



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**Caracterización molecular de cepas de  
*Histoplasma capsulatum*  
de diversos orígenes.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**JOSE FRANCISCO VALENZUELA TOVAR**

279592  
265642

ASESORES: DR. VICTOR M. ZENDEJAS BUITRON  
DR. EVERARDO CURIEL QUESADA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2000



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.



VERDAD NACIONAL  
AUTONOMIA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Caracterización molecular de cepas de Histoplasma capsulatum  
de diversos orígenes.

que presenta el pasante: José Francisco Valenzuela Tovar  
con número de cuenta: 8429572-9 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 22 de Marzo de 2000

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q.I.B. Idalia Avila Miyazawa

SECRETARIO Dr. Víctor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE en C. Ana Laura Vázquez Martínez

279592

## **Agradecimientos.**

A **Dios**, por regalarme el don de la vida, darme salud y los dones necesarios como son la inteligencia, comprensión y paciencia para lograr las metas que día a día fijo en mi vida.

A **mis padres**, quienes con su amor, cariño, comprensión, paciencia y ejemplo siempre digno, han sabido darme la fuerza necesaria para alcanzar metas las cuales no son suficientes para agradecerles.

Con mucho cariño.

*Paco.*

A **mis hermanos**, gracias por su cariño y comprensión, pero sobre todo porque siempre han demostrado que sabemos estar unidos para enfrentar las crisis más difíciles a las que nos hemos enfrentado.

Con cariño.

*Paco.*

A **Sandy**, gracias por todo el amor, cariño, paciencia, comprensión que me has brindado a lo largo de este tiempo, también por el aliento que me das para seguir adelante y conseguir llegar a la meta fijada.

Con amor.

*Frank.*

Por último a todos mis profesores, amigos, compañeros y colegas profesionistas que me han brindado su apoyo y comprensión.

Gracias.

*Francisco.*

## INDICE

	Página.
<b>INDICE .....</b>	<b>1</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<i>GENERALIDADES</i> .....	5
MORFOLOGÍA.....	6
PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	8
ESPECTRO DE LA ENFERMEDAD.....	10
EPIDEMIOLOGÍA.....	11
INMUNOLOGÍA.....	12
DIAGNÓSTICO.....	16
TRATAMIENTO.....	18
PREVENCIÓN.....	18
ASPECTOS MOLECULARES.....	20
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>22</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
OBTENCIÓN DE LA MASA MICELIAL.....	26
EXTRACCIÓN DEL DNA TOTAL DEL HONGO.....	26
MÉTODO DE SPITZER (MODIFICADO PARA HONGOS) .....	27
MÉTODO RÁPIDO DE EXTRACCIÓN POR SALES DE DNA GENÓMICO.....	29

OBTENCIÓN DE LOS PERFILES DE POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>APENDICE 1</b> .....	<b>43</b>
<b>PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS</b> .....	<b>43</b>
AGUA DESTILADA FILTRADA Y ESTERIL.....	43
CLORURO DE SODIO (NaCl) 6M (saturado).....	43
BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL).....	43
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 2%.....	44
TRIS-HCl 2 M pH.8.0.....	44
ETILEN DIAMINO TETRACÉTICO (EDTA) 1 M pH. 8.0.....	44
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS ACETATO EDTA (TAE 50X).....	45
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS-BORATOS-EDTA (TBE 5X).....	45
FENOL-TRIS pH. 8.0 (Equilibrado).....	46
RNAsa LIBRE DE DNAsa.....	47
PROTEINASA K.....	47
REGULADOR AZUL DE BROMOFENOL.....	47
<b>APENDICE 2</b> .....	<b>48</b>
<b>TECNICAS EMPLEADAS</b> .....	<b>48</b>
<i>Cuantificación de DNA por el método espectrofotométrico</i> .....	48
<i>Cuantificación de DNA por el método de minigel</i> .....	48
<i>Extracción con Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico. (25:24:1)</i> .....	49
<i>Preparación de un Gel de Agarosa</i> .....	50
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>55</b>

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig. 1. Microfotografía que muestra un macroconidio con sus proyecciones digitiformes.....	6
Fig. 2. <i>H. capsulatum</i> . Aspecto microscópico donde se observa micelio fino y septado y gran cantidad de macroconidios equinulados. Tinción con azul de algodón .....	7
Fig. 3. En esta microfotografía se observan levaduras dentro de un macrófago. 100x.....	8
Fig. 4. Radiografía de tórax, en la que se muestran lesiones producidas por <i>H. capsulatum</i> , están señaladas con la punta de flecha.....	9
Fig. 5. Plan de trabajo general.....	24
Tabla 1. Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> en estudio.....	25
Fig. 6. Método de Spitzer. Extracción de DNA modificada para hongos.....	27
Fig. 7. Extracción de DNA genómico por sales.....	29
Fig. 8. Obtención del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción RFLP's.....	30
Fig. 9. Comparación de las técnicas de aislamiento de DNA.....	32
Fig. 10. Perfiles RFLP de las cepas de <i>H. capsulatum</i> , con la enzima <i>Hae</i> III.....	34
Fig. 11. RFLP de las cepas de <i>H. capsulatum</i> , con la enzima <i>Hae</i> III. Perfil tipo C.....	34
Fig. 12. RFLP de las cepas de <i>H. capsulatum</i> , con la enzima <i>Hae</i> III. Perfiles nuevos .....	34
Tabla 2. Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de <i>H. capsulatum</i> en estudio. Perfiles RFLP con la enzima <i>Hae</i> III.....	35
Tabla 3. Matriz de datos de los perfiles con la enzima <i>Hae</i> III de las cepas de <i>H. capsulatum</i> .....	36
Tabla 4. Preparación de reguladores empleados en las técnicas.....	46
Fig. 13. Preparación de un gel de agarosa.....	53
Fig. 14. Observación y fotografiado del gel de agarosa.....	54

## RESUMEN

La histoplasmosis es una enfermedad infecciosa causada por la inhalación de esporas de un hongo dimórfico llamado *Histoplasma capsulatum*; no es contagiosa; afecta principalmente los pulmones y sus síntomas son variables. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas o presentan síntomas leves; esta enfermedad tiene un amplio espectro. (1,2)

*H. capsulatum* se encuentra en el suelo, crece mejor en aquellos con alto contenido de nitrógeno, especialmente aquellos con guano de murciélago o de pájaros. Las esporas de *H. capsulatum* son fácilmente transportadas por el viento a grandes distancias. En México el hongo se encuentra circunscrito a cavernas, minas, túneles y casas abandonadas donde existen las condiciones que conforman el nicho ecológico de este microorganismo. (28-31)

Los datos epidemiológicos de la histoplasmosis en nuestro país están rezagados, dispersos y poco difundidos. En 1988 se inicia el registro oficial por parte de la Secretaría de Salud (SSA) y su Dirección General de Epidemiología (DGE), donde hasta 1994 se reportaron 1065 casos en todo el país. Estos informes se refieren a la forma epidémica y los casos reportados son básicamente brotes. La histoplasmosis endémica ha sido poco estudiada y caracterizada en el país. (37)

El aislamiento de *H. capsulatum* de distintas fuentes y procedencias permite encontrar diferencias genotípicas, que pueden ser reflejadas en cambios fenotípicos, los datos estas variantes proceden de estudios con metodologías moleculares y sirven para relacionar entre sí los aislamientos del hongo.

Lo anterior ha permitido la tipificación del ácido desoxirribonucleico (DNA) de diferentes cepas de *H. capsulatum* estudiadas en Estados Unidos, ésta es utilizada en diversas 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. (19-25)

## INTRODUCCIÓN

### *Generalidades.*

La histoplasmosis es una micosis profunda o sistémica, es una enfermedad infecciosa causada por la inhalación de esporas de un hongo dimórfico llamado *Histoplasma capsulatum*, ocasionalmente se adquiere por inoculación cutánea. Esta enfermedad también es conocida como enfermedad de Darling, Histo, enfermedad de las cuevas, fiebre de las cuevas, enfermedad del Valle de Ohio, reticuloendoteliosis, citomicosis reticuloendotelial y enfermedad del sistema fagocítico mononuclear. Las formas clínicas y la severidad dependen de las condiciones inmunológicas del hospedero y de la cantidad de esporas y tiempo de exposición. La histoplasmosis no es contagiosa; no se transmite de un enfermo a otro sano, afecta principalmente los pulmones y sus síntomas son muy variables. (1,2, 28-31).

*H. capsulatum* se encuentra, en el suelo en todo el mundo, particularmente en el que está enriquecido con excretas de aves o murciélagos (guano), la característica de estos suelos es su alto contenido de nitrógeno. Las condiciones ideales en las que habita *H. capsulatum* incluyen un lugar cerrado (cueva, minas) con alta humedad (67 a 87%), temperaturas alrededor de 20 a 29°C y la presencia de guano. En sitios abiertos la ocurrencia del hongo generalmente está restringida a latitudes entre 45° Norte y 45° Sur. Fuera de esta zona tropical, la concentración del hongo está sujeta a condiciones ambientales apropiadas. (28- 31).

## Morfología.

*Histoplasma capsulatum* es el estado anamórfico de un Ascomyceto heterotálico, cuyo estado telomórfico o perfecto (fase sexual) es *Ajellomyces capsulatus*, el cual se clasifica en la familia Gymnoascaceae. Este hongo presenta dimorfismo, como muchos de los hongos que producen micosis sistémicas, esto es, tiene una forma micelial o fase filamentosa (saprobia) que se desarrolla en el medio ambiente y en cultivos a 25-28°C, en esta se pueden distinguir dos tipos de colonias: Las tipo A (albas, la cual tiene hifas aéreas blancas y macroconidias lisas. Las tipo B (Brown) son de color pardo claro a oscuro y macroconidias tuberculadas. Ambas tienen un aspecto algodonoso, liso o cerebriforme. (1, 2, 28, 29, 32, 33).

Bajo observación microscópica presenta hifas septadas que miden de 1.2 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con dos tipos de conidios los microconidios redondos piriformes o clavados, de pared lisa de 1 a 4 x 2 a 6  $\mu\text{m}$ , sésiles o unidos a pequeños conidióforos y los macroconidios (Fig. 1) redondos de 8 a 14  $\mu\text{m}$  de diámetro, los cuales tienen proyecciones digitiformes que son típicas de la especie y se adhieren a las hifas por conidióforos cortos generalmente formando un ángulo aproximado de 90°C con las mismas. El tipo B produce mayor número de microconidios que el tipo A. (fig. 2) (28, 29, 32, 33).

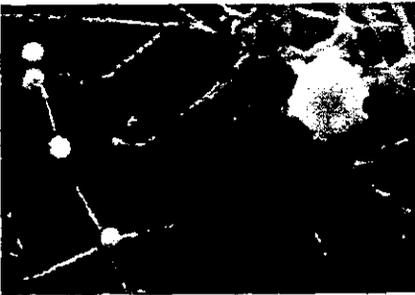


Fig. 1. Microfotografía que muestra un macroconidio con sus proyecciones digitiformes. Tomado de Wheath J. MD. 1999 (31).

La morfología colonial de *H. capsulatum* no se puede distinguir de la de algunos hongos filamentosos blancos que aparecen como contaminantes, de modo que se hace necesario demostrar la existencia de los macroconidios tuberculados y la conversión a la fase levaduriforme del microorganismo, la cual se obtiene al incubar en agar sangre o agar infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C. Dos especies de hongos *Chrysosporium spp.* y *Sepedonium sp.* también producen macroconidios equinulados que pueden llevar a error, sin embargo estos no forman levaduras en BHI a 37°C. (28)

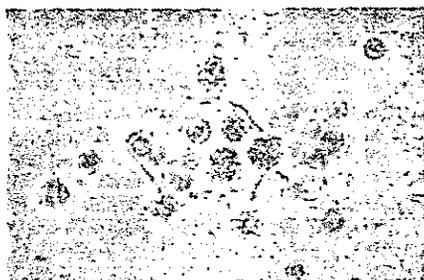


Fig. 2. *H. capsulatum*. Aspecto microscópico donde se observa micelio fino y septado y gran cantidad de macroconidios equinulados. Tinción con azul de algodón (28).

La fase levaduriforme, parasitaria o virulenta de *H. capsulatum* se desarrolla a 37°C y forma colonias opacas, húmedas, al principio son blancas, lisas y pegajosas, en la morfología microscópica se observa una mezcla de pseudohifas, hifas en proceso de conversión y levaduras no gemantes. Posteriormente la colonia toma un aspecto cremoso y su examen microscópico permite observar levaduras ovoides, 2 a 4 µm de diámetro que se reproducen por gemación, permitiendo el establecimiento de la infección. Los blastoconidios se encuentran en el extremo angosto de la levadura, tienen un cuello estrecho con aspecto de fino filamento. Esta última característica permite diferenciar las levaduras de *H. capsulatum* de las formas pequeñas de *B. dermatitidis*, cuyas células son multinucleadas con gemas de base ancha. (9-10,28, 29, 32-34).

A nivel tisular, en el hospedero infectado, *H. capsulatum* desarrolla levaduras pequeñas de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, de forma oval, gemantes, con un gran núcleo y carecen de cápsula, aunque en las preparaciones teñidas se observa un halo refringente que simula la cápsula; estas formas son de localización intracelular en macrófagos, células gigantes y polimorfonucleares. (Fig. 3) (29, 31).



Fig. 3. En esta microfotografía se observan levaduras dentro de un macrófago. 100x. Tomado de Wheath J. MD. 1999 (31).

