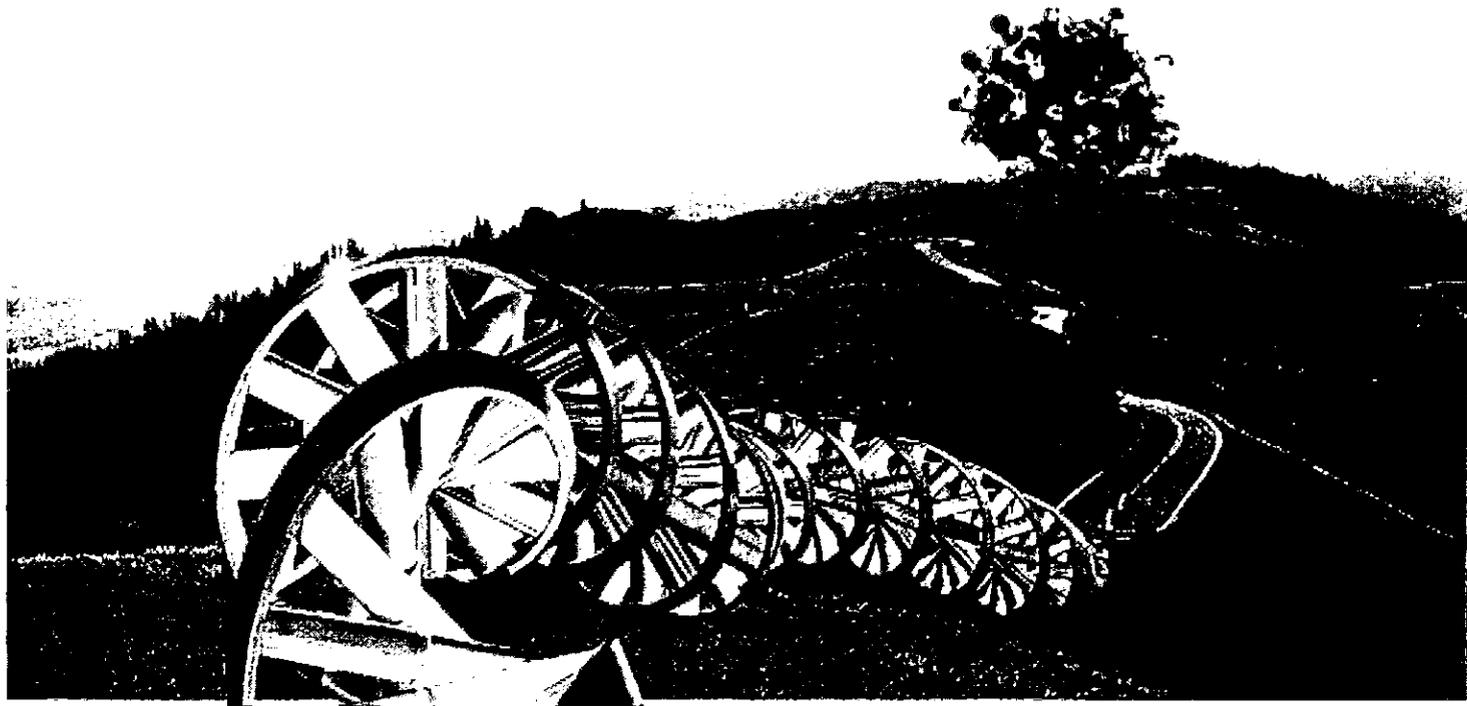


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Con todo cariño

Para mi amada esposa

SONIA

A quien dedico este trabajo

Agradecimientos (por orden de aparición)

A mi amigo y maestro Carlos Luna que por su insistencia y apoyo incondicional me abrió el camino hacia La investigación..

A mi padrino memo que por su amistad y sus sinceras palabras me ha encausado a ser persistente en el logro de mis metas.

A la Dra. Maria Lucia Taylor, que a pesar de sus gritos y regaños, no dejó de confiar en mí, a quien también debo gran parte de mi escala de vida académica y a la que admiro por su inteligencia.

A la Dra. Rocio Reyes por su paciencia y asesoramiento.

A mis compañeros del laboratorio Rocio, Espe, Gabi Rodríguez, Chalia, Aniceto, Eugenia, Ali y Gabi Peña quienes además de brindarme su amistad incondicional, cada uno de ellos aportaron un granito de arena para la culminación de la presente investigación.

A los Doctores: Conchita Toriello, Roberto Tovar, Catalina Chávex y Everardo Curiel, a quienes por sus sabias críticas, finalicé mi trabajo de investigación.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por la concesión de las becas 93689 CONACYT y IN203197-DGAPA, durante la realización de mi tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) por haber proporcionado apoyo técnico para la obtención del material biológico.

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, a través de los proyectos 101PM-CONACYT y IN203197-DGAPA, UNAM, bajo las responsabilidades de las Dras. M. R. Reyes-Montes y M. L. Taylor, respectivamente.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología de Hongos, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, que agradezco por haberme proporcionado la infraestructura y su equipo de investigación.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

COASESORA DE TESIS

Dra. María del Rocío Reyes Montes

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
OBJETIVOS GENERALES	10
OBJETIVOS PARTICULARES	11
HIPÓTESIS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Áreas de estudio	13
Captura de murciélagos	13
Colecta de guano	14
Aislamiento del hongo <i>H. capsulatum</i> de murciélagos infectados	14
Aislamiento del hongo <i>H. capsulatum</i> de guano de murciélago	14
Identificación de <i>H. capsulatum</i>	15
Extracción del DNA de <i>H. capsulatum</i>	16
Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR)	17
Análisis de imagen de los perfiles del RAPD-PCR	18
Análisis de relacionamiento por SSPS/PC+	18

RESULTADOS	19
Captura de murciélagos	19
Colecta de guano	19
Aislamiento y caracterización de <i>H. capsulatum</i> a partir de murciélagos infectados	20
Aislamiento y caracterización de <i>H. capsulatum</i> a partir de guano	21
RAPD-PCR	21
Análisis de los patrones polimórficos de los DNAs procesados por RAPD-PCR	22
DISCUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Aislamiento en México de <i>H. capsulatum</i> de la naturaleza (suelo con excretas)	34
Tabla 2 (parte I). Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> en murciélagos capturados en diferentes áreas geográficas	35
Tabla 2 (parte II). Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> en murciélagos capturados en diferentes áreas geográficas	36
Tabla 3 (parte I). Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> estudiados	37
Tabla 3 (parte II). Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> estudiados (cepas de referencia)	38
Tabla 4. Datos de murciélagos infectados con <i>H. capsulatum</i> capturados en México	39
Tabla 5. Aislamiento e identificación de <i>H. capsulatum</i> de murciélagos infectados en México	40
Tabla 6. Matriz de los perfiles de los DNAs obtenidos por RAPD-PCR de las cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiadas	41
Figura 1. Áreas geográficas de los sitios de captura de murciélagos y colecta de excreta de ave y murciélago en México	42
Figura 2. Morfología de <i>H. capsulatum</i>	43

Figura 3. Exoantígenos de los aislados de <i>H. capsulatum</i>	44
Figura 4. Determinación de la concentración del DNA genómico de distintas cepas de <i>H. capsulatum</i>	45
Figura 5. RAPD-PCR de cepas de <i>H. capsulatum</i> aisladas de murciélago infectados	46
Figura 6. RAPD-PCR de cepas de <i>H. capsulatum</i> aisladas de distintas fuentes y orígenes geográficos	47
Figura 7. Dendrograma de relacionamiento entre las cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiadas	48
Figura 8. Mapa general de los perfiles del RAPD-PCR de todas las cepas de <i>H. capsulatum</i> estudiadas	49

RESUMEN

Histoplasma capsulatum, hongo dimórfico, es el agente causal de la histoplasmosis. Su hábitat natural está relacionado con sitios donde se encuentran excretas de aves y murciélagos. Las técnicas moleculares han permitido ordenar los aislamientos del hongo en 6 clases que agrupan cepas de distintas fuentes y regiones de América. Entre éstas se incluyen métodos como la amplificación al azar del polimorfismo del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) que presenta alta sensibilidad para la tipificación de cepas. En México, no hay una información sobre la distribución de *H. capsulatum* en la naturaleza, por lo que este trabajo contribuye a la epidemiología molecular de la enfermedad, al estudiar aislamientos de *H. capsulatum* con el fin de relacionar la fuente y el origen geográfico de ellos. Se analizaron los patrones del polimorfismo del DNA de cepas de *H. capsulatum* aisladas de órganos de varios murciélagos: *Mormoops megalophylla*, *Natalus stramineus*, *Artibeus hirsutus* y *Leptonycteris nivalis*, capturados en los estados de Guerrero y Morelos. Se incluyeron en el análisis cepas aisladas de casos clínicos, así como de excreta de murciélago (guano) y de aves, colectadas en México y Guatemala. Para el RAPD-PCR, se utilizó el oligonucleótido 1281 (5'-AACGCGCAAC) referido para *H. capsulatum*. Los resultados mostraron seis bandas principales de 3.6, 2.7, 2.3, 2.15, 1.35 y 1.0 kb, en la mayoría de las cepas aisladas de murciélagos infectados y de pacientes humanos. Por el análisis de imagen de las bandas de los patrones polimórficos de DNA, se formaron 3 grupos de cepas, según los porcentajes de relacionamiento entre ellas. El grupo I incluyó a seis aislamientos clínicos, tres de México y tres de Guatemala, así como a dos cepas aisladas de excretas de aves en Guatemala. El grupo II incluyó tres subgrupos: el IIa con ocho cepas aisladas de murciélagos infectados capturados en Morelos; el IIb con una cepa aislada de guano de murciélago colectado en el estado de Sinaloa; y el IIc con cuatro aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos de murciélagos infectados, tres capturados en Morelos y uno en Guerrero. El grupo III incluyó a tres cepas, una aislada de guano de murciélago colectado en Sinaloa y dos aisladas de la naturaleza en Guerrero (excreta de gallo y guano de murciélago). Por la estrecha correlación observada entre los patrones del RAPD-PCR de los aislamientos de *H. capsulatum* estudiados, se puede proponer este método como una herramienta útil para la tipificación de cepas del hongo a partir de diferentes fuentes y orígenes geográficos en la naturaleza.

ABSTRACT

The natural habitat of *Histoplasma capsulatum*, a dimorphic fungus which is the causative agent of the respiratory mycosis, histoplasmosis, is associated to bat guano and bird droppings. Molecular techniques have classified the *H. capsulatum* isolates in 6 different classes, grouping them according to their sources and geographic origins, in America. Among these techniques, the method of RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA based on Polimerase Chain Reaction) is considered due to its high sensitivity for typing strains. In Mexico, the information about *H. capsulatum* spreading in nature is unknown. Therefore, the present study was aimed to identify *H. capsulatum* isolated from naturally infected bats, in order to contribute to molecular epidemiology of histoplasmosis, in the country. The analysis of the DNA polymorphic patterns of the fungus *Histoplasma capsulatum* isolated from guts, lungs, and spleens of the bat specimens: *Mormoops megalophylla*, *Natalus stramineus*, *Artibeus hirsutus*, and *Leptonycteris nivalis* captured in the states of Guerrero and Morelos, Mexico, was performed. Strains isolated from histoplasmosis clinical cases, as well as from bat guano and bird excreta, from Mexico and Guatemala, were also processed. DNA polymorphisms were evaluated by RAPD-PCR using the 1281 primer (5'-AACGCGCAAC) referred for *H. capsulatum*. Results showed six major bands of 3.6, 2.7, 2.3, 2.15, 1.35, and 1.0 kb that are shared by most *H. capsulatum* isolates from bats and humans. Three groups were formed by DNA polymorphisms image analysis according to their relatedness percentage: Group I included six human clinical *H. capsulatum* isolates, three from Mexico and three from Guatemala, as well as two strains isolated from bird excreta from Guatemala. Group II with three subgroups: subgroup IIa was formed by eight *H. capsulatum* strains isolated from infected bats captured in the State of Morelos; subgroup IIb with one isolate from bat guano collected in the State of Sinaloa; and subgroup IIc contained four *H. capsulatum* isolates from infected bats, three captured in Morelos and one in Guerrero. Group III included three *H. capsulatum* strains, one isolated from bat guano collected in Sinaloa, and two isolated from cock excreta and bat guano collected in Guerrero. A tight correlation among the DNA polymorphic patterns of the *H. capsulatum* isolates studied by RAPD-PCR was observed, which could be proposed as a useful tool for typing *H. capsulatum* strains from different sources and geographic origins, in nature.

INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis es una micosis sistémica cuyo compromiso, en el humano, es principalmente pulmonar. Es causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Darling, 1906), parásito intracelular facultativo que induce lesiones granulomatosas en el hospedero, en las que la reacción tisular se caracteriza por el predominio de macrófagos en la respuesta inflamatoria, acompañado por la presencia de linfocitos (1-5).