#### **Patogenia y Manifestaciones Clínicas.**

A partir de la inhalación del hongo, éste desciende por el árbol respiratorio hasta bronquiolos y alvéolos; se produce una alveolitis y reacción inflamatoria, las células de defensa son parasitadas y algunas transportan al hongo a otras regiones anatómicas. En el sitio de establecimiento inicial se desarrolla una respuesta celular y la formación de tubérculos idénticos a los que se presentan en el caso de tuberculosis. Al igual que en la tuberculosis pulmonar, se puede presentar linfangitis y adenitis y formas cavitarias progresivas crónicas. (29).

La gran mayoría de las personas infectadas son asintomáticas o presentan síntomas tan leves que no requieren atención médica. Si es que hay síntomas, generalmente empiezan 3 a 17 días después de la exposición, con un promedio de 10 días; puede aparecer como una enfermedad respiratoria tipo influenza leve y tiene una combinación de síntomas que incluyen decaimiento (sensación de enfermedad), fiebre, dolor de pecho, tos seca no productiva, cefalea, anorexia, disnea, mialgias, artralgias, escalofríos y ronquera.

Una radiografía de tórax puede mostrar hallazgos específicos en los pulmones de la persona enferma. Fig. 4 (1-4, 6, 31).



Fig. 4. Radiografía de tórax, en la que se muestran lesiones producidas por *H. capsulatum*, están señaladas con la punta de flecha. Tomado de Wheath J. MD. 1999 (31).

La histoplasmosis presenta un amplio espectro de enfermedad, y los síntomas varían dependiendo del tipo de infección, la salud del paciente y la extensión de la exposición. Por ejemplo puede ser más severa en un trabajador que inhaló miles de esporas mientras limpia un lugar contaminado, que en un corredor que inhaló unas cuantas esporas mientras realizaba su actividad en el campo. (31).

Cualquier persona que trabaje o esté en lugares contaminados con *H. capsulatum* puede desarrollar histoplasmosis si inhala suficientes esporas propias de la fase micelial o infectante del hongo, denominados microconidios así como pequeños fragmentos de hifas contenidos en aerosoles, que penetran por vía respiratoria. Las esporas al llegar a los macrófagos alveolares se convierten dentro de este tipo celular en la fase parasitaria o virulenta del hongo. (9-10)

Después de una exposición, la severidad de la enfermedad es muy variable y probablemente dependa del número de esporas inhaladas y de la edad y susceptibilidad de la persona a contraer la enfermedad. El número de esporas que es necesario inhalar para contraer la enfermedad es desconocido. Los niños pequeños y los adultos mayores, particularmente aquellos con enfermedad pulmonar crónica, sufren mayor riesgo de desarrollar histoplasmosis sintomática. Las personas con deficiencias inmunológicas tienen mayor riesgo de desarrollar histoplasmosis severa y diseminada, este grupo se encuentran aquellas con Síndrome

de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o cáncer y las que están recibiendo quimioterapia; terapia con altas dosis de esteroides por tiempo prolongado; o terapia con otras drogas inmunosupresoras. (1-2, 4-8)

### **Espectro de la Enfermedad.**

Histoplasmosis primaria. Muchos individuos infectados con *H. capsulatum* experimentan una enfermedad inaparente que puede confundirse con influenza. El estudio radiológico revela lesiones focales múltiples dentro de los pulmones denominados granulomas que a menudo son calcificados y representan un esfuerzo del cuerpo para restringir la diseminación de la infección. Dentro de una misma persona todas las lesiones presentan las mismas características histopatológicas. La diseminación del organismo ocurre vía linfahematogena a los órganos reticuloendoteliales como ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. (3,6,29, 32)

Histoplasmosis diseminada. En pacientes con enfermedad diseminada, las lesiones pueden aparecer no solamente en el sistema reticuloendotelial sino también en órganos que contienen relativamente pocos macrófagos. (piel, corazón, cerebro, etc.) La colonización extensiva de una amplia variedad de tejidos es el resultado presumiblemente de una disminución en la inmunidad celular asociada con la histoplasmosis diseminada. (6,29, 32)

Los pacientes se pueden recuperar de esta forma de la enfermedad, pero *H. capsulatum* no es necesariamente eliminado del cuerpo y puede establecerse una infección latente que puede reactivarse. La inmunosupresión por quimioterapia se asocia con algunos de los casos de reactivación, los casos restantes se explican por una alteración de la fisiología o estado inmune del individuo. (6,29, 32)

Histoplasmosis pulmonar crónica. Resulta de una infección exógena primaria o reinfección con esporas de *H. capsulatum*. El factor predisponente más común es el tabaquismo (fumadores de 30 a 50 cigarrillos

diarios). En este tipo de fumadores se presenta enfisema centrilobular, condición que proporciona las condiciones ambientales adecuadas para el hongo, permitiendo que se establezca una infección persistente explicando la naturaleza crónica de la enfermedad. Frecuentemente se asocia con signos y síntomas de enfermedad broncopulmonar obstructiva crónica. Las lesiones son limitadas a los pulmones, las características clínicas tempranas y tardías son similares a la tuberculosis pulmonar crónica. La expectoración es un síntoma usual en esta forma de la enfermedad.(4,6,29,32, 35)

Mediastinitis fibrosa. Es la forma menos común pero más seria de la histoplasmosis. Se extiende de las glándulas linfoides localizadas en el pecho a importantes estructuras cercanas como las que tienen grandes vasos sanguíneos entrando al corazón o pulmones, bronquios, la tráquea y el esófago. Esta forma representa una respuesta a un primer episodio de histoplasmosis más que a una infección activa y a menudo es progresiva causando una variedad de complicaciones serias. (31).

Histoplasmosis ocular. Se cree que las esporas de *H. capsulatum* se diseminan de los pulmones al ojo, alojándose en la membrana intermedia del globo, una capa de vasos sanguíneos que proveen de sangre y nutrientes a la retina, aunque en este sitio no es nada fácil detectar al hongo; este padecimiento se conoce como Síndrome de Histoplasmosis ocular. Este síndrome se presenta especialmente en individuos que tienen el tipo HLA B7 y DRw2, además de una inmunidad celular disminuida. (32, 36).

### **Epidemiología.**

La distribución de *H. capsulatum* es cosmopolita, en los Estados Unidos, el hongo es endémico y la proporción de personas infectadas es mayor en los estados del este y centro, especialmente a lo largo de los valles de los ríos Ohio, Mississippi, St. Lawrence y río Grande; la manipulación de material contaminado hace que las pequeñas esporas de *H. capsulatum* se hagan volátiles siendo fácilmente transportadas por corrientes de viento a grandes distancias. (6, 11-13)

En México el hongo 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, estas condiciones ambientales son las adecuadas para su desarrollo. (14-16)

Los datos sobre prevalencia y panorama epidemiológico de la histoplasmosis en nuestro país están rezagados, dispersos y poco difundidos. A partir de 1988 se iniciaron los registros oficiales por parte del organismo de difusión epidemiológica de la SSA, la DGE, donde hasta 1994 se reportaron 1065 casos de histoplasmosis en todo el país. Los informes de esta enfermedad en México se refieren principalmente a la forma epidémica y los casos reportados por la DGE son básicamente brotes. Cabe señalar que la histoplasmosis endémica ha sido poco estudiada y caracterizada en el país. El diagnóstico inadecuado, la carencia de información médica especializada y el desconocimiento de datos actuales sobre las áreas endémicas del país en donde existen probablemente muchos casos mal diagnosticados ha generado el rezago antes mencionado. Recientemente Martínez-Rivera, Vaca-Marín y col. han elaborado estudios retrospectivos sobre la epidemiología, en estos se intenta advertir a las autoridades de salud sobre la actual prevalencia y distribución de la enfermedad en el país y proponer mecanismos para su reincorporación al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE), así como criterios para la asignación de su endemidad en el país. (18, 37).

### **Inmunología.**

Durante el encuentro inicial el hospedero expuesto a las esporas y pequeños fragmentos de hifas de *H. capsulatum*, las inhala y entonces se lleva a cabo el primer evento en la patogénesis, la conversión de la forma saprobia (espora) a la forma parasitaria (levadura) que es relativamente rápido en los macrófagos; la fagocitosis de microconidios y pequeños fragmentos de micelio toma de 4 a 6 horas, y la conversión a la

fase de levadura es aparente a las 24 horas y se completa dentro de las 72 horas. La transición a la fase de levadura es un requerimiento absoluto para la progresión de la enfermedad; la transición de micelio a levadura no es esencial para el crecimiento a altas temperaturas, pero es requerida para establecer una infección exitosa.(32)

La característica más consistente de la histoplasmosis es la capacidad del hongo para parasitar macrófagos. Una vez ingeridos y dentro del fagosoma, las levaduras continúan multiplicándose, así en contraste con el papel de las células fagocíticas profesionales de eliminar microorganismos, en el pulmón los macrófagos proveen un ambiente para que *H. capsulatum* continúe creciendo y facilita su diseminación a otros tejidos. El ambiente intracelular provee ventajas únicas para la sobrevivencia del hongo, incluyendo los mecanismos no específicos de defensa y el acceso a otros órganos vía la corriente sanguínea y ganglios linfáticos. También hay ventajas en las condiciones nutricionales especiales para el crecimiento intracelular. Por ejemplo el crecimiento de *H. capsulatum in vitro* depende de la producción de sideróforos de ácido hidroxámico para secuestrar hierro. (32)

El ambiente dentro de los fagocitos profesionales es complejo, cambiante y generalmente hostil para los microorganismos, los patógenos intracelulares se encuentran con una serie de obstáculos para entrar sin ser destruidos. En el caso de *H. capsulatum*, la evolución de estrategias eficientes de sobrevivencia son especialmente sorprendentes porque la fase de levadura no es requerida para su sobrevivencia y proliferación en el suelo. (32)

Se han identificado receptores para la unión de *H. capsulatum* con los fagocitos profesionales, las levaduras se unen a la familia de receptores CD18 en macrófagos derivados de monocitos humanos, macrófagos alveolares y polimorfonucleares; los macroconidios se unen también a este receptor. Coordinado con la fagocitosis de microorganismos, los fagocitos liberan una variedad de metabolitos de

oxígeno tóxicos: superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular y radicales hidroxilo; sin embargo una gran variedad de microorganismos patógenos frustran esas defensas, por ejemplo *Nocardia asteroides* resiste el mecanismo de muerte oxidativa porque libera superóxido dismutasa y posee catalasa. En cepas de *H. capsulatum* se ha encontrado que tienen diferentes cantidades de catalasa, los niveles de esta enzima no se correlacionan con su virulencia. Este hongo ha desarrollado un mecanismo para lograr sobrevivir dentro del fagosoma minimizando la acidificación que se produce en las vesículas no se conoce exactamente como ocurre esto. Las levaduras pueden crecer en un medio con pH entre 5 y 10, sin embargo *H. capsulatum* modula su ambiente así que el pH del medio llega a ser neutral, un fenómeno similar ocurre con *Mycobacterium tuberculosis*, del cual se conoce que libera amoníaco y crece dentro de los macrófagos. (32, 49)

La proliferación del *H. capsulatum* dentro de los macrófagos termina con el desarrollo de la inmunidad mediada por células y la correspondiente activación de macrófagos. Esto lleva a la inhibición del crecimiento pero no a la muerte completa de las levaduras intracelulares. La falla en la activación de estas células conduce a una infección persistente en el hospedero. (32, 45, 46)

Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> juegan un papel importante en la resistencia del hospedero al hongo, aunque las células T CD8<sup>+</sup> no son cruciales, son requeridas para la óptima eliminación de *H. capsulatum* de órganos infectados. Uno de los principales mecanismos por los cuales las células T contribuyen para la eliminación de *H. capsulatum* es la liberación de citocinas que activan macrófagos, las principales células efectoras para restringir el crecimiento intracelular del organismo; estas citocinas forman parte de la respuesta inmunológica tipo Th1 la cual es importante en la protección contra infecciones intracelulares incluyendo *H. capsulatum* las moléculas coestimuladoras como el CD40 ligando (CD40L) tienen un papel importante en la regulación in vivo de esta respuesta. La capacidad de CD40L-CD40 para estimular la regulación de las citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  ocurre a través de la inducción de la primera en células

presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas y el aumento en la expresión de moléculas de superficie celular coestimuladoras como B7-1 y B7-2 que llevan también a la estimulación de células T. (45-48, 50-53)

La IL-12 tiene su efecto incrementando la producción de mediadores solubles como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  por parte de células T y macrófagos. El IFN- $\gamma$  tiene un papel importante en la actividad anti-histoplasma por su actividad fungistática es decir detiene el crecimiento intracelular del hongo, esto sucede en coordinación con el TNF- $\alpha$  el cual también activa a los macrófagos para expresar su actividad fungicida a través de la síntesis de óxido nítrico, importante para la muerte intracelular del patógeno. La respuesta protectora a la infección con *H. capsulatum* es multifactorial, la respuesta inicial puede requerir de neutrófilos capaces de controlar la infección a través de un mecanismo fagocítico directo e induciendo la producción de IL-12, estos neutrófilos tienen alguna actividad fungistática. En resumen durante la infección primaria se requiere de la participación coordinada de la IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (esenciales en esta infección) y óxido nítrico que trabajan directamente o en combinación para dar muerte al patógeno intracelular. (45-48, 50-53)

En la infección secundaria los neutrófilos, el IFN- $\gamma$  y la IL-12 no son esenciales para el mantenimiento de la inmunidad (memoria inmunológica) y no son requeridos para la muerte intracelular después de la reinfección; en cambio el TNF- $\alpha$  es un importante regulador de la respuesta inmunológica protectora a la infección secundaria con *H. capsulatum* en la ausencia del IFN- $\gamma$  manteniendo una producción efectiva de óxido nítrico ejerciendo un efecto fungicida o fungistático directo contra el hongo independiente del óxido nítrico. La presencia del IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  solos es suficiente para dar muerte intracelular en ausencia de óxido nítrico. El incremento en la producción de TNF- $\alpha$  tiene efecto protector pero también tiene efectos dañinos en los hospederos. Al inicio de la infección primaria la inducción de IFN- $\gamma$  lleva al

aumento de TNF- $\alpha$ ; una vez generada la respuesta primaria efectiva el TNF- $\alpha$  y el óxido nítrico inducen un potente mecanismo de retroalimentación negativa capaz de inhibir la expansión de la respuesta. El incremento de TNF- $\alpha$  contribuye a la erradicación de *H. capsulatum* por su capacidad de inducir necrosis tumoral y alterar la integridad vascular generando daño independientemente de la carga infecciosa. La carencia de TNF- $\alpha$  durante la infección secundaria inclina al hospedero hacia una respuesta tipo Th2 en la cual hay niveles elevados de IL-4 e IL-10 que contribuyen al aumento en la susceptibilidad del hospedero. (45-48, 50-53)

Por otro lado se ha observado que la actividad del IFN- $\gamma$  puede ser antagonizada por la presencia de los interferones tipo 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ), los cuales presentan mayor afinidad por los receptores del IFN- $\gamma$  interfiriendo con la activación de macrófagos comprometiendo sus funciones efectoras, incluyendo la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduciendo la actividad contra el hongo. Los IFN- $\alpha/\beta$  son generados en bajos niveles por ciertos virus que causan inmunosupresión y susceptibilidad a infecciones oportunistas, comprometiendo las funciones efectoras de los macrófagos; el mecanismo por el cual ocurre esta interferencia es la unión competitiva por los receptores del IFN- $\gamma$ . (45)

### **Diagnóstico.**

Debido a las múltiples posibilidades clínicas, el diagnóstico diferencial es imprescindible con tuberculosis, sarcoidosis, actinomicosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, neumonías bacterianas y virales, fibrosis pulmonar y algunas otras entidades nosológicas. El diagnóstico clínico se apoya de forma importante en el radiológico; en el diagnóstico micológico se realiza examen directo y cultivo de varios materiales biológicos, también se realiza histopatología. Para el diagnóstico inmunológico se realiza una prueba intradérmica con histoplasmina e inmunoserología con pruebas como fijación de complemento, inmunodifusión, precipitación en tubo capilar y estudios inmunoenzimáticos. (28-31)

Se puede saber si una persona ha sido previamente infectada con *H. capsulatum* a través de una prueba cutánea con histoplasmina. Esta prueba, similar a la prueba cutánea con tuberculina, está disponible en el consultorio de muchos médicos y clínicas médicas. La histoplasmina se prepara partiendo de un cultivo de fase micelial del hongo, se incuba durante 4 meses y se filtra, este filtrado es el que se conoce como histoplasmina. Otros investigadores proponen el uso de un antígeno diferente para esta misma prueba, el cual se obtiene de un cultivo de fase de levadura, a este se le realizan extracciones con solventes orgánicos y se obtiene un extracto polisacárido denominado histoplasmin, se usa igual que la histoplasmina, pero se presenta mayor reactividad hacia él. (6,38)

La infección previa puede otorgar inmunidad parcial contra la reinfección. Dado que una prueba cutánea positiva no significa que una persona sea completamente inmune a la reinfección, se deben tomar medidas apropiadas de protección contra la exposición, en cualquier situación donde se manipulen materiales que puedan estar contaminados con *H. capsulatum* independientemente de la prueba cutánea positiva. (6)

Para saber si el suelo o el guano están contaminados con *H. capsulatum*, deben tomarse muestras para cultivo. Actualmente, el método usado para aislar *H. capsulatum* es caro y requiere varias semanas para completarlo. Si no se toman suficientes muestras, las áreas pequeñas pero muy contaminadas pueden ser ignoradas. Hasta que exista un método más rápido y menos caro, el examen de muestras seguirá siendo poco práctico para la mayoría de las situaciones. Consecuentemente, cuando no se hace un examen extensivo, el enfoque más seguro es asumir que el suelo en regiones endémicas y cualquier acumulación de guano de murciélago o pájaros, están contaminados con *H. capsulatum* y por lo tanto, tomar las medidas necesarias para prevenir la infección. (6)

## **Tratamiento.**

Los casos leves de histoplasmosis generalmente se resuelven sin tratamiento, los severos requieren medicamentos especiales fungicidas para controlar la enfermedad. La histoplasmosis diseminada es fatal si no se trata, pero la muerte también puede ocurrir aún cuando se reciba tratamiento médico. El tratamiento de elección es la administración intravenosa de anfotericina B, el blanco de ésta es el ergosterol presente en la membrana citoplásmica del hongo, se une irreversiblemente a este esterol, resultando en el rompimiento de la integridad de la membrana y finalmente la muerte, la anfotericina B es considerada por algunos como el "estándar de oro". Actualmente se está trabajando en el desarrollo de nuevas formulaciones antifúngicas dirigidas a nuevos blancos en el hongo. (1,6, 30, 39)

## **Prevención.**

La mejor forma de prevenir la exposición a las esporas de *H. capsulatum* es evitar aquellas situaciones donde los materiales contaminados puedan hacerse volátiles y las esporas ser subsecuentemente inhaladas. Esto es especialmente importante para aquellas personas con depresión del sistema inmunológico. (2,6,17)

Los métodos de supresión de polvo, tal como humedecer cuidadosamente con agua, pueden ser útiles para reducir la cantidad de material que se volatiliza durante algunas actividades, tales como remover una acumulación de guano de murciélago o pájaro desde un lugar cerrado, como un ático, también debe usarse un respirador aprobado por el Instituto Nacional de Salud Ocupacional (NIOSH) del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) y otros artículos de protección personal pueden ser necesarios para disminuir el riesgo de exposición a *H. capsulatum*. Sin embargo, sólo las personas entrenadas en la selección y el uso adecuados del equipo de protección personal deben llevar a cabo actividades donde este equipo sea requerido. Los desinfectantes han sido usados ocasionalmente para tratar el suelo y la acumulación de guano de murciélago o pájaros, cuando la remoción ha sido imposible, o como

una precaución antes de iniciar el proceso de remoción. Las soluciones de formaldehído son los únicos desinfectantes que han probado ser efectivos para descontaminar suelos que contienen *H. capsulatum*. Dado que las consecuencias para la salud debidos a la exposición al formaldehído pueden ser potencialmente graves, este reactivo debe ser manejado solamente por personas que saben como aplicarlo en forma segura. (6)

A continuación hay una lista parcial de actividades que tienen riesgo de exposición a esporas de *H. capsulatum*. Para prevenir la exposición deben tomarse las medidas adecuadas por estas personas, cuando se manipule suelo contaminado, o guano de murciélago o pájaros. (6,17)

Inspector o pintor de puentes, Trabajador de la construcción o demolición.

Aseador de chimeneas, Restaurador de edificios históricos o abandonados.

Granjero, trabajador agrícola, Jardínero, Trabajador de control de plagas.

Instalador o agente de servicio de sistemas de aire acondicionado y calefacción.

Trabajador de laboratorio microbiológico.

Explorador de cuevas o Espeleólogo.

George Deepe, Jr., M.D. y sus colegas en el Colegio de Medicina de la Universidad de Cincinnati están trabajando en el desarrollo de vacunas para la protección contra *H. capsulatum* para ello utilizan una proteína hecha a través de ingeniería genética, esta proteína recombinante conocida como proteína de choque térmico 60 es idéntica a la proteína aislada del hongo originalmente denominada HIS-62. Con la proteína recombinante inmunizaron ratones y demostraron que existe protección, ahora están trabajando en la identificación del fragmento de la proteína recombinante que es capaz de proteger al ratón. Sus investigaciones son financiadas por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). (40,55)

John Bennett, M.D. recientemente encontró que la interleucina 12 (IL-12) puede ser útil en la intervención inmunológica contra la infección con *Histoplasma capsulatum*, los ratones tratados con IL-12, infectados con el hongo tenían menos levaduras en sus células de bazo, y sustancialmente disminuyó la mortalidad comparada con los animales testigo. También mostraron que el IFN- $\gamma$  bloquea el efecto terapéutico de la IL-12. (40,47,56).

### **Aspectos Moleculares.**

El aislamiento de *H. capsulatum* de distintas fuentes y procedencias permite postular diferencias genotípicas, reflejadas en cambios fenotípicos, encontrados en la morfología, fisiología y virulencia de la cepas, estas mismas diferencias aportan datos que proceden de estudios acorde con metodologías moleculares como Southern blot con sondas específicas, análisis de los perfiles polimórficos de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP) o de amplificación al azar de DNA polimórfico por el método de reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) y sirven para relacionar los aislamientos del hongo. Lo anterior ha permitido la tipificación de DNA de diferentes cepas de *H. capsulatum* estudiadas en Estados Unidos, que es utilizada en diversas 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. (19-25)

Basándose en el polimorfismo del DNA mitocondrial, que se obtiene por tratamiento con enzimas de restricción, Vincent y col. Clasificaron 23 aislamientos de *H. capsulatum* tanto de origen humano como de animal, los cuales se distribuyeron en tres clases: Clase 1 Cepas de baja virulencia y sensible a la temperatura denominada cepa "Downs". Clase 2 contiene 14 cepas de Norteamérica y dos de Africa. Clase 3, seis cepas de Centro y Sudamérica.(19) Spitzer utilizando también esta característica del DNA mitocondrial y ribosomal desarrolló un mejor procedimiento para la clasificación de aislamientos

ambientales y clínicos de *H. capsulatum* observando que la mayoría de los aislamientos clínicos y del suelo de Estados Unidos presentaron patrones idénticos a los de la clase 2 de Vincent; mientras que las de origen clínico Downs y G186B de Panamá las colocaron en las clases 1 y 3 respectivamente.(20)

Finalmente Keath y col. en 1992 propusieron un nuevo sistema para la tipificación de *H. capsulatum* con base en el análisis RFLP del gen nuclear yps-3, gen específico de la fase levaduriforme del hongo, este sistema se adicionó de una subtipificación con una sonda de DNA mitocondrial, lo cual permitió que 76 aislamientos clínicos se agruparan en 6 clases distintas, una de estas clases, la 5 tiene la particularidad de presentar 4 subclases.(22)

## Hipótesis

Si se utiliza un grupo de cepas de *H. capsulatum* aislados a partir de diferentes fuentes y poblaciones en México y se comparan molecularmente con otras cepas encontradas en países colindantes y cercanos (Panamá y Colombia) con el nuestro, entonces se podrá establecer si dichas cepas presentan alguna relación genética asociada a su distribución geográfica.

## Objetivos Generales.

- ♦ Caracterizar biológica y molecularmente las cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas a partir de la naturaleza y animales infectados localizados en diferentes áreas geográficas de la república, así como de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA.

## Objetivos Particulares.

- ♦ Comparar la técnica de aislamiento común de DNA de *H. capsulatum* con técnicas de aislamiento de DNA cromosomal más recientes.
- ♦ Clasificar al hongo *H. capsulatum* mediante la técnica de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

## Justificación.

México es considerado como un puente geográfico debido a que ocupa el límite extremo de Norteamérica y al sur con los países centroamericanos, en estos sitios los ambientes son favorables para el desarrollo de *H. capsulatum*, en los Estados Unidos predominan las cepas clasificadas como clase 2 estas cepas se aislaron de casos clínicos y de suelo, la clase 1 la constituye una cepa de baja virulencia recuperada de una paciente inmunosuprimida, las cepas aisladas de Centroamérica, particularmente Panamá, que se han

## Hipótesis

Si se utiliza un grupo de cepas de *H. capsulatum* aislados a partir de diferentes fuentes y poblaciones en México y se comparan molecularmente con otras cepas encontradas en países colindantes y cercanos (Panamá y Colombia) con el nuestro, entonces se podrá establecer si dichas cepas presentan alguna relación genética asociada a su distribución geográfica.

## Objetivos Generales.

- ♦ Caracterizar biológica y molecularmente las cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas a partir de la naturaleza y animales infectados localizados en diferentes áreas geográficas de la república, así como de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA.

## Objetivos Particulares.

- ♦ Comparar la técnica de aislamiento común de DNA de *H. capsulatum* con técnicas de aislamiento de DNA cromosomal más recientes.
- ♦ Clasificar al hongo *H. capsulatum* mediante la técnica de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

## Justificación.

México es considerado como un puente geográfico debido a que ocupa el límite extremo de Norteamérica y al sur con los países centroamericanos, en estos sitios los ambientes son favorables para el desarrollo de *H. capsulatum*, en los Estados Unidos predominan las cepas clasificadas como clase 2 estas cepas se aislaron de casos clínicos y de suelo, la clase 1 la constituye una cepa de baja virulencia recuperada de una paciente inmunosuprimida, las cepas aisladas de Centroamérica, particularmente Panamá, que se han

## Hipótesis

Si se utiliza un grupo de cepas de *H. capsulatum* aislados a partir de diferentes fuentes y poblaciones en México y se comparan molecularmente con otras cepas encontradas en países colindantes y cercanos (Panamá y Colombia) con el nuestro, entonces se podrá establecer si dichas cepas presentan alguna relación genética asociada a su distribución geográfica.