En la histoplasmosis se reconocen principalmente dos fases: 1) infección primaria de tipo asintomático o sintomático; 2) enfermedad evolutiva o diseminada con dos tipos clínicos, el agudo y el crónico. La mayoría de las veces se adquiere la infección en forma subclínica, por lo que se incluye en el tipo asintomático. Los casos sintomáticos presentan las formas clínicas: leve, que simula un ataque gripal, con malestar general; moderada, que toma un aspecto de neumonía atípica con fiebre, hallazgos radiológicos acentuados y serología positiva intensa; y grave, que se presenta con fiebre y está caracterizada por una serología positiva muy alta, lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas con una imagen radiológica sumamente peculiar semejante a la de una infección hematógena producida por *Mycobacterium tuberculosis* (6-9).

Se ha determinado que el agente etiológico de esta enfermedad requiere de condiciones ambientales óptimas para su desarrollo (10-12). En México, se encuentra principalmente circunscrito a cavernas, minas, túneles y casas abandonadas donde existe guano de murciélagos o excretas de aves que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo y que junto con las condiciones del suelo, humedad y temperatura, conforman el nicho ecológico de este microorganismo (13-17). En este ambiente natural se desarrolla la fase micelial o infectante del hongo y las esporas típicas de esta fase, macroconidios redondos de 8 a 4 μm de diámetro (caracterizados por proyecciones digitiformes) y principalmente microconidios ovalados de 2 a 4 μm así como pequeños fragmentos de hifas, contenidos en aerosoles, son capaces de penetrar por vía respiratoria, a los individuos que visitan los lugares contaminados, adquiriendo así la histoplasmosis. Las esporas al ser inhaladas se convierten dentro de los macrófagos alveolares en la fase parasitaria o virulenta del hongo, las levaduras de 2 a 4 μm de diámetro que se reproducen por gemación, principalmente en el interior de los fagocitos del hospedero y permitiendo el establecimiento de la infección (1, 2, 4, 5, 18).

La histoplasmosis es una micosis de gran importancia en el mundo y posiblemente la de mayor trascendencia en el continente americano. En nuestro país, no es una enfermedad rara, ya que con frecuencia se infectan individuos tales como mineros, campesinos recolectores de guano, peones limpiadores de minas, excursionistas, antropólogos, geólogos, quienes ignorando los riesgos de infección penetran a espacios donde se refugian murciélagos y que constituyen el hábitat del hongo (19-21).

Los datos sobre la prevalencia y la realidad del panorama epidemiológico de la histoplasmosis en el país están rezagados, dispersos y poco difundidos. A partir de 1988 empezaron los registros oficiales por parte del organismo de difusión epidemiológica de la secretaría de salud (S.S.), la Dirección General de Epidemiología (DGE), donde hasta 1994 se reportaron 1065 casos de histoplasmosis en todo el país (22). Los informes sobre la histoplasmosis en México se refieren fundamentalmente a la forma epidémica y los casos reportados por la DGE son básicamente brotes. Es necesario señalar que la histoplasmosis endémica ha sido poco caracterizada y estudiada en el país. La falta de datos más concisos de la histoplasmosis en México se debe a un diagnóstico inadecuado, por insuficiencia de información médica especializada y por el desconocimiento de los datos actuales sobre las áreas endémicas del país donde existen posiblemente casos mal diagnosticados. Un estudio retrospectivo sobre la epidemiología de la enfermedad y su posible prevalencia actual fue recién elaborado por Martínez-Rivera *et al.* (22).

Teniendo en cuenta la frecuencia de casos nuevos no oficialmente registrados y considerando, además, la gravedad del cuadro pulmonar, sobre todo en sujetos con condiciones de mala nutrición, generalmente asociada a clases sociales bajas, así como, en estados de inmunosupresión del hospedero, es de fundamental importancia conocer la verdadera distribución y epidemiología de la enfermedad en los estados del país, particularmente en aquéllos con actividad minera así como en aquéllos con gran número de cuevas y grutas, donde se encuentran murciélagos, con el objeto de prevenir el riesgo de los individuos que por el tipo de actividad laboral a la que se dedican, están más expuestos al agente etiológico de la histoplasmosis.

Histoplasma capsulatum ha sido aislado de varias cuevas de los Estados Unidos de América (12, 23-25), donde se encuentran murciélagos que emigran hacia o desde México (26), asimismo de hábitats naturales en México, como se muestra en los aislamientos referidos en la tabla 1 (13,

15, 16, 27). Los murciélagos son algunos de los especímenes de mamíferos que están típicamente infectados. Estudios experimentales con estos animales, usando la especie *Artibeus lituratus*, han mostrado que ellos desarrollan la respuesta inmune humoral y celular, determinada la primera por la producción de anticuerpos precipitantes y fijadores del complemento; mientras que la respuesta celular se manifestó entre 2 a 3 semanas, lo que permitió utilizarla como indicador de una histoplasmosis activa (28, 29, 30, 31). Kunz (32) en 1988, presenta un estudio donde integra todos los datos reportados de aislamiento de *H. capsulatum* a partir de murciélagos infectados, entre 1970 y 1981. Fernández-Andreu (33) y Taylor *et al.* (16), reportan nuevos registros de la infección en murciélagos. El primer autor refiere la infección de *Macrotus waterhousii minor* en Cuba y el último refiere tres aislamientos de *H. capsulatum* de murciélagos insectívoros, identificados como *Myotis californicus*, *Mormoops megalophylla* y *Pteronotus parnellii*. Las infecciones de *M. californicus* y *M. megalophylla* son consideradas como el primer registro en el mundo, mientras que la infección en *P. parnellii* es un nuevo registro para México. En la tabla 2 se mencionan todos los murciélagos reportados con infección por *H. capsulatum* en el mundo, con base en los autores antes referidos (16, 32, 33).

México alberga 134 especies de murciélagos, según los estudios de Arita en 1993 (34). De estas especies el 45% presentan hábitos cavernícolas (34). Es posible que estos ambientes propicien el desarrollo de *H. capsulatum* facilitando la proliferación de algunas cepas que, en particular, pudieran permanecer en el ambiente por fases de infección sucesivas en animales que cohabitan en cuevas, entre ellos los murciélagos, los cuales podrían desplazar a corta, mediana y larga distancia el hongo, distribuyéndolo en el medio ambiente, funcionando así como dispersores naturales de este patógeno, como lo ha sugerido Hoff y Bigler en 1981 (31).

El aislamiento de *H. capsulatum* de distintas fuentes y procedencias ha permitido postular diferencias genotípicas, que se reflejan en cambios fenotípicos, detectados en la morfología, fisiología y virulencia de las cepas. Estas diferencias genotípicas aportan datos para relacionar los aislamientos del hongo y proceden de estudios acorde con metodologías moleculares, como Southern blot con sondas específicas, análisis de los perfiles polimórficos de fragmentos de DNA obtenidos por enzimas de restricción (RFLP) o de amplificación al azar de DNA polimórfico por el método de reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Lo anterior ha permitido la tipificación de DNA de diferentes cepas de *H. capsulatum* estudiadas en los EUA, que ha sido

utilizada en diferentes aplicaciones. Una de ellas, es la obtención y promoción de un sistema rápido de clasificación molecular de los aislamientos de *H. capsulatum*, lo que hace posible establecer diferencias locales y regionales en cepas, como parte de los estudios epidemiológicos detallados (35-40).

Con base en el polimorfismo genético del DNA mitocondrial (mtDNA) obtenido por tratamiento con enzimas de restricción, Vincent *et al.* (35) han clasificado 23 aislamientos de *H. capsulatum* tanto de origen humano como de animal, los cuales han sido distribuidos en tres clases: Clase 1- Formada por una cepa denominada "Downs", que es considerada de baja virulencia y sensible a la temperatura acorde con su descripción inicial (41); Clase 2- Contiene 14 cepas de Norteamérica y dos cepas de *H. capsulatum* var. *duboisii* de África; Clase 3- Contiene 6 cepas del Centro y Sudamérica.

Spitzer *et al.* (36), utilizando también el polimorfismo del mtDNA y del DNA ribosomal (rDNA) desarrollaron un mejor procedimiento para la clasificación de aislamientos ambientales y clínicos de *H. capsulatum*. Las cepas fueron inicialmente agrupadas según el polimorfismo de mtDNA por RFLP e hibridación (Southern) con sondas de mtDNA clonados. Los autores observaron que la mayoría de los aislamientos clínicos y de suelo de los EUA presentaron patrones idénticos de mtDNA ubicándolos dentro de la clase 2 de Vincent *et al.* (35); mientras que las cepas de origen clínico "Downs" y la G186B de Panamá fueron colocadas en las clases 1 y 3, respectivamente. Otra cepa aislada de suelo en Florida conformó una nueva clase 4. El polimorfismo del rDNA definió dos bandas, una de 3.3 y otra de 1.1 kb, consideradas como las "huellas" de reconocimiento de la mayoría de los aislados de *H. capsulatum* estudiados, siendo constantes en los aislamientos de origen clínico y de suelo, de ahí que el uso de ambos DNAs en la tipificación de cepas, fue sugerido por los autores, para resolver problemas epidemiológicos de infección por *H. capsulatum*.

En otro estudio, Spitzer *et al.* (37) según el análisis de los perfiles establecidos por RFLPs del mtDNA, del rDNA y del gen *yps-3*, el cual es un gen específico asociado a la virulencia de la fase de levaduriforme del hongo, encontraron que los aislamientos de *H. capsulatum* provenientes de pacientes con histoplasmosis diseminada asociada a SIDA, en el área de St. Louis, Mo., EUA, se relacionaban con los patrones genéticos descritos para la cepa de baja virulencia "Downs" (41), incluyéndolos en la clase 1 de Vincent *et al.* (35); mientras que los aislamientos clínicos

procedentes de pacientes no asociados a SIDA fueron incluidos en la clase 2.

Keath *et al.* en 1992 (38), propusieron un nuevo sistema para la tipificación de *H. capsulatum* con base en el análisis del RFLP del locus del gen nuclear *yps-3*, este sistema fue adicionado de una subtipificación con una sonda de mtDNA. Este análisis permitió que 76 aislamientos clínicos y de suelo de *H. capsulatum*, la mayoría de los EUA, se agruparan en 6 clases distintas, con la particularidad de que la clase 5 presentó cuatro subclases.

Recientemente, Woods *et al.* (39) y Kersulyte *et al.* (40) han usado el método con iniciadores (oligonucleótidos) arbitrarios, llamado amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Con este método ellos pudieron seleccionar oligonucleótidos que permitieron agrupar cepas semejantes de *H. capsulatum* y obtener resultados reproducibles y alta sensibilidad. Además, por esta metodología, fue posible distinguir diferencias entre los aislamientos de *H. capsulatum* pertenecientes a una misma clase, lo que refleja que *H. capsulatum* tiene más variabilidad genética de lo que se había demostrado por RFLP.