## Objetivos Generales.

- ◆ Caracterizar biológica y molecularmente las cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas a partir de la naturaleza y animales infectados localizados en diferentes áreas geográficas de la república, así como de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA.

## Objetivos Particulares.

- ◆ Comparar la técnica de aislamiento común de DNA de *H. capsulatum* con técnicas de aislamiento de DNA cromosomal más recientes.
- ◆ Clasificar al hongo *H. capsulatum* mediante la técnica de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

## Justificación.

México es considerado como un puente geográfico debido a que ocupa el límite extremo de Norteamérica y al sur con los países centroamericanos, en estos sitios los ambientes son favorables para el desarrollo de *H. capsulatum*, en los Estados Unidos predominan las cepas clasificadas como clase 2 estas cepas se aislaron de casos clínicos y de suelo, la clase 1 la constituye una cepa de baja virulencia recuperada de una paciente inmunosuprimida, las cepas aisladas de Centroamérica, particularmente Panamá, que se han

estudiado por métodos moleculares se clasifican dentro de la clase 3, según lo descrito por R.D. Vincent, y cols. en 1986 (19).

En México hay zonas donde existen condiciones ambientales apropiadas como cuevas, ambientes cerrados, que sirven como refugio de especies de murciélagos migratorios, lo que favorece la acumulación de guano, el cual funciona como fuente de nutrientes para el desarrollo de *H. capsulatum*, aunado a las condiciones adecuadas de humedad y temperatura; existen reportes de aislamientos del hongo en animales infectados y en el guano, por lo que se plantea la posibilidad de que estos funcionen como reservorios y diseminadores del hongo en la naturaleza.(14, 18, 37)

Los reportes de casos de histoplasmosis en el territorio nacional proceden de todas las entidades federativas, sin embargo, los datos están referidos a la enfermedad activa, y se desconoce la información sobre el sitio donde se adquirió la infección, también se han reportado aislamientos del hongo en muestras de pacientes con inmunosupresión o con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA), ya que esta condición favorece la infección por diferentes agentes no solo patógenos, sino también por otros microorganismos no considerados patógenos, en estas personas este tipo de micosis se presenta como una infección oportunista (18).

Actualmente en México se han iniciado los trabajos dirigidos hacia la caracterización molecular de diferentes aislados de *H. capsulatum*, utilizando las técnicas de Biología Molecular para detectar la diversidad genética entre cepas estrechamente relacionadas, y con ello generar datos que permitan conocer su epidemiología molecular en el país (18).

En el presente trabajo se empleó para la caracterización molecular de las cepas, el método de RFLP, seleccionado por ser el que más se ha utilizado en la genotipificación molecular de *H. capsulatum*.(19, 22, 26)

## Metodología.

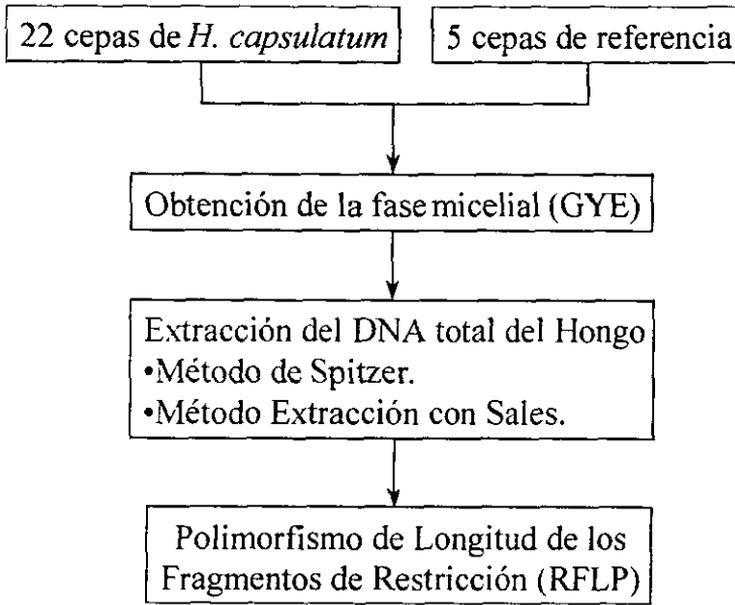


Fig. 5. Plan de trabajo general.

### Cepas de *H. capsulatum*. (Tabla 1)

Se trabajaron 22 cepas de *H. capsulatum* aisladas de diferentes orígenes geográficos y diferentes fuentes de aislamiento (clínico y naturaleza); además se contó con 5 cepas de referencia: 2 aisladas de pacientes mexicanos con diagnóstico de histoplasmosis casos clínicos no asociados a SIDA, las cepas EH-46 y EH-53; 3 cepas donadas por el Dr. G.S. Kobayashi de la Universidad de Washington, la G217B y la denominada Downs aisladas en Estados Unidos de Norte América y la G186B aislada de Panamá, todas ellas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Tabla 1. Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de *Histoplasma capsulatum* en estudio.

No. de registro.	Fuente	Origen geográfico	Comentario
EH46	Humano	México (Guerrero)	referencia
EH53	Humano	México (Hidalgo)	referencia
EH303	Humano	Guatemala (Alta Verapaz)	
EH 306	Humano	Guatemala	
EH 313	Guano	México (Guerrero)	
EH 314	Excretas de Gallo	México (Guerrero)	
EH 316	Humano (SIDA)	México (Guerrero)	
EH 317	Humano (SIDA)	México (Morelos)	
EH 319	Humano (SIDA)	México (D.F.)	
EH 325	Humano (SIDA)	México (Chiapas)	
EH 330	Humano	Colombia	
EH 331	Humano	Panamá	Ref. (G186B)
EH 333	Excretas de Zanate	Guatemala	
EH 335	Humano	EUA (Louisiana)	Ref. (G217B)
EH 336	Humano (SIDA)	EUA	Ref. ( Downs)
EH 355	Humano (SIDA)	México	
EH 356	Humano (SIDA)	México	
EH 357	Humano (SIDA)	México	
EH 358	Humano (SIDA)	México	
EH 362	Excretas de Zanate	Guatemala (Escuintla)	
EH 364	Humano	Guatemala (Guatemala)	
EH 373	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	
EH 374	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	
EH 375	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	
EH 376	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	
EH 378	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	
EH 392	Excretas de ave	México (D. F.)	

Todas estas cepas cuentan con la datos que las caracterizan como *H. capsulatum*, es decir se les ha realizado la identificación morfológica, inmunológica, transición dimórfica, determinación de la dosis letal al 50%, electrotipos de las histoplasminas y la técnica de amplificación al azar del DNA polimórfico por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) para algunas de ellas.(25,33)

Las cepas de *H. capsulatum* descritas se conservaron en refrigeración (4°C) en agar micobiótico (Bioxon, Becton-Dickinson de México) en fase micelial.

### **Obtención de la masa micelial.**

De la fase micelial en la que se encuentran cada una de las cepas se sembró en 300 mL de agar GYE (1% de extracto de levadura y 2% glucosa), se incubó a 28 °C y con agitación moderada (50 g) durante un periodo de 15 a 30 días o hasta obtener abundante masa micelial y se separó el micelio por filtración con un embudo Buchner con papel filtro de poro grueso.

A partir del filtrado concentrado, se realizó una prueba de doble inmunodifusión con un antisuero específico y antígeno de referencia, para comprobar la identidad inmunológica del hongo, ésta se llevo a cabo antes de iniciar el proceso de extracción de DNA. Cuando la identificación para *H. capsulatum* fue negativa, se descartó el micelio correspondiente. Esta prueba de identidad se realizo en el Laboratorio de inmunología de hongos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### **Extracción del DNA total del Hongo.**

Para lograr el aislamiento del DNA total de *H. capsulatum* se propusieron dos técnicas de aislamiento del mismo; de la evaluación de cada una de ellas a través de la calidad y cantidad de DNA obtenido, y por consiguiente si es posible digerirlo con la enzima de restricción a utilizar se eligió la más conveniente.

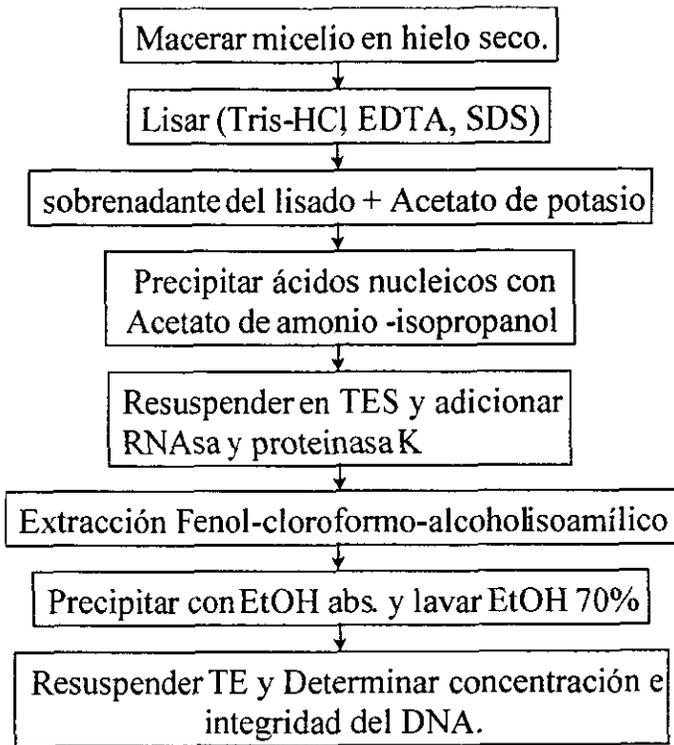


Fig. 6. Método de Spitzer. Extracción de DNA modificada para hongos.

#### Método de Spitzer (Modificado para hongos) (26)

Lavar 2 veces la masa micelial con solución reguladora TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) o con TBS, centrifugar a 3000 g durante 10 min. para recuperar el micelio y mantenerlo en congelación hasta su procesamiento.

Vaciar el micelio congelado a un mortero previamente enfriado a  $-70^{\circ}\text{C}$  y colocarlo en un lecho de hielo seco; macerar suave pero firmemente, primero en seco con la adición de trozos de hielo seco, evitando derramar el contenido del mortero; continuar rompiendo el micelio con la adición de hielo seco hasta obtener polvo fino.

Añadir aproximadamente 20 mL de solución reguladora de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 62.5 mM, SDS al 2%, pH 8.0) e incubar a temperatura ambiente con agitación moderada (50 g) durante 60 min.

Centrifugar el lisado a 3000 g por 10 min. a 4°C, separar el sobrenadante y adicionar ¼ de volumen de acetato de potasio 8 M, mezclar e incubar sobre hielo 30 min.

Centrifugar a 10,000 g durante 10 min. a 4°C, separar el sobrenadante y precipitar los ácidos nucleicos adicionando ¼ de volumen de acetato de amonio 8 M y 0.6 volúmenes de isopropanol.

Incubar 30 min. a -20°C y centrifugar a 10,000 g durante 10 min. a 4°C, resuspender los ácidos nucleicos en 3 mL de solución reguladora TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.5%).

Adicionar al DNA 50 µg/mL de RNasa (pancreática) e incubar a 37°C durante 30 min.

Adicionar proteinasa K a una concentración final de 0.5 mg/mL, incubar a 55°C por 30 min.

Extraer el DNA con un volumen igual de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) y 2 volúmenes de cloroformo : alcohol isoamílico (2:1). Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío, recuperar la malla de DNA con una punta de vidrio, lavar la malla con etanol al 70% y disolverla con solución reguladora "low" TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM).

Determinar la concentración del DNA, por espectrofotometría: midiendo la absorbencia a 260 nm y la integridad por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, comparando con el DNA del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ).

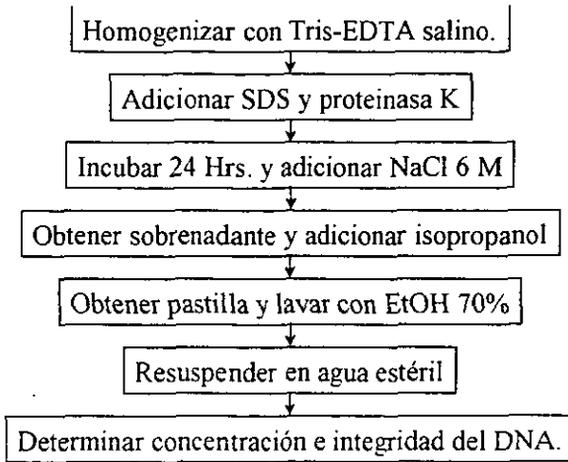


Fig. 7. Extracción de DNA genómico por sales.

#### Método rápido de extracción por sales de DNA genómico. (27)

Es un método de extracción de DNA genómico, es simple, rápido, universalmente aplicable y reproducible ya que puede ser utilizado para una gran variedad de tejidos lográndose obtener DNA de alta calidad que puede ser utilizado en diferentes técnicas de manipulación como PCR, Southern blot, clonación y digestión-restricción.

Obtener 50 a 100 mg del tejido o micelios filtrados y secos.

Homogeneizar en 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador de homogeneización salino estéril (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) utilizando un homogeneizador de tejidos Politron durante 10 a 15 segundos.

Adicionar 40  $\mu\text{L}$  de SDS al 20 % (concentración final 2%) y 8  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a 20 mg/mL (concentración final de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mezclar bien.

Incubar las muestras a 55-65°C por al menos 1 hora o toda la noche, después adicionar a cada muestra 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 6 M (solución saturada), mezclar en vórtex durante 30 segundos a máxima velocidad.

Centrifugar a 10,000 g durante 30 minutos. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos.

Añadir un volumen igual de isopropanol a cada muestra mezclar bien e incubar durante 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Centrifugar las muestras a 10,000 g durante 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Lavar la pastilla con etanol al 70%, secar y resuspender en 300 - 500  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

Determinar la concentración del DNA, por espectrofotometría midiendo la absorbencia a 260 nm y la integridad por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, con el DNA del bacteriófago  $\lambda$ .

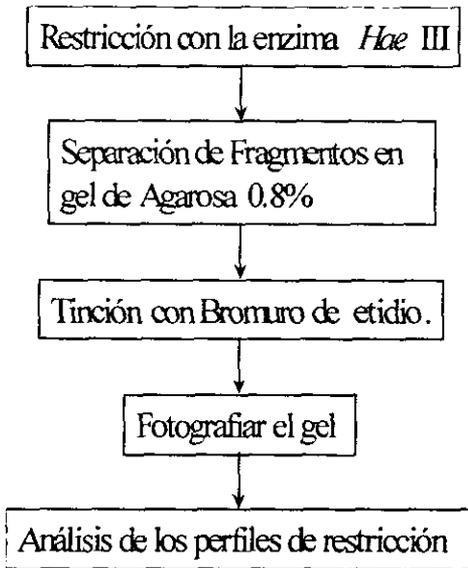


Fig. B. Obtención del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción RFLP's

### **Obtención de los perfiles de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).**

A partir de 5 µg de DNA de cada cepa, efectuar la digestión con 40-60 Unidades de la enzima de restricción *Hae* III (sigma MR.)

Separar los fragmentos de DNA obtenidos por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, utilizando un voltaje de 60 Volts durante 2 horas, teñirlos con bromuro de etidio. Utilizar como estándar de peso molecular el DNA del fago λ tratado con la enzima *Hind* III.

Fotografiar los geles con una película instantánea Polaroid 667 de alta velocidad en un transiluminador 2020 E (Stratagene) o en un documentador de imágenes "Eagle eye" (Stratagene).

Analizar los resultados de estos perfiles construyendo las matrices de datos correspondientes y agrupar las cepas de acuerdo a sus perfiles RFLP, y compararlos con los datos ya referidos en la literatura correspondiente.

## Resultados

Antes de realizar cualquiera de los procedimientos de aislamiento de DNA total del hongo, primero se les identificó como *H. capsulatum* mediante una prueba de doble inmunodifusión; los micelios que no confirmados o negativos a esta prueba fueron eliminados.

En la figura 9 se muestra el DNA obtenido con las 2 técnicas de aislamiento de DNA total.

La concentración de DNA total obtenido por el método de Spitzer fue de 305  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los cuales fueron calculados con la relación:  $1 \text{ As}_{260} = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . (26)

Cálculo:  $\text{As}_{\text{conc}} = \text{As}_{260} \times \text{dilución} = R \times 50 \mu\text{g}/\text{mL} = \mu\text{g}/\text{mL}$

Del espectrograma:  $\text{As}_{260} = 0.142$  por lo tanto  $\text{As}_{\text{conc}} = 0.142 \times 50 = 7.1 \times 50 \mu\text{g}/\text{mL} = 305 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

La concentración de DNA total obtenido por el método rápido de extracción por sales fue de 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esta concentración se calculó utilizando la relación anterior. (27)

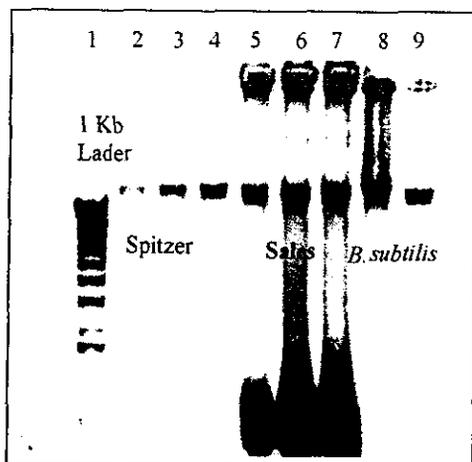


Fig. 9. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 escala de 1 kb. carriles: 2 a 4 DNA obtenido por el método de Spitzer, 5 a 7 DNA obtenido por el método rápido con sales, 8 y 9 DNA purificado de *Bacillus subtilis*. De los tres tipos de DNA se hizo una dilución 1:10 y se aplicaron 2, 4 y 6  $\mu\text{l}$  en cada carril para Spitzer y 1, 2 y 3  $\mu\text{l}$  para sales. Las concentraciones de cada uno de los DNA sin diluir fueron: Spitzer 305  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sales 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de *B. subtilis* 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La digestión del DNA total de las cepas de *H. capsulatum* con la enzima de restricción *Hae* III produjo 7 perfiles diferentes de los cuales 16 de las cepas corresponden al perfil tipo C, 3 al perfil tipo A, 1 al perfil tipo F y 1 al perfil tipo I, estos 4 tipos de perfil anteriormente descritos por Salas Ríos. También se encontraron 3 perfiles que no corresponden a ninguno de los anteriormente descritos y se asignaron como perfil tipo K, L y M respectivamente. (Figuras 11 y 12). (42)

Todos los perfiles fueron agrupados en base a la disposición y número de bandas observadas y en relación con el marcador de peso molecular. La asignación de los nuevos perfiles se hizo partiendo de lo propuesto por Salas Ríos. Por lo que respecta a las cepas de referencia estas mostraron el perfil que ya se había descrito. La tabla 2 resume los datos de los perfiles obtenidos tanto de las cepas en estudio como las de referencia así como su fuente de aislamiento y origen geográfico. (42)

Las 14 cepas con perfil tipo C se muestran en la figura 11, en esta misma figura se muestra el perfil de las cepas de referencia EH46 y EH53 ambas con perfil tipo C. En la figura 12 se muestran los perfiles tipo A, F, e I, así como los perfiles tipo K, L y M. Con la disposición y número de bandas en relación con el marcador de peso molecular obtenido de estos corrimientos electroforéticos se construyó una matriz de valores de pesos moleculares expresados en kilobases (kb) de cada banda. El cálculo de estos se determinó según Sambrook et al. graficando en papel semilogarítmico los valores de los estándares de peso molecular vs distancia de corrimiento y extrapolando las distancias de las bandas presentes en cada perfil. Por último para los valores de la matriz se dieron valores arbitrarios de 0 y 1; el 1 indica la presencia de la banda y el 0 la ausencia de la misma (Tabla 3). El perfil polimórfico del DNA de cada cepa se determinó con los datos integrados en esta matriz. (41)

La figura 10 muestra los perfiles representativos del polimorfismo de DNA obtenidos por Salas Ríos y colaboradores (42) en la cual se observan los distintos perfiles encontrados en el grupo de cepas obtenidas

de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA así como los perfiles de las cepas de referencia de Estados Unidos, Panamá y México.

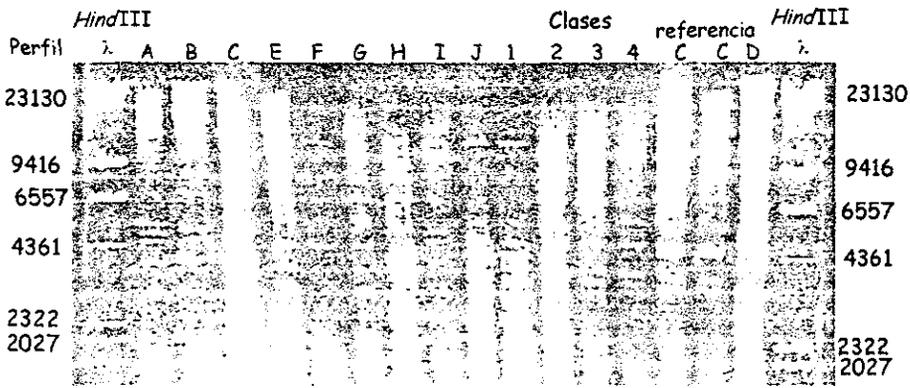


Fig. 10. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Perfiles del polimorfismo del DNA por RFLP de las cepas de *H. capsulatum*, de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA y las cepas de referencia de México, Estados Unidos y Panamá, digeridos con la enzima *Hae* III. Tomado de Salas ríos. (42)

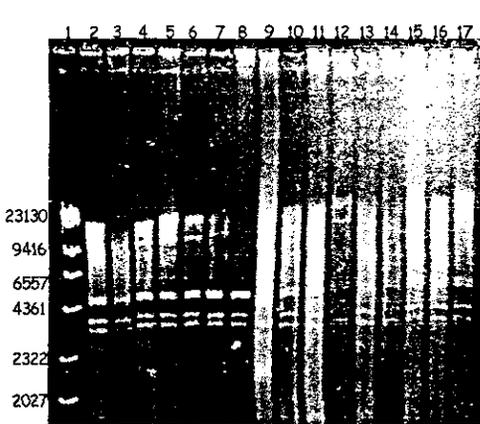


Fig. 11. Gel de agarosa al 0.8%. Tinción con bromuro de etidio. Carril 1 DNA fago  $\lambda$  cortado con *Hind* III, carriles 2 y 3 cepas de referencia EH453 y EH 46 perfil tipo C, 4 a 17 cepas con perfil tipo C.

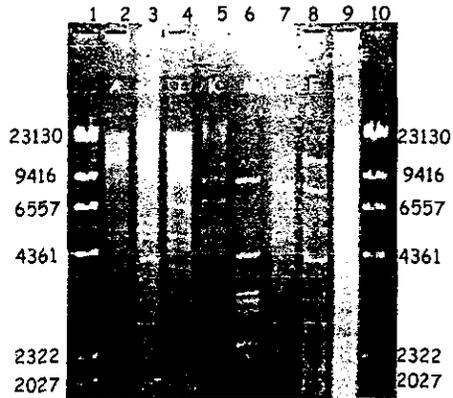


Fig. 12. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 y 10 DNA fago  $\lambda$  cortado con *Hind* III, carriles 2 y 3 perfil A, carril 4 I, carril 5 perfil nuevo K, carril 6 perfil nuevo M, carril 7 perfil nuevo L. carril 8 perfil F, carril 9 perfil clase 1.

Tabla 2. Fuentes y orígenes geográficos de los aislamientos de *Histoplasma capsulatum* en estudio. Perfiles RFLP obtenidos con *Hae* III.

No. de registro	Fuente	Origen geográfico	RFLP
EH46	Humano (referencia)	México (Guerrero)	C
EH53	Humano (Referencia)	México (Hidalgo)	C
EH303	Humano	Guatemala (Alta Verapaz)	C
EH 306	Humano	Guatemala	C
EH 313	Guano de murciélago	México (Guerrero)	K
EH 314	Excretas de Gallo	México (Guerrero)	L
EH 316	Humano (SIDA)	México (Guerrero)	M
EH 317	Humano (SIDA)	México (Morelos)	C
EH 319	Humano (SIDA)	México (D.F.)	C
EH 325	Humano (SIDA)	México (Chiapas)	I
EH 330	Humano	Colombia	C
EH 331	Humano (Ref. G186B)	Panamá	CLASE3
EH 333	Excretas de Zanate	Guatemala	C
EH 335	Humano (Ref. G217B)	EUA (Louisiana)	CLASE2
EH 336	Humano (SIDA) ( Ref. Downs)	EUA	CLASE1
EH 355	Humano (SIDA)	México	A
EH 356	Humano (SIDA)	México	A
EH 357	Humano (SIDA)	México	A
EH 358	Humano (SIDA)	México	C
EH 362	Excretas de Zanate	Guatemala (Escuintla)	C
EH 364	Humano	Guatemala (Guatemala)	C
EH 373	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	C
EH 374	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	C
EH 375	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	C
EH 376	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	C
EH 378	Murciélago ( <i>Artibeus hirsutus</i> )	México (Morelos)	C
EH 392	Excretas de ave	México (D. F.)	F

Perfiles descritos en México: A, B, C, D, E, F, G, H, I y J. (42)

Perfiles descritos en Estados Unidos: Clase 1, clase 2 y clase 3.(19)

Guatemala y Colombia: no se han descrito perfiles.

La ← denota perfiles nuevos.

Tabla 3. Matriz de datos de perfiles de RFLP obtenidos con la enzima *Hae* III de las cepas de *H. capsulatum*.

Cepas en estudio																				
Cepa	Perfil	Kb																		
		15	13	12	9.3	8.0	7.0	6.3	5.0	4.8	4.6	4.3	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0	2.7	2.5	2.3
EH355	A	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EH356	A	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EH357	A	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EH303	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH306	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH317	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH319	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH330	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH333	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH358	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH362	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH364	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH373	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH374	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH375	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH376	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH378	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH392	F	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EH325	I	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EH313	K*	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EH314	L*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1
EH316	M*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Cepas de referencia																				
EH46	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH53	C	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
EH331	3 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
EH335	2 <sup>1</sup>	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
EH336	1 <sup>1</sup>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0

\*Perfiles nuevos. <sup>1</sup> Clase según Vincent et al.(19).

Los pesos moleculares en Kb calculados según Sambrook (41). 0 y 1 son valores arbitrarios asignados para la construcción de la matriz, el 0 indica ausencia de la banda y el 1 indica presencia de la banda.