Reyes-Montes *et al.* (42) realizaron, por el método del RAPD-PCR, un estudio molecular de cepas de *H. capsulatum* aisladas en México de pacientes con histoplasmosis asociada o no a SIDA, comparando sus patrones polimórficos con cepas aisladas de pacientes procedentes de Centro y Sudamérica, así como con las cepas de referencia de Panamá (G186B) y de EUA (G217B y "Downs"); se incluyó en el estudio cepas aisladas en México, de la naturaleza, a partir de excretas de gallo, guano de murciélago y murciélago infectado. Sus resultados permitieron agrupar a las cepas en cuatro grupos: El grupo I se formó por la mayoría de las cepas aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA, por cepas aisladas de pacientes mexicanos con histoplasmosis no asociada a SIDA, y por las cepas de pacientes procedentes de Colombia, Guatemala y EUA ("Downs"); este grupo se subdividió en dos subgrupos, el Ia con seis cepas de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a SIDA además de la cepa del paciente colombiano, y el Ib con las cepas de dos pacientes mexicanos y uno guatemalteco con histoplasmosis no asociada a SIDA, además de la cepa "Downs" aislada en EUA. El grupo II sólo incluyó la cepa G186B de Panamá. El grupo III incluyó a las cepas aisladas de excretas de gallo y guano de murciélago en Guerrero, además de una cepa de paciente mexicano con histoplasmosis asociada a SIDA. Finalmente, el grupo IV incluyó solamente una cepa aislada de murciélago infectado. La comparación de los grupos formados con los aislamientos de *H. capsulatum*,

obtenidos por RAPD-PCR, demostró una identidad entre cepas de áreas geográficas relativamente cercanas, explicable por el posible desplazamiento de éstas en la naturaleza, permitiendo establecer patrones geográficos de tipificación molecular de este hongo, en el país.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro país se encuentra en una posición de puente geográfico, ocupando el límite extremo del continente norteamericano y colindando al sur con países centroamericanos. Los ambientes favorables para el desarrollo de *H. capsulatum*, en los EUA, han permitido el predominio de un tipo de cepas aisladas de casos clínicos y de suelo clasificadas en la clase 2; las cepas estudiadas con los métodos moleculares aisladas de Centroamérica proceden fundamentalmente de Panamá y a la fecha han sido clasificadas dentro de la clase 3, según Vincent *et al.* (35). México y Guatemala ocupan posiciones geográficas extremas entre Norte y Centroamérica y presentan condiciones ambientales apropiadas para la presencia de especies de murciélagos migratorios; como consecuencia del uso de cuevas y de ambientes cerrados como refugios para estos animales se favorece la acumulación de guano, el cual funciona como fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo *H. capsulatum*, aunado a condiciones óptimas de humedad y temperatura. Por los hallazgos de aislamiento de *H. capsulatum* en murciélagos infectados y en guano, se plantea que su distribución está relacionada con el desplazamiento de murciélagos hacia los distintos sitios de refugio, actuando estos animales como uno de los posibles reservorios y diseminadores del hongo en la naturaleza. Se desconocen las características moleculares de las cepas aisladas de la naturaleza, en México y Guatemala, y menos se sabe de los aislamientos obtenidos de murciélagos infectados. Partiendo de estos hechos, en el presente trabajo, se propone aportar criterios moleculares que permitan relacionar cepas del hongo aisladas de la naturaleza con distintas regiones geográficas del país, determinar el posible origen de sus aislamientos y obtener evidencias del desplazamiento del hongo *H. capsulatum* en la naturaleza, relacionándolo con el desplazamiento de murciélagos. Para la caracterización molecular de las cepas se usará el método de RAPD-PCR que permite establecer patrones moleculares repetitivos lo que permitiría trazar una ruta de desplazamiento geográfico de las cepas de *H. capsulatum* en el territorio nacional y contribuir así a un mejor entendimiento de la epidemiología molecular de la histoplasmosis.

OBJETIVOS GENERALES

- Identificar las especies de murciélagos que presentan infección o de cuyo guano el hongo ha sido aislado y registrar sus hábitos alimenticios y migratorios.
- Caracterizar biológica y molecularmente las cepas de *H. capsulatum* aisladas en diferentes áreas geográficas de la república.
- Establecer evidencias del desplazamiento de cepas de *H. capsulatum* en la naturaleza con base en el análisis molecular del hongo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Proporcionar material biológico a los diferentes grupos multidisciplinares ya establecidos de histoplasmosis.
- Aislar el hongo a partir del guano y del murciélago infectado e identificarlo por su biología.
- Clasificar al hongo *H. capsulatum* mediante la técnica de amplificación al azar del DNA polimórfico por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).
- Establecer una relación de desplazamiento del hongo en la naturaleza considerando los factores de: tipo de polimorfismo molecular; aislamiento de distintas fuentes y regiones geográficas; y la información de infección en murciélagos con su respectiva actividad migratoria.

HIPÓTESIS

- Los marcadores genéticos dados por el análisis de polimorfismo del DNA de *H. capsulatum* proporcionan datos reproducibles para agrupar cepas de diferentes fuentes y orígenes en la naturaleza.
- Los marcadores genéticos dados por el análisis de polimorfismo del DNA de *H. capsulatum* proporcionan datos reproducibles para identificar posibles desplazamientos de las cepas del hongo en la naturaleza.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREAS DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó con material biológico procedente de tres diferentes estados de la República Mexicana (Guerrero, Morelos y Sinaloa), seleccionados por la disponibilidad técnica de sus respectivas universidades estatales y por el acceso asistido y facilitado a minas y cavernas de sus regiones rurales, además de que éstos estados están ubicados en regiones geográficas donde las condiciones climáticas son favorables para el crecimiento del hongo *H. capsulatum*. Los sitios específicos de captura de murciélagos y colecta de guano fueron: A) En Guerrero: la cueva de "Coapala" en el municipio de Olinalá; B) En Morelos: la mina "El Clarín" en el municipio de Tlaquiltenango y las cuevas "El Salitre" en el municipio de Tlaltizapán y "El Diablo" en el municipio de Tepoztlán; C) En Sinaloa: la cueva "La Cruz" en el municipio de Navolato. Las coordenadas y localizaciones específicas de los municipios son mostrados en la figura 1.

CAPTURA DE MURCIÉLAGOS

Para la determinación de los sitios de muestreo se consideraron los reportes de individuos que referían minas, cavernas u otro tipo de lugares donde existían colonias de murciélagos con cantidades importantes de especímenes. Los murciélagos fueron capturados utilizando redes "mistnet" y red de mano de acuerdo a Kunz y Kurta (43) y Handley (44). La captura se realizó durante la noche a la salida de los refugios o en las primeras horas del día dentro de los mismos. Los especímenes se seleccionaron *in situ*, liberando a las hembras preñadas. Los murciélagos fueron transportados al laboratorio, preferencialmente vivos y los demás fueron colocados en hielo a -70°C . A todos los especímenes capturados se les asignó un número de registro y se anotaron los datos de sexo, medidas somáticas, condición reproductora, peso y edad. El material fue preparado de acuerdo a Handley (44) y enviado a especialistas del Laboratorio de Zoología, Campus-Iztacala, UNAM, para la determinación taxonómica según Hall (45) y Wilson y Reeder (46).

COLECTA DE GUANO

La colecta de guano de murciélago se realizó de preferencia por debajo de las colonias de los especímenes capturados, anotando el sitio de colecta, distancia desde la entrada, profundidad de la toma de muestra del guano y temperatura del suelo. Cada muestra recibió un número de registro donde se anotaron los datos correspondientes. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en frascos estériles, almacenadas en refrigeración por corto tiempo previo el procesamiento para el aislamiento del hongo. Es importante mencionar que para la seguridad personal durante el proceso de captura de murciélagos y colecta de guano se utilizaron mascarillas (INFRA MOD. IV-M-430-G) con cartuchos intercambiables (INFRA MOD. 4C-500-1), batas y gorros desechables, además de guantes de piel.

AISLAMIENTO DEL HONGO *H. capsulatum* DE MURCIÉLAGOS INFECTADOS

Los murciélagos fueron procesados en el laboratorio no más de 1 a 2 días después de la captura, y se siguieron los procedimientos para su determinación taxonómica y preservación para colección. De los órganos internos se tomaron muestras de pulmón, intestino, bazo e hígado en condiciones de esterilidad, los cuales fueron lavados con 5 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2, suplementado con 50-100 µg/ml de estreptomicina y 50-100 U/ml de penicilina (Lakeside, México). Los tejidos fueron macerados y sembrados en cajas de Petri con agar micobiótico (Bioxón, México) y agar-infusión cerebro corazón (agar-BHI) (Bioxón). El medio BHI fue suplementado con 1% de glucosa, 0.1% de L-cisteína, 0.05% de cicloheximida y 0.005% de cloranfenicol. Se prepararon duplicados de cada medio adicionando rosa de Bengala al 0.02% para reducir la contaminación de hongos no patógenos. Se adicionó a todos los medios 1% de factor de crecimiento de *H. capsulatum* (47), preparado en medio líquido sintético (48), para facilitar el desarrollo de las colonias. Todos los medios fueron incubados a 28 y a 37°C.

AISLAMIENTO DEL HONGO *H. capsulatum* DE GUANO DE MURCIÉLAGO

Se mezcló un gramo de muestra de guano con 10 ml de PBS pH 7.2, suplementado con gentamicina (50 µg/ml). Se centrifugó a 300 g por 10 min y se sembró 0.1 ml del sobrenadante en

cajas de Petri con los medios de cultivo previamente referidos, empleando el mismo procedimiento para el aislamiento del hongo a partir de murciélagos infectados. Las muestras de guano fueron preservadas a -70°C previa adición de glicerol al 10%.

IDENTIFICACIÓN DE *H. capsulatum*

Después de 1-6 semanas de incubación de los cultivos de órganos de murciélagos y de los cultivos de guano, las colonias con macromorfología sospechosa de *H. capsulatum* fueron seleccionadas y diluidas en forma seriada, para separar colonias puras. Las cepas procedentes de cultivos puros con morfología colonial similar a la de *H. capsulatum* fueron observadas por microscopía para identificar las características morfológicas microscópicas típicas del hongo.

Una vez realizada la identificación microscópica de *H. capsulatum*, se llevó a cabo la prueba de exoantígenos de Standard y Kaufman (49) revelada con el método de doble inmunodifusión en gel (50). Los antígenos crudos (histoplasminas) fueron preparados y estandarizados como lo describe Taylor *et al.* (16). Se utilizaron como antígenos de referencia las histoplasminas preparadas de aislamientos procedentes de las mismas áreas geográficas de los sitios de captura de los murciélagos o cercanos a ellos, así como de aislamientos de otros países y de otras fuentes ambientales, a saber: 1) de pacientes mexicanos con histoplasmosis, EH-53 (estado de Hidalgo), EH-317 (estado de Morelos) y EH-46 (paciente de origen desconocido); 2) de pacientes guatemaltecos con histoplasmosis, H102W, H.1.12.96, CEPA 3; 3) de cepas aisladas de la naturaleza en Guatemala, L-100-91 y CEPA 2. El suero positivo de referencia fue de un paciente con histoplasmosis activa comprobada y el control negativo de un voluntario sano.

La conversión de la fase micelial a levaduriforme del hongo, se realizó a 37°C en medio líquido sintético (48) con agitación moderada durante 1-2 semanas. Después de la conversión inicial, la fase levadura de cada cepa de *H. capsulatum* fue proliferada a 37°C en medio BHI (Bioxón) suplementado con 1% de glucosa y 0.1% de L-cisteína. Las levaduras fueron cosechadas por centrifugación a 400 g y suspendidas en 1 ml de una mezcla de suero fetal bovino (Gibco, Gran Island Biological Co., N.Y.) y dimetil sulfóxido (9:1), respectivamente. Finalmente, las levaduras fueron almacenadas en criotubos a -173°C.

Para la identificación de la especie *H. capsulatum* var. *capsulatum* se consideraron simultáneamente los criterios de morfología colonial y microscópica, producción de exoantígenos y conversión de micelio a levadura; excluyendo del estudio las cepas que no cumplieron con estos criterios.

EXTRACCIÓN DEL DNA DE *H. capsulatum*

Se siguió los lineamientos generales para obtener del DNA de *H. capsulatum* según Spitzer (51). Se cultivó la fase micelial del hongo en medio GYE (2% de glucosa y 1% de extracto de levadura) a 28°C, con agitación moderada (120 rpm), durante 1-2 semanas hasta alcanzar el crecimiento de fase logarítmica. Se colectó el micelio por filtración en papel filtro normal sobre un embudo Buchner. Antes de la extracción de DNA se hicieron pruebas de IDG con el filtrado, frente a sueros controles positivos y negativos, para descartar contaminación de la masa fúngica y determinar el destino del micelio. El micelio se lavó con 50 ml de amortiguador TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM), transfiriéndolo a un mortero y triturando con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adicionaron 30 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 62.5 mM, SDS 2%) agitándolo moderadamente a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 400 g a 4°C, por 10 min y luego se adicionó 1/4 de volumen de acetato de potasio 8 M al sobrenadante, incubándolo sobre hielo por 45 min para centrifugarlo a 10000 g a 4°C, por 12 minutos. Se filtró el sobrenadante, en papel filtro normal, se adicionó 1/4 de volumen de acetato de amonio 8 M y un volumen igual de isopropanol, para incubarlo toda la noche a -20°C (1-2 h a -70°C). Se centrifugó a 10000 g a 4°C por 12 min, y se resuspendieron los ácidos nucleicos con amortiguador TE a un volumen de 0.5 ml. En seguida se adicionó el volumen necesario de SDS al 10-15% a la suspensión anterior, para ajustarla en SDS al 2%, y se adicionó 0.8 mg/ml de proteinasa K, incubando a 56°C por 30 minutos. La extracción de ácidos nucleicos se realizó dos veces con un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) y 2 o más veces con Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1), hasta obtener transparente la fase acuosa superior. Posteriormente, se adicionó RNAsa a una concentración final de 50 µg/ml, incubando a 37°C por 30 minutos. Se agregó nuevamente el volumen necesario de SDS al 10-15% a la suspensión anterior para ajustarla en SDS al 2% y se adicionaron 0.8 mg/ml de

proteínasa K, incubando a 56°C por 30 minutos. Se realizó nueva extracción con un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) y 2 volúmenes de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1). Posteriormente, se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío para obtener la malla de DNA, recuperando ésta con una punta recortada de una micropipeta de 1 ml, colocando la malla en un tubo de microcentrifuga. Después de centrifugar a 10000 g por 10 min, se lavó la pastilla de DNA con etanol al 70% y se disolvió el DNA en TE. Se determinó la concentración del DNA en espectrofotómetro a 260 nm y en electroforesis en agarosa al 0.8% para demostrar la integridad del DNA aislado (52).

AMPLIFICACIÓN AL AZAR DEL DNA POLIMÓRFICO POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RAPD-PCR)

Se usó el oligonucleótido arbitrario 1281 (5'-AACGCGCAAC) (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor.), que se caracterizó previamente como “específico” para *H. capsulatum* (34, 35). El procedimiento se estandarizó para obtener patrones de bandas definidas que se amplificaran por PCR. La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Para la estandarización se probaron distintas concentraciones del DNA genómico de la cepa EH-53 de *H. capsulatum* (cepa de referencia del Laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM) del oligonucleótido, y otros componentes de la reacción: dNTPs (ATP, GTP, CTP y TTP); Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus); y MgCl₂. Además, se probaron ciclos de temperatura de desnaturalización, alineamiento y síntesis de la cadena. Finalmente, por cada reacción en 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 en un volumen de 20 µl, se estandarizó las óptimas concentraciones de: 2 ng de DNA, 15 pmol del oligonucleótido 1281, 200 µM de dNTPs, una unidad de Taq polimerasa y 2 mM de MgCl₂, a 35 ciclos, cada uno a 94°C por 10 seg, 36°C por 30 seg y 72°C por 1 minuto. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando como estándares de pares de bases (marcadores de pesos molecular) los fagos λ digerido con la enzima HindIII y φX174 con la enzima HaeIII. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con una película instantánea Polaroid 667 de alta velocidad, con luz de baja intensidad en un transiluminador T1202 (Sigma).

ANÁLISIS DE IMAGEN DE LOS PERFILES DEL RAPD-PCR

Los patrones de los fragmentos amplificados de DNAs obtenidos por RAPD-PCR fueron fotografiados para estimar su migración relativa (R_f). Los valores R_f de los fragmentos de DNA fueron tratados como caracteres variables para elaborar una matriz, considerando para la presencia de una banda el valor de 1, mientras que en la posición vacante se asignó el valor de 0; de este modo el valor de los R_f fueron convertidos a una matriz de datos con valores arbitrarios de 1 a 0. Los valores de kilobases (kb) de cada banda de DNA fueron calculados según el procedimiento establecido para metodologías que implican cálculos de migraciones de bandas en geles de agarosa (52).

ANÁLISIS DE RELACIONAMIENTO POR SPSS/PC+

El programa SPSS/PC⁺ versión 2.3 fue utilizado para analizar cada matriz de datos por un método de grupos desbalanceados, usando un promedio de relación (entre grupos) para elaborar los dendrogramas (53).

RESULTADOS

En la tabla 3 parte I se relacionan las cepas estudiadas de *H. capsulatum* aisladas de la naturaleza de distintas fuentes y orígenes geográficos en México, donde se observa que la mayoría de ellas fueron aisladas a partir de murciélagos infectados, capturados en diferentes cuevas del estado de Morelos (EH-365, 366, 370, 372-78 y 383) y en la cueva de “Coapala” en Guerrero (EH-315). Las cepas restantes fueron aisladas de guano de murciélago, en los estados de Guerrero (EH-313) y Sinaloa (EH-360 y EH-385), y de excreta de gallo en Guerrero (EH-314). En la tabla 3 parte II, se mencionan las fuentes y orígenes geográficos de las cepas utilizadas como referencia, aisladas de casos clínicos de pacientes procedentes de México (EH-46, 53 y 317) y de Guatemala (H102W, H.1.12.96, CEPA 3), además de 2 cepas (L-100-91, CEPA 2) aisladas de excreta de zanate, en Guatemala.

CAPTURA DE MURCIÉLAGOS

Un total de 36 murciélagos, correspondientes a 4 especies, con diferencias en sexo, dieta y migración, fueron capturados en las distintas cuevas muestreadas. Siete murciélagos hembras de la especie *Mormoops megalophylla*, insectívoros y no migratorios fueron capturados en la cueva de “Coapala”, Gro.; cinco machos de la especie *Natalus stramineus*, insectívoros y no migratorios, fueron capturados en la mina “El Clarín”, Mor.; nueve especímenes de *Leptonycteris nivalis* (5 machos y 4 hembras), polinívoros/nectarívoros y migratorios, fueron capturados en la cueva “El Diablo” Mor.; y quince murciélagos de la especie *Artibeus hirsutus* (2 machos y 13 hembras), frugívoros y no migratorios fueron capturados en la cueva “El Salitre”, Mor. (Tabla 4). Las localidades geográficas muestreadas en los estados mencionados vienen referidas en materiales y métodos y la ubicación precisa con sus respectivas coordenadas en la figura 1.

COLECTA DE GUANO

Se colectaron 35 muestras de guano en los diferentes sitios de captura de murciélagos, 10 fueron colectadas en Guerrero y 15 en Morelos. De estas últimas, 5 en la mina “El Clarín”, 5 en la

cueva “El Salitre” y 5 en la cueva “El Diablo. En la cueva “La Cruz” en el municipio de Navolato, estado de Sinaloa, se colectaron 10 muestras de guano sin que se lograra la captura de murciélagos. Finalmente, se colectó una muestra de excreta de gallo, proveniente del patio de una casa en Olinalá, Guerrero.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *H. capsulatum* A PARTIR DE MURCIÉLAGOS INFECTADOS

Los aislamientos del hongo fueron caracterizados inicialmente por el desarrollo de la fase micelial en los medios de cultivo, consistente en la presencia de colonias que van de blanco a pardo oscuro, referidas como morfología colonial A las albinas o de color blanco y B las de color pardo oscuro a café (Figura 2a). La identificación microscópica fue confirmada por la presencia de la morfología típica del hongo con la observación de macroconidios con proyecciones digitiformes, un número variable de microconidios e hifas delgadas septadas (Figura 2b). La producción de exoantígenos confirmó la identificación de la especie del hongo aislada a partir de murciélagos infectados, por la observación de líneas de precipitación por el método de la doble inmunodifusión, al enfrentar los exoantígenos de cada aislamiento con suero inmune procedente de un caso de histoplasmosis humana. El antígeno de referencia de la cepa EH-53 confirmó la especie de *H. capsulatum* por la presencia de bandas de identidad con cepas aisladas de murciélagos (Figura 3a y b). La tabla 5 muestra el número asignado a cada aislamiento de *H. capsulatum* obtenido de murciélago, refiriendo las especies y los órganos a partir de los cuales se obtuvieron cultivos positivos; siete aislamientos de tejido pulmonar, cuatro de intestino y uno de bazo (Tabla 5). Las cepas aisladas con números EH-365 y EH-366 mostraron morfología colonial de tipo A, en contraste con las restantes que desarrollaron morfología colonial tipo B. Finalmente, todos los aislamientos convirtieron a levaduras en las condiciones señaladas en materiales y métodos en tres semanas máximo de estimulación del cambio dimórfico.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *H. capsulatum* A PARTIR DE GUANO

De las 35 muestras de guano de murciélago colectadas, se aislaron 3 cepas de *H. capsulatum*. Todas presentaron el tipo de colonia B y las características microscópicas de la especie, además de la producción de exoantígenos (Figura 3b) y conversión a levaduras. La cepa EH-313 fue aislada del guano de murciélagos de la gruta de “Juxtlahuaca”, Gro.; las cepas EH-360 y la EH-385 fueron aisladas en la cueva “La Cruz”, en Navolato, Sinaloa. Estas últimas proceden de muestras colectadas a tres metros de distancia una de la otra y debajo de colonias de murciélagos de la especie *Balantiopteryx plicata* (especie no capturada). Por otra parte, se aisló la cepa EH-314 de excreta de gallo de pelea, proveniente del patio de una casa en Olinalá, Guerrero (Tabla 3 parte I).

RAPD-PCR

Una vez confirmada la identidad de las cepas aisladas de la naturaleza como *H. capsulatum*, se procedió al aislamiento del DNA total de las 24 cepas estudiadas (12 cepas aisladas de murciélagos, 3 de guano, 1 de excreta de gallo, además de las de referencia: 3 de pacientes mexicanos; 3 de guatemaltecos; 2 de excreta de zanate aisladas en Guatemala) (Tabla 3 parte I y II). A cada una se les cuantificó su concentración de DNA, resultando las concentraciones obtenidas de 50-200 $\eta\mu\text{l}$ de DNA, con una considerable limpieza e integridad (Figura 4). Estos DNAs fueron almacenados a -20°C , para su posterior amplificación.

Los DNAs extraídos de cepas de *H. capsulatum* fueron sometidos a la amplificación al azar por PCR (RAPD-PCR), usando el oligonucleótido arbitrario 1281, el producto de la amplificación fue emigrado por electroforesis en gel de agarosa y visualizado por fluorescencia utilizando bromuro de etidio. En la figura 5 se muestran los perfiles polimórficos de las cepas aisladas de murciélagos infectados en México, observándose 2 patrones distintos: El primero se refiere a 8 cepas aisladas en el estado de Morelos con gran similitud entre ellas, provenientes de la cueva “El Salitre” (EH-372-78) y la cueva “El Diablo” (EH-383); el segundo patrón incluye a las cepas EH-365 y EH-366, también aisladas en la cueva “El Salitre” muy similares entre sí, además de las cepas EH-370 aislada en la cueva “El Clarín” en Morelos, y la cepa EH-315 aislada en la cueva de “Coapala” en Guerrero, estas cepas son similares entre sí, pero difieren ligeramente de las anteriores.

En la figura 6 se muestra el polimorfismo entre cepas de *H. capsulatum* aisladas de murciélago (EH-315 y EH-370), guano de murciélago (EH-313, 360 y 385), excreta de ave (EH-314) y cepas de referencia (EH-46, 53, 317, H102W, H.1.12.96, L-100-91, CEPA 2 y CEPA 3). Las cepas aisladas de guano y de excretas de aves son polimórficamente distintas entre sí. Sin embargo, la cepa EH-360 (Sinaloa) comparte mayor similitud con las aisladas de otras fuentes y orígenes geográficos. Los patrones polimórficos de las cepas EH-315 y EH-370 (Figura 6) confirman la estrecha similitud entre ellas y la repetitividad de los experimentos como el ilustrado en la figura 5.

Los resultados de las figuras 5 y 6 permitieron integrar una matriz única (Tabla 6) que dio origen a un dendrograma general de las cepas (Figura 7). El análisis de las figuras 5-7 y de la tabla 6 se expresa en forma completa por la construcción de un mapa general de los patrones detectados para cada cepa, con sus respectivos valores de kb para cada banda de DNA (Figura 8).

ANÁLISIS DE LOS PATRONES POLIMÓRFICOS DE LOS DNA_s PROCESADOS POR RAPD-PCR

Para confirmar la similitud entre cepas de *H. capsulatum* establecidas por el método de RAPD-PCR, los patrones polimórficos fueron sometidos a un análisis de imagen, elaborándose una matriz única de datos (Tabla 6) a fin de relacionar cepas por el programa SPSS/PC⁺ versión 2.3, observadas en el dendrograma de la figura 7. La relación genotípica de los aislamientos de *H. capsulatum* estudiados por la determinación de los patrones polimórficos del DNA a través del método RAPD-PCR, muestran seis principales bandas de 3.6, 2.7, 2.3, 2.15, 1.35 y 1.0 kb, en la mayoría de las cepas estudiadas (Figura 8). Existe entre todas las cepas estudiadas un alto rango de similitud, entre 100 y 75%, por lo que se corrobora a nivel molecular la especie *H. capsulatum*. Con base en el análisis de imagen (Figuras 7 y 8) se sugiere la existencia de tres grandes grupos polimórficos. En el grupo I se encuentran todas las cepas usadas como referencia, aisladas de pacientes de México (EH-46, EH-53 y EH-317) y Guatemala (H102W, H.1.12.96 y CEPA 3), además de las aisladas de excretas de zanate en Guatemala (L-100-91 y CEPA 2), relacionándose las cepas del grupo I en un 90-100%. El grupo II se divide en tres subgrupos: el IIa y IIc agrupan todas las cepas aisladas de murciélagos infectados y capturados en Morelos (EH-365, EH-366, EH-370, EH-372-378 y EH-383) y Guerrero (EH-315), el IIa corresponde a las

cepas EH-372-378 y EH-383 relacionadas entre sí en un 99%, y el IIc corresponde a las cepas EH-365 y EH-366 relacionadas entre sí en un 99% y a las cepas EH-315 y EH-370 que se relacionan en un 97%, siendo que las cepas de este subgrupo se relacionan entre sí en un 87%, finalmente todas las cepas del subgrupo IIc se relacionan con el subgrupo IIa y con el grupo I en un 80%.; El subgrupo IIb contiene sólo a la cepa EH-360, aislada de guano de murciélago en Sinaloa relacionada con los subgrupos anteriores en un 86%. Por último, el grupo III se formó con las cepas EH-314 y EH-313 aisladas en Guerrero de excretas de ave y de murciélago, respectivamente; además de la cepa EH-385 aislada de guano de murciélago en Sinaloa, todas relacionadas entre sí en un 80.8%.