## Análisis de resultados.

El número de cepas que se procesaron aunque pocas son muy importantes dadas las dificultades técnicas que tienen que sortearse para poder obtenerlas ya que la primera de ellas representa un verdadero logro pues el tener la cepa pura implica mucho trabajo porque el material del cual se recupera *H. capsulatum* viene siempre acompañado de un gran número de hongos filamentosos y levaduras asociadas al hábitat de *H. capsulatum* que al crecer más rápido, dificultan su aislamiento; por ello se hace necesario el uso de cicloheximida para reducir el número de contaminantes: sin embargo algunas de las levaduras son resistentes al antibiótico, pero su morfología (colonial y microscópica) reduce las posibilidades de confusión. Por lo que respecta al aislamiento del hongo de muestras en teoría más limpias como son las que provienen de pacientes o animales infectados, se ha informado que estas también pueden venir acompañadas por estas levaduras u hongos filamentosos, que son saprobios en su mayoría pero algunos de ellos son potencialmente patógenos al hombre y animales de sangre caliente. Algunos de estos hongos están apareciendo como causantes de infecciones sistémicas oportunistas en pacientes con SIDA. (43-44).

Para obtener el DNA total de *H. capsulatum* se propusieron dos técnicas de aislamiento del mismo: el método de Spitzer y el método rápido de extracción por sales de la evaluación de la calidad y cantidad resultante del material procesado por ambas técnicas, entendiéndose por calidad que el DNA obtenido no se encuentre degradado, es decir que no sufra nucleólisis inespecífica; ambos métodos permiten la obtención de material de buena calidad, además este material también es susceptible de ser cortado por la enzima de restricción *Hae* III produciendo perfiles adecuados. Se eligió el método rápido de extracción por sales debido a que el rendimiento (cantidad de DNA) obtenido es el doble (600 µg/mL) comparado con la primera metodología (Spitzer), esto lo observamos en el gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (figura 9) y por la cuantificación espectrofotométrica; en el método de Spitzer obtuvimos 305 µg/mL. (26,27)

Otra característica que vale la pena mencionar es que en el método rápido de extracción por sales utiliza menos reactivos y se requiere un menor tiempo para su realización, la desventaja es que junto con el DNA se obtienen otras impurezas, como la gran cantidad de RNA y otros materiales insolubles, los cuales no interfieren con el proceso de restricción.

Como resultado de la digestión del DNA de las cepas estudiadas hasta el momento, 16 de las cepas corresponden al perfil C, tres al perfil A y una para cada uno de los perfiles F e I descritos por Salas Ríos, encontramos al menos tres perfiles nuevos o diferentes a los antes publicados en México. (42)

Salas Ríos y cols. empleando únicamente el método de RFLP en el grupo de cepas recuperadas de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA encontró 10 perfiles claramente diferenciables en cada una de sus cepas, lo mismo sucede con las cepas que nosotros estudiamos la mayoría de los perfiles que se obtuvieron corresponden a esta clasificación y solo 3 resultan ser nuevos o diferentes, porque no corresponden a ninguna de las clasificaciones publicadas; el tipo K tiene un triplete de bandas idéntico al perfil tipo A (5, 4.8 y 4.6 Kb) y 2 (9.3 y 7 Kb) que no corresponden a ninguno de los tipos; el tipo L integrado por 7 bandas 5 de ellas por debajo de 3.6 Kb (3.4, 3.2, 3, 2.5 y 2.3 Kb) el límite inferior del resto de los perfiles, las otras dos bandas son de 9.3 y 6.3 KB; el perfil M esta compuesto únicamente por 3 bandas (8, 4.8 y 4.3 Kb) que son diferentes del tipo F, además los perfiles de Salas y los aquí encontrados no corresponden a ninguna de las clases 1, 2, 3 y 4 descritas en la literatura obtenidas también por RFLP. (19, 22, 42)

Los perfiles obtenidos por RFLP de las cepas estudiadas mostraron un claro predominio del tipo C (63.6 %) ya que 14 de las 22 cepas estudiadas presentaron éste, seguida por el perfil tipo A (13.6%), ambos son los que en el trabajo de Salas Ríos se reportan como predominantes en nuestro país y pueden ser sugeridos como perfiles geográficamente regionales. (42)

El resto de los perfiles fueron únicos, las cepas de referencia de México EH46 y EH53 presentaron por este método, el perfil tipo C: este hecho permite considerar la probable abundancia de cepas con esta organización génica en el territorio nacional, además las cepas procedentes de Guatemala y Colombia también presentaron esta clase de organización génica, lo cual hace pensar que este tipo de perfil no solo se encuentra en el sureste de México sino que su abundancia va más allá de nuestras fronteras. Cabe mencionar que el perfil tipo C no solo se encontró en cepas recuperadas de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA, sino en aquellas recuperadas de pacientes con histoplasmosis, murciélagos infectados y excretas.

Los 3 perfiles nuevos sumados a los 10 propuestos por Salas Ríos indican que en México existe una mayor variedad genética de las cepas de *H. capsulatum* que lo reportado para el territorio norteamericano donde Vincent et al. describe 3 tipos de perfiles diferentes (asignados como clases) y con el predominio de la clase 1 en 20 cepas de origen humano y animales. (19)

Keath et al. encontró que de 45 aislados del medio oeste de EUA 41 (91%) correspondían a la clase 2 y solo 4 (9%) a la clase 1. En este mismo estudio pero utilizando la sonda génica yps-3 que es una sonda dirigida a un gen específico de la fase levaduriforme de *H. capsulatum*, para clasificar sus aislados describen la existencia de una clase 5 con 4 subclases y una clase 6, incluyeron cepas procedentes de países con clima tropical como Panamá y Puerto Rico, aunque estas cepas fueron pocas (11 cepas) mostraron una gran diversidad genotípica comparados con el número de aislados de EUA ya que estas cepas fueron clasificadas en las clases 3, 5a, 5b, 5c y 6. (22)

Nuestro trabajo y el de otros autores indica que en México una gran variabilidad genética entre las cepas estudiadas hasta el momento pues se tiene un total de al menos 13 perfiles diferentes claramente diferenciables entre 46 cepas estudiadas utilizando solo el método de RFLP. (42)

La variabilidad genética observada en México para las cepas de *H. capsulatum*, posiblemente sea el resultado de los factores ambientales sobre el hongo, como la alta tasa de crecimiento y las presiones resultantes de los diferentes climas (tropicales y subtropicales) que se presentan en nuestro territorio y que pueden favorecer el predominio de una determinada cepa resultante de una clona en particular o de mecanismos de recombinación genética, ya que *H. capsulatum* es un hongo que presenta una fase sexuada cuyo estado teleomórfico se denomina *Ajellomyces capsulatum*.

Las 3 cepas nuevas encontradas proceden del estado de Guerrero, éstas son de origen diferente (guano, excretas de gallo, humano) por lo tanto estén sometidas a diferentes presiones en su nicho ecológico, generando así una heterogeneidad genética, la cual se manifiesta en características genotípicas y fenotípicas diferentes en las cepas (p. ej. virulencia); por otra parte el estado de Guerrero se caracteriza por tener localidades donde hay un elevado porcentaje de primocontacto (80-87%) y otras con infección casi nula (4.7%), esto se debe a las actividades ocupacionales desarrolladas y el contacto con el hongo guardan una estrecha relación, así, los guías turísticos de cavernas, colectores de guano y cuidadores de gallos de pelea tienen mayor riesgo que las personas que se dedican a la pesca, esto enfatiza las diferencias en la distribución de la infección por *H. capsulatum* en el estado. (15,16,18)

Los estudios de epidemiología molecular efectuados hasta el momento para *H. capsulatum* se fundamentan principalmente en el polimorfismo del DNA mitocondrial y ribosomal obtenidos mediante RFLP y por hibridación con la sonda del gen *yps-3*. Estos estudios han permitido proponer clasificaciones tanto de las cepas estudiadas de casos clínicos asociadas o no a SIDA como de las recuperadas del suelo, además de relacionarlas de acuerdo a su distribución geográfica.

Los datos procedentes del estudio de Salas-Ríos y los aquí obtenidos logran asociar las cepas en grupos del A al M de acuerdo al tipo de perfil y con estudios adicionales de termotolerancia y virulencia pueden ser incluidas en la clasificación internacional descrita a la fecha. (42)

## Conclusiones.

1. Se comparó la técnica de aislamiento de DNA propuesta por Spitzer modificada para hongos con la técnica de aislamiento de DNA que utiliza sales, ambas son de gran utilidad; la segunda es más universal, menos laboriosa y proporciona un mayor rendimiento.
2. Se clasificaron 22 cepas de *H. capsulatum* en 7 tipos de perfiles diferentes a través de su RFLP.
3. Se caracterizaron biológica y molecularmente 22 cepas de *H. capsulatum* recuperadas a partir de la naturaleza (guano, excretas de aves) y animales infectados (murciélagos) localizados en diferentes zonas geográficas de la república, así como de pacientes con histoplasmosis asociada o no a SIDA.
4. Entre las cepas estudiadas por el método de RFLP se encontraron 7 perfiles diferentes claramente diferenciables, de los cuales 3 son totalmente nuevos (K, L y M) y 4 corresponden a los descritos en la literatura para las cepas mexicanas. (42)
5. El 63.6% (14) de las cepas corresponde al perfil tipo C; además este perfil se encuentra tanto en aislamientos de la naturaleza como en aislamientos de origen humano; también es el que presentan las cepas de referencia mexicanas EH46 y EH53.
6. La organización génica de las cepas con perfil tipo A y tipo C son predominantes y pueden ser propuestos como perfiles geográficos regionales.
7. El perfil tipo C es probablemente el más ampliamente distribuido está presente en el sur de México y en las cepas de Guatemala y Colombia que estudiamos.

8. No se observaron perfiles similares a las clases de Vincent et al. y Keath et al. (cepas de Estados Unidos, Panamá y Puerto Rico) pertenecientes a la clasificación internacional, entre las cepas recuperadas de diversas fuentes y orígenes geográficos tanto en México como en países ubicados hacia la frontera sur del mismo (Guatemala y Colombia), esto al menos en el grupo de cepas estudiadas. (19, 22)

Finalmente parece existir una relación génica regional entre las cepas del sur de México con las cepas procedentes de centro (Guatemala) y América del Sur (Colombia) que estudiamos, pero no con las cepas de Norteamérica usadas como referencia; entre las cepas de Guerrero los resultados indican que no hay relación, por lo tanto no podemos decir que nuestra hipótesis se cumple, se hace necesario pues realizar más estudios utilizando un mayor número de cepas para el estado de Guerrero, de otros países del centro y sur de América e incluir cepas procedentes del Norte de nuestro país. También utilizar técnicas más sensibles que utilizan el DNA cromosomal como el RAPD-PCR y no solo DNA mitocondrial como el RFLP. En estos nuevos estudios se pueden incluir estudios de virulencia y termotolerancia de las cepas.

## APENDICE 1

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES y REACTIVOS. (41)

#### AGUA DESTILADA FILTRADA Y ESTERIL.

AGUA DESTILADA: 3500 mL

1. El agua se filtra en un sistema Millipore con membranas MSI de acetato con poro de 0.22 - 0.45  $\mu\text{m}$ .
2. Envasar en un matraz de 4000 mL.
3. Etiquetar y esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

#### CLORURO DE SODIO (NaCl) 6M (saturado).

NaCl (SIGMA) 351 g.  
AGUA DESTILA c.b.p. 1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL de agua destilada.
2. Adicionar el NaCl poco a poco hasta solubilizar.
3. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
4. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
5. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
6. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
7. Enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

#### BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL)

Bromuro de etidio 1 g.  
Agua destilada 100 mL.

1. Agregar 1 g de bromuro de etidio a 100 mL de agua destilada, agite en un agitador magnético por varias horas para asegurar que el colorante se disuelva bien, colóquelo en un frasco ámbar y almacene a temperatura ambiente.

### DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 20%

SDS (SIGMA)	200 g
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL de agua destilada.
2. Calentar ligeramente.
3. Adicionar el SDS poco a poco hasta solubilizar.
4. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
5. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
6. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
7. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
8. Enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

### TRIS-HCl 2 M pH.8.0

TRIZMA BASE (SIGMA)	121.1g
TRIZMA HIDROCLORADO (SIGMA)	157.6 g
HCl CONCENTRADO (BAKER)	para ajustar el pH.
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL. de agua destilada.
2. Adicionar el TRIZMA BASE poco a poco hasta solubilizar.
3. Repetir la operación con el TRIZMA HIDROCLORADO.
4. Ajustar el pH a 8.0 con HCl gota a gota.
5. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
6. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
7. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
8. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
9. Enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

### ETILEN DIAMINO TETRACÉTICO (EDTA) 1M pH. 8.0

EDTA DIHIDRATADO (CTR)	372.26 g.
NaOH (QUIROMED)	para ayudar a la solubilización del EDTA
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se coloca 800 mL. de agua destilada.
2. Calentar ligeramente.
3. Adicionar el EDTA.
4. Adicionar el NaOH en hojuelas hasta solubilizar el primero.
5. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH.
6. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
7. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
8. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
9. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
10. Se enfría y se almacena a temperatura ambiente.

Nota: El EDTA solubiliza cuando el pH de la solución es ocho o esta muy cercano.

#### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS ACETATO EDTA (TAE 50X)

ÁCIDO ACÉTICO GLACIAR (RPQF)	57.1 mL.
TRIZMA BASE (SIGMA)	242 g.
EDTA 1M pH.8.0	50 mL.
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL. de agua destilada.
2. Adicionar el EDTA, TRIZMA base y ácido acético glacial hasta solubilizarlos.
3. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
4. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
5. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
6. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
7. Se enfría y se almacena a temperatura ambiente.

#### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS-BORATOS-EDTA (TBE 5X)

ÁCIDO BÓRICO	27.5 g
TRIZMA BASE (SIGMA)	54.0 g.
EDTA 1M pH. 8.0	10 mL.
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL. de agua destilada.

2. Adicionar el EDTA, TRIZMA base y ácido acético glacial hasta solubilizarlos.
3. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
4. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .
5. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
6. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.
7. Se enfría y se almacena a temperatura ambiente.

#### FENOL-TRIS pH. 8.0 (Equilibrado)

FENOL GRADO BIOLOGÍA MOLECULAR (SIGMA)	500 g.
TRIS 1M pH. 8.0	2000 mL.
8-HIDROXIQUINOLINA	0.5 g.

1. Fundir el fenol a temperatura ambiente.
2. Adicionar un agitador magnético libre de DN.Asas.
3. Agregar aproximadamente 500 mL. de Tris 1M pH. 8.0.
4. Agitar 10 minutos y se deja reposar.
5. Extraer la fase acuosa, a la que se mide el pH. con potenciómetro.
6. Se repiten los pasos 3, 4, y 5, de 2 a 3 veces, hasta alcanzar el pH de 8.0.
7. Adicionar 0.5g de 8-hidroxiquinolina.
8. Agitar por 10 minutos.
9. Etiquetar, Almacenar en obscuridad a 4°C.

Notas: Las soluciones denominadas TE, "Low" TE, TES, Solución reguladora de Lisis, y Amortiguador de homogeneización, se preparan mezclando las soluciones anteriores en la proporción adecuada.

Regulador	Tris-HCl	EDTA	SDS	NaCl
TE	10 mM	1 mM	---	---
"Low" TE	10 mM	0.1 mM	---	---
TES	10 mM	1 mM	---	0.5%
Lisis	50 mM	62.5 mM	2%	---
Homogeneización salino estéril	10 mM	2 mM	---	0.4 M

Todos los reguladores se ajustan a un pH de 8.0

#### RNAsa LIBRE DE DNAsa.

RNAsa PANCREÁTICA (RNAsa A)	10 mg
Acetato de Sodio 0.01 M pH. 5.2	1 mL.

Disolver RNAsa pancreática (RNAsa A) en 1 mL de acetato de sodio 0.01 M pH 5.2.

Calentar a 100°C por 15 minutos

Enfriar lentamente a temperatura ambiente.

Ajustar el pH adicionando volúmenes de 0.1 mL de Tris-HCl pH 7.4.

Separar en alícuotas de 20  $\mu$ L y Almacenar a -20°C.

#### PROTEINASA K.

Disolver 20 mg de proteinasa K en 1 mL de agua estéril.

Separar en alícuotas de 20  $\mu$ L y almacenar a -20°C.

La proteinasa K actúa entre 37°C y 65°C y no requiere pretratamiento.

#### REGULADOR AZUL DE BROMOFENOL.

Este regulador sirve para 3 propósitos: Incrementar la densidad de la muestra; asegurarse que el DNA quede uniformemente dentro del pozo; proporcionar color a la muestra, además de simplificar el proceso de carga.

Mezclar 0.25% (peso/volumen) de azul de bromofenol con 40% (peso/volumen) de sacarosa en agua.

Mezclar bien.

Hacer alícuotas y almacenar a 4°C.

Nota final: Todos los reactivos empleados deberán ser "Grado Biología Molecular", si no se cuenta con ellos, deben emplearse los reactivos de más alta calidad.

## APENDICE 2

### TECNICAS EMPLEADAS. (41)

#### Cuantificación de DNA por el método espectrofotométrico.

Colocar la muestra de DNA en tubos para microcentrifuga, adicionar agua bidestilada para realizar una dilución 1:500. Mezclar en vórtex y dar una centrifugación rápida (10000 g por 5 segundos).

Tomar la mitad de la solución anterior y colocarla en un tubo para microcentrifuga con agua bidestilada. Mezclar y dar una centrifugación rápida (10000 g por 5 segundos). Continuar con el proceso para obtener diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:4000.

Tomar lectura de las diluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .

Determinar la concentración de DNA de la siguiente forma:

Hacer una regresión lineal de las densidades ópticas obtenidas de cada una de las lecturas de las diluciones utilizando la ecuación de la recta:  $y = mx - b$ .

Utilizando los datos obtenidos en la regresión calcular los valores de densidad óptica corregida de cada una de las diluciones y con este valor obtener la concentración de la muestra de acuerdo a lo siguiente:

Una densidad óptica (D.O.) = 1.0 corresponde a 33  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena sencilla/mL y a 50  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena doble.

#### Cuantificación de DNA por el método de minigel.

Este método proporciona una forma rápida y conveniente para medir la cantidad de DNA y analizar al mismo tiempo su estado físico.

Mezclar 2  $\mu\text{L}$  de la muestra de DNA con 0.4  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol y colóquelo en un pozo del gel de agarosa al 0.8 % que contiene bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Mezclar 2  $\mu\text{L}$  de diferentes diluciones de una solución estándar de DNA (0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con 0.4  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol.

Efectuar la electroforesis hasta que el colorante haya migrado aproximadamente 1 a 2 cm.

Fotografiar el gel usando irradiación con luz UV y compare la intensidad de fluorescencia de el DNA desconocido con los del DNA estándar y estime la cantidad de DNA en la muestra.

### **Extracción con Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico. (25:24:1)**

Una mezcla consistiendo de partes iguales de fenol equilibrado y cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) se emplea para remover proteínas de preparaciones de ácidos nucleicos. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica, y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción. Además, aunque el fenol desnaturaliza proteínas eficientemente, no inhibe completamente la actividad de RNAsas y es un solvente para RNA con cadena de poli A grande, este problema se soluciona usando la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción subsiguiente con cloroformo remueve trazas de fenol de la preparación de ácidos nucleicos, para que en el futuro, las trazas de fenol no inhiban a las enzimas (de restricción, polimerasas etc.).

El cloroformo y el alcohol isoamílico no requieren tratamiento previo para su uso. La mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico se almacena con Tris-HCl pH 8.0 en frascos ámbar a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta 1 mes.

### **Técnica.**

Adicionar un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico a la muestra de ácidos nucleicos en un tubo 1.5 mL de polipropileno con tapa.

1. Mezclar hasta formar una emulsión.
2. Centrifugar la muestra a 12000 g por 15 segundos en una microcentrifuga a temperatura ambiente. Si la fase orgánica y acuosa no se separaron bien centrifugar otra vez por mayor tiempo y velocidad.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y descarte la fase orgánica.
4. Repetir los pasos 1 a 4 hasta que no se observen proteínas en la interfase de las fases acuosa y orgánica.
5. Adicionar un volumen igual de cloroformo y repita los pasos 2 a 4.

6. Recuperar el DNA por precipitación con etanol frío o isopropanol ajustando la concentración de cationes monovalentes hasta 0.5 de NaCl, mezclar bien y agregar dos volúmenes del etanol frío o un volumen de isopropanol frío y vuelva a mezclar bien.
7. Colocar la solución en hielo y permita que el DNA precipite, generalmente se requieren 15 a 30 minutos, pero si el tamaño del DNA o su concentración son pequeños el período de almacenaje debe extenderse a una hora y adicionar cloruro de magnesio a una concentración final de 0.01 M.
8. Recuperar el DNA por centrifugación a 0°C, a 12000 g por 10 minutos.
9. Retirar el sobrenadante, cuidadosamente sin mover la pastilla (la cual puede ser invisible, esto indica que el DNA está muy limpio de sales).
10. Lavar con etanol al 70% agregando este al tubo y centrifugar como en el paso anterior.
11. Repetir el paso 10 y disuelva la pastilla que a menudo es invisible en el volumen deseado de TE o Agua destilada estéril.

Notas:

Si el fenol no esta bien equilibrado el DNA puede pasar a la fase orgánica.

Normalmente, la fase acuosa se forma en la fase superior, sin embargo, si la fase acuosa es densa a causa de sales se forma abajo. La fase orgánica es fácilmente identificable porque contiene el color amarillo de la hidroxiquinolina que se adiciona al fenol durante la equilibración.

Para realizar una mejor recuperación del DNA, la fase orgánica y la interfase pueden ser reextraídas después de que la fase acuosa ha sido transferida a otro tubo, adicione un volumen igual de TE pH 8.0, mezcle bien, separe las fases por centrifugación como en el paso 3. Combine esta segunda fase acuosa con la anterior.

El DNA puede ser almacenado en solución etanólica a 0°C.

### **Preparación de un Gel de Agarosa. (figura 13)**

1. Sellar los bordes de una placa de vidrio limpia y seca (o las terminaciones abiertas del dispositivo de plástico provisto con el aparato de electroforesis) con cinta adhesiva "maskingtape" para formar el molde como lo muestra la figura 13. Colocar el molde en una sección horizontal de la mesa, (verificar con un nivelador).

2. Preparar la cantidad suficiente de regulador de electroforesis (generalmente TAE 1X o TBE 0.5X) para llenar el tanque de electroforesis y para preparar el gel. Adicionar la cantidad correcta de agarosa en polvo de acuerdo a la concentración necesaria para lograr una separación adecuada de las moléculas de DNA; medir la cantidad necesaria del regulador de electroforesis en un matraz Erlenmeyer o una botella de vidrio con tapa de rosca, el regulador no debe ocupar más del 50% del volumen del matraz o botella.
3. Tapar el cuello del matraz con parafilm o si usa la botella asegurar que la tapa esté medio cerrada. Caliente la mezcla en un baño de agua hirviendo o en horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva.
4. Enfriar la solución a 60°C y adicionar el bromuro de etidio (de una solución stock de 10 mg/mL en agua) a una concentración final de 0.5 µg/mL y mezclar vigorosamente.
5. Utilizando una pipeta Pasteur selle los bordes del molde con una pequeña cantidad de la solución de agarosa, permita que selle; la posición del peine deberá estar de 0.5 a 1.0 mm arriba de la placa para que se forme un pozo completo cuando la agarosa sea adicionada. Si el peine esta muy cerca de la placa de vidrio existe el riesgo de que la base del pozo se rompa cuando el peine sea retirado, permitiendo que la muestra quede entre el gel y la placa de vidrio.
6. Verter la solución de agarosa en el molde, el gel deberá ser de 3 a 5 mm de espesor; revisar para ver que no haya burbujas de aire debajo o entre los dientes del peine.
7. Después de que haya gelificado completamente, cuidadosamente retire el peine y la cinta adhesiva y colocar el gel en el tanque de electroforesis.
8. Adicionar solo la cantidad necesaria de regulador de electroforesis para cubrir el gel a una profundidad de 1 mm.
9. Mezclar las muestras de DNA con regulador de muestra (azul de bromofenol más sacarosa) y colocarlas en los pozos del gel sumergido.
10. Cerrar el tanque de electroforesis y permita que el DNA migre hacia el ánodo. Aplique un voltaje de 1-5 V/cm (mida la distancia entre los electrodos). Correr el gel hasta que el azul de bromofenol haya migrado a una distancia apropiada a través del gel.
11. Examinar el gel utilizando luz UV y fotografiar el gel. (figura 14)

Notas: Es importante que use el mismo regulador de electroforesis en el tanque y en el gel.

Pequeñas diferencias en la fuerza iónica o pH crean frentes en el gel que pueden afectar la movilidad de los fragmentos de DNA.

**Precaución :** El bromuro de etidio es un poderoso mutágeno, cancerígeno y es tóxico. Se deben usar guantes cuando se trabaje con soluciones que contienen este químico. Después de usarse los materiales deben descontaminarse antes de desecharlos en un contenedor apropiado para confinamiento especial.

La solución stock de bromuro de etidio debe protegerse de la luz.

Cuando prepare geles de agarosa de concentraciones arriba del 2% enfríe rápidamente a 70°C y vierta el gel inmediatamente.

La máxima cantidad de DNA que puede ser aplicado en el pozo del gel depende del número de fragmentos en la muestra y sus tamaños. La mínima cantidad del DNA que puede ser detectada por la fotografía en geles teñidos con bromuro de etidio es de 2 ng.

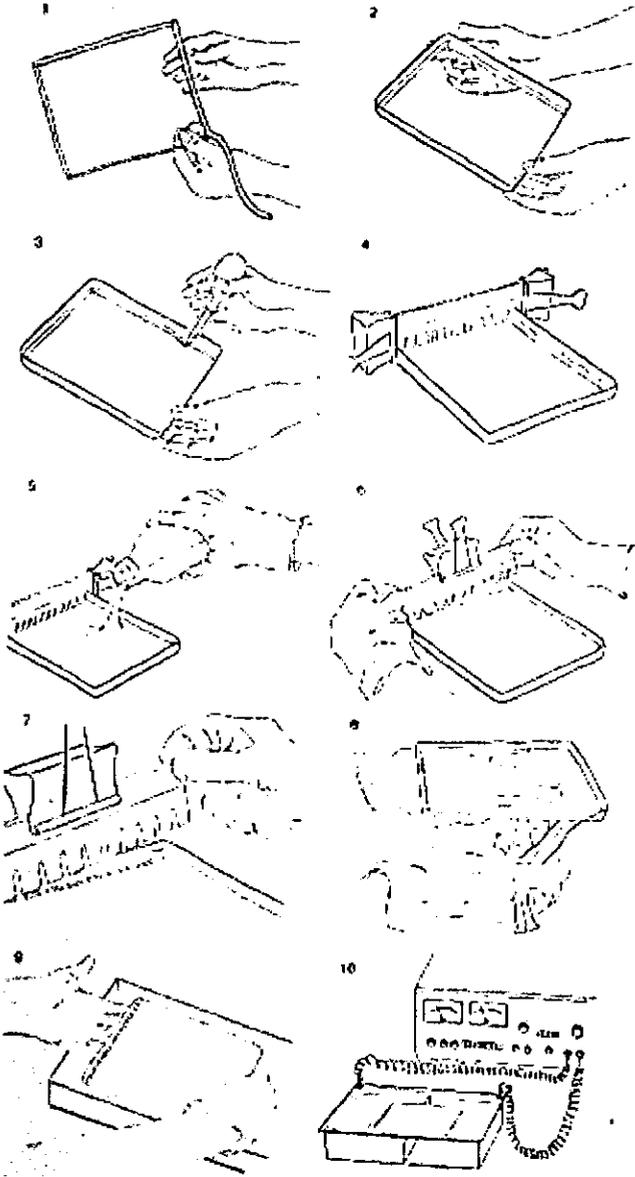


Fig. 13. Preparación de un gel de agarosa.