Las cepas aisladas de excretas, colectadas en Guerrero (EH-313 y EH-314) y Sinaloa (EH-360 y EH-385) son polimórficamente distintas; sin embargo la cepa EH-360 aislada de guano de murciélago en Sinaloa, se asemeja más a las cepas del subgrupo IIc (EH-315, EH-370, EH-365 y EH-366) aisladas de murciélagos infectados en Guerrero y Morelos que a la cepa EH-385 aislada de la misma fuente (guano de murciélago) y origen geográfico (cueva "La Cruz", Sinaloa) (Figura 7 y 8). La cepa EH-314 se asemeja en un 82% a la cepa EH-313 y estas dos últimas se asemejan a la EH-385 en un 80% (Figura 7). Se confirma en todos los experimentos la repetitividad del método y del comportamiento de los patrones polimórficos del DNA de *H. capsulatum* como se ha señalado en los resultados de los experimentos de las figuras 5-7.

DISCUSIÓN

Los murciélagos desempeñan un papel relevante como polinizadores, dispersores de semillas de cactus, agaves y otras plantas de diferentes ecosistemas tropicales; ellos participan además como controladores naturales de plagas agrícolas. Estos mamíferos muestran adaptaciones para el vuelo, presentan alimentación nocturna, son capaces de seleccionar sus refugios y algunas especies tienen hábitos migratorios. Los murciélagos pueden formar colonias que varían de 50 a más de 20,000 especímenes, o bien se relacionan en pequeños grupos, harems o viven solitariamente. Los factores bióticos y climáticos son importantes para la regulación natural de sus poblaciones; los cambios climáticos que afectan directamente la vegetación inciden sobre la diversidad y disponibilidad de los recursos alimentarios, así como en sus interacciones competitivas (54). No obstante, a la fecha se ha dado poca importancia a la infección de los murciélagos con diferentes patógenos, como un factor que pudiera influir en su densidad poblacional.

En la República Mexicana, la histoplasmosis ha presentado una alta variación en los índices de prevalencia en algunas áreas endémicas y es considerada como de amplia distribución en el país (22). Estudios epidemiológicos han demostrado que esta enfermedad tiene una relación directa entre el riesgo de infección y algunas actividades ocupacionales humanas realizadas en el interior de los refugios de murciélagos, tales como la espeleología, minería, exploración geológica y particularmente, la colección de guano de murciélago para ser usado como fertilizante (17, 21, 22). En estos lugares, el patógeno *H. capsulatum* fue encontrado en guano mezclado con suelo y aislado de murciélagos infectados (16, 27). Sin embargo, las cuevas y otros ambientes cerrados utilizados como refugios de murciélagos no son los únicos sitios asociados con la histoplasmosis humana; este hongo también ha sido aislado de excreta de ave debajo de los árboles en áreas rurales y urbanas, en el interior de los huecos de troncos y debajo de puentes (2, 22). Consecuentemente, es posible que además del inóculo del hongo, las fuentes y orígenes geográficos de las cepas de *H. capsulatum* puedan estar relacionadas a la severidad de las formas clínicas de la histoplasmosis y su distribución en el mundo; por lo que se plantea que los murciélagos infectados desempeñan un papel importante en el mantenimiento y dispersión de este patógeno en la naturaleza (55).

Algunos aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de América del Sur y de América Central, incluyendo a varios aislados de EUA, han sido agrupados en diferentes clases con base en el análisis de los patrones polimórficos del DNA, obtenidos por la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); la mayoría de los aislados estudiados fueron de procedencia clínica, escasos aislamientos de suelo, 2 de animales (gato y tlacuache) y ninguno de murciélagos (35-38).

Este estudio aporta información sobre el polimorfismo del DNA detectado por RAPD-PCR de aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de intestino, pulmón y bazo de especímenes de murciélagos colectados en los estados de Guerrero y Morelos. El análisis de los patrones polimórficos, obtenidos por RAPD-PCR, de los aislamientos de *H. capsulatum* de murciélagos, reveló una estrecha aproximación y ligeras divergencias entre ellos, de acuerdo a sus orígenes geográficos. Con base en estos análisis, se sugiere que las cepas aisladas de dos cuevas distintas en el estado de Morelos, de murciélagos infectados no migratorios *A. hirsutus* (EH-372-378) y de la especie migratoria *L. nivalis* (EH-383), son genótipicamente idénticas. A pesar de que éstas cepas comparten similitudes con otras, aisladas de murciélagos infectados capturados en Morelos (EH-370) y Guerrero (EH-315), así como con dos cepas de *H. capsulatum* aisladas de murciélagos no migratorios *A. hirsutus* (EH-365 y EH-366) capturados en la misma cueva de los especímenes EH-372-378, una ligera diversidad fue revelada entre los aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de la misma fuente y dentro de una delimitada área geográfica.

Algunas cepas de *H. capsulatum*, como las aisladas de pacientes mexicanos con histoplasmosis, la EH-46, y particularmente la cepa EH-53 aislada de un minero infectado en la "Galería Neptuno" de una mina de plata, localizada en el estado cercano, Hidalgo, se comportan molecularmente de manera muy similar a las cepas aisladas de casos clínicos (H.1.12.96, H102W y CEPA 3) y de excretas de aves (L-100-91 y CEPA 2) de Guatemala.

Un aspecto importante que puede explicar la estrecha relación de las cepas estudiadas es la cercanía geográfica entre las fuentes de infección, probablemente más circunscritas en los aislamientos de *H. capsulatum* de los murciélagos. En el caso de cepas de aislados clínicos, es más difícil precisar el origen geográfico de la infección, algunas veces esto ocurre, tal como en la cepa EH-317, aislada de un paciente mexicano con histoplasmosis asociada a SIDA, quien ha referido residir en Morelos.

La diversidad de los patrones polimórficos del DNA detectado entre algunas cepas aisladas de excreta de gallo (EH-314) y guano de murciélago (EH-313) en Guerrero, y de guano de murciélago (EH-360 y 385) en Sinaloa, puede sugerir una recombinación genética entre estas cepas en la naturaleza, como se puede esperar de un organismo sexuado como *H. capsulatum*, que presenta su fase teleomórfica probablemente en el medio ambiente, como lo ha referido Carter *et al.* (56).

Considerando la localización geográfica de México y la ausencia de información a cerca del polimorfismo del DNA de los aislamientos de *H. capsulatum* en la República Mexicana, existe el interés en clasificar estos aislamientos de acuerdo con sus elementos repetitivos del DNA polimórfico, el cual puede ser usado como marcador epidemiológico para determinar los orígenes de las cepas de *H. capsulatum* de los pacientes mexicanos con histoplasmosis, así como en establecer relaciones con otros aislados clasificados del Sur, Centro y Norteamérica. Los resultados obtenidos en esta investigación apoyan una interacción entre la presencia del hongo en fuentes naturales, su mantenimiento y dispersión por los murciélagos, y la fuente de infección en humanos.

Es posible que los patrones del polimorfismo de las cepas estudiadas se registren en otras áreas, a medida que éstas cepas son desplazadas por “vectores” de diferentes tipos, considerando a los murciélagos como uno de ellos, funcionando al mismo tiempo como reservorios y responsables de la dispersión del hongo en la naturaleza. Es probable, que a través de especies migratorias por excelencia que se desplazan a grandes distancias, o por especies que realizan desplazamientos cortos o de pequeñas distancias, que la dispersión del hongo se realice como un evento natural.

Dada la importancia de estos hallazgos iniciales, en la actualidad se está ampliando este tipo de trabajo con el objeto de identificar el polimorfismo del hongo aislado de murciélagos migratorios polinívoros con mayor rango de desplazamiento; de cierta manera, podríamos contribuir no sólo a trazar un mapa de la distribución de patrones polimórficos de *H. capsulatum* en la naturaleza (epidemiología molecular), sino también aportar datos para definir rutas migratorias de murciélagos que siempre son cuestionadas por los especialistas mastozoólogos. Es clara la relevancia del estudio de los murciélagos como posibles agentes de dispersión del hongo *H. capsulatum*. El aislamiento obtenido de *L. nivalis*, especie migratoria por excelencia, es de

especial interés para continuar la investigación a lo largo de sus posibles rutas de migración, así como la búsqueda de *H. capsulatum* en *Tadarida brasiliensis*, especie insectívora que realiza desplazamientos de larga distancia en Norteamérica (55), lo que permitiría definir con más elementos el mapa de distribución de cepas de *H. capsulatum* a lo largo del continente.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Rippon JW.** Medical Mycology. 3rd. ed. Philadelphia: Saunders WB, 1988.
- 2 **Kwong-Chung KJ, Bennett JE.** Histoplasmosis. *In: Medical Mycology.* Philadelphia: Lea and Febiger, 464-513, 1992.
- 3 **Youmans GP.** Histoplasmosis, coccidiomycosis, blastomycosis. *In: Youmans GP, Paterson PY, Sommer HM (eds.). The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases.* Philadelphia: Saunders WB, 404-27, 1980.
- 4 **Taylor ML, Díaz S, González PA, Sosa AC, Toriello C.** Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: A hypothetical approach. *Rev. Infect. Dis.* 6: 775-82, 1984.
- 5 **Taylor ML, Duarte-Escalante E.** Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos. *Rev. Invest. Clin.* 47: 499-506, 1995.
- 6 **González-Ochoa A.** Histoplasmosis pulmonar aguda primaria. *Gac. Méd. Méx.* 87: 733-44, 1957.
- 7 **González-Ochoa A.** Histoplasmosis primaria pulmonar aguda en la República Mexicana. Estudio de 74 casos. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx).* 19: 341-50, 1959.
- 8 **González-Ochoa A, Cervantes-Ochoa A.** Histoplasmosis epidémica y su prevención. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx).* 20: 129-45, 1960.
- 9 **Velasco-Castrejón O.** Micosis profunda. *In: García-García ML, Giono-Cerezo S, Pacheco CR, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino-Gómez JL (eds.). Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas.* México D.F: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 231-48, 1994.

- 10 **Goodman LN, Larsh HW.** Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopath. Mycol. Appl.* 33: 145-56, 1967.
- 11 **Mahvi AT.** Factors governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopath. Mycol. Appl.* 41: 167-76, 1970.
- 12 **DiSalvo AF, Bigler WJ, Ajello L, Johnson JE, Palmer J.** Bat and soil for sources of histoplasmosis in Florida. *Publ. Health Rep.* 85: 1063-69, 1970.
- 13 **Aguirre-Pequeño E.** Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México. *Gac. Méd. Méx.* 89: 243-53, 1959.
- 14 **González-Ochoa A.** Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México. Comentario al trabajo del Dr. Aguirre Pequeño. *Gac. Méd. Méx.* 89: 254-57, 1959.
- 15 **González-Ochoa A.** Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)*. 23: 81-6, 1963.
- 16 **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: 49-53, 1994.
- 17 **Taylor ML, Granados J, Toriello C.** Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 39: 375-9, 1996.
- 18 **Eissenberg LG, Goldman WE.** *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 411-21, 1991.
- 19 **Velasco-Castrejón O, González-Ochoa A.** Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. *Mykosen* 20: 393-9, 1977.
- 20 **Velasco-Castrejón O.** Quelques aspect de l histoplasmosse en republique Mexicaine. *Med. Tropicale* 41: 681-83, 1981.

- 21 **Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J.** Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 38: 137-41, 1997.
- 22 **Martínez-Rivera MA, Reyes-Montes MR, Vaca-Marín MA, Taylor ML.** Histoplasmosis in Mexico: A review and new epidemiologic and molecular findings. *Epidemiol. Rev.* (manuscrito enviado).
- 23 **Bryles MC, Cozad GC, Robinson A.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in Oklahoma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 399-400, 1969.
- 24 **DiSalvo AF, Ajello L, Palmer JW, Winkler WG.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *Am. J. Epidemiol.* 89: 606-14, 1969.
- 25 **Chick WE, Bauman DS, Leroy LN, Morgan WKC.** A combined and laboratory epidemic of histoplasmosis. Isolation from bat feces in West Virginian. *Am. Rev. Resp. Dis.* 105: 968-71, 1972.
- 26 **McCracken GF, McCracken MK, Vawter AT.** Genetic structure in migratory populations of the bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. *J. Mammal.* 75: 500-14, 1994.
- 27 **Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR.** Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in natural Mexican harborage. *Ecology* (manuscrito enviado).
- 28 **McMurray DN, Thomas ME, Greer DL, Tolentino NL.** Humoral and cell-mediated immunity to *Histoplasma capsulatum* during experimental infection in neotropical bats (*Artibeus lituratus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 815-21, 1978.
- 29 **McMurray DN, Greer DL.** Immune responses in bats following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 1036-9, 1979.

- 30 **Greer DL, McMurray DN.** Pathogenesis of experimental histoplasmosis in the bat, *Artibeus lituratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 653-9, 1981.
- 31 **Hoff GL, Bigler WJ.** The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wildlife Dis.* 17: 191-7, 1981.
- 32 **Kunz TH.** *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats.* London: Smithsonian Institution Press, 1988.
- 33 **Fernández-Andreu CM.** Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos en Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 40: 36-43, 1988.
- 34 **Arita HT.** Conservation biology of the cave bats of Mexico. *J. Mammal.* 74: 693-702, 1993.
- 35 **Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G.** Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J. Bacteriol.* 165: 813-8, 1986.
- 36 **Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G.** Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 57: 1409-12, 1989.
- 37 **Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G.** Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* 162: 258-61, 1990.
- 38 **Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G.** Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2104-7, 1992.
- 39 **Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE.** Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: Methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 463-4, 1993.

- 40 **Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE.** Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174: 7075-9, 1992.
- 41 **Gass M, Kobayashi GS.** Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch. Derm.* 100: 724-7, 1969.
- 42 **Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML.** Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolated from AIDS-associated-Mexican-histoplasmosis-patients, using histoplasmin-electrotypes and RAPD-patterns. *J. Clin. Microbiol.* (manuscrito enviado).
- 43 **Kunz TH, Kurta A.** Capture methods and holding devices. *In:* Kunz TH (ed.). *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats.* London: Smithsonian Institution Press, 1-28, 1988.
- 44 **Handley CO.** Specimen preparation. *In:* Kunz TH (ed.). *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats.* London: Smithsonian Institution Press, 437-57, 1988.
- 45 **Hall ER.** *The Mammals of North America.* 2nd ed. New York: J. Wiley and Sons, 1981.
- 46 **Wilson DE, Reeder DAM.** *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference.* 2nd ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993.
- 47 **Burt WR, Underwood AL, Appleton GL.** Hydroxamic acid from *Histoplasma capsulatum* that displays growth factor activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 560-3, 1981.
- 48 **Tewari RP, Kegel HI.** Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 44: 231-40, 1971.
- 49 **Standard PG, Kaufman L.** Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. Clin. Microbiol.* 3: 191-9, 1976.

- 50 **Ouchterlony O, Nilsson LA.** Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *In:* Weir DM (ed.). Handbook of Experimental Immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 19.1-.44, 1978.
- 51 **Spitzer ED.** RFLP and its application to epidemiology of *Histoplasma capsulatum*. *In:* Maresca B, Kobayashi GS (eds.). Molecular Biology of Pathogenic Fungi: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Telos Press, 375-9, 1994.
- 52 **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Gel electrophoresis of DNA *In:* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.1-62, 1989.
- 53 **Norusis MJ.** SPSS/PC+ for the IBM PC/XT/AT. Chicago: SPSS Inc. 659, 1986.
- 54 **Gaisler J.** Ecology of bats. *In:* Stoddaart M (ed.). Ecology of Small Mammals. London: Chapman and Hall, 281, 1979.
- 55 **Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML.** El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. (manuscrito enviado).
- 56 **Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ.** Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana; have a recombining population structure. J. Clin. Microbiol. 34: 2577-84, 1996.

TABLA 1. AISLAMIENTO EN MÉXICO DE *H. capsulatum* DE LA NATURALEZA (SUELO CON EXCRETAS)

PROCEDENCIA	AÑO	FUENTE	REFERENCIA
Gruta "Cacahuamilpa" ¹	1956	Guano de murciélago	15
Cueva "La envenenada" ³	1959	Guano de murciélago	13
Cueva "El Diablo" ³	1959	Guano de murciélago	13
Cueva "El Refugio" ³	1959	Guano de murciélago	13
Cueva "Del Guano" ²	1959	Guano de murciélago	13
Mina "Del Indio" ³	1959	Guano de murciélago	13
Túnel de "Cardona" ⁴	1960	Guano de murciélago	15
Túnel "La Joya" ⁵	1961	Guano de murciélago	15
Gruta "Cacahuamilpa" ¹	1962	Guano de murciélago	15
Cajales ¹	1962	Guano de murciélago	15
Túnel "Neptuno" ⁸	1977	Guano de murciélago	NP
Gruta "Juxtlahuaca" ¹	1994	Guano de murciélago	16
Patio de casa, Olinalá ¹	1994	Excreta de ave	16
Cueva de "La Cruz" ⁷	1996	Guano de murciélago	27
Mina "El Clarín" ⁶	1997	Guano de murciélago	27
Parque de Tlalpan ⁹	1997	Excreta de ave	NP

¹Guerrero ²Tamaulipas ³Nuevo León ⁴Colima ⁵Durango ⁶Morelos ⁷Sinaloa ⁸Hidalgo
⁹México D.F.N.P. No Publicado.

TABLA 2 (PARTE I). AISLAMIENTO DE *H. capsulatum* EN MURCIÉLAGOS CAPTURADOS EN DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS

FAMILIAS Y ESPECIES	PAÍS DE AISLAMIENTO
Noctilionidae	
<i>Noctilio labialis</i>	Panamá
Mormoopidae	
<i>Mormoops blainvillii</i>	Cuba
<i>Mormoops megalophylla</i>	México
<i>Pteronotus parnellii</i>	Panamá, Belice, México
<i>Pteronotus suapurensis</i>	Panamá
Phyllostomidae	
<i>Artibeus jamaicensis</i>	El Salvador, Cuba
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	Puerto Rico
<i>Brachyphylla nana</i>	Cuba
<i>Carollia perspicillata</i>	Panamá, Colombia, Ecuador
<i>Desmodus rotundus</i>	Panamá, Colombia
<i>Glossophaga soricina</i>	Panamá, Colombia
<i>Leptonycteris sanborni</i>	EUA
<i>Lonchophylla robusta</i>	Panamá
<i>Lonchorhina aurita</i>	Panamá
<i>Macrotus waterhousii</i>	Cuba
<i>Micronycteris megalotis</i>	Panamá
<i>Phyllostomus discolor</i>	Panamá
<i>Tonatia bidens</i>	Panamá

Continúa en la Parte II.

TABLA 2 (PARTE II). AISLAMIENTO DE *H. capsulatum* EN MURCIÉLAGOS CAPTURADOS EN DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS

FAMILIAS Y ESPECIES	PAÍS DE AISLAMIENTO
Vespertilionidae	
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Colombia
<i>Eptesicus fuscus</i>	EUA, Cuba
<i>Myotis austroriparius</i>	EUA
<i>Myotis californicus</i>	México
<i>Myotis grisescens</i>	EUA
<i>Myotis lucifugus</i>	EUA
<i>Myotis myotis</i>	Israel
<i>Myotis sodalis</i>	EUA
<i>Nycticeus humeralis</i>	EUA
<i>Pipistrellus subflavus</i>	EUA
Molossidae	
<i>Molossus molossus</i>	Panamá, Ecuador
<i>Molossus sp.</i>	Panamá
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Panamá
<i>Tadarida brasiliensis</i>	EUA

Modificado de Kunz (28) con datos de Fernández-Andreu (29) y Taylor *et al.* (16).

TABLA 3 (PARTE D). FUENTES Y ORÍGENES GEOGRÁFICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *H. capsulatum* ESTUDIADOS

AISLADOS	FUENTES	ORIGEN GEOGRÁFICO
EH-313 ¹	GUANO DE MURCIÉLAGO	GUERRERO, MEX.
EH-314 ²	EXCRETA DE GALLO	GUERRERO, MEX.
EH-315 ³	MURCIÉLAGO	GUERRERO, MEX.
EH-360 ⁴	GUANO DE MURCIÉLAGO	SINALOA, MEX.
EH-365 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-366 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-370 ⁶	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-372 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-373 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-374 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-375 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-376 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-377 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-378 ⁵	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-383 ⁷	MURCIÉLAGO	MORELOS, MEX.
EH-385 ⁴	GUANO DE MURCIÉLAGO	SINALOA, MEX.

¹Gruta de "Juxtlahuaca"; ²patio casa-habitación de Olinalá; ³cueva de "Coapala"; ⁴cueva "La Cruz"; ⁵cueva "El Salitre"; ⁶mina "El Clarín"; ⁷cueva "El Diablo".

TABLA 3 (PARTE II). FUENTES Y ORÍGENES GEOGRÁFICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *H. capsulatum* ESTUDIADOS (Cepas de referencia)

AISLADOS	FUENTES	ORIGEN GEOGRÁFICO
EH-46	HUMANO	MÉXICO
EH-53*	HUMANO	HIDALGO, MEX.
H102W*	HUMANO	GUATEMALA, GUATE.
H.1.12.96*	HUMANO	GUATEMALA, GUATE.
EH-317	HUMANO (SIDA)	MORELOS, MEX.
L-100-91*	EXCRETA DE ZANATE	GUATEMALA, GUATE.
CEPA 2*	EXCRETA DE ZANATE	GUATEMALA, GUATE.
CEPA 3*	HUMANO	GUATEMALA, GUATE.

*Cepas con orígenes geográficos bien definidos

TABLA 4. DATOS DE MURCIÉLAGOS INFECTADOS CON *H. capsulatum* CAPTURADOS EN MÉXICO

MURCIÉLAGOS (ESPECIE)	SITIOS DE CAPTURA	SEXO	RELACIÓN- INFECTADOS/ CAPTURADOS ♦	DIETA	MIGRACIÓN
<i>M. megalophylla</i>	Cueva "Coapala", Guerrero	Hembras	1/7	Insectívoro	No migratorio
<i>N. stramineus</i>	Mina "El Clarín", Morelos	Macho	1/5	Insectívoro	No migratorio
<i>A. hirsutus</i>	Cueva "El Salitre", Morelos	2 Machos 13 Hembras	9/15	Frugívoro	No migratorio
<i>L. nivalis</i>	Cueva "El Diablo", Morelos	5 Machos 4 Hembras	1/9	Polinívoro/ Nectarívoro	Migratorio

♦En el mismo sitio de captura.

TABLA 5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *H. capsulatum* DE MURCIÉLAGOS INFECTADOS EN MÉXICO

ESPECIE	Nº. CEPA	ÓRGANO DE AISLAMIENTO	TIPO DE COLONIA	CONVERSIÓN A LEVADURAS
<i>Mormoops megalophylla</i>	EH-315	Intestino	B	+
<i>Artibeus hirsutus</i>	EH-365, EH-366	Intestino	A	+
<i>Natalus stramineus</i>	EH-370	Pulmón	B	+
<i>Artibeus hirsutus</i>	EH-372	Intestino	B	+
	EH-373	Pulmón	B	+
	EH-374	Bazo	B	+
	EH-375- EH-378	Pulmón	B	+
<i>Leptonycteris nivalis</i>	EH-383	Pulmón	B	+

TABLA 6. MATRIZ DE LOS PERFILES DE LOS DNAs OBTENIDOS POR RAPD-PCR DE LAS CEPAS DE *H. capsulatum* ESTUDIADAS

Rf X 100	31.2	33.3	37.5	39.5	41.6	44.7	47.9	51.0	54.0	56.2	58.3	60.0	62.5	66.6	68.7	76.0
EH-315	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
EH-370	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
EH-365	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
EH-366	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
EH-372	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-373	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-374	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-375	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-376	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-377	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-378	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-383	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
EH-53	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
H.1.12.96	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
EH-46	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
CEPA 2	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
CEPA 3	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
L-100-91	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
H102W	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
EH-317	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
EH-360	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
EH-385	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
EH-314	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
EH-313	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0

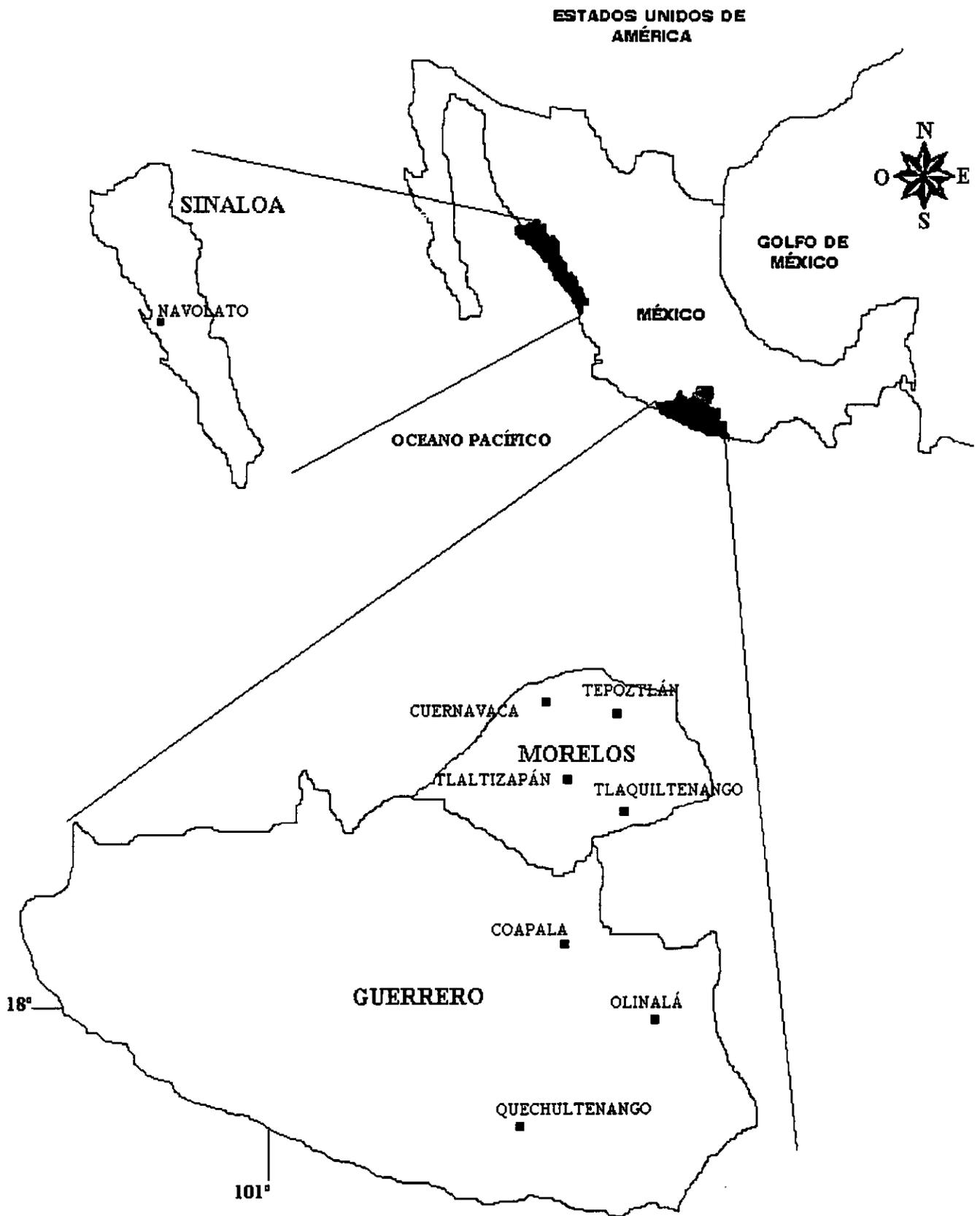


Figura 1. Áreas geográficas de los sitios de captura de murciélagos y colecta de excretas de ave y murciélago en México.

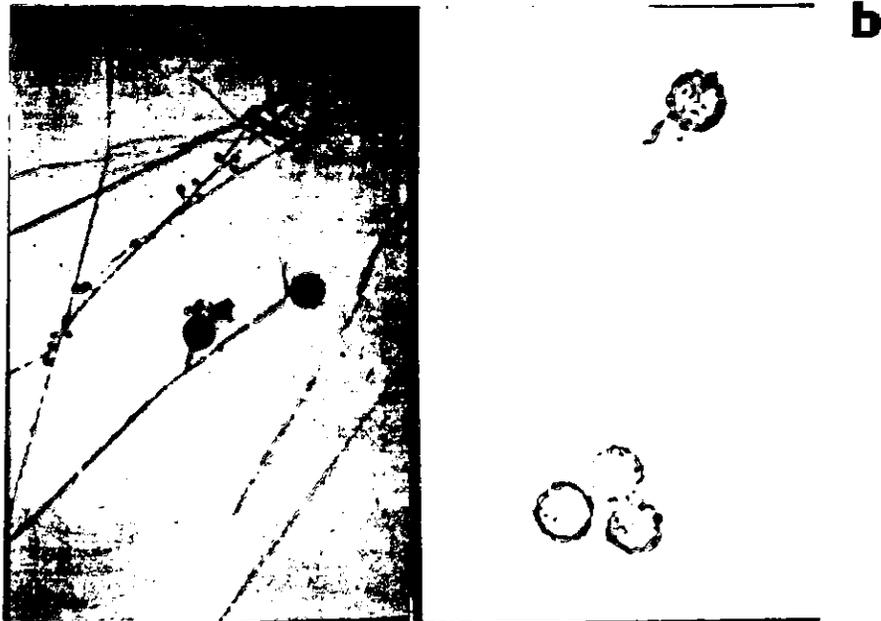


Figura 2 (a, b). Morfología de *H. capsulatum*. a) Morfología colonial; b) Morfología microscópica. Los tipos coloniales Albino (A) y Pardo-oscuro (B) se ilustran en 2a; las hifas delgadas y septadas, microconidios y macroconidios con proyecciones digitiformes se observan en 3b (X 809).

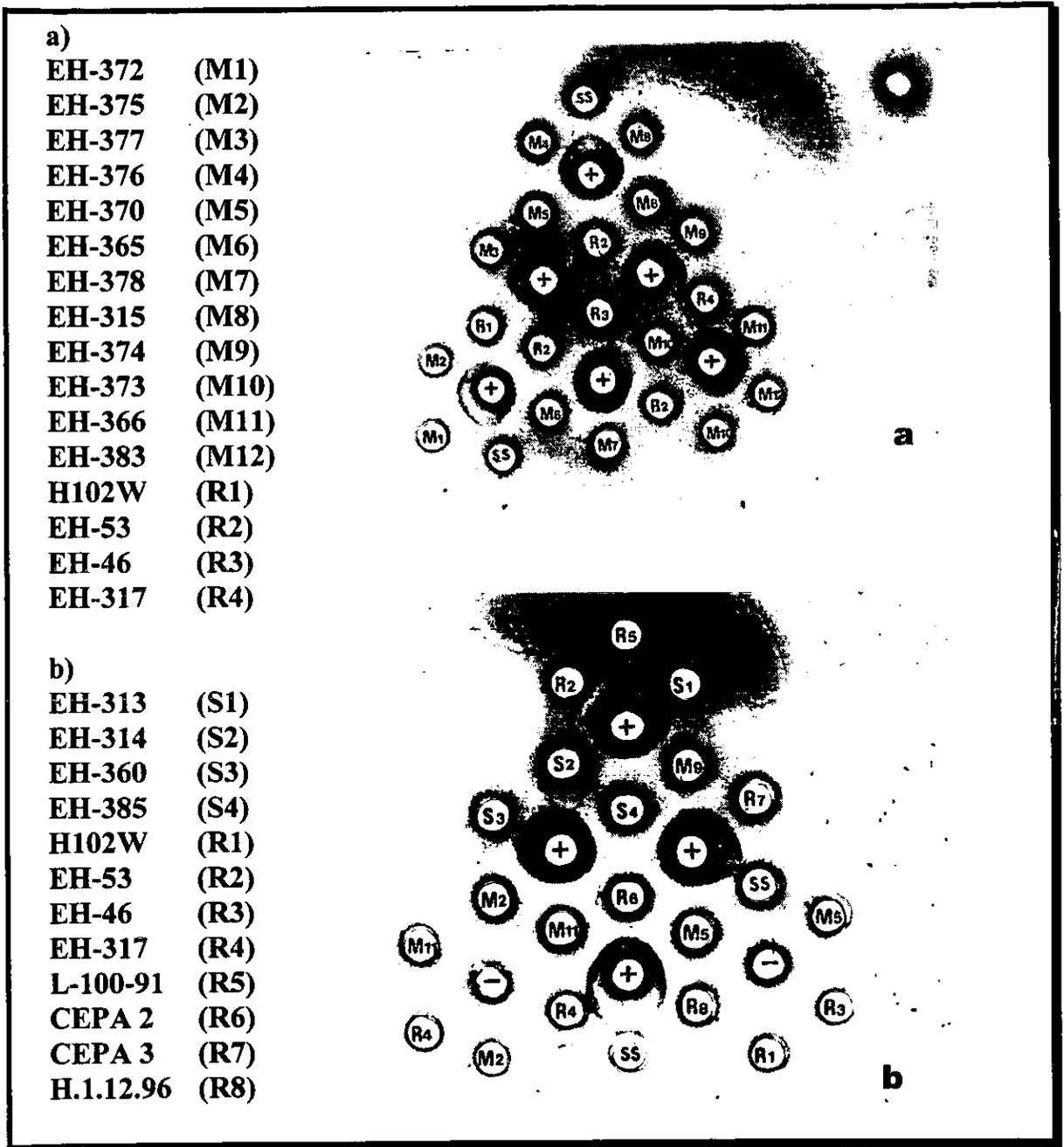


Figura 3 (a, b). Exoantígenos de los aislados de *H. capsulatum*. La prueba de exoantígenos se llevó a cabo de acuerdo a Standard y Kaufman (49). a) Aislados de *H. capsulatum* de murciélagos infectados (M₁-M₁₂), cepas de referencia (R₁-R₄); b) Aislados de guano de murciélagos y excretas de aves (S₁-S₄), cepas de referencia (R₁-R₈); (+) Suero de paciente con histoplasmosis; (-) Suero de individuo sano; (Ss) Solución salina.

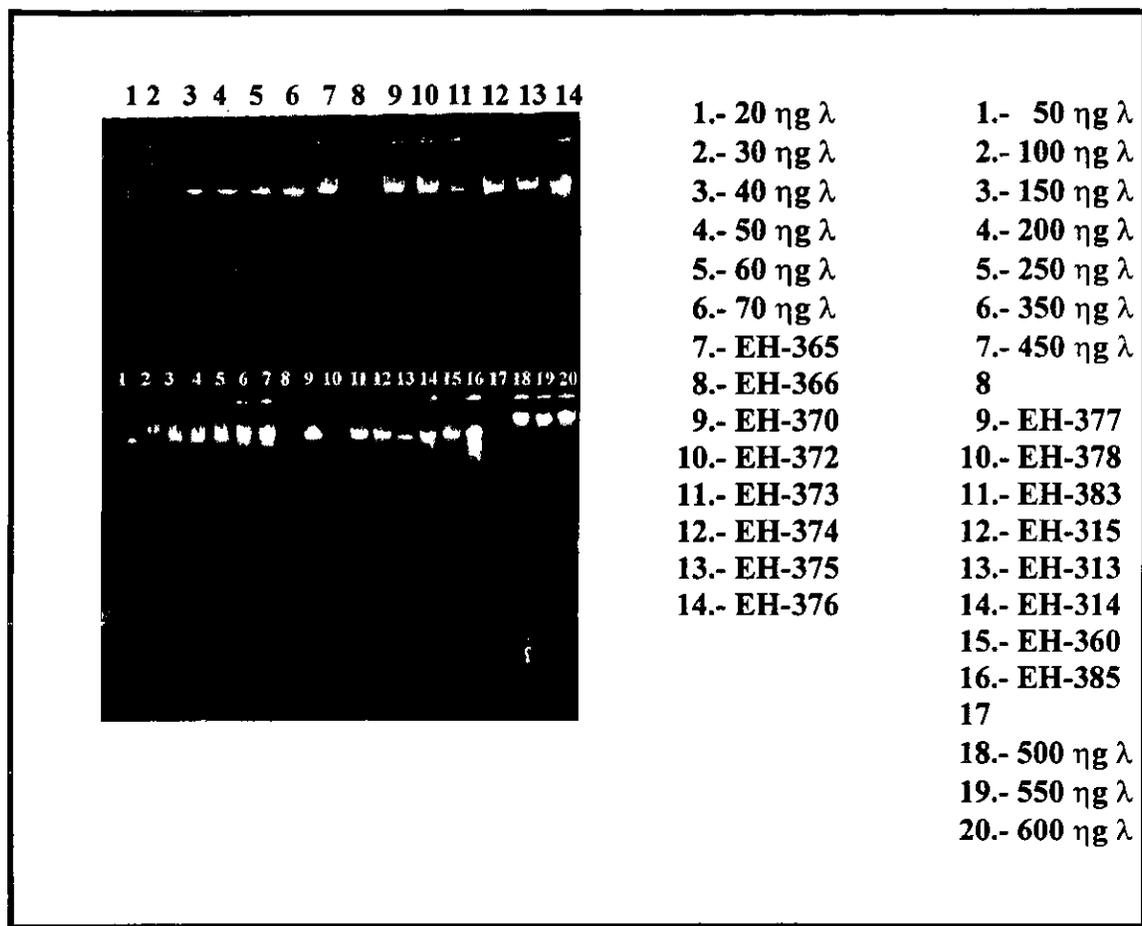


Figura 4. Determinación de la concentración del DNA genómico de distintas cepas de *H. capsulatum*. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Los carriles del 7-14 de la parte A de la figura y los carriles del 9-16 de la parte B, muestran el DNA de las cepas estudiadas. Los carriles del 1-6 (parte A) y 1-7 (parte B) muestran el marcador molecular de DNA del fago λ a distintas concentraciones.

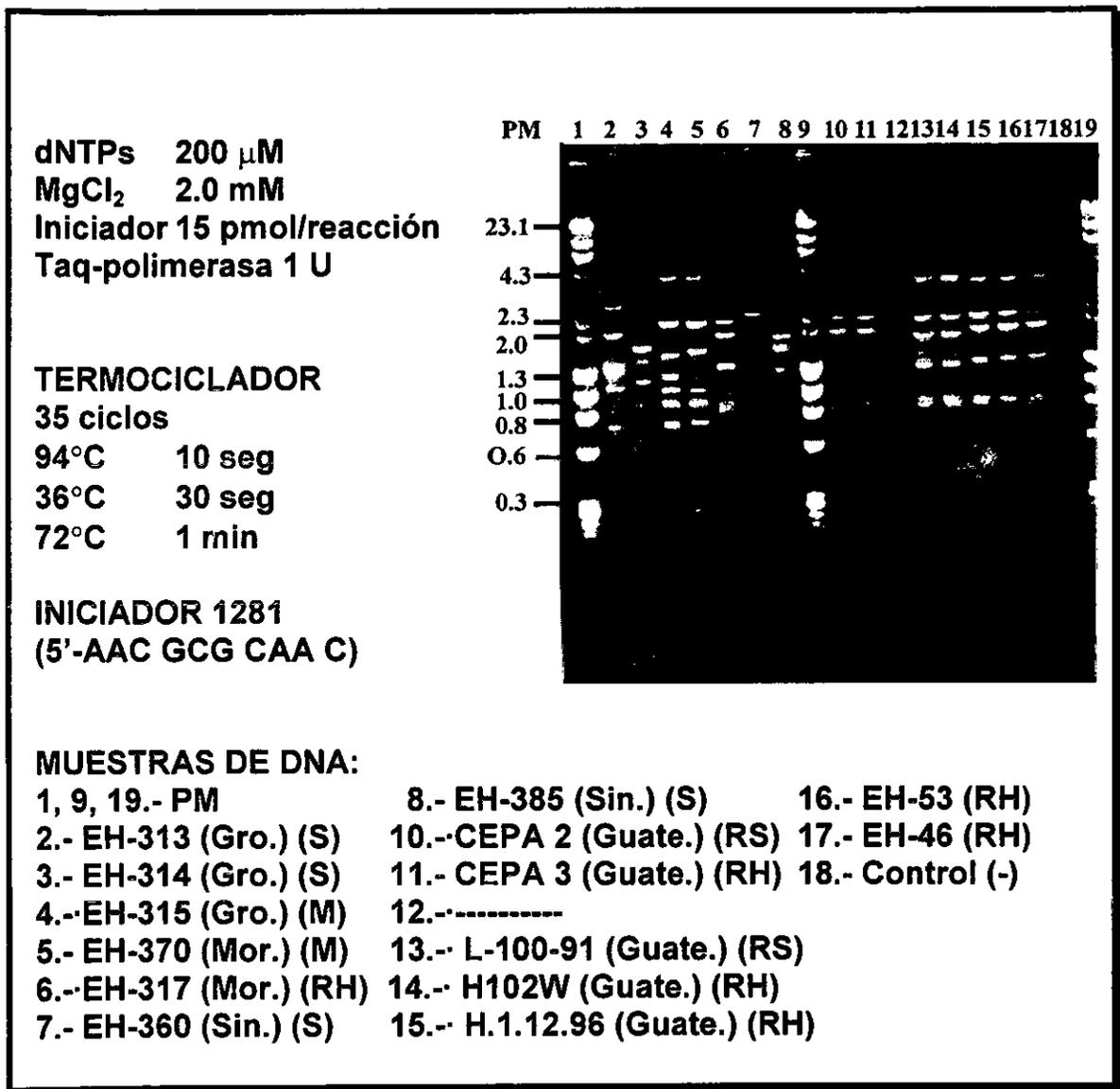
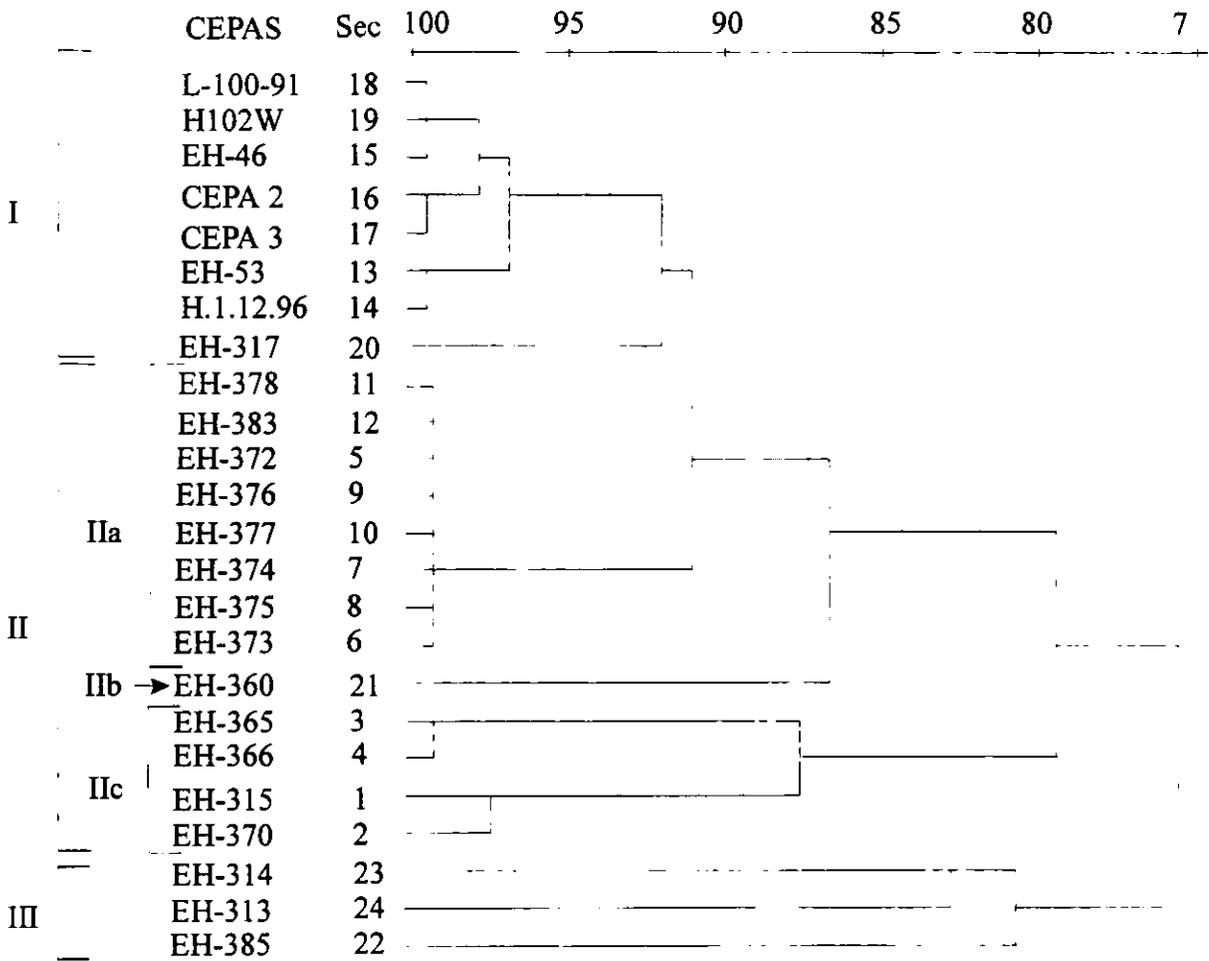


Figura. 6. RAPD-PCR de cepas de *H. capsulatum* aisladas de distintos fuentes y orígenes geográficos. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos del RAPD-PCR; Morelos (Mor.), Guerrero (Gro.), Sinaloa (Sin.), Guatemala (Guate.), Murciélago (M), Suelo (S), Referencia Suelo (RS), Referencia Humano (RH), Peso Molecular (PM). En los carriles 1, 9 y 19 se muestran la doble digestión del DNA del fago λ con HindIII/ ϕ X 174-HaeIII.

Porcentaje de Relacionamiento



SPSS/PC+

Figura 7. Dendrograma de relacionamiento entre las cepas de *H. capsulatum* estudiadas. Se utilizó el programa SSPS/PC+ versión 2.3 el cual analizó por el método de grupos desbalanceados la matriz de datos de la tabla 6, expresando el porcentaje de relación entre cepas.

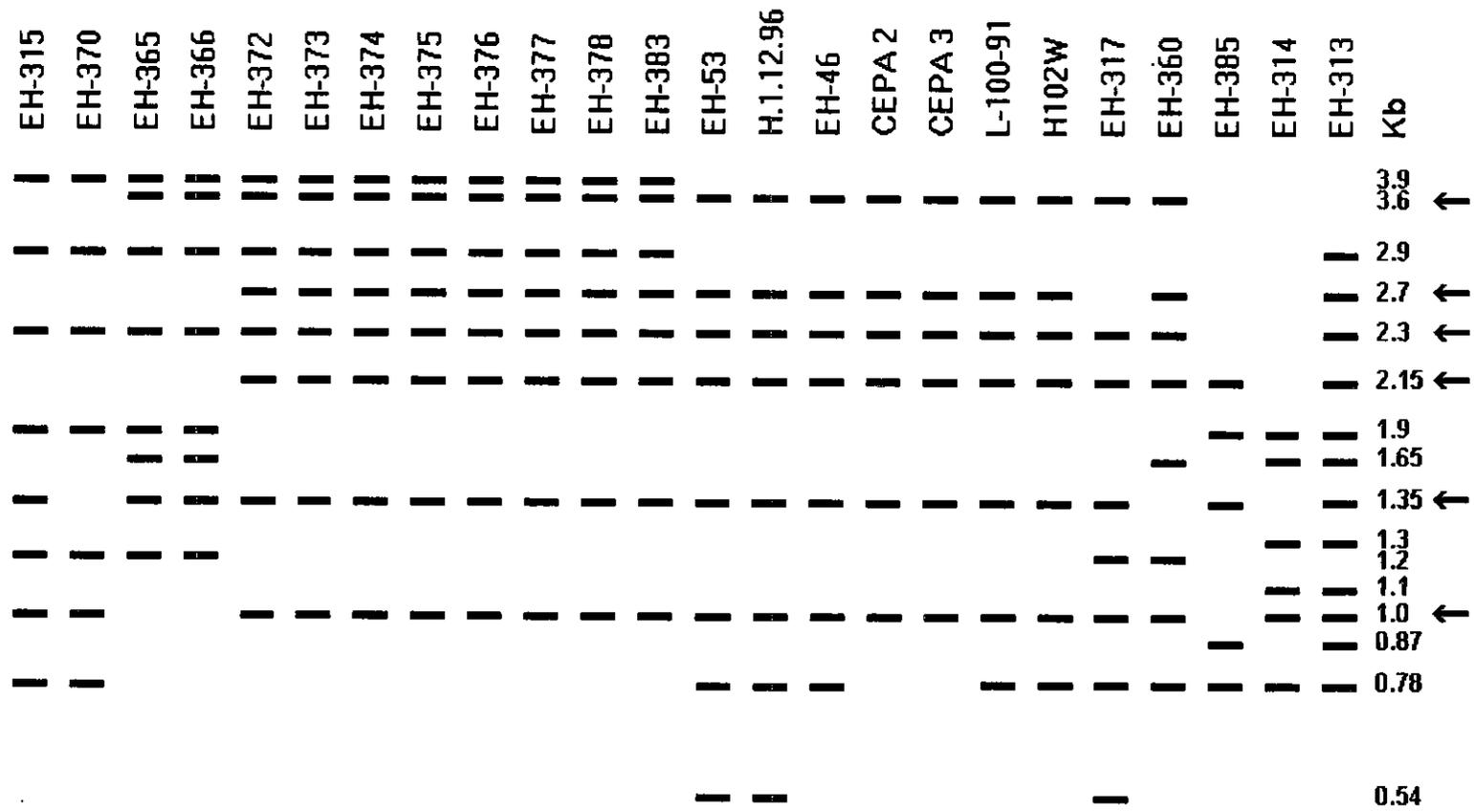


Figura 8. Mapa general de los perfiles del RAPD-PCR de todas las cepas de *H. capsulatum* estudiadas. Se reprodujeron los patrones polimórficos observados en las figuras 5 y 6. Los valores de kb fueron calculados según los Rf determinados en las respectivas figuras y se siguió el procedimiento establecido para cálculos de kb (52).