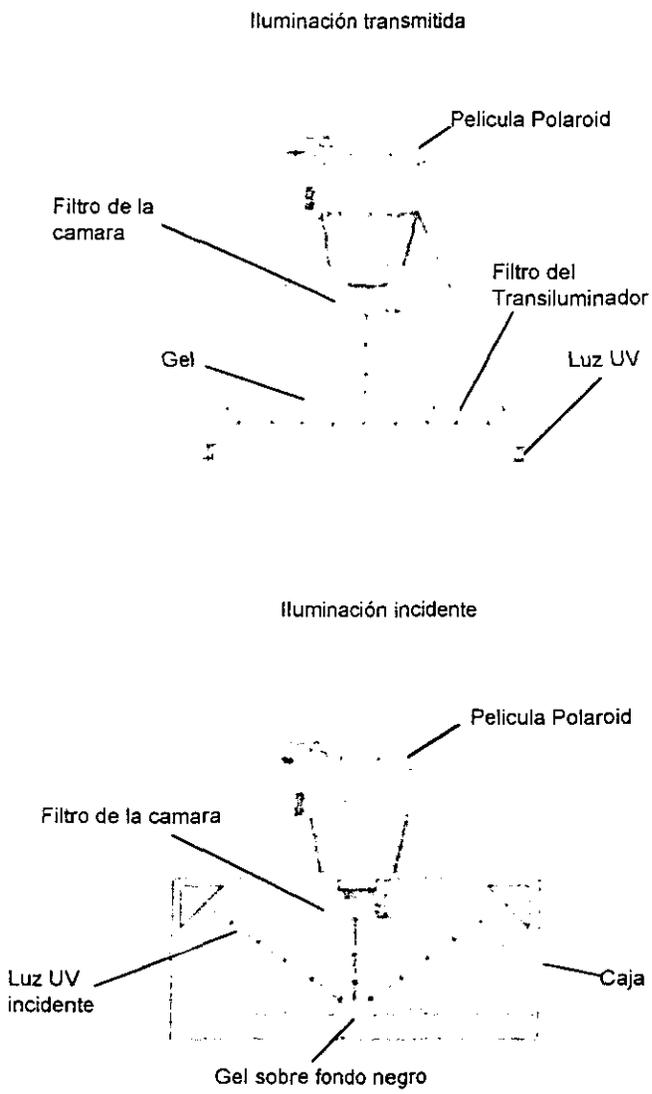


Fig. 14. Observación y fotografiado del gel de agarosa.

## Referencias.

1. Rippon JW. (1988) **Medical Mycology**. 3a. Edición Philadelphia, Saunders WB.
2. Kwon-Chung, K.J., Bennet, J.E. (1992) **Medical Mycology**. Lea & Febiger , Philadelphia.
3. González-Ochoa(1957) **Histoplasmosis pulmonar aguda primaria**. Gac. Méd. Méx. 87 :733-44.
4. González-Ochoa, (1959) **Histoplasmosis primaria pulmonar aguda en la República Mexicana. Estudio de 74 casos**. Rev. Insti. Salubr. Enferm Trop. (Mex.) 19 :341-350.
5. Velasco-Castrejón (1994) **Micosis profunda**. In :García-García ML, Giono-Cerezo S, Pacheco CR, Escobar-Gutierrez A, Valdespino Gómez JL (eds.) **Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas**. México D.F. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 231-248.
6. **Hoja informativa sobre la histoplasmosis**. Instituto Nacional de Salud Ocupacional (NIOSH) y el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (NCID), ambos de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades. DHHS (NIOSH) PUBLICATION NO. 97-146 September 1997.
7. Eissenberg, LG, & Goldman WE, (1991). **Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism : New perspectives on histoplasmosis**. Clin. Microbiol. Rev. 4 : 411-421.
8. Eissenberg, LG, & Goldman WE, (1994). **The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells**. Baillière's Clin. Infect. Dis. 1 :265-283.
9. Taylor ML, Díaz S, González PA, Sosa AC, Toriello C. (1984) **Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis : A hypothetical approach**. Rev. Infect. Dis. 6 : 775-782
10. Taylor ML, Duarte-Escalante E. (1995) **Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos**. Rev. Invest. Clin. 47 :499-506.
11. Goodman LN, Larsh HW (1967) **Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil**. Mycopath. Mycol. Appl. 33 :145-156.
12. Mahvi AT, (1970) **Factor governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil**. Mycopath. Mycol. Appl. 41 :167-176.
13. Disalvo AF, Bigler WJ, Ajello L, Johnson JE, Palmer J. (1970) **Bat and soil for sources of histoplasmosis in Florida**. Publ. Health Rep. 85 :1063-1069
14. Aguirre-Pequeño E. (1959) **Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México**. Gac. Méd. Méx. 89 :243-253.
15. Taylor ML, Toriello C. Pérez-Mejía A. Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C.(1994) **Histoplasmosis in the State of Guerrero, México : A biological approach**. Rev. Mex. Mic. 10 :49-53.

16. Taylor ML, Granados J, Toriello C. (1996) **Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, México.** Mycoses 39 :375-379.
17. Climent-Beltrán, J.B. (1990) **Ley Federal del Trabajo, comentario y jurisprudencia.** 4a. de. Editorial Esfinge, México D.F.
18. Martínez-Rivera MA, Reyes-Montes MR, Vaca-Marín MA, Taylor ML. **Histoplasmosis in México : A review and new epidemiologic and molecular findings.** Epidemiol. Rev. (manuscrito enviado).
19. Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. (1986) **Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms.** J. Bacteriol. 165 :813-818.
20. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. (1989) **Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*.** Infect. Immun. 57 : 1409-12.
21. Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. (1990) **Temperature sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome.** J. Infect. Dis. 162 :258-261.
22. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. (1992). **Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene.** J. Clin. Microbiol. 31 : 2104-2107.
23. Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. (1993). **Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: Methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies.** J. Clin. Microbiol. 31 :463-464.
24. Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE.(1992). **Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers.** J. Bacteriol. 174 :7075-7079.
25. Reyes Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. (1999) **Related analyses of *Histoplasma capsulatum* isolated from AIDS-associated-Mexican-histoplasmosis-patients, using, histoplasmin-electrotypes and RAPD patterns.** J. Clin. Microbiol. 35: 1404-1408
26. 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. 2<sup>nd</sup> ed, Telos Press New York. 1994.
27. Sala M, Alijanabi and Iciar Martínez. (1997). **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** Nucleic Acids Reseach. 25 : 4692-4693.

28. López Martínez R., Méndez Tovar L.J., Hernández Hernández T. Castañón Olivares R. (1995) **Micología Médica**. Editorial Trillas, México. Págs 83-87.
29. Romero Cabello R. (1993) **Microbiología y Parasitología Humana** Editorial Panamericana, México. Págs. 445-450.
30. Smith Garry K. (1997) **Are you exposing yourself to Histoplasmosis?** Australian Caver No. 136. Pags. 6-8.
31. Wheath, J. M.D. (1999) **Histoplasmosis Information Guide**. Communication of Histoplasmosis Reference Laboratory of Whishard Memorial Hospital of Indianapolis. Pags. 1-7.
32. Eissenberg Linda G. And Goldman W. E. (1991). **Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on Histoplasmosis**. Clinical Microbiology Reviews. 4 (4) 411-421.
33. Rodríguez Arellanes G., Pérez Mejía A., Duarte Escalante E, Taylor M. L. (1998) **Organización de la colección de cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de hongos, Facultad de Medicina UNAM**. Rev. Inst. Al. En. Res. Mex. 11 (3) 243-246.
34. Pereira Morales M. Toriello C. Taylor, M.L. (1998). **Inmunolocalización del complejo polisacárido-proteína en ultraestructuras de la fase micelial y levaduriforme de *Histoplasma capsulatum***. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11 (3) 237-242.
35. Severo L.C., Rizzon C.F., Roesch W. E., Oliveira M. F., Porto Da Silva N. (1997). **Chronic pulmonary Histoplasmosis in Brazil: Report of Two cases with cavitation diagnosed by Transthoracic Needle biopsy**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 39 (5) 293-297.
36. Communication of National Eye Institute, February 1999. Fact Sheet. **Histoplasmosis and the Eye**. Pág. 1-5
37. Vaca Marín M.A. , Martínez Rivera M.A. Flores E.J. (1998). **Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos**. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11 (3) 208-215.
38. Fava Di Camilo S., Rivitti A. E., Cuce C. L., Weiss S., Rigone G., Fava-Netto C. (1997) **Histoplasmin reaction, comparison of a polysaccharide antigen to the filtrate antigen**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 39 (5) 257-260.
39. Communication. The second NIAID Workshop in Medical Mycology: Molecular and Immunologic Approache to the Diagnosis and Tratment of Systemic Mycoses. (1999) pp. 1-4.
40. Communication Facth Sheet. **NIAID mycoses research: Recent advances scientist search for vaccines**. (1999) pp.1-4.
41. Sambrook-Fritsch-Maniatis. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. (1989). 2a edición. Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1 y 3.

42. Salas Ríos M. A. (1998). **Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* en pacientes con SIDA.** Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11(3) 202-207. 1998.
43. Ulloa M., Lappe P., Aguilar S., Pérez-Mejía A., Toriello C., Taylor ML. (1998) **Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México.** Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11(3) 173-182.
44. Lappe P., Ulloa M., Aguilar S., Pérez-Mejía A., Toreillo C., Taylor ML. (1998). **Levaduras asociadas con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México.** Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11 (3) 162-172.
45. Villarete L, Rici de Fries, Kolhekar S. Howard D, Ahmed R. Wu-Hsieh B.(1995). **Impaired Responsiveness to Gamma Interferon of Macrophages Infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus Clone 13: Susceptibility to Histoplasmosis.** Infect Immun 63: 1468-1472.
46. Allendoerfer R. and Deepe GS. (1997) **Intrapulmonary Response to *Histoplasma capsulatum* in Gamma Interferon Knockout Mice.** Infect Immun 65 : 2564-2569
47. Ping Zhou, Sieve MC, Tewari RP ad, Seder RA.(1997) **Interleukin-12 Modulates the Protective Immune Response in SCID Mice Infected with *Histoplasma capsulatum*.** Infect Immun. 65:9.36-942.
48. Allendoerfer R. Boivin GP and Deepe GS.(1997) **Modulation of Immune Responses in Murine Pulmonary Histoplasmosis.** J Infect Dis 175:905-914.
49. Taylor M. L. et al. (1998) **Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*.** Clin Exp Immunol 113:423-428.
50. Wu-Hsieh BA, Chen W, Lee HJ. (1998) **Nitric Oxide Synthase Expression in Macrophages of *Histoplasma capsulatum*-Infected Mice Is Associated with Splenocyte Apoptosis and Unresponsiveness.** Infect Immun 66:5520-5526. Infect Immun 66:5520-5526.
51. Allendoerfer R. And Deepe GS.(1998) **Blockade of Endogenous TNF- $\alpha$  Exacerbates Primary and Secondary Pulmonary Histoplasmosis by Differential Mechanism.** J immunol 160:6072-6082.
52. Ping Zhou, Miller G. Seder RA. (1998). **Factors Involved in Regulating Primary and Secondary Immunity to Infection with *Histoplasma capsulatum*: TNF- $\alpha$  Plays a Critical Role in Maintaining Secondary Immunity in the Absence of IFN- $\gamma$ .** J immunol 160:1359-68.
53. Ping Zhou and Seder RA. (1998). **CD40 Ligand Is Not Essential for Induction of Type 1 Cytokine Responses or Protective Immunity after Primary or Secondary Infection With *Histoplasma capsulatum*.** J Exp Med 8:1315-1324.

54. Allendoerfer R, Brunner GD and Deepe GS.(1999) **Complex Requirements for Nascent and Memory Immunity in Pulmonary Histoplasmosis.** J immunol 162:7389-7396.
55. Gómez FJ, Allendoerfer R, Deepe GS. (1995). **Vaccination with Recombinant Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum* Protects Mice against Pulmonary Histoplasmosis.** Infect Immun 63: 2587-2595.
56. Ping Zhou, Sieve MC, Bennett J, Kwon-Chung KJ, Tewari RP, Gazzinelli RT, Sher A, Seder RA. (1995). **IL-12 Prevents Mortality in Mice Infected with *Histoplasma capsulatum* Through Induction of IFN- $\gamma$ .** J Immunol 155:785-795.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA