

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“Caracterización de cepas de *histoplasma capsulatum*
asociadas a histoplasmosis en pacientes con
inmunocompromiso severo”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

CRISTINA ELENA CANTEROS

Directora de Tesis: Dra. MARÍA ELICIA TAYLOR

MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2005



m347641



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.



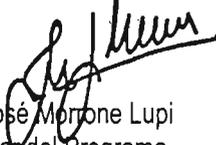
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna CANTEROS CRISTINA ELENA con número de cuenta 503451310, con la tesis titulada: "Caracterización de cepas de *Histoplasma capsulatum* asociadas a histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso severo", bajo la dirección del Dra. Maria Lucia Taylor Da Cunha e Mello .

Presidente:	Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
Vocal:	Dra. María del Rocío Reyes Montes
Vocal:	Dr. Miguel Ulloa Sosa
Vocal:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Secretario:	Dra. Maria Lucia Taylor Da Cunha e Mello
Suplente:	Dr. Julio Granados Arreola
Suplente:	Dra. Concepción Toriello Nájera

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de agosto del 2005.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este proyecto contó con el apoyo económico del

CONCEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MÉXICO, CONACYT, A TRAVÉS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN N° 34443-M.

CONVENIO DE COLABORACIÓN ACADÉMICA ENTRE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD “DR. CARLOS G. MALBRÁN”-“ANLIS”- DE LA REPÚBLICA ARGENTINA Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO-“UNAM”- DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. N° DE REGISTRO: 14925-398-14-IV-04.

La parte experimental de la tesis fue realizada en:

LOS LABORATORIOS DE INMUNOLOGÍA DE HONGOS Y MICOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM, MÉXICO.

EL DEPARTAMENTO MICOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, ANLIS, “DR. CARLOS G. MALBRÁN”, ARGENTINA.

ESTE TRABAJO TUVO COMO ASESORA EXTRANJERA INVITADA, A LA **DRA. VIVIANA RITACCO**, INVESTIGADORA DEL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) DE ARGENTINA, REGISTRADA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNAM, A ELLA UN ESPECIAL RECONOCIMIENTO POR TODA LA COLABORACIÓN QUE ME BRINDO EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL:

DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES-MONTES

DR. JULIO GRANADOS-ARREOLA

DR. MIGUEL ULLOA-SOSA

DRA. INGBORG BECKER FAUSER

DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO-NÁJERA

DR. JOAQUÍN CIFUENTES-BLANCO

POR LOS VALIOSOS APORTES REALIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, Y LAS SUGERENCIAS Y OBSERVACIONES EFECTUADAS EN LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

AGRADEZCO EN ESPECIAL

A LA **DRA MARIA LUCIA TAYLOR**, POR RECIBIRME EN SU LABORATORIO, PERMITIRME FORMAR PARTE DE EL, PERO SOBRE TODO POR MOSTRARME QUE LO IMPOSIBLE ES POSIBLE, SÓLO CON DESEARLO.

A LA **DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES**, POR ABRIRME LAS PUERTAS DE SU LABORATORIO Y ENSEÑARME LOS ENCANTOS DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR, POR BRINDARME SU AMISTAD Y SOBRE TODO POR ESCUCHARME SIEMPRE.

A LA **DRA. GRACIELA DAVEL**, POR SU INCONDICIONAL E ILIMITADO APOYO A TODOS MIS PROYECTOS.

A LOS TÉCNICOS **CRISTINA RIVAS Y WILLIAM LEE** POR ACOMPAÑARME CON ALEGRÍA Y HACER DE LO IMPOSIBLE UNA POSIBILIDAD CIERTA.

A LA **BQCA. FERNANDA ZUIANI**, POR SER MIS MANOS Y MI CABEZA EN MUCHAS OPORTUNIDADES.

AL **DR. MARCELO SORIA** POR SU INCALCULABLE AYUDA COMO GUÍA EN EL INTRINCADO MUNDO DE LA ESTADÍSTICA.

AL **DR. GERARDO ZUÑIGA**, POR SU PACIENCIA, SU CALIDEZ Y SU PREDISPOSICIÓN PARA CONTESTAR TODAS MIS PREGUNTAS.

A TODO EL EQUIPO DE TRABAJO DE LOS LABORATORIOS DE MICOLOGÍA MOLECULAR: **ESPERANZA DUARTE-ESCALANTE, AURORA HERNÁNDEZ-RAMIREZ Y A LA SRA. PAULINA BOYAS-SALGADO** Y DE INMUNOLOGÍA DE HONGOS: **GABRIELA RODRÍGUEZ, ADRIÁN VENANCIO-HERRERA Y RAFAEL ROMERO-MARTÍNEZ** POR SU INCALCULABLE APOYO PROFESIONAL Y PERSONAL.

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO DEL MALBRÁN, **WALTER VIVOT, HERNÁN ABRANTES, DIEGO PERROTTA, RUBEN ABRANTES, MARTÍN BRUDNY, NICOLÁS REFOJO, EUGENIA BOSCO BERGEAT, SUSANA CÓRDOBA, Y ANGELA LUNA** POR EL AGUANTE.

A LA **DRA. MARIA INÉS DE MITRI, DIRECTORA DEL INEI- "DR. CARLOS G. MALBRÁN"**, DE ARGENTINA, POR EL CONTINUO APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A TODOS LOS MAESTROS QUE ME GUIARON EN LA **UNAM** Y A **MÉXICO**, UN PAÍS MARAVILLOSO, CON UNA RIQUEZA INIGUALABLE, QUE ME ENSEÑO QUE LA HUMILDAD NO ES SUMISIÓN Y QUE EL RESPETO PUEDE MÁS QUE LA ALTANERÍA VANA.

A ROBERTO,

*por ser mi amor, darme amor, y estar en mi amor, porque
comparte mi vida terrenal, porque me invita cada día a
participar en sus sueños y se regocija en los míos. ¡Gracias mi
TESORO, por estar a mi lado!*

DEDICATORIAS

A Mi Mamá y a la memoria de Mi papá por guiarme desde siempre y enseñarme lo bella que es la vida.

A mi hermano Francisco por apoyar desde sus silencios y desde su sabia paciencia mi vida arrebatada, y a mi reciente hermana Luisa, por cuidarlo y hacerlo feliz.

A mis hijos, Samanta, Silvestre, Martina y Camila, por la devoción y fidelidad con que me acompañan y me esperan siempre.

A Graciela, mi hermana de toda la vida, con la que compartí la taxonomía fúngica con mate y tortillas tucumanas, gracias!! por acompañarme en el Gran Viaje de mi juventud, y seguir conmigo en la adultez, por su comida naturista, por no abandonarme nunca, por cuidar mis tesoros cuando estoy ausente, y por bendecirme con un hijo espiritual.

A Tomás, simplemente por ser "LA TIA".

A Violé, mi amiga del alma, por levantarme cada vez que me caigo, por su sabiduría, su bondad y su confianza en mis sueños, y a su Roberto por ser el consultor en mis dilemas. Ambos quiero que sepan que los amo, y que son mi familia.

A Bety, por no dejar que los gepardos nos coman aquella tarde... y con su energía y coraje salvarme de los voraces cocodrilos del Zambezi. Por toda el África salvaje y apasionante y los demás locos viajes que soportamos y sufrimos en nuestras vidas... ¡Ah!, gracias por la lluvia y el granizo!

A Luci, por los interminables viernes de psicoanálisis junto a Los López y Los Anunka, quienes nos develaban el mundo de manera diferente después de cada agobiante semana de trabajo.

A Viviana, por su dedicación, por sus regaños, consejos y conversaciones que enriquecieron nuestra relación personal y profesional. Por la mejor café de las tardes malbranenses, por su estoicismo fúngico, por guiarme y vivir conmigo este viaje hacia el conocimiento, GRACIAS TRAESMA!!!

A Ana Corral, por romperme los esquemas mentales y estar siempre a mi lado, gracias amigaza!!!

A Benja, por su sensibilidad y su paciencia para escucharme, y también por la consideración de empujarme a lo aviones a donde quise subir.

A Cecilita, por compartir muchas mañanas de radio y sueños y preocuparse por mis hijos en mis ausencias.

A Graciela, ¡LA JEFA!, por su aguante y su complicidad, por ser firme e incansable, pero sobre todo por su terquedad que mueve montañas.

A Jorge Sahaza, por compartir aquellos interminables viajes en la línea verde, y sobre todo por su "NO SE NIME IMPORTA".

A Willito, Cris, Fer por soportarme, por su incondicionalidad y por no dejarme sola en los momentos difíciles.

A la gran barra de Escobar del Country Club "Los Hososok": Cacho, Cucky, Sorber, Lili y Eze por los sábados con sushi, sake, champú y los domingos con asado y sus complementos.

A todos mis amigos del cafecito y las tertulias de en mis días mexicanos: Rocío, Gaby, Espe, Aurora, Amelia, David, Paty, Horte y Helena.

	<i>Páginas</i>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
FISIOPATOGENIA Y FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD	4
ORIGEN GEOGRÁFICO Y FORMAS CLÍNICAS	5
FENOTIPOS Y VIRULENCIA	7
FENOTIPOS E INFECCIÓN MÚLTIPLE	9
GENOTIPOS Y ORIGEN GEOGRÁFICO	10
GENOTIPOS Y VIRULENCIA	11
GENOTIPOS E INFECCIÓN MÚLTIPLE	12
ELECTROCARIOTIPOS	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
AISLAMIENTOS Y CEPAS DE <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	17
ESTUDIOS FENOTÍPICOS	18
MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE M	18
MICROMORFOLOGÍA DE LA FASE M	18
TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) DE LA FASE M	19
CONVERSIÓN DIMÓRFICA (FASE M A L)	20
MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE L	21
IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE EXOANTÍGENOS	21
ESTUDIOS GENOTÍPICOS	23
AMPLIFICACIÓN DE DNA AL AZAR POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RAPD-PCR)	23
CARIOTIPIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)	25
ANÁLISIS DE PERFILES ELECTROFORÉTICOS	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS	29
CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS AISLAMIENTOS	29
ESTUDIOS FENOTÍPICOS	29
MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE M	29
MICROMORFOLOGÍA DE LA FASE M	31
TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	33
CONVERSIÓN DIMÓRFICA	34
MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE L	35
IDENTIFICACIÓN DE EXOANTÍGENOS	35
SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LOS EXOANTÍGENOS	35

ESTUDIOS GENOTÍPICOS	37
POLIMORFISMO DEL DNA GENÓMICO POR RAPD-PCR	37
CARIOTIPOS ELECTROFORÉTICOS	38
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN MÚLTIPLE	41
DISCUSIÓN	42
FENOTIPOS	43
GENOTIPOS	48
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO	55
TABLAS	
TABLA 1. DATOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>H. CAPSULATUM</i> ESTUDIADOS	56
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÚLTIPLES AISLAMIENTOS DE UN MISMO PACIENTE	58
TABLA 3. PROTOCOLOS DE PFGE UTILIZADOS PARA LA SEPARACIÓN DE BANDAS CROMOSÓMICAS EN HONGOS DE DIFERENTES TAMAÑOS GENÓMICOS	59
TABLA 4. PROTOCOLOS PROBADOS DURANTE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PFGE	59
TABLA 5. RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA GEOGRÁFICA, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS	60
TABLA 6. RELACIÓN ENTRE LA PROCEDENCIA GEOGRÁFICA, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL MORFOTIPO COLONIAL DE LOS AISLAMIENTOS	61
TABLA 7. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL MORFOTIPO COLONIAL DE LOS AISLAMIENTOS	61
TABLA 8. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL DIÁMETRO DE LOS MACROCONIDIOS DE LOS AISLAMIENTOS	62
TABLA 9. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL DIÁMETRO DE LOS MACROCONIDIOS DE LOS AISLAMIENTOS	62
TABLA 10. TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS EN CULTIVOS	63
TABLA 11. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y LA TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS	64
TABLA 12. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y LA TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS	64
TABLA 13. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y LA CAPACIDAD DE CONVERSIÓN <i>IN VITRO</i> A LA FASE L DE LOS AISLAMIENTOS	65
TABLA 14. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y LA CAPACIDAD DE CONVERSIÓN <i>IN VITRO</i> A LA FASE L DE LOS AISLAMIENTOS	65
TABLA 15. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL FENOTIPO SDS-PAGE DE LOS AISLAMIENTOS	66
TABLA 16. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL FENOTIPO SDS-PAGE DE LOS AISLAMIENTOS	66
TABLA 17. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL GENOTIPO RAPD-PCR DE LOS AISLAMIENTOS	67

TABLA 18. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL GENOTIPO RAPD-PCR DE LOS AISLAMIENTOS	67
TABLA 19. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL NÚMERO DE BANDAS CROMOSÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS	68
TABLA 20. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL NÚMERO DE BANDAS CROMOSÓMICAS DE LOS AISLAMIENTOS	68
TABLA 21. RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO, LA CONDICIÓN DE INMUNOCOMPROMISO DEL PACIENTE Y EL EK DE LOS AISLAMIENTOS	69
TABLA 22. RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL CLÍNICO DE ORIGEN Y EL EK DE LOS AISLAMIENTOS	69
FIGURAS	
FIGURA 1. DENDROGRAMA ORIGINADO DEL ANÁLISIS POR UPGMA DE LOS AISLAMIENTOS SEGÚN LAS CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS	70
FIGURA 2 (a-l). MACROMORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE CADA UNO DE LOS GRUPOS FORMADOS EN EL ANÁLISIS POR UPGMA	71
FIGURA 3 (a y b). MACRO- Y MICROMORFOLOGÍA DE MÚLTIPLES AISLAMIENTOS DE <i>H. CAPSULATUM</i> DE UN MISMO PACIENTE	72
FIGURA 4 (a-h). MICROMORFOLOGÍA EN FASE M DE ALGUNOS AISLAMIENTOS DE <i>H. CAPSULATUM</i>	73
FIGURA 5 (a-f). MICROMORFOLOGÍA EN FASE M DE LAS CEPAS DE REFERENCIA Y DE ALGUNOS AISLAMIENTOS DE <i>H. CAPSULATUM</i>	74
FIGURA 6 (a-f). ETAPAS EN LA CONVERSIÓN TERMODIMÓRFICA	75
FIGURA 7 (a-f). MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE L DE DIFERENTES AISLAMIENTOS Y DE LAS CEPAS DE REFERENCIA	76
FIGURA 8 (a y b). SDS-PAGE DE LOS EXOANTÍGENOS DE <i>H. CAPSULATUM</i> REVELADOS CON TINCIÓN DE PLATA	77
FIGURA 9 (a y b). SDS-PAGE Y WB DE LOS EXOANTÍGENOS DE CUATRO AISLAMIENTOS REPRESENTATIVOS DEL ESTUDIO	78
FIGURA 10. DENDROGRAMA, GEL NORMALIZADO Y EXPRESIÓN GRÁFICA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR SDS-PAGE	79
FIGURA 11 (a y b). PERFILES DEL RAPD-PCR OBTENIDOS CON DOBLE INICIADOR	80
FIGURA 12. DENDROGRAMA, GEL NORMALIZADO Y EXPRESIÓN GRÁFICA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR RAPD-PCR	81
FIGURA 13. VISUALIZACIÓN DE BANDAS CROMOSÓMICAS CON DIFERENTES PROTOCOLOS DE PFGE	82
FIGURA 14 (a-d). PERFILES DE BANDAS CROMOSÓMICAS DE ALGUNOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>H. CAPSULATUM</i> OBTENIDOS POR PFGE	83
FIGURA 15. DENDROGRAMA, GEL NORMALIZADO Y EXPRESIÓN GRÁFICA DE LAS BANDAS CROMOSÓMICAS OBTENIDAS POR PFGE	84
FIGURA 16. COMPARACIÓN ENTRE EL FENOTIPO SDS-PAGE Y LOS GENOTIPOS RAPD-PCR Y PFGE (EKS), DE ALGUNOS MÚLTIPLES AISLAMIENTOS DE UN MISMO PACIENTE	85
FIGURA 17. CAMBIOS EN LAS BANDAS CROMOSÓMICAS DURANTE LA DOMESTICACIÓN DE DOS AISLAMIENTOS	86
BIBLIOGRAFÍA	87

RESUMEN

La histoplasmosis (HP), enfermedad de distribución mundial, es producida por *Histoplasma capsulatum* (*Hc*). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza de sus áreas endémicas. La existencia de diversidad intra-especie fue demostrada con anterioridad. Sin embargo, aún se ignora si determinados fenotipos y/o genotipos están asociados a cepas más virulentas para el hombre. El objetivo general de este estudio fue discernir, a través de análisis fenotípicos, cuáles son los aislamientos que pueden producir HP en pacientes con inmunocompromiso severo (ICS) o leve (ICL). Además, esta investigación trató de: (a) demostrar que la pandemia de SIDA amplió el espectro fenotípico de cepas con capacidad de producir enfermedad; (b) investigar la existencia de infecciones por múltiples aislamientos en un mismo huésped; (c) determinar si la procedencia geográfica y el tropismo de los aislamientos por algunos órganos y/o tejidos de los pacientes están relacionados con un fenotipo y/o genotipo particular de *Hc*. Para ello, se estudiaron el morfotipo colonial, la micromorfología, la tasa específica de crecimiento (μ) de la fase micelial y el electrotipo SDS-PAGE (fenotipos), así como el polimorfismo genético por RAPD-PCR y por PFGE (genotipos) de 74 aislamientos clínicos de *Hc*. Cincuenta y siete de éstos provinieron de pacientes de Argentina (AR), 14 de México (MX) y tres de Guatemala (GT). Se incluyeron las cepas de referencia G186B de Panamá y Downs de Estados Unidos. Los aislamientos se clasificaron con base en el origen geográfico (AR y MX/GT), la causa de inmunocompromiso del paciente [ICS-SIDA, ICS-VIH(-) e ICL], así como según el material clínico de donde procedía el aislamiento (sangre/médula ósea, piel, n. n. n., tracto respiratorio y otros). Se incluyeron 20 especímenes fúngicos de ocho pacientes con múltiples aislamientos obtenidos durante el mismo o diferentes episodios clínicos. Los pacientes con ICS-SIDA de AR fueron infectados por casi todos los morfotipos coloniales y fenotipos SDS-PAGE observados en este estudio. Los aislamientos con valores de μ más bajos estuvieron asociados a pacientes con ICS, independiente del origen geográfico. Los aislamientos de los pacientes con ICS-SIDA presentaron macroconidios con diámetros medios cercanos a la media inferior referida para la especie. Mediante los análisis de correlación múltiple se demostraron relaciones significativas entre el genotipo RAPD-PCR, el fenotipo SDS-PAGE y el origen geográfico. Asimismo, se observaron asociaciones del genotipo RAPD-PCR o del fenotipo SDS-PAGE con la condición inmunológica del huésped. Los electrocariotipos (Eks), revelados por PFGE, mostraron un importante polimorfismo cromosómico, tanto en los números como en los tamaños de las bandas, mayor al informado en trabajos previos, debido a que se encontraron aislamientos con 3 y 4 bandas cromosómicas. La mayoría de los aislamientos revelaron 5 bandas y un Ek predominante que estuvo relacionado a aislamientos de AR. Este es el primer estudio que permitió relacionar similitudes y diversidades fenotípicas de los aislamientos de *Hc* con el origen geográfico, el estado ICS/ICL del paciente, y el material clínico de aislamiento. El hecho de que aislamientos con características poco habituales (morfotipos coloniales aberrantes, macroconidios con diámetros medios inferiores al límite normal, μ bajas y fenotipos SDS-PAGE menos frecuentes) estuvieron más relacionados a pacientes con ICS, permite especular que cualquier cepa de *Hc* podría infectar y producir HP en pacientes con ICS, en especial los ICS-SIDA. En algunos múltiples aislamientos de un mismo paciente, se logró demostrar que éstos eran fenotípicamente distintos. No se puede atribuir este hecho a la existencia de infección múltiple en un mismo paciente, ya que los cambios del Ek en sucesivos cultivos *in vitro* sugieren que el genoma de *Hc* puede ser inestable, y además no descarta que los reordenamientos cromosómicos puedan suceder *in vivo*. No se encontraron relaciones entre el fenotipo y/o genotipo con el material clínico de aislamiento. Es interesante resaltar que aislamientos con morfotipos coloniales y valores de μ semejantes, además de idénticos perfiles SDS-PAGE y/o RAPD-PCR, mostraron notable disimilitud en los Eks, o viceversa. Esto pone en evidencia que, individualmente, cada una de las técnicas fenotípicas da una visión parcial de la biología de *Hc*. Dadas la naturaleza eucariótica de este microorganismo y la enorme complejidad de su genética, es difícil lograr una caracterización precisa utilizando una metodología única. En contraste, la combinación de estudios sobre las características morfológicas, fisiológicas y genéticas sería muy útil para tener una visión más amplia de este patógeno y contribuiría a un mejor conocimiento de *Hc*, especialmente en la relación huésped-parásito.

ABSTRACT

Histoplasmosis (HP) is a worldwide disease produced by *Histoplasma capsulatum* (*Hc*). This fungus is widely distributed in nature of its endemic areas. The intra-species diversity of *Hc* has been demonstrated previously. However, it is still not known whether certain pheno- and/or genotypes are associated with strains that might be more virulent for humans. The reason of this study was to distinguish, through pheno-genotypic analyses, which are the isolates able to produce HP in severe (SIC) and mild (LIC) immunocompromised patients. In addition, this research aimed to: (a) demonstrate that the AIDS pandemic amplified the pheno-genotypic spectra of the strains able to produce the disease; (b) investigate the existence of infection by multiple isolates in a single host; (c) determine if the geographic origin and the *Hc* isolates' tropism for some organs and/or tissues of patients are related to a particular *Hc* pheno- and/or genotype. For this, colonial morphotype, micromorphology, specific growth rate (μ) of the micelial-phase, and SDS-PAGE electrophoretic (phenotypes), as well as the genetic polymorphism by RAPD-PCR and PFGE (genotypes) were studied from 74 *Hc* clinical isolates; of which 57 came from patients from Argentina (AR), 14 from Mexico (MX), and 3 from Guatemala (GT). Reference strains, G186B from Panama and Downs from the US, were included. The isolates were classified based on their geographic origin (AR and MX/GT), the immunocompromised condition of each patient [SIC-AIDS, SIC-HIV(-), and LIC], as well as the clinical sample from which the isolates came from (blood/bone marrow, skin, mucosa, respiratory tract, and others). Twenty fungal specimens from eight patients, with multiple isolates obtained during the same or different clinical episodes, were included in the study. The SIC-AIDS patients from AR were infected by almost all the colonial morphotypes and SDS-PAGE phenotypes observed in this study. The isolates with lower μ values were associated to SIC patients, aside from their geographic origin. The isolates from SIC-AIDS patients showed macroconidia with average diameters close to the inferior mean referred for the species. Significant relationships between RAPD-PCR genotype, SDS-PAGE phenotype, and the geographic origin were demonstrated by multiple correlation analyses. Besides, associations of RAPD-PCR genotype or SDS-PAGE phenotype with host immunological condition were observed. The electrokaryotypes (Eks), revealed by PFGE, showed important chromosome length polymorphism, either in numbers or in band sizes as previously reported, and 3 and 4 chromosomal bands were found. Most of the AR isolates revealed 5 chromosomal bands and a major Ek. This is the first study that has allowed to relate pheno-genotypic similarities and diversities of *Hc* isolates with the geographic origin, the host immunological condition (SIC/LIC), and the source of clinical sample. Isolates with unusual characteristics (aberrant colonial morphotypes, macroconidia with smaller diameters than those accepted as typical for the species, low μ values, and less frequent SDS-PAGE phenotypes) were more related to SIC patients and allow to suggest that any *Hc* strain could infect and produce HP in SIC patients, mainly those with SIC-AIDS. In some multiple isolates from a single patient, pheno-genotypes differences were demonstrated. Nevertheless, multiple infections cannot be inferred from this finding, because changes in the *Hc* Eks by several *in vitro* subcultures suggest that this fungus' genome could be unstable and, besides, *in vivo* chromosomal rearrangements could also occur. No relation of pheno- and/or genotypes and patient clinical sample was found. It is interesting to emphasize that isolates with similar colonial morphotypes and μ values, besides identical SDS-PAGE and/or RAPD-PCR profiles, showed remarkable Eks dissimilarity or vice versa. This finding stands out because it shows that, individually, each pheno- and genotype technique provides only a partial vision of the *Hc* biology. Due to the eukaryotic nature of this microorganism and its high genetic complexity, it is very difficult to achieve a precise characterization of this fungus by using a single methodology. In contrast, the combination of morphologic, physiologic, and genetic studies would be very useful to amplify the vision of this pathogen and would contribute to a better knowledge of *Hc*, especially regarding the host-parasite relationship.

INTRODUCCIÓN

La especie fúngica *Histoplasma capsulatum*, agente de la histoplasmosis, es un hongo termodimórfico. Su forma filamentosa multicelular (fase micelial - M) desarrolla a 25-28 °C en la naturaleza e *in vitro*, mientras que su forma unicelular (fase levaduriforme - L) crece a 37 °C tanto *in vivo* (tejidos del huésped) como *in vitro* [Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1992].

Se conocen tres variedades taxonómicas de *H. capsulatum*, que difieren en algunas características fenotípicas, el nicho ecológico y las características de los huéspedes susceptibles. *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, endémico de África, produce infección en humanos y más raramente en animales. *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, endémico de Asia y África, es el agente de la linfangitis equina. Por último, *H. var. capsulatum* es el agente de la “**histoplasmosis capsulati**”, enfermedad endémica en toda América, que también ha causado casos esporádicos en el hombre y otros mamíferos en el resto del mundo, entre los paralelos 45° Norte y 30° Sur [Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1992].

Actualmente; Kasuga *et al.* [1999; 2003], con base en las secuencias parciales del DNA de cuatro genes, describieron ocho poblaciones genéticas o clados asociados al origen geográfico del hongo, siete de los cuales fueron propuestos como especies filogenéticas diferentes. Esta clasificación incluyó 137 cepas de orígenes geográficos diversos y las tres variedades taxonómicas del hongo, destacando seis de la var. *duboisii* y 13 de la var. *farciminosum*. Las siete especies filogenéticas reconocidas al momento son: Norte América clase 1 (**NAm 1**), Norte América clase 2 (**NAm 2**), Latinoamérica grupo A (**LAm A**), Latinoamérica grupo B (**LAm B**), **Australia**, **Holanda-Indonesia** y **África**.

In vitro, *H. capsulatum* var. *capsulatum* Darling 1906, desarrolla a 25-28 °C formando colonias de crecimiento lento, morfología algodonosa, color blanco o pardo con reverso incoloro, amarillo o anaranjado parduzco. Al examen microscópico presenta hifas delgadas de 1.2-1.5 µm, ramificadas y tabicadas, numerosos macroconidios de 8-14 µm de diámetro, esféricos y más raramente piriformes, de paredes lisas o verrugosas, microconidios de 1-4 x 2-6 µm redondos o piriformes, de paredes lisas o equinuladas. Ambos tipos de conidios nacen sobre conidióforos simples [de Hoog *et al.*, 2000; Kwon-Chung & Bennett, 1992; Tewari *et al.*, 1998]. En un estudio de aislamientos humanos, animales y ambientales de diversos países americanos, Berliner [1968] clasificó las colonias de la fase saprobia en albinas (A) y pardas (B), a las que atribuyó macroconidios lisos y verrugosos, respectivamente. Esta antigua clasificación morfológica aún sigue vigente, sin embargo, desde entonces han sido descritas numerosas variantes morfológicas

de *H. capsulatum*, la mayoría de ellas asociadas a enfermedad, e inclusive colonias con pigmento rojo o rosado [Lacaz *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1986; Rippon, 1992; Staib & Grosse, 1996; Sutton *et al.*, 1997; Taylor ML, comunicación personal; Zuiani *et al.*, 2005].

El hábitat de este hongo en la naturaleza está relacionado con suelos ricos en materia orgánica, con alto contenido en nitrógeno, fosfatos e hidratos de carbono. También es favorecido por la presencia de cationes divalentes como el calcio y el magnesio, los que inhiben el desarrollo de microorganismos competidores [Goldman & Larch, 1967; Lappe *et al.*, 1998; Mahvi, 1970; Taylor *et al.*, 1999; 2000c; Ulloa *et al.* 1998]. Estas condiciones se presentan en cavernas y otras oquedades donde habitan aves y murciélagos, en gallineros, palomares y construcciones deshabitadas. El hombre y los animales se infectan por la inhalación de microconidios y pequeños fragmentos de hifas aerosolizados en ese tipo de ambientes [Huhn *et al.*, 2005, Taylor *et al.*, 1994; 1996; 1997a; 2000b; Tewari *et al.*, 1998; Kwon-Chung & Bennett, 1992].

Los eventos que suceden a la infección en humanos y otros mamíferos dependen de factores inherentes tanto al huésped como al microorganismo.

FISIOPATOGENIA Y FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Si un individuo inmunocompetente se expone a bajas concentraciones de propágulos infectivos de *H. capsulatum* resuelve la infección sin mayores consecuencias. En la mayoría de los casos esta primoinfección pasa inadvertida y menos del 5 % de los individuos expuestos al hongo desarrolla sintomatología similar a la de un resfriado común [Goodwin *et al.*, 1981; Cano & Hajjeh, 2001]. En cambio, si el huésped expuesto tiene algún grado de compromiso del sistema inmune, es más probable que la infección progrese a enfermedad [McKinsey *et al.*, 1997; Negróni *et al.*, 1991; Retallack & Woods, 1999; Wheat, 1996; Woods, 2002]. Por lo que la enfermedad puede estar asociada a distintos grados de inmunocompromiso. Cuando el paciente presenta un inmunocompromiso severo (ICS), puede ocurrir un cuadro de sepsis que incluye fiebre, pérdida de masa corporal y hepatoesplenomegalia [Graybill, 1998; Negróni *et al.*, 1991; Wheat, 1996]. Estos pacientes frecuentemente presentan enfermedades o condiciones debilitantes del sistema inmune, como el SIDA, enfermedades autoinmunes, neoplasias, diabetes, neuropatías, nefropatías, trasplantes y otras patologías que requieren tratamientos con inmunodepresores. En otras situaciones la enfermedad puede ser adquirida sin causa aparente de inmunocompromiso o inmunocompromiso leve (ICL), tales como exposición a inóculos masivos, estrés psíquico, senilidad, etilismo, tabaquismo, asma, etcétera.

El espectro de formas clínicas de la enfermedad ha sido sujeto de distintas propuestas de clasificación. Una de ellas es la propuesta por Negroni y Negroni [Rubinstein & Negroni, 1981]. Cuando los individuos se exponen a concentraciones masivas de elementos infecciosos pueden desarrollar una infección respiratoria aguda denominada **histoplasmosis pulmonar primaria**, la que se presenta con fiebre, tos no productiva y mal estado general. En estos pacientes, una rápida y exacerbada respuesta inflamatoria es la causa fundamental de la sintomatología pulmonar [Rubin, 1959]. Esta forma clínica ha ocurrido con frecuencia en brotes epidémicos en Estados Unidos (EU), México (MX) y Centroamérica [Byrd *et al.*, 1975; Chamany *et al.*, 2004; García-Vásquez, 2005; Huhn *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2003; Schlech *et al.*, 1983; Stobierski *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2005b; Velazco-Castrejón, 1998; Waldman *et al.*, 1983; Wheat *et al.*, 1981]. La misma puede derivar a formas diseminadas que comprometen seriamente la vida del paciente.

En individuos infectados, el microorganismo puede permanecer en estado de latencia, y la enfermedad producirse por una **reactivación de la infección** asociada a una disminución de la inmunidad [Graybill, 1998; Porta & Maresca, 2000]. Es por esta causa que, pacientes que alguna vez habitaron y/o visitaron áreas endémicas de histoplasmosis pueden manifestar la enfermedad mucho tiempo después de la exposición y en países donde ésta es exótica.

La **forma diseminada aguda o subaguda**, sea a consecuencia de infección reciente o de reactivación endógena, se manifiesta comúnmente en pacientes con ICS.

Otra presentación es la **histoplasmosis pulmonar crónica**, clínicamente indistinguible de la tuberculosis avanzada del adulto, enfermedad a la que puede asociarse. También puede coexistir con otras enfermedades respiratorias crónicas [Negroni *et al.*, 1991; Weisburd, 1995].

La forma **diseminada crónica** es de evolución lenta y se caracteriza por lesiones granulomatosas localizadas comúnmente en mucosas y parénquima pulmonar, hepático y esplénico. Si no es tratada a tiempo, puede producir lesiones irreversibles e incluso llevar a la muerte del individuo [Negroni *et al.*, 1991].

ORIGEN GEOGRÁFICO Y FORMAS CLÍNICAS

En **Argentina (AR)** la infección está muy difundida, a juzgar por el porcentaje de individuos reactivos a la histoplasmina, que varía en el intervalo de 5-78 %, según el grupo etario y la región geográfica [Mangiaterra *et al.*, 1996; Marticorena *et al.*, 1991; Masih *et al.*, 1987; Rodríguez de Marengo *et al.*, 1979; Rubinstein & Negroni, 1981; van Gelderen de Komaid *et al.*, 1992; 1999]. Se estima que existen aproximadamente ocho millones de individuos infectados por *H. capsulatum* en

todo el país [Negroni R, comunicación personal]. La primera observación de la histoplasmosis enfermedad en Sudamérica fue publicada en Buenos Aires, en 1941 [Rubinstein & Negroni, 1981]. Hasta la emergencia del SIDA, la forma predominante en la zona del Río de la Plata era la **diseminada crónica**, localizada comúnmente en piel y mucosas orofaringolaríngeas. Esta forma aún se presenta en pacientes mayores de 45 años sin deterioro severo del sistema inmune. En este tipo de pacientes es la segunda micosis endémica en frecuencia después de la paracoccidioidomicosis [Canteros *et al.*, 2004; Latini, 1985]. En este país los brotes epidémicos no son informados con frecuencia y las formas pulmonares agudas son raras [Negroni *et al.*, 1994; Rubinstein & Negroni, 1981].

A partir del primer caso asociado a SIDA descrito en 1983 [Negroni *et al.*, 1990], la incidencia de histoplasmosis en pacientes con ICS aumentó drásticamente [Negroni *et al.*, 1994]. El índice de prevalencia de la enfermedad fue estimado entre 0.5-1.0 por cada 1000 personas infectadas [Bava, 1995]. En pacientes con ICS el microorganismo actúa como oportunista, produciendo histoplasmosis diseminada aguda o subaguda. Al igual que en las formas diseminadas crónicas, las lesiones mucocutáneas son las más frecuentes. En un hospital de la ciudad de Buenos Aires, Negroni *et al.* [1994] encontraron este tipo de lesiones en 42 de 53 casos de histoplasmosis asociada a SIDA, diagnosticados entre 1983 y 1992. Más recientemente, en un hospital del interior del país, Pietrobon *et al.* [2004] también describieron lesiones mucocutáneas en una alta proporción de pacientes con histoplasmosis y SIDA (12:16).

En **MX**, los niveles de infección también son muy variables. Entre 2 y 87 % de la población, dependiendo del área geográfica, presenta reactividad cutánea a la histoplasmina. Existen evidencias sugestivas de que el primer brote de histoplasmosis en el mundo ocurrió en MX a fines del Siglo XIX, aún antes de la descripción formal de la enfermedad realizada por Samuel Taylor Darling en 1906, en un individuo de Martinica que trabajaba en la construcción del canal de Panamá [Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1992]. Pero no fue sino hasta 1943 que se documentó el primer caso confirmado de histoplasmosis. El primer brote se registró en una mina abandonada en Nuevo León, en la década de los 50s. Desde entonces se han producido numerosos **brotes epidémicos** en el país por exposición a altas concentraciones de conidios, y la enfermedad es reconocida como un serio problema de salud y considerada una enfermedad ocupacional. Entre 1948 y 1955 se registraron 20 brotes, entre 1956 y 1963 se registraron 11, y 110 entre 1963 y 1994. La histoplasmosis ocurre tanto en áreas rurales (minas y cavernas) como en áreas urbanas (casas abandonadas, oquedades naturales o artificiales y gallineros). Dada la alta frecuencia de brotes epidémicos, la forma clínica predominante en este país es la **histoplasmosis pulmonar primaria o aguda**, de pronóstico sombrío. En los brotes donde se registró la

letalidad, ésta varió entre 12 % y 100 %. Según datos de la Dirección General de Epidemiología de MX, entre 1989 y 1991 la incidencia de la enfermedad varió entre 0.1 y 0.18 por 100,000 habitantes, y en 1994 se incrementó a cerca de 0.3 por 100,000 [Vaca-Macín *et al.*, 1998; Velasco-Castrejón, 1998]. En la actualidad, los brotes siguen ocurriendo pero la enfermedad dejó de ser de notificación obligatoria, razón por la cual no existen datos oficiales en los últimos 11 años. Sin embargo, el panorama no es alentador y recientemente, en 2001, ocurrió uno de los mayores brotes de histoplasmosis en una zona urbana, con varios episodios, en el puerto de Acapulco, tan conocido por su gran atractivo turístico [Morgan *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005b]. Las formas diseminadas también han registrado un incremento concomitante a la pandemia de SIDA [Salas-Ríos *et al.*, 1998; Velasco-Castrejón, 1998]. En contraste con lo que se observa en AR, las localizaciones mucocutáneas fueron y siguen siendo infrecuentes [Reyes *et al.*, 2003].

Entre otros países del continente Americano también se describieron diferencias en las formas clínicas y la patogenia de la histoplasmosis. En efecto, comparando las manifestaciones de la enfermedad, Karimi *et al.* [2002] observaron lesiones cutáneas en 66 % de los pacientes de Sao Paulo (Sur de Brasil), y sólo 1-7 % de los pacientes de EU. Los autores atribuyen este hecho a una posible diferencia en la virulencia entre los aislamientos obtenidos al Norte y Sur del Ecuador. En un modelo murino experimental, el mismo grupo de trabajo demostró una mayor virulencia de las cepas de pacientes de Brasil comparadas con las de paciente norteamericanos [Durkin *et al.*, 2004]. Un trabajo retrospectivo realizado sobre población del sur de Brasil, [Unis *et al.*, 2004] mostró un porcentaje elevado de lesiones cutáneas en pacientes con SIDA e histoplasmosis, sugiriendo que estas diferencias pueden deberse a diferencias en patogenicidad entre aislamientos de Norte y Sudamérica.

FENOTIPOS Y VIRULENCIA

Macro- y micromorfología. Desde los primeros estudios de caracterización de aislamientos de *H. capsulatum* se intentó establecer una asociación entre morfotipo y virulencia. Berliner [1968] fue la primera en postular que los aislamientos primarios son lo más parecido a la verdadera forma fúngica infectiva y que la diversidad morfológica de los cultivos primarios es generalmente ignorada en el diseño de estudios de virulencia y respuesta inmune. De hecho, la mayoría de estos estudios se realizaron con cepas muy subcultivadas en el laboratorio, sin tener en cuenta que tal vez durante las sucesivas resiembras se pierden factores esenciales a la virulencia y la antigenicidad.

El hecho real es que el hongo aislado de diversos cuadros clínicos de la enfermedad muestra un amplio polimorfismo fenotípico, inclusive con macro- y micromorfologías no características de la especie. Estas variantes incluyen colonias glabras y verrugosas [Rippon, 1992], colonias húmedas, cerebriformes y pigmentadas a 25-28 °C, con clamidosporas al examen microscópico [Lacaz *et al.*, 1999; Sandin *et al.*, 1993; Sutton *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999]. Muchos de estos aislamientos atípicos fueron notificados en pacientes tratados con antifúngicos [Kwon-Chung & Bennett, 1992] y en pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA [Staib & Grosse, 1996; Taylor *et al.*, 1999; Zuiani *et al.*, 2005].

Hasta el momento, los escasos estudios de morfotipo y virulencia se realizaron con la fase L. Diferentes investigadores demostraron que las levaduras provenientes de cepas pardas (colonias **B en fase M**) eran letales para el conejo, y además más virulentas en el modelo murino que las albinas (colonias **A en fase M**) [Campbell & Berliner, 1973; Daniels *et al.*, 1968; Tewari & Berkhout, 1972].

Dimorfismo. El dimorfismo no es sólo un fenómeno morfogénico, es un evento muy complejo desde el punto de vista fisicoquímico (pH, potencial redox, choque térmico), bioquímico (vías metabólicas), así como transducional y genético. Se ha comprobado que la transformación dimórfica es importante en la patogénesis de *H. capsulatum* en el modelo murino, puesto que el bloqueo de esta transformación con un inhibidor de grupo sulfhídrico (ácido *p*-cloromercurifenil-sulfónico) hace que algunas cepas sean incapaces de producir infección y enfermedad [Medoff *et al.*, 1987]. También, la mayor rapidez de conversión termodimórfica *in vitro* ha sido asociada a mayor virulencia [Kimberlin *et al.*, 1981; Medoff *et al.*, 1986]. Sin embargo, se han aislado variantes que producen enfermedad pero que exhiben cierta incapacidad de convertir a levadura en las condiciones experimentales probadas *in vitro* [Lacaz *et al.*, 1999], por lo que se especula que los mecanismos de agresión de este patógeno son muy complejos [Ignatov & Keath, 2002]. La obtención de formas levaduriformes de *H. capsulatum* en el laboratorio no es un evento fácil. Tal aseveración fue documentada y es compartida por varios especialistas que trabajan con este hongo [Berliner, 1968; Martínez-Rivera, 1998; Sahaza-Cardona, 2004]. El éxito en la obtención de levaduras varía con la cepa, el tiempo y el número de subcultivos, y asimismo con las características del medio de conversión. Para dar un ejemplo, hay cepas que presentan la primoconversión *in vitro* en una semana, otras entre dos y tres semanas, y, finalmente, existen aquellas que no se han podido transformar en levaduras.

Termotolerancia y cinética de crecimiento. Uno de los aspectos fisiológicos más interesantes, relacionados a la virulencia, es la tolerancia de algunos aislamientos de *H. capsulatum* a temperatura de 40 °C. Spitzer *et al* [1990], con base en el análisis de dos características fenotípicas relacionadas a la cepa de referencia Downs (clase 1), su termosensibilidad a 40 °C y su avirulencia para ratones, reportaron que los aislamientos estudiados procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA del área de Saint Louis, Missouri, EU, compartían las características fenotípicas de la cepa Downs. Esta asociación fue corroborada por métodos genotípicos, los cuales revelaron que los aislamientos de Saint Louis presentaron un perfil polimórfico del mtDNA igual al de la cepa Downs, por lo que fueron incluidos en la clase 1.

Recientes estudios de termotolerancia relacionados a la cinética de crecimiento en fase L demostraron que de 37 aislamientos estudiados sólo una cepa de AR poseía un período de latencia similar al de la cepa Downs, (12 h), a las temperaturas probadas; no obstante, la única termosensible a 40 °C fue la Downs. Asimismo, los estudios fenotípicos asociados al tiempo de generación (Tg) de la fase L a 37 °C, confirman que *H. capsulatum* es un microorganismo de crecimiento lento y que tiene diferentes intervalos de Tg, dependiendo de los aislamientos estudiados [Sahaza *et al*, 2003; Sahaza-Cardona, 2004].

FENOTIPOS E INFECCIÓN MÚLTIPLE

Macro- y micromorfología. Berlíner [1968], a partir de la observación de aislamientos morfológicamente diferentes obtenidos de un mismo paciente, infirió la posibilidad de infecciones múltiples. La infección múltiple fue observada con otras especies fúngicas, cuya puerta de entrada es el aparato respiratorio [Bertout *et al*, 2001; Haynes *et al*, 1995; Menotti *et al*, 2005; Rodríguez *et al*, 1999; Sukroongreung *et al*, 1999; 2001] No es ilógico especular que en un nicho ecológico de *H. capsulatum* puedan coexistir o cohabitar aislamientos fenotípicos y/o genotípicamente distintos.

Polimorfismo isoenzimático. Gaur *et al* [1981] distinguieron gran variedad de fenotipos isoenzimáticos entre aislamientos de *H. capsulatum* de cuatro áreas geográficas de EU. En los aislamientos de ratones inoculados con muestras de suelo, estos autores encontraron que un mismo ratón estaba infectado con distintos aislamientos que presentaban diferentes fenotipos isoenzimáticos del hongo, postulando también la existencia de infección múltiple.

GENOTIPOS Y ORIGEN GEOGRÁFICO

La creciente aplicación de técnicas moleculares a la investigación de las relaciones biológicas trajo acompañado importantes avances en la taxonomía, la filogenia, la epidemiología y la patogenia de una gama de microorganismos, incluidos los hongos. Las características ecológicas, morfológicas y fisiológicas de *H. capsulatum* se analizaron a la luz de los resultados del estudio del DNA, y de esa manera se comenzaron a dilucidar las relaciones fenotípicas y/o genotípicas entre aislamientos, su origen geográfico y su interacción con los huéspedes susceptibles.

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA, conocido por sus siglas en inglés **RFLP** (restriction fragment length polymorphisms), fue uno de los primeros métodos moleculares utilizados para clasificar *H. capsulatum*. A partir de 1992 surge una clasificación molecular del hongo, con base en los perfiles de RFLP del DNA genómico comparados por hibridación con "Southern-blot", utilizando dos sondas de *H. capsulatum*, una del mtDNA y otra de un fragmento de 1.85 Kb obtenido por digestión del gen *YPS-3* con la enzima *HindIII*. Esta metodología estableció seis clases que prevalecen a la fecha, de las cuales cuatro habían sido descritas previamente [Spitzer *et al.*, 1989; 1990; Vincent *et al.*, 1986] y dos fueron incorporadas de acuerdo con el análisis de nuevos aislamientos [Keath *et al.*, 1992]. Esta clasificación permitió establecer una relación entre genotipos y origen geográfico formando seis clases conocidas: clase 1 de Norteamérica (incluye la cepa Downs y similares); clase 2 de Norteamérica que contiene la mayoría de los aislamientos de EU; clase 3 (incluye la cepa de referencia de Panamá (PA) G186B); clase 4 que se constituyó con el DNA de un aislamiento de Florida; clase 5 con aislamientos de Centro y Sudamérica; y clase 6 con un único aislamiento de un paciente con SIDA de PA. Esta clasificación, hecha mayoritariamente con aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, contiene dos representantes de var. *duboisii* que se ubicaron en la clase 2 de Norteamérica.

Posteriormente, Kersulyte *et al.* [1992] y Woods *et al.* [1993] probaron 20 oligonucleótidos aleatorios como iniciadores en la reacción de **PCR** (polymerase chain reaction), método conocido como **RAPD-PCR** (randomly amplified polymorphic DNA). Estos autores lograron discriminar diferencias sutiles entre aislamientos clínicos de *H. capsulatum* que se agrupaban en la misma clase 2 de Norteamérica [Vincent *et al.*, 1986]. Además de tener una mayor capacidad de discriminación, el método de RAPD-PCR y sus variantes pueden realizarse con pequeñas cantidades de DNA, cuya pureza no necesita ser muy alta. El análisis de los resultados de diversos autores utilizando distintos iniciadores convergieron en que el RAPD-PCR permite evidenciar agrupaciones geográficas de los genotipos y abre nuevas posibilidades para

estudios epidemiológicos de la histoplasmosis [Canteros *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c; Chávez-Tapia *et al.*, 1998; de Medeiros-Muniz *et al.*, 2001; Perrotta *et al.*, 2001; Poonwan *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Sahaza-Cardona, 2004; Taylor *et al.*, 2000a; 2005a].

Kasuga *et al.* [1999; 2003], obtuvieron una clara agrupación filogeográfica de un número considerable de cepas de *H. capsulatum*, que incluyó las variedades taxonómicas *duboisii* y *farciminosum*. Para este estudio utilizaron la secuencia parcial de cuatro genes que codifican las siguientes proteínas: el factor de ribosilación del ADP (*ARF*); el precursor del antígeno H (*H-ANT1*); la desaturasa $\Delta-9$ de ácido graso (*OLE*) y; la α -tubulina (*TUB1*). Estos autores describieron ocho clados asociados al origen geográfico, según lo referido previamente. Esta técnica, mucho más precisa para establecer relaciones filogenéticas, también corrobora la asociación entre genotipo y lugar de origen (filogeografía).

GENOTIPOS Y VIRULENCIA

Spitzer *et al.* [1990] fueron los primeros en relacionar características fenotípicas (termosensibilidad) y genotípicas (restricción de mtDNA / hibridación con YPS-3) de aislamientos clínicos de tres pacientes con SIDA y cinco pacientes VIH negativos de Missouai, EU. Los aislamientos de pacientes con SIDA se agruparon genéticamente con la cepa Downs y fueron termosensibles a 40 °C. Estos autores postularon que los pacientes con SIDA pueden ser susceptibles a la infección con genotipos "Downs-like" de *H. capsulatum*, los cuales no causan enfermedad en otros grupos de pacientes inmunocomprometidos o no. Sin embargo, esto no exime a los pacientes con SIDA de infectarse con cepas de alta virulencia.

Carter *et al.* [1996], en un estudio con 30 pacientes de Indiana, EU, no encontraron asociación entre el genotipo de los aislamientos, el estado inmunológico y/o las formas clínicas de la enfermedad, al utilizar once marcadores bialélicos en PCR. Sin embargo, en ese estudio, la enfermedad de base del huésped fue identificada sólo en 11 pacientes.

En MX, Reyes-Montes *et al.* [1999] estudiaron aislamientos de *H. capsulatum* de fuentes naturales y de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA y, asimismo, de pacientes sin evidencia de infección con VIH. Al analizar los perfiles electroforéticos del DNA revelados por RAPD-PCR (iniciador 1281) y los perfiles de exoantígenos obtenidos en SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), los autores sugieren la existencia de una relación entre la condición de infección con VIH y el fenotipo y/o genotipo de los aislamientos. Con el mismo método molecular y el mismo iniciador, en AR, Perrotta *et al.* [2001] también

encontraron que la mayoría de los aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes con SIDA se agruparon en "clusters" muy relacionados.

En Brasil, de Medeiros-Muniz *et al* [2001], al utilizar RAPD con otros iniciadores, observaron un marcado polimorfismo genético en 28 aislamientos clínicos de pacientes, tanto VIH positivos como negativos. Los aislamientos de los pacientes con SIDA no presentaron un genotipo predominante y tampoco estuvieron relacionados con la cepa Downs. Karimi *et al* [2002], mediante RFLP e hibridación con YPS-3, y además de RAPD-PCR, compararon aislamientos clínicos de pacientes con SIDA de Brasil y EU; en los brasileños predominaban las lesiones cutáneas y sus aislamientos pertenecían a los genotipos clases 5 y 6, según Keath *et al* [1992], mientras que las lesiones cutáneas eran raras o no existían en los pacientes de EU y todos sus aislamientos pertenecían a la clase 2 de Norteamérica. Con base en sus resultados, estos autores postularon la existencia de una asociación entre genotipo y tropismo tisular.

Hasta el momento, los resultados que respaldan la asociación genotipo y virulencia siguen siendo poco concluyentes, debido a que no se caracteriza en forma fehaciente y sistemática la relación entre los aislamientos y los datos clínicos del huésped y a que el número de aislamientos estudiados es bajo en la mayoría de los estudios.

GENOTIPOS E INFECCIÓN MÚLTIPLE

Poonwan *et al* [1998] fueron los primeros en comunicar la coexistencia de diferentes genotipos en aislamientos de *H. capsulatum* de un mismo paciente (lavado broncoalveolar y sangre). Este interesante hallazgo molecular sustenta los hallazgos fenotípicos previos que sugieren la posible infección múltiple. Sin embargo, de Medeiros-Muniz *et al* [2001] y Carter *et al* [2001] no pudieron determinar diferencias entre aislamientos de diferentes orígenes clínicos de un mismo paciente, al utilizar RAPD-PCR y polimorfismo de secuencias microsátélites, respectivamente.

A la fecha, la infección múltiple no ha sido comprobada categóricamente en la histoplasmosis por ninguno de los métodos feno- y/o genotípicos.

ELECTROCARIOTIPOS

En el pasado, el estudio del cariotipo fúngico fue relegado porque los métodos de la genética clásica no permitían la observación de los cromosomas de los hongos debido a su pequeño

tamaño. Sumado a esto, los métodos citogenéticos son extremadamente laboriosos para ser aplicados a un gran número de aislamientos fúngicos. A partir del advenimiento de PFGE (pulse field gel electrophoresis) en el estudio del genoma fúngico, los cariotipos electroforéticos (electrokaryotypes, Eks) de algunos hongos patógenos de humanos empezaron a ser estudiados, entre ellos el de *H. capsulatum*. Este método, con más de una variante, además de permitir el revelado de cromosomas pequeños, evidencia el polimorfismo cromosómico (CLP-chromosome length polymorphism) que presentan las especies fúngicas en general [Beadle *et al.*, 2003; Fierro & Martín, 1999; Romero-Martínez *et al.*, 2004; Zolan, 1995].

Steele *et al.* [1989] estudiaron por primera vez los Eks de tres cepas de laboratorio de *H. capsulatum*, utilizando dos variantes CHEF (contour-clumped homogeneous electric field) y FIGE (field-inversion gel electrophoresis). Estos autores observaron que la cepa Downs de EU, termosensible y avirulenta en el modelo murino, poseía al menos siete cromosomas, mientras que las cepas G217B de EU y G186B de PA, consideradas virulentas en el ratón, poseían tres y cuatro cromosomas, respectivamente. De esta manera, los autores demostraron la existencia de CLP en *H. capsulatum*. Posteriormente, Carr y Sherer [1998], usando tres métodos diferentes, determinaron los tamaños del genoma de las cepas Downs y G186A en 32 y 22 Mbp, respectivamente. Recientemente, Magrini *et al.* [2004] utilizando un mapeo de restricción, con tres endonucleasas (*Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I), combinado con varias técnicas moleculares, calcularon el tamaño genómico de la cepa G217B por encima de 43.5 Mbp. Estos datos confirman las diferencias en el tamaño genómico entre aislamientos de este hongo. Parte de los resultados publicados de esta tesis confirma el CLP en aislamientos clínicos, revelando 15 Eks entre 19 aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes de AR, MX, Guatemala (GT) y la cepa G186B. Aunque el CLP quedó ampliamente demostrado, tanto en número como en tamaño de las bandas, no se encontró relación estrecha entre el Ek, la enfermedad de base y el origen geográfico [Canteros *et al.*, 2005d]. Hasta el momento no están claros los mecanismos por los cuales estas variaciones en bandas cromosómicas pueden ocurrir, aunque son varias las hipótesis propuestas. Las especies fúngicas pueden, durante su ciclo vital, sufrir reordenamiento cromosómico, deleciones y/o inserciones de fragmentos de DNA genómico durante los procesos de recombinación [Fierro & Martín, 1999; Zolan, 1995]. Estos eventos, en otras especies fúngicas patógenas para el hombre, pudieron relacionarse a cambios fenotípicos y fisiológicos [Magee, 1993; Rustchenko *et al.* 1994], a virulencia y, en general, a procesos adaptativos frente a cambios ambientales [Zolan, 1995].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La capacidad de *H. capsulatum* para producir enfermedad está asociado a factores inherentes tanto al huésped como al patógeno. La infección se puede mantener en forma subclínica mientras el sistema inmune es competente, y puede progresar a enfermedad sólo cuando existe un cierto grado de inmunocompromiso y la presencia de factores genéticos que aumentan la susceptibilidad del huésped. Con respecto a los factores inherentes al patógeno, se ha explorado la diversidad fenotípica y/o genotípica de *H. capsulatum* en aislamientos clínicos y ambientales procedentes de diversas áreas endémicas; si bien estos estudios revelaron un vasto polimorfismo intra-especie, sus resultados son preliminares y todavía contradictorios, particularmente cuando son asociados con patologías específicas como el SIDA [Carter *et al.*, 1996; de Medeiros-Muniz *et al.*, 2001; Perrotta *et al.*, 2001; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Spitzer *et al.*, 1990].

Es posible que pacientes con ICS sean susceptibles a la infección por una amplia variedad de cepas que habitualmente no son causa de enfermedad en otros grupos de pacientes [Spitzer *et al.*, 1990]. En efecto, en pacientes con ICS el microorganismo se comportaría como un oportunista, y al no encontrar mayor oposición por parte de la respuesta inmune del huésped, cualquier cepa estaría en condiciones de producir infección y posterior enfermedad. En cambio, sólo los microorganismos más virulentos estarían en condiciones de producir enfermedad en pacientes con ICL. Si esto es cierto, las características genéticas de los aislamientos provenientes de pacientes con ICL podrían ser distintas de las de pacientes con ICS. Asimismo, las cepas que afectan a pacientes con diferente grado de inmunodepresión podrían diferir también en sus características fenotípicas.

Para comprender el alcance real de la relación huésped-parásito en la histoplasmosis, sería de mucha utilidad discriminar inmunológicamente la enfermedad de base en cada paciente, antes de realizar estudios fenotípicos y/o genotípicos de los aislamientos.

HIPÓTESIS

Cualquier cepa de *H. capsulatum* var. *capsulatum* es capaz de infectar y enfermar a pacientes con ICS. Sin embargo, sólo algunas con características fenotípicas y/o genotípicas particulares son capaces de producir enfermedad en pacientes con ICL, y estas características podrían ser independientes del origen geográfico de los aislamientos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la similitud y diversidad fenotípica y/o genotípica de aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a los diferentes tipos de inmunocompromiso y la enfermedad de base, al tipo de material clínico y al origen geográfico de los pacientes.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar diferencias fenotípicas (morfotipo colonial, tasa de crecimiento y producción de proteínas extracelulares) en la fase infectiva de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de pacientes con ICS e ICL.

Determinar diferencias genotípicas (Eks y CLP del genoma intacto y polimorfismo del DNA mediante RAPD-PCR) en los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de pacientes con ICS e ICL.

Determinar diferencias fenotípicas y/o genotípicas en aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de distintas áreas geográficas de Latinoamérica.

Determinar diferencias fenotípicas y/o genotípicas en aislamientos de *H. capsulatum* provenientes de distintas localizaciones anatómicas de un mismo paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTOS Y CEPAS DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM*

Se analizó un total de 74 aislamientos clínicos y dos cepas de referencia internacional, como se detalla a continuación:

a) De AR se procesaron 56 aislamientos, provenientes de 44 pacientes, puesto que de algunos pacientes se lograron múltiples aislamientos. La mayoría de los aislamientos de AR fueron obtenidos durante un estudio de corte transversal realizado, entre 2000 y 2002, por el Departamento Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS, "Dr. Carlos G. Malbrán", de Buenos Aires. Además, se incluyó un aislamiento clínico del año 1990 que se utiliza como cepa de referencia doméstica del laboratorio (cepa 90455). Todos estos especímenes fúngicos se mantienen preservados en la Colección de Cultivos del Departamento Micología.

b) De MX (n = 14) y GT (n = 3), depositados en la "Colección de Cultivos de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM" [Taylor *et al.*, 1999].

c) Dos cepas de referencia internacional: Downs de EU y G186B de PA. Ambas donadas por el Dr. G. S. Kobayashi, de la Universidad de Washington.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes de los cuales provenían los aislamientos y los datos analizados fueron vertidos en una planilla de Excel versión 2000 para Windows. En la **Tabla 1** se describen las características más importantes: número de registro, procedencia geográfica, sexo del paciente, material clínico y enfermedad de base concomitante. Los pacientes con HP y una enfermedad manifiesta del sistema inmune fueron clasificados en el grupo ICS, y aquellos sin causa conocida de inmunodepresión fueron clasificados en el grupo ICL.

En este estudio se incluyeron múltiples aislamientos de ocho pacientes distintos, obtenidos durante el mismo o diferente episodio clínico; éstos están discriminados en la **Tabla 2**.

Los criterios de inclusión de los aislamientos fúngicos en el presente estudio fueron principalmente: la macro- y micromorfología y la presencia de exotígenos específicos (H y/o M) en los sobrenadantes de cultivos de la fase M.

Para los ensayos, todos los cultivos de *H. capsulatum* fueron mantenidos en fase M por siembras sucesivas cada 90 días en agar Sabouraud (glucosa 2 %, peptona 1 % y agar 1.5 %), como procedimiento rutinario de laboratorio.

ESTUDIOS FENOTÍPICOS

MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE M

Procedimiento. El agar micobiótico (Bioxón, México, DF) se preparó según las especificaciones del fabricante, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C y se vertieron 25 ml de agar por placa de Petri de 10 mm de diámetro. Las placas fueron colocadas en incubación 48 h a 25-28 °C, para controlar su esterilidad.

Un pequeño fragmento de la cepa en estudio fue sembrado en el centro de la superficie del agar. Los bordes de la placa fueron sellados con cinta adhesiva transparente para evitar la contaminación y desecación. Cada placa se mantuvo en posición invertida durante el tiempo del cultivo para evitar que las esporas se dispersaran y al germinar formaran colonias satélites que pudieran afectar el desarrollo pleno de la colonia central. A los 35 días de crecimiento a 25-28 °C se documentó fotográficamente el aspecto de cada colonia, por el anverso y el reverso.

Todos los aislamientos fueron caracterizados por el aspecto colonial típico para la fase M de la especie *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Los datos de la macromorfología de las colonias fueron vertidos en una planilla Excel, realizada *ad hoc*, para su posterior análisis. Los experimentos fueron realizados por quintuplicado y dos observadores independientes registraron, a ciego, las características de cada aislamiento, según los siguientes criterios de lectura:

- **Textura:** aterciopelada, pulverulenta, glabra;
- **Extensión:** limitada, no limitada;
- **Superficie:** plana, plegada;
- **Pigmento pardo:** presente, ausente.

Para sistematizar las observaciones se realizó un análisis de agrupamiento por el método UPGMA (**unweighted pair group method analysis with arithmetic averages**), sobre la base de la matriz de similitud de coeficiente de distancia “taxonómica” entre caracteres. El análisis fue realizado en NTSYSpc ver 2.02j. Se incluyeron en el análisis las dos cepas de referencia (G186B y Downs).

Los morfotipos resultantes fueron incorporados a las **Tablas 1 y 2**.

MICROMORFOLOGÍA DE LA FASE M

Procedimiento. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estrictas de esterilidad. Dentro de una placa de Petri de vidrio se colocó un soporte y sobre éste dos portaobjetos

limpios. Se esterilizó el material mediante calor seco (160 °C, 2 h). Sobre cada uno de los portaobjetos se distribuyó una gota de agar Sabouraud en forma de óvalo. Un fragmento de micelio fúngico de 1 a 2 mm fue colocado en cada uno de los extremos del agar. Se invirtió cada portaobjeto con el inóculo y se agregó agua destilada en el fondo de la placa de Petri para producir una atmósfera húmeda. La humedad se controló periódicamente durante los 35 días de incubación del ensayo a 25-28 °C. El cultivo se inactivó con vapores de formol 40 %. Los microcultivos fueron fijados con Colodión por 24 h y observados al microscopio previa coloración con azul de lactofenol.

Se registró presencia o ausencia de macro- y microconidios. Se midió el tamaño de los macroconidios con un ocular graduado y con objetivo de 40x, en un microscopio óptico Nikon OPTIPHOT-2 (Nikon, Japan). Se midieron, por cada aislamiento, al menos 50 macroconidios en dos microcultivos y se registraron los valores máximo y mínimo (**Tablas 1 y 2**). En caso de ausente o escasa conidiación, se realizó la búsqueda en al menos cuatro microcultivos. Las medidas de los macroconidios, fueron vertidas en una planilla de cálculo Excel que permitió determinar el diámetro promedio y su desviación estándar (SD) de los conidios de cada aislamiento (**Tablas 1 y 2**).

Todos los microcultivos fueron fotodocumentados con un sistema de cámara digital (PIXERA Studio 3.0.1, Pixera Corporation, Japan) adaptado a un microscopio triocular Nikon OPTIPHOT.

TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) DE LA FASE M

Experimentos preliminares con 11 aislamientos fueron realizados para comparar el crecimiento en superficie versus el crecimiento sumergido.

Tasa de crecimiento en cultivo sobre superficie. A partir de un inóculo de 7 días, incubado a 25-28 °C en placas de agar micobiótico, se tomó un fragmento de 1 mm de diámetro, de cada aislamiento y de las cepas de referencia, y se colocó en el centro de la superficie de la placa. Los bordes de la placa fueron sellados y la placa fue incubada en posición invertida. A los 7, 14, 21 y 28 días se realizaron lecturas del diámetro mayor y menor de la colonia. Los valores obtenidos de cada tiempo fueron vertidos en una planilla de Excel donde se calculó el área de la superficie de la colonia en mm², según la siguiente fórmula: **Área = $\pi \times R \times r$** (R: radio mayor, r: radio menor). Se determinó la tasa de crecimiento de los aislamientos y cepas estudiados, por comparación del área (mm²) obtenida en los diferentes tiempos de lectura. Cada ensayo fue

realizado por quintuplicado. Los valores del área de desarrollo expresadas en $\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$ fueron transformados a $\mu \text{ día}^{-1}$ como se indica posteriormente en “Análisis de correlación entre el cultivo sumergido y el de superficie”.

Tasa de crecimiento en cultivo sumergido. Conidios y fragmentos de micelio de un cultivo de dos semanas en agar Sabouraud a 25-28 °C, fueron suspendidos en 5 ml de solución fisiológica adicionada con 5 % de Tween-20. La suspensión fue trasvasada a un tubo estéril conteniendo perlas de vidrio y agitada vigorosamente en un vórtex. Una vez homogeneizada, la suspensión fue diluida en Sabouraud líquido hasta alcanzar una turbidez equivalente a 2 en la escala de Mac Farland. Un mililitro de ésta fue agregado a 9 ml del mismo medio de cultivo. Se sembraron 12 tubos por cada aislamiento estudiado. En el día 7 se tomaron tres tubos, los que se inactivaron con formol al 40 %. La biomasa de cada tubo fue separada por filtración en un embudo Büchner, con un filtro Whatman N° 1 previamente tarado, y fue lavada con agua destilada para eliminar residuos del medio. El filtro fue colocado en una estufa de secado a 80 °C, durante tres días. Luego, fue pesado para determinar el peso seco del micelio, por diferencia con el peso previo. Esta operación se repitió para los 14, 21 y 28 días. Los valores de peso seco fueron anotados en una planilla de cálculo Excel, y los promedios de los pesos calculados y la tasa de crecimiento expresada en g día^{-1} fue transformada a $\mu \text{ día}^{-1}$ como se indica a continuación.

Análisis de correlación entre el cultivo sumergido y el de superficie. Los valores de la tasa de crecimiento en $\text{mm}^2 \text{ día}^{-1}$ y en g día^{-1} , a diferentes tiempos, fueron utilizados para el cálculo de μ . Se eligió la tasa específica porque es constante en toda la curva de crecimiento del organismo y está expresada por unidad de biomasa. Para los cultivos en superficie se realizó la transformación a raíz cuadrada de los datos y se ajustaron al siguiente modelo: **raíz cuadrada (superficie X) = raíz cuadrada (superficie 0) $\times \mu \times t$** (X: biomasa al tiempo t, 0: inicial, μ : tasa específica de crecimiento, t: tiempo). Para los cultivos sumergidos se ajustaron los datos al modelo común de crecimiento exponencial transformado. Se trabajó con los logaritmos naturales de los datos, según la siguiente fórmula: **$\ln X = \ln X_0 + \mu \times t$** (X: biomasa al tiempo t, X_0 : biomasa inicial, μ : tasa específica de crecimiento, t: tiempo).

CONVERSIÓN DIMÓRFICA (FASE M A L)

La fase M de los aislamientos y las dos cepas de *H. capsulatum* estudiadas fueron cultivadas en diferentes medios para su conversión dimórfica: (a) medio sintético de Tewari y Kegel [1971]; (b) medio agar MLGema [Fressatti *et al.*, 1992]; (c) agar BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI)

suplementado con cisteína y glucosa [Kwon-Chung & Bennett, 1992]. Los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación para el medio de Tewari y Kegel, y a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ para los medios con agar. Se realizaron subcultivos individuales cada 72-96 h, hasta lograr la conversión. Una vez obtenida la fase L completa, la biomasa de levaduras procedente de un cultivo de 72 h en BHI a 37 °C fue cosechada y preservada a -80 °C hasta su uso. La criopreservación se realizó en presencia de suero fetal bovino (GIBCO BRL, Gran Island, Biological Co. N.Y.) y dimetilsulfóxido (9:1) previamente esterilizado por filtración (Sahaza-Cardona, 2004).

MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE L

Procedimiento. Se preparó agar BHI (Difco) suplementado y se distribuyó en placas de Petri de 50 mm de diámetro, las cuales fueron incubadas 48 h a 25-28 °C para controlar su esterilidad. Cada aislamiento fue sembrado en el centro de la superficie del agar e incubado a 37 °C en atmósfera de CO₂. A los 21 días de crecimiento se documentó fotográficamente el aspecto de la colonia por el anverso. Los parámetros determinados fueron:

- **Aspecto:** liso o rugoso;
- **Borde:** liso o irregular;
- **Pigmento:** presente o ausente.

IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE EXOANTÍGENOS

Inmunodifusión doble (IDD). La presencia de exoantígenos específicos de *H. capsulatum* (H y M) se determinó en sobrenadantes de cultivos de la fase M de cada aislamiento, sembrados en caldo GYE (glucosa 2 % y extracto de levadura 1 %) y mantenidos por 3 meses a 25-28 °C en cultivo estático. Después de la incubación, cada cultivo se inactivó con timerosal 1:5000 y se separó la biomasa micelial por filtración. El sobrenadante fue filtrado utilizando membranas de 0.22 µm y concentrado por congelación (Taylor ML, comunicación personal). Brevemente, se repartió el filtrado en dos tubos de plástico de 50 ml y se almacenó a -20 °C hasta congelamiento. La capa superior más oscura y densa del congelado (antígeno crudo) se extrajo con una espátula (aproximadamente entre 2 y 4 ml), se colocó en un tubo y se preservó a 4 °C.

Para identificar la especificidad de cada exoantígeno se utilizó el método de inmunodifusión doble en gel de agar (IDD) [Ouchterlony & Nilsson, 1978], empleando los reactivos biológicos del equipo IMMY (IMMUNO-MYCOLOGICS, INC. Norman, OK), tanto el suero anti-*H.*

capsulatum como su antígeno homólogo. La identificación inmunológica de los aislamientos se efectuó con base en la aparición de las bandas de identidad, H y/o M, características de la especie.

Separación electroforética de exoantígenos. Los exoantígenos previamente identificados por IDD fueron sometidos a SDS-PAGE. Inicialmente, se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford [Bradford, 1976]. Cada exoantígeno, ajustado a la concentración de trabajo según los mg de proteínas, fue diluido 1:4 en amortiguador de preparación de muestra (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, conteniendo SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.025 %) y tratado a 100 °C por 4 min.

La electroforesis se realizó según el método de Laemmli [Laemmli, 1970] en el sistema Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) a 200 V por 40 min a 4 °C, usando como concentrador un gel al 4 %, y como separador un gel homogéneo al 12 %. Se sembró 1.0-1.2 µg de proteínas por carril. Cada exoantígeno fue sometido a dos corridas electroforéticas, como mínimo.

Se utilizó un marcador comercial para SDS-PAGE de amplio peso molecular en el intervalo de 200-6.5 kDa (Bio-Rad), y el antígeno testigo de *H. capsulatum* producido en el INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán de AR, previamente validado por IDD y Western blotting (WB) frente a antígeno y antisuero estándar.

El gel fue coloreado primeramente con Coomassie blue R-250 (límite de detección 1-10 µg de proteínas por banda) al 0.1 % en metanol al 40 % y ácido acético glacial al 10 %, durante 1 h. Enseguida, decolorado con una mezcla de metanol al 40 % y ácido acético al 10 %, hasta la visualización de las bandas. Para aumentar la sensibilidad, los geles fueron revelados posteriormente con plata (límite de detección 10-100 ng de proteínas por banda), utilizando el método de Oakley *et al.* [1980]. Brevemente, el gel procedente de la coloración con Coomassie blue fue lavado con etanol al 50 %, pre-tratado por 1 min exacto con tiosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5 H_2O 0.2 g l⁻¹), lavado tres veces con agua bidestilada por 20 s exactos, impregnado por 20 min con solución de nitrato de plata (AgNO_3 2 g l⁻¹, formol 0.75 ml l⁻¹) y lavado 2 veces con agua bidestilada por 20 s. El revelado se realizó con solución de tiosulfito de sodio-carbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5 H_2O 4 mg l⁻¹, Na_2CO_3 60 g l⁻¹, formol 0.5 ml l⁻¹), hasta la aparición de bandas pardas. La reacción fue detenida con metanol al 50 % y ácido acético al 12 %. Los geles fueron documentados en un escáner UMAX Astra 610 P.

Western blotting. Para confirmar la presencia de bandas H y M e identificar sus posiciones en el perfil electroforético, se usó el método de WB [Pizzini *et al.*, 1999]. Brevemente, luego de efectuada la separación de proteínas en SDS-PAGE, los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa durante 1 h a 100V en Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), en amortiguador de transferencia (Tris-ClH 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 % v:v, pH 8.3). Las membranas fueron bloqueadas con albúmina al 5 % y la presencia de las bandas H y M fue revelada con un suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum*, diluido 1:100 [Perrotta *et al.*, 1998]. Se utilizó proteína A-peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluida 1:1000 como reactivo secundario, y el revelado se realizó con 4 cloro-1 naftol [Gandhi, 1986].

ESTUDIOS GENOTÍPICOS

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

Cultivo del microorganismo. Los aislamientos se mantuvieron en caldo GYE en cultivo estático a 25-28 °C, durante 3 a 4 semanas. Cada micelio se cosechó individualmente por filtración en un embudo Büchner con papel filtro Whatman N° 1. El micelio fue lavado con agua destilada estéril para eliminar el exceso de medio, secado y conservado a -20 °C hasta el momento de su procesamiento, previa verificación de la identidad de *H. capsulatum* mediante IDD en los sobrenadantes de los cultivos concentrados por congelación. En ausencia de bandas H y/o M por IDD frente al suero de referencia, el micelio fue considerado contaminado y por lo tanto descartado.

Extracción del DNA genómico. Una porción de aproximadamente 2 g de cada micelio se trituro con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana hasta obtener polvo fino. El micelio triturado se repartió en cuatro tubos Eppendorf y se adicionaron 600 µl de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM, SDS 6 %, β-mercaptoetanol 1 %). La suspensión resultante se agitó manualmente y se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C, por 10 min, y el sobrenadante (500 µl aproximadamente) se transfirió a un tubo Eppendorf, al cual se adicionaron 10 µl de proteinasa K (Sigma) a una concentración final de 200 µg ml⁻¹. Después de mezclar e incubar por 2 h a 55 °C, se adicionó RNAsa (Qiagen Hilden, Alemania) a una concentración final de 100 µg µl⁻¹ y se incubó a 37 °C por 2 h. La extracción del DNA se realizó con igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando el tubo suavemente por inversión, hasta obtener una mezcla lechosa. Enseguida, se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C por 15 min. La fase acuosa (superior) fue

separada y colocada en un nuevo tubo donde se agregaron 10 μ l de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 100 % en frío. Cuando se observó hebra de DNA, ésta fue separada, lavada con etanol 70 % y resuspendida en 100 μ l de agua de MilliQ. En ausencia de hebra de DNA, el tubo se incubó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, se realizó la centrifugación y el botón fue lavado con etanol al 70 %, secado y resuspendido en 50 μ l de agua de MilliQ.

Para verificar la presencia y calidad del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.9 %, preparado en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) adicionado con 1:10000 partes de bromuro de etidio 10 μ g ml⁻¹. Dos microlitros de cada muestra fueron mezclados con igual volumen de amortiguador de muestra (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, ClNa 50 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 5 mM, glicerol 20 %, azul de bromofenol 1 mg ml⁻¹, xileno cianol 1 mg ml⁻¹) y sometido a electroforesis (100 V, 40 min) en el mismo amortiguador en el que fue preparado el gel. Después, se observó la presencia, integridad y pureza del DNA en un transiluminador. Las muestras fueron conservadas a -20 °C para su uso posterior. Cuando el DNA presentó impurezas, se repitió el tratamiento con RNAsa y/o proteinasa K, y extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).

Determinación de la concentración de DNA. Se realizó una electroforesis de 2 μ l del DNA problema y concentraciones crecientes de fago λ (GIBCO) en agarosa al 0.8 % con bromuro de etidio. Se visualizó por UV y se registró la banda de DNA en un fotodocumentador de geles GeneCam (Synoptics Ltd, Syn Gene, Cambridge, UK). La estimación semicuantitativa de cada muestra se realizó por comparación visual de las imágenes documentadas. Los DNAs de todos los aislamientos fueron diluidos a una concentración de 10 ng μ l⁻¹.

RAPD-PCR. Se empleó una versión del método probado con anterioridad para *H. capsulatum* con excelentes resultados [Hu *et al.*, 1995]. Se emplearon dos iniciadores de 10 nucleótidos: 1281 (5'-AACGCGCAAC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') (Operon Technologies Inc. Alamenda, CA). Las condiciones de trabajo fueron estandarizadas previamente [Taylor *et al.*, 2000a] con 10 ng de DNA genómico, 30 pmoles de cada iniciador, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs (Invitrogen- Tech-Line Life, USA) 0.2 mM, *Taq* DNA polimerasa (Perkin-Elmer Cetus Norwalk, CT) 1 U y amortiguador 10X 2.5 μ l para un volumen final de reacción de 25 μ l.

En un termociclador (Cycler Ver 2.038, Bio-Rad) se aplicó el siguiente programa de amplificación: un ciclo de 7 min a 94 °C, seguido por 45 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 35 °C y 1 min a 72 °C. Finalmente, se llevó a cabo una extensión de 5 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5X durante 270 min a 90 V. Se utilizó 123 bp DNA Ladder (Invitrogen) como estándar de pares de bases. Para visualizar las bandas, los geles fueron coloreados con bromuro de etidio a una concentración de 10 µg ml⁻¹. La imagen de los geles fue capturada en un fotodocumentador Gene Snap Synoptics. El tamaño de los fragmentos se calculó por comparación con el marcador 123 bp DNA Ladder. El RAPD-PCR fue realizado por triplicado, como mínimo para cada DNA.

CARIOTIPIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)

Preparación de los bloques de agarosa. Las levaduras se cultivaron por 72 h en caldo GYE a 37 °C y agitación a 120 rpm. Las células fueron cosechadas, centrifugadas y lavadas con agua destilada. Como paso previo a la preparación de los bloques de agarosa se estimuló la formación de esferoplastos; para ello se probaron diferentes cantidades de enzima lisante de *Trichoderma harzianum* (Sigma) (entre 300 y 600 µg) y liticasa (Sigma) (entre 80 y 200 U). La actividad óptima para 0.1 g de levaduras se logró con una mezcla de 500 µg de enzima lisante de *T. harzianum* y 84 U de liticasa. Enseguida, las células fueron inmersas en agarosa de bajo punto de fusión (2 %) en amortiguador EDTA 0.125 M, y la mezcla fue dispensada en los moldes para formar bloques. Los bloques formados se incubaron con agitación suave por 8 h a 25-28 °C. Los esferoplastos fueron lisados con una solución de laurilsarcosina al 1 % en EDTA 500 mM pH 8.0, y proteínaasa K (0.5 mg ml⁻¹) con agitación suave a 55 °C por 18 h. Luego, los bloques fueron lavados tres veces a 50 °C con amortiguador Tris-EDTA (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) y finalmente dos veces con el mismo amortiguador a 25-28 °C. Los bloques fueron conservados a 4 °C en amortiguador EDTA 50 mM hasta su utilización.

Una porción del cultivo original se incubó en 500 ml de caldo GYE a 25-28 °C hasta el crecimiento total del hongo en la superficie del medio líquido (30 a 60 días). En el sobrenadante de este cultivo concentrado por congelación se buscó la presencia de bandas específicas de precipitación por IDD. En ausencia de banda de precipitación el bloque fue descartado.

Optimización del PFGE para *H. capsulatum*. La separación electroforética de las bandas cromosómicas se realizó en un aparato CHEF-DR III (Bio-Rad). La **Tabla 3** muestra los protocolos de corrida electroforética sugeridos para tres distintas especies fúngicas con bandas cromosómicas cuyos tamaños estuvieran en los intervalos de las posibles bandas de *H. capsulatum*. Todas las electroforesis para *H. capsulatum* se realizaron en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato

40 mM pH 7.5, EDTA 2 mM pH 8.0) a temperatura constante de 14 °C y con ángulo de 106°. Los geles fueron revelados con bromuro de etidio, observados en un transiluminador y documentados fotográficamente.

Se probaron diferentes protocolos de corrida con base en: (a) los protocolos sugeridos en la **Tabla 3**; (b) estudios realizados por otros investigadores sobre separación cromosómica de hongos [Perrotta et al., 2002; Sambrook & Russell, 2001]; (c) el número y tamaño de las bandas cromosómicas de *H. capsulatum* estimado por Steele *et al.* [1989]. Dada la variabilidad prevista en el número y tamaño de las bandas cromosómicas de este hongo, en la mayoría de los protocolos se emplearon diferentes gradientes de tiempos de pulso para evitar áreas de compresión de bandas en el centro del gel. En la **Tabla 4** se presenta una síntesis de las condiciones probadas antes de elegir el mejor protocolo de corrida.

Preparación de bloques de referencia. En la imposibilidad de contar con un control de las corridas de PFGE con bandas cromosómicas por encima de los 5.7 Mbp, y frente a la necesidad de este patrón para luego trabajar con el programa de análisis de perfiles, se eligió un aislamiento para utilizarlo como estándar en todas las corridas de PFGE. Para esto se seleccionó un aislamiento que poseía el Ek más común entre los aislamientos estudiados. Éste fue denominado “Control” y correspondió al aislamiento 02923. Los tamaños de sus bandas, fueron calculados previamente con base en dos estándares, *Hansenula wingeii*: 3.13-2.7; 2.3-1.7 y 1.05 Mbp y *Schizosaccharomyces pombe*: 5.7-4.6-3.5 Mbp, (Bio-Rad). Los tamaños de bandas cromosómicas calculados para el bloque “Control” fueron: 7.0, 5.8, 4.5, 3.8 y 2.4 Mbp. Varios bloques de la cepa 02923 fueron producidos y conservados a 4 °C para ser utilizados en todos los experimentos, en conjunto con los marcadores comerciales.

ANÁLISIS DE PERFILES ELECTROFORÉTICOS

Los perfiles fotodocumentados procedentes de los ensayos de SDS-PAGE, RAPD-PCR y PFGE fueron sometidos al programa computarizado BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium, <http://www.applied-maths.com>), que realiza el análisis integral de las relaciones biológicas entre los aislamientos estudiados según los diferentes ensayos. Las imágenes fueron convertidas a formato tiff en 256 tonos de grises, y al menos 300 dpi de resolución en el procesador de imágenes Adobe Photoshop, versión 6.0. Para la construcción de la base de datos de *H. capsulatum* se crearon tres experimentos de tipo “fingerprint”, uno para SDS-PAGE, otro para RAPD-PCR, y el último para PFGE. Las imágenes digitalizadas fueron ingresadas a la base de datos, convertidas y normalizadas. En todos los geles se colocaron patrones de corridas en el

primer, en el del medio, y en el último carril como estándar externo para la normalización. Esto permitió realizar comparaciones intergeles, puesto que a partir del primer gel ingresado de cada experimento se define un sistema de referencia con base en la posición de las bandas de los estándares respectivos. A partir de la normalización, los siguientes geles fueron comparados al gel inicial de cada experimento. Se utilizaron los siguientes estándares: para RAPD-PCR el 123 bp DNA Ladder; para SDS-PAGE el marcador de peso molecular de 200-6.5 kDa; y para PFGE el bloque del aislamiento denominado "Control" (ver preparación del bloque de referencia). Además, en todas las corridas electroforéticas de PFGE se incluyeron bloques de *H. wingeii* y *Sch. pombe* en los carriles centrales, para evaluar la reproducibilidad del bloque "Control".

Una vez que las imágenes de todos los geles obtenidos de un mismo tipo de experimento se normalizaron, según este sistema de referencia, éstas se grabaron en la base de datos. La similitud entre los perfiles electroforéticos de un mismo experimento se analizaron en una matriz construida con base en la cantidad y posición de las bandas. Para ello se aplicó el coeficiente de Dice, con tolerancias de 2 % en los experimentos de SDS-PAGE y RAPD-PCR, y de 3 % en el experimento de PFGE. La tolerancia indica el máximo desplazamiento permitido entre bandas de dos perfiles idénticos. Para construir el dendrograma, se utilizó en el programa Bionumerics el método de UPGMA. La confiabilidad de los agrupamientos de cada experimento fue determinada por el cálculo del valor de correlación cofenética (Bionumerics) mostrados en cada nodo de los dendrogramas. Este método calcula la correlación entre las similitudes derivadas del dendrograma y la matriz de similitud, proporcionando una medida de confiabilidad estadística para cada agrupación. Asimismo, se calculó el valor de corte, que permite definir de manera más fehaciente los grupos segregados.

Posteriormente, los fenotipos SDS-PAGE y los genotipos RAPD-PCR y PFGE fueron incorporados a las **Tablas 1 y 2** para los análisis estadísticos pertinentes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Significancia (*P*). Para determinar este parámetro estadístico entre las variaciones del diámetro promedio de los macroconidios y de las tasas específicas de crecimiento entre diferentes aislamientos, se calculó la *t* de Student utilizando el programa MedCalc (<http://www.medcalc.be>). Este programa también fue empleado para analizar algunas de las relaciones entre variables individuales como el morfotipo, la capacidad de conversión *in vitro* de la fase M a la L, y el fenotipo SDS-PAGE versus el origen geográfico, condición ICS/ICL y el material clínico del aislamiento fúngico utilizando la prueba de Chi cuadrado.

Análisis de correlación múltiple (R). Las relaciones entre todas las variables se realizaron por el análisis de correlación múltiple, usando el paquete estadístico R versión 2.0.1 (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org>). Para codificar los datos, los aislamientos se organizaron por filas y las variables en columnas en una tabla de Excel. Las variables cualitativas binarias se codificaron como 0 (ausencia) y 1 (presencia), las cualitativas multinominales con “n” niveles distintos se descompusieron en “n-1” variables independientes con codificación cero/uno. Las variables numéricas continuas, como tasa específica de crecimiento y tamaño de macroconidios, no fueron codificadas.

El PFGE sólo pudo ser analizado versus el origen geográfico, condición ICL/ICS, y el material clínico del aislamiento fúngico por la imposibilidad de obtener la fase L en algunos casos. Finalmente, se analizó si existía alguna asociación entre los patrones de bandeo SDS-PAGE y RAPD-PCR. Se construyeron tablas de contingencia y se evaluó la hipótesis nula de que no hubiera asociación entre ellas.

RESULTADOS

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS AISLAMIENTOS

El 68 % de los pacientes fueron del sexo masculino y el 24 % del femenino; en dos casos el sexo del paciente no fue registrado en la historia clínica. Los 57 aislamientos fúngicos de AR, 14 de MX y tres de GT, fueron clasificados según la condición de inmunocompromiso de los pacientes [ICS-SIDA, ICS-HIV(-) e ICL] y el material de origen del cual el hongo fue recuperado (Tablas 1 y 2).

Cabe destacar que los aislamientos de pacientes mexicanos y guatemaltecos se analizaron conjuntamente por la cercanía geográfica de ambos países.

Los aislamientos de AR fueron, en su mayoría, de pacientes con SIDA (63 %), mientras que el 59 % de los aislamientos de MX/GT fueron de pacientes con ICL. El 36 % de los aislamientos fueron obtenidos de muestras de sangre y/o médula ósea. Una importante proporción de aislamientos de AR provinieron de lesiones de piel (32 %) y, la mayoría de éstos, de pacientes con SIDA (36 %); sin embargo, la relación no fue significativa ($P > 0.01$). Sólo un aislamiento procedente de un paciente de GT fue obtenido de piel (EH-364) y otro de mucosa de un paciente de MX (EH-359) (Tablas 1, 2 y 5).

La Tabla 2 agrupa los múltiples aislamientos obtenidos de diferentes materiales clínicos de un mismo paciente, no referidos en la Tabla 1. En el caso del paciente N° 6, los aislamientos 01751, 01869 y 01870 correspondieron a un mismo episodio, ya que fueron aislados en el lapso de un mes; el otro aislamiento de este paciente, 01894, fue obtenido cuatro meses después del tratamiento, y considerado de diferente episodio clínico. En cambio, los aislamientos de los pacientes N° 2, N° 7 y N° 8, aunque de fechas distintas menores a un mes, pueden considerarse del mismo episodio. El resto de los aislamientos tuvieron la misma fecha de cultivo. A excepción del paciente N° 5, los restantes fueron catalogados como ICS.

ESTUDIOS FENOTÍPICOS

MACROMORFOLOGÍA DE LA FASE M

Con base en la clasificación propuesta por Berliner [1968], se encontró que de 74 aislamientos estudiados 66 fueron del tipo colonial pigmentado B (89 %). Sin embargo, visualmente, las variaciones macromorfológicas fueron más diversas, por lo que se sumaron otras características al

análisis. Al incluir todos los criterios de análisis del aspecto colonial se formaron nueve grupos que fueron denominados arbitrariamente morfotipos I al IX (Figura 1).

La cepa de referencia Downs, con morfocaracterísticas únicas, con colonia glabra, crecimiento limitado, plegada y albina (colonia A), segregó de forma independiente en el dendrograma, en el morfotipo VIII (Figura 2 a). La cepa de referencia G186B fue similar en macromorfología a la Downs, pero con colonia B, y se agrupó en el morfotipo VI (Figura 2 b).

El morfotipo predominante fue el IV que agrupó el 37 % de los aislamientos estudiados ($n = 28$). Este morfotipo presentó colonias B de superficie plana, crecimiento no limitado y textura pulverulenta. Algunos de estos aislamientos mostraron la peculiaridad de crecimiento sectorizado en forma de diana (Figura 2 c). El morfotipo I le siguió en frecuencia al anterior con 27 % ($n = 21$) de los aislamientos compartiendo la mayoría de las características coloniales, a excepción de la textura aterciopelada (Figura 2 d).

Representantes de cada uno de los grupos restantes formados en el dendrograma pueden observarse en las Figuras 2 e-i. Las colonias del morfotipo II, muy parecidas a las del I, fueron albinas (Figura 2 e); el morfotipo III fue pardo, con colonias plegadas, crecimiento no limitado y textura aterciopelada (Figura 2 f); el morfotipo V, se diferenció del anterior sólo por su crecimiento limitado (Figura 2 g); el morfotipo VII fue formado por colonias A, plegadas, de crecimiento no limitado y textura aterciopelada (Figura 2 h); y, finalmente, el morfotipo IX incluyó colonias B, plegadas, de crecimiento limitado y textura pulverulenta (Figura 2 i).

La asociación entre los morfotipos coloniales generados por UPGMA, los orígenes geográficos y las condiciones inmunológicas del paciente, aparece sintetizada en la Tabla 6, y la relación con los materiales clínicos de donde procedieron los aislamientos, en la Tabla 7.

Los morfotipos predominantes I y IV se hallan en ambas latitudes del continente americano. El morfotipo IV fue aislado en 44 % de los pacientes de AR y en 24 % de los pacientes de MX/GT, estos últimos todos con ICL. El morfotipo I fue cultivado de 41 % de los pacientes de MX/GT y 24 % de los de AR (Tabla 6). Hay que recordar que las diferencias entre estos dos morfotipos es sólo en la textura (Figuras 2 c y d).

Los aislamientos de los pacientes ICS-SIDA, particularmente de AR, se ubicaron en todos los morfotipos, excepto el VIII, que correspondió a la cepa Downs. Por otra parte, los aislamientos de pacientes con ICL de ambas latitudes se distribuyeron en los morfotipos I, III, IV y VII.

Se encontró un morfotipo aberrante (similar a la cepa G186B) procedente de un paciente ICS-SIDA de AR (01730); en la **Figura 2 j** se muestra el reverso de este morfotipo que al igual que su anverso, fueron idénticos a la G186B. En las **Figuras 2 k y l** se muestran los reversos típicos de las colonias, una productora de pigmento y otra albina, respectivamente.

Al comparar los materiales clínicos de los que *H. capsulatum* fue aislado, versus el morfotipo (**Tabla 7**), se observó que los morfotipos más comunes, I y IV, se aislaron de todos los materiales clínicos. Sin embargo, los demás morfotipos fueron aislados en bajo número y no se encontró relación entre éstos y el material de origen ($P = 0.319$).

Los aislamientos de diferentes materiales clínicos de un mismo paciente no siempre mostraron morfologías coloniales idénticas (**Tabla 2**). Los aislamientos 00205 (sangre) y 00335 (piel); provenientes del paciente N° 1 presentaron colonias disímiles; mientras que la colonia aislada de sangre fue parda, aterciopelada, de crecimiento no limitado y superficie plana (morfotipo I); la de piel se diferenció en su crecimiento limitado y superficie plegada (morfotipo V) (**Figura 3 a**). Un fenómeno similar se observó entre fenotipos coloniales de otros tres múltiples aislamientos procedentes de los pacientes N° 3, N° 4 y N° 6. De estos, los aislamientos correspondientes al paciente N° 4 se ilustran en la **Figura 3 b**, por la notoria diferencia en la morfología colonial. En el paciente N° 6, el cuarto múltiple aislamiento, obtenido postratamiento fue macromorfológicamente diferente (datos no mostrados) (**Tabla 2**).

MICROMORFOLOGÍA DE LA FASE M

Los macroconidios fueron en general globosos, con proyecciones digitiformes de la pared. Debido a que los microcultivos conservan la integridad de las estructuras fúngicas, se pudo observar con frecuencia que los macroconidios emergían de conidióforos cortos que formaban un ángulo de 90° con la hifa que le dio origen, característica distintiva de *H. capsulatum* (**Figuras 4 a y b**). En algunos aislamientos se observaron, además, macroconidios piriformes de pared lisa o con proyecciones (**Figuras 4 c-e**), y asimismo macroconidios globosos de pared lisa (**Figura 4 f**).

Los microconidios fueron globosos o piriformes y de pared lisa (**Figura 4 g**). Sin embargo, en algunos aislamientos éstos presentaron particularidades, como tamaño muy pequeño ($\cong 1 \mu\text{m}$) en el caso del aislamiento 00225, que en ocasiones formaban cadenas de hasta tres conidios, a diferencia de la morfología clásica ilustrada en el aislamiento 00335 (ver detalles en la **Figura 3 a**). También presentaron microconidios en cadenas cortas, los aislamientos 01733 (**Figura 4 h**) y 01730 (dato no mostrado).

Las dos cepas de referencia, Downs y G186B, no mostraron estructuras típicas de la especie; estas cepas no desarrollaron conidios y presentaron micelio septado, con hifas espiraladas y clamidosporas terminales e intercalares (Figuras 5 a y b). La ausencia de macroconidios fue registrada en cuatro aislamientos de pacientes de AR (01730, 01731, 01746 y 01752) (Tabla 1). Asimismo, la ausencia de microconidios sólo se notó en un aislamiento (01558) de un paciente de AR, aunque este aislamiento desarrolló escasos macroconidios de pared lisa ($n = 10$) y clamidosporas terminales e intercalares en los tres preparados estudiados (Figura 5 c). Después de la búsqueda exhaustiva en dos a cuatro microcultivos, la mayoría de los aislamientos reveló un número superior a 25 macroconidios. Sin embargo, en tres aislamientos (01735, 01736 y EH 364) el número de macroconidios fue inferior a 10, y en cinco (01558, EH-448, 00205, 00335 y 01749) entre 10 y 25 (Tablas 1 y 2).

Los diámetros promedio de los macroconidios oscilaron entre valores de 6.5 y 13.9 μm , y el de los microconidios entre 1 y 4 μm . En dos aislamientos (02924 y EH-409) se observaron algunos macroconidios con tamaños de 20 μm (Figura 5 d).

A pesar de que los aislamientos presentaron macroconidios con morfología típica, la mayoría de éstos fueron de tamaños promedios inferiores a 8 μm , y el límite inferior del diámetro de los macroconidios en 48 aislamientos fue de 6.3 μm (Figuras 5 e y f) (Tablas 1 y 2).

La diferencia entre los diámetros promedios de los macroconidios de los aislamientos de pacientes con ICS versus ICL no fue estadísticamente significativa (ICS: 8.6 ± 1.6 , $n = 54$ vs. ICL: 9.2 ± 1.7 , $n = 16$; $P = 0.1983$, t de Student). Sin embargo, los diámetros promedios de los macroconidios de pacientes ICS-SIDA, independientemente del origen geográfico, fueron los menores (8.0 y 8.3 μm para MX/GT y AR, respectivamente) (Tabla 8). El análisis estadístico entre los diámetros de los macroconidios de los aislamientos provenientes de pacientes ICS-SIDA en relación con el resto de los aislamientos fue significativo (ICS-SIDA: 8.2 ± 1.3 , $n = 39$ vs. ICS-HIV(-) + ICL: 9.5 ± 1.8 , $n = 31$; $P < 0.0008$, t de Student).

Aunque no hubo diferencias significativas entre los diámetros promedios de los macroconidios de los aislamientos procedentes de los diversos materiales clínicos ($P > 0.05$, t de Student) (Tabla 9), es importante señalar que los aislamientos de origen respiratorio tuvieron el mayor diámetro promedio, $9.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$.

Entre aislamientos de diferentes materiales clínicos del mismo paciente también se observó variación en el diámetro de los macroconidios. En cinco casos (N° 3-5, N° 7 y N° 8) las diferencias en el diámetro promedio de los macroconidios fueron estadísticamente significativas

($P < 0.01$, t de Student). Por ejemplo, en el paciente N° 4, se pudo observar una diferencia significativa ($P = 0.003$) en el tamaño de los macroconidios de los aislamientos 01744 y 01745, de piel y sangre, respectivamente (Figura 3 b). En el paciente N° 6, el diámetro promedio de los macroconidios del aislamiento 01894 (postratamiento) fue más pequeño que el del 01869 y 01870 (pretratamiento) ($P < 0.0001$); sin embargo, no se observó diferencia con el diámetro del aislamiento 01751 ($P = 0.0672$) (pretratamiento), obtenido de muestra de sangre durante el primer episodio clínico de este paciente (Tabla 2).

TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

Las tasas específicas de crecimiento, determinadas tanto por cultivo en superficie y sumergido, expresadas en μ día⁻¹ se muestran en la Tabla 10. Se obtuvo una correlación $R = 0.66$ ($R^2: 0.44$) entre las tasas obtenidas por ambas metodologías; este valor es aceptable para la relación propuesta, considerando que los medios en ambos experimentos difirieron en los componentes antimicrobianos (cicloheximida y cloranfenicol) en el medio sólido, y que *H. capsulatum* crece mejor en superficie que en cultivos sumergidos. De acuerdo con la correlación positiva entre ambos métodos, se eligió el crecimiento en superficie para realizar el cálculo de μ del total de los aislamientos, por la facilidad y reproducibilidad de la metodología. Los valores de μ de las cinco lecturas realizadas para cada aislamiento se promediaron, y el promedio y su \pm DS fueron vertidos en las Tablas 1 y 2.

Los valores de μ oscilaron entre 0.61-2.15 día⁻¹ (Tablas 1 y 2), lo que quiere decir que la biomasa del aislamiento de crecimiento más lento aumentó en 0.61, y del más rápido en 2.15 veces, cada 24 h. La cepa Downs y los aislamientos 01730 y 01753 de pacientes ICS de AR exhibieron los valores de μ más bajos ≤ 0.71 día⁻¹, y los aislamientos EH-46 y EH-53 de pacientes ICL de MX los más altos ≥ 2.13 día⁻¹ (Tabla 1).

Para poder analizar la relación entre el crecimiento de la colonia versus el origen geográfico, el estado ICS/ICL de los pacientes y el material clínico de origen, los valores de μ fueron separados en grupos. Considerando que la distribución de las tasas fue de tipo Gauss de dos colas, se asumió como el grupo de tasa intermedia el que poseía una tasa media \pm 1DS (1.48 ± 0.34 día⁻¹). En este intervalo de tasa se agruparon el 66 % ($n = 50$) de los aislamientos estudiados. Las colonias con μ inferiores ($n = 11$) y superiores ($n = 13$) al intervalo medio, fueron consideradas como de baja y alta tasa, respectivamente. De esta manera, quedaron constituidos tres grupos de aislamientos con tasas: (a) menores a 1.14 día⁻¹; (b) entre 1.14-1.82 día⁻¹; (c) mayores a 1.82 día⁻¹.

La relación existente entre estas tasas de crecimiento con el origen geográfico y el estado inmunológico del paciente se sintetiza en la **Tabla 11**. Diez aislamientos de pacientes con SIDA y uno de paciente transplantado (ICS), tuvieron μ inferiores a 1.14 día^{-1} . En todos los aislamientos proveniente de pacientes ICL, los valores de μ fueron superiores a 1.14 día^{-1} , independiente del origen geográfico (**Tabla 1**).

Al comparar los intervalos de μ versus los materiales de donde el hongo fue recuperado utilizando la prueba de Chi cuadrado, no se encontró ningún tipo de asociación ($P = 0.1384$) (**Tabla 12**).

Entre aislamientos de diferentes materiales clínicos del mismo paciente, N° 1, N° 5 y N° 7, se encontraron diferencias significativas en la μ ($P \leq 0.001$, *t* de Student) (**Tabla 2**).

La tasa específica de crecimiento de la fase M está directamente relacionada con el morfotipo colonial, puesto que todas las colonias de crecimiento no limitado presentaron una μ superior a la media calculada (datos no mostrados).

CONVERSIÓN DIMÓRFICA

Durante el desarrollo del protocolo sólo se logró la fase L de 54 aislamientos y de las cepas de referencia, a pesar de los sucesivos subcultivos en los medios recomendados. Esto representa 76 % de los *H. capsulatum* estudiados. En algunos casos, aunque macroscópicamente las colonias cultivadas a 37 °C en agar BHI-cisteína-glucosa tenían aspecto de cultivo levaduriforme, en el examen microscópico se observaron hifas septadas (**Figura 6 a**). Otros aislamientos permanecieron en un estado intermedio entre las fases L y M (**Figuras 6 b y c**). En los aislamientos que alcanzaron la fase L, el tamaño promedio de las levaduras osciló entre $1-1.5 \times 2-4 \text{ }\mu\text{m}$ (**Figuras 6 d-f**).

Los aislamientos de pacientes de AR convirtieron a fase L en mayor proporción que los de MX/GT ($P = 0.01$). Asimismo, se observó que los aislamientos asociados a pacientes con ICS, independiente del origen geográfico, también convirtieron a fase L en mayor número, aunque esta relación no fue significativa ($P > 0.05$) (**Tabla 13**). Por otra parte, la capacidad de conversión dimórfica no mostró ninguna relación con respecto el material clínico de donde el hongo fue recuperado ($P = 0.141$, Chi cuadrado) (**Tabla 14**).

Todos los aislamientos de diferentes materiales clínicos del mismo paciente, pudieron ser convertidos a su fase L (**Tabla 2**).

MACROMORFOLÓGICA DE LA FASE L

Todos los aislamientos convertidos a la fase L presentaron un aspecto colonial rugoso, de bordes irregulares y sin pigmentación. Adicionalmente, se observó una característica distintiva en el aislamiento 01730 que estuvo asociada a la menor superficie observada entre las colonias. Esta característica fue compartida por las dos cepas de referencia (**Figura 7**). Este dato no fue analizado con relación al estado inmunológico del paciente, origen geográfico y material clínico, por ser una variable única.

IDENTIFICACIÓN DE EXOANTÍGENOS

La IDD reveló la presencia de banda H en todos los aislamientos y en muchos la banda M. Estas bandas fueron mejor observadas en los perfiles proteicos revelados por SDS-PAGE (**Figuras 8 a y b**) y, en general, la banda M fue más intensa que la H.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LOS EXOANTÍGENOS

Los electrotipos observados en SDS-PAGE, se muestran de modo representativo en las **Figuras 8 a y b**. Los aislamientos de AR, MX/GT y las cepas de referencia, difirieron entre sí, tanto en el número como en el desplazamiento (movilidad) de las bandas. Todos los aislamientos y las dos cepas de referencia presentaron dos bandas con pesos moleculares de $\cong 116$ y 97-94 kDa, sugestivas de los antígenos H y M de *H. capsulatum*, según estudios previos [Pizzini *et al*, 1999; Zancopé-Oliveira *et al*, 1994; 1999].

La identidad de las bandas H y M fue confirmada en todos los aislamientos por WB, independientemente de que éstas aparecieran poco nítidas en SDS-PAGE. Sin embargo, el WB no reveló todas las bandas de exoantígenos identificadas en los perfiles de SDS-PAGE, como es el caso de la banda $\cong 15$ kDa del aislamiento 00225 que fue aparentemente no reconocida por el suero hiperinmune de conejo (anti-*H. capsulatum*), utilizado para identificar los perfiles antigénicos con subsiguiente revelado enzimático (**Figuras 9 a y b**).

Los perfiles proteicos de los exoantígenos fueron procesados en el Bionumerics ver 4.0, como se indica en Materiales y Métodos. En la **Figura 10** se discriminan el dendrograma, los gels normatizados y la expresión gráfica de los perfiles de bandas de todos los aislamientos analizados.

Las relaciones entre todos los aislamientos estudiados fue de 70.9 %. El mejor valor de corte para establecer las relaciones entre aislamientos fue calculado por el programa en 76 %. Con base en el dendrograma, considerando el valor de corte de 76 %, se formaron seis grupos principales de aislamientos, los que se encuentran indicados con números romanos (I-VI), a la derecha de la figura. Los valores de correlación cofenética señalados en cada nodo del árbol fueron aceptables ($c \geq 56$) y confirmaron la confiabilidad de los agrupamientos.

El grupo I, con similitud ≥ 76.9 %, se formó con un aislamiento de AR, cuatro de MX y dos de GT. El II, con similitud ≥ 77 %, comprendió cuatro aislamientos de AR, uno de GT, nueve de MX y la cepa de referencia Downs de EU. El III, con similitud ≥ 76 %, contuvo 46 aislamientos de AR y solamente uno de MX. El IV sólo tuvo dos representantes, un aislamiento de AR y la cepa de referencia G186B, con 80 % de similitud entre ellos. Finalmente, los grupos V y VI se formaron sólo con aislamientos de pacientes argentinos; el V con cuatro aislamientos de los cuales tres pertenecían al mismo paciente (similitud ≥ 88 %); y el VI tuvo un único representante (Figura 10).

Para relacionar los fenotipos SDS-PAGE con el origen geográfico, el estado ICS/ICL de los pacientes y el material clínico de origen, los datos obtenidos fueron vertidos en las Tablas 15 y 16 para facilitar las comparaciones. Con respecto al origen geográfico, el fenotipo SDS-PAGE III fue el más frecuente para aislamientos de AR, e incluyó el 81 % de éstos, independientemente de su condición inmunológica. Los aislamientos de los pacientes de MX/GT segregaron en los fenotipos I y II, con 6 y 10 aislamientos, respectivamente. Las asociaciones entre el origen geográfico y la condición inmunológica con los fenotipos SDS-PAGE I-III fueron significativa ($P < 0.001$). Los fenotipos IV-VI no se incluyeron en este análisis por la limitante de que sólo se presentaron en pacientes ICS-SIDA de AR, aunque fueron incluidos posteriormente en los análisis de correlación múltiple.

Con base en el estado inmunológico, el fenotipo II se distribuyó entre los pacientes de MX/GT en proporciones cercanas con respecto a la condición ICS e ICL (6 y 4, respectivamente), mientras que en el fenotipo I predominaron los pacientes ICL (5:6). El análisis estadístico de estos datos se dificultó por el número bajo de aislamientos. Un resultado que debe ser resaltado fue el relacionado a la condición inmunológica del paciente, donde se observó que los aislamientos de pacientes ICS-SIDA de AR se distribuyeron en todos los fenotipos SDS-PAGE, hecho que no fue observado en los aislamientos de pacientes ICS-HIV(-) y en los ICL tanto de MX/GT como de AR (Tabla 15).

No se pudo establecer asociación entre los fenotipos SDS-PAGE y el material clínico de origen de cada aislamiento ($P = 0.08$, Chi cuadrado) (Tabla 16).

Con respecto a los múltiples aislamientos, el 01735 (líquido articular) y el 01736 (piel) provenientes del paciente N° 2 tuvieron diferentes perfiles SDS-PAGE, con 9 y 14 bandas proteicas, respectivamente (Tabla 2, Figura 10). En general, el resto de los múltiples aislamientos de un mismo paciente se agruparon en el mismo fenotipo, aunque no presentaron 100 % de similitud en sus perfiles de exoantígenos por SDS-PAGE (Figura 10).

ESTUDIOS GENOTÍPICOS

POLIMORFISMO DEL DNA GENÓMICO POR RAPD-PCR

El perfil genético de algunos aislamientos estudiados se muestra, de modo representativo, en las Figuras 11 a y b. A la primera observación de los geles de la Figura 11 b, sobresale el perfil homogéneo de los aislamientos de los pacientes de AR, a diferencia de los aislamientos de otros orígenes geográficos (Figura 11 a). Las bandas de 0.135 y 1.23 Kb son muy notables en la mayoría de los aislamientos de MX y en las cepas de referencia, mientras que estas bandas sólo fueron observadas con baja intensidad, en todos (0.135 Kb) o en más de la mitad (1.23 Kb), de los aislamientos de AR (Figuras 11 y 12).

El análisis de los perfiles de RAPD-PCR se realizó por UPGMA utilizando el coeficiente de Dice (ver Materiales y Métodos). La observación de la imagen reveló entre 5 y 15 bandas polimórficas entre los 74 aislamientos y las dos cepas de referencia, las cuales difirieron en número y movilidad. En la Figura 12 se discriminan el dendrograma, los geles normalizados y la expresión gráfica de los perfiles de RAPD-PCR de todos los aislamientos estudiados.

EL porcentaje de similitud entre todos los aislamientos analizados fue de 56.6 % para una tolerancia de 2.0 % y optimización de 10.0 %. El mejor valor de corte calculado por el programa consistió en 79.4 % y generó 9 grupos principales numerados desde I-IX.

El grupo I estuvo conformado por ocho aislamientos de MX y uno de GT. Los grupos II, III y IV se formaron por un solo representante, cepas G186B de PA, Downs de EU y el aislamiento EH-303 de GT, respectivamente. El grupo V se formó con un aislamiento de AR y uno de MX; el VI con dos de MX, y el VII con tres de MX y uno de GT. El grupo VIII contuvo un único aislamiento de AR. Finalmente, el IX agrupó 55 aislamientos de AR, con una similitud > 81.5%. Dentro de este grupo se segregaron 5 subgrupos con 100 % de similitud, dos de ellos con 21 y 14

aislamientos (**Tabla 17, Figura 12**). Los valores de correlación cofenética ($c \geq 68$) sostuvieron la confiabilidad de los agrupamientos.

Es evidente la asociación de los genotipos RAPD-PCR con el origen geográfico ($P < 0.001$). Los datos de la **Tabla 17** destacan la asociación de los aislamientos del genotipo IX (todos de AR) con el estado de ICS del huésped, más notoria en los pacientes con ICS-SIDA; asimismo, sobresale la asociación del genotipo I de MX/GT con el estado de ICL del huésped ($P < 0.0001$). Sin embargo, no se observó relación entre estos genotipos RAPD-PCR y los distintos materiales clínicos del huésped ($P = 0.298$, Chi cuadrado) (**Tabla 18**).

Entre los aislamientos de diferentes materiales clínicos del mismo paciente, aunque todos incluidos en el grupo IX, se observaron mínimas diferencias entre sus perfiles electroforéticos revelados por RAPD-PCR (ver representación esquemática de la **Figura 12** de los aislamientos señalados en color anaranjado, 01738 y 01739, 02938, en celeste, 01748, 01749 y 01750 y en verde 02936, 02937). Estas diferencias fueron en la posición de una o dos bandas entre los aislamientos de los pacientes N° 3, N° 5 y N° 8. El resto de los aislamientos obtenidos de los diferentes materiales clínicos de un mismo paciente fueron 100 % idénticos entre sí (**Figura 12**).

CARIOTIPOS ELECTROFORÉTICOS

De los protocolos probados (**Tabla 4**), en el 1 y 2 (agarosa 0.8 %) las bandas fueron poco definidas y no se separaron bien entre ellas. Para corregir estas deformaciones, se aumentó la concentración de agarosa a 1.0 %, variando tiempo y voltaje (protocolos 3-5). De éstos, el protocolo 3 presentó una mejor separación de las bandas cromosómicas, aunque éstas no fueron bien definidas (**Figura 13**). Para optimizar la definición en cada uno de los probables de tamaño de bandas, se evaluaron diferentes gradientes de tiempos de pulso (protocolos 6 y 7). El protocolo 7 mostró mejor resolución en todo el gel, incluso para las bandas de menor tamaño (**Figura 13**). Una vez obtenida una mejor resolución, se bajó la concentración de agarosa a 0.7 % para facilitar la penetración y movilización de las bandas cromosómicas en los protocolos 8 y 10 (**Figura 13**). Finalmente, el protocolo 10 fue seleccionado para comparar los Eks entre los diferentes aislamientos del estudio. Cuando se sospechó la presencia de bandas cromosómicas que comigraban, se utilizó el protocolo 7 (agarosa 1.0 %), para obtener una mejor separación de las bandas más pequeñas.

Los Eks generados por PFGE se muestran de modo representativo en las **Figuras 14 a-d**. Sólo se obtuvieron los perfiles de bandas cromosómicas de 54 aislamientos y de las cepas de

referencia, debido a que no se pudo obtener la fase L de 20 aislamientos. Resalta en la observación de los geles un importante CLP entre los aislamientos procesados.

El número de bandas cromosómicas reveladas por PFGE varió entre 3 y 7 con tamaño de bandas cromosómicas entre 1.1 y 10.0 Mbp. La mayoría de los aislamientos tuvieron 5 bandas ($n = 28$), al igual que las dos cepas de referencia. Le siguieron los aislamientos con 4 ($n = 12$) y 6 ($n = 12$) bandas. Sólo en dos aislamientos se observaron 3 y 7 bandas cromosómicas (Tabla 1, Figura 15).

Para facilitar comparaciones y relacionar el número de bandas cromosómicas con el origen geográfico, el estado ICS/ICL de los pacientes y el material clínico, los datos obtenidos fueron vertidos en las Tablas 19 y 20. Las pruebas estadísticas no arrojaron diferencias significativas entre los aislamientos que presentaron los valores más frecuentes de bandas cromosómicas (4-6) con el origen geográfico, el estado ICS/ICL de los pacientes y el material clínico de procedencia de los aislamientos ($P > 0.05$, Chi cuadrado).

Los perfiles electroforéticos fueron analizados como se refiere en Materiales y Métodos, usando el coeficiente de Dice y UPGMA. Como las bandas cromosómicas debido a su tamaño son gruesas (como manchas), para la comparación se aplicó una tolerancia de 3.0 %. Estos valores fueron los que se cotejaron mejor con el análisis visual. Se formaron diez grupos indicados con números romanos (I-X) en el dendrograma generado (Figura 15). El valor de correlación cofenética calculado fue $c > 60$, confirmando la confiabilidad de las agrupaciones. El mejor valor de corte fue de 75 %.

De los 10 grupos de Eks formados llama la atención el grupo VI, integrado por 36 aislamientos tuvo 75.4 % de similitud. Este grupo contuvo varios subgrupos con 100 % de similitud; entre ellos se destaca uno con 12 aislamientos (de AR) con 5 bandas. En el grupo VII, sobresalen cinco aislamientos de AR (tres de un mismo paciente) con 4 bandas cromosómicas e idéntico Ek (100 % de similitud) (Figura 15).

Los aislamientos de los pacientes ICS, se ubicaron en todos los Eks excepto el X, exclusivo de la cepa G186B, mientras que los aislamientos de pacientes ICL de ambas latitudes se distribuyeron en los Eks V-VII y IX ($P < 0.05$) (Tabla 21). Sin embargo, no se observó relación entre los Eks y el material clínico de donde *H. capsulatum* fue aislado ($P > 0.05$) (Tabla 22). Ambas cepas de referencia, Downs y G186B, presentaron 5 bandas cromosómicas según la metodología usada.

Es importante destacar que aunque varios aislamientos mostraron el mismo número de bandas cromosómicas (algunas idénticas), no significa que estos aislamientos tuvieran el mismo Ek (Tablas 1 y 2, Figura 15).

Los aislamientos pertenecientes a diferentes materiales clínicos del mismo paciente presentaron, en tres casos (N° 1, N° 3 y N° 7), Ek VI con 5 bandas cromosómicas y 100 % de similitud. Mientras que en el paciente N° 8 los Eks de dos de sus aislamientos, 02936 y 02937, con 5 bandas, tuvieron 91 % de similitud y el aislamiento restante, 02938, con 6 bandas, presentó 86 % de similitud (Tabla 2, Figura 15). En el paciente N° 5 sus múltiples aislamientos presentaron 4 bandas cromosómicas y 100 % de similitud (Ek VII); asimismo, en el paciente N° 2 sus aislamientos tuvieron también 4 bandas cromosómicas pero con Eks distintos (V y VI) y con 71 % similitud (Tabla 2, Figura 15). Los aislamientos del paciente N° 4 (01744 y 01745), aunque tuvieron el mismo Ek (IV), difirieron en el número de bandas, 6 y 5 respectivamente. Los aislamientos 01751, 1869, 01870 y 01894, pertenecientes al paciente N° 6 mostraron tres Eks diferentes (III, VI y IX), con 5 y 6 bandas cromosómicas (Tabla 2, Figura 15).

La comparación entre el Ek, el RAPD-PCR y el fenotipo SDS-PAGE de algunos múltiples aislamientos procedentes de un mismo paciente, permitió observar ciertas discrepancias entre los parámetros feno-genotípicos. Por ejemplo, en el paciente N° 1, mientras sus dos múltiples aislamientos permanecieron con sus genotipos RAPD-PCR y Eks idénticos entre sí, su fenotipo SDS-PAGE presentó variaciones en el número y tamaño de bandas proteicas (Figura 16 a). Otro ejemplo se ilustra en el cariotipo de los cuatro aislamientos (01751, 01869, 01870 y 01894) pertenecientes al paciente N° 6, donde sus Eks mostraron diferencias marcadas en el número y tamaño de las bandas cromosómicas, aunque sus genotipos RAPD-PCR fueron idénticos y su perfil SDS-PAGE no varió substancialmente (Figura 16 b).

Un hallazgo adicional registrado en ensayos de PFGE, durante los tres años en que los aislamientos estuvieron sometidos a subcultivos, fue la inestabilidad en el cariotipo. Este hecho se observó en los Eks de los aislamientos 01869 y 01870 del paciente N° 6 que mostraron, después de muchas resiembras y reversiones de fase M a L *in vitro*, un cambio notorio en el número y tamaño de las bandas cromosómicas (Figura 17).

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN MÚLTIPLE

Debido al gran número de correlaciones calculadas, es posible que algunas de ellas presenten valores altos sólo por azar, razón por la que se dio especial importancia a las correlaciones más altas o aquéllas entre grupos de variables.

Entre las correlaciones significativas, era de esperarse la encontrada entre los valores de μ versus el morfotipo colonial de extensión no limitada y de superficie plana, con valores de correlación de Pearson de 0.664 y 0.586, respectivamente ($P < 0.001$).

Las correlaciones más interesantes se encontraron entre los perfiles de SDS-PAGE o de RAPD-PCR y el origen geográfico de los pacientes de donde procedían los aislamientos. La relación entre el fenotipo SDS-PAGE y el origen geográfico resultó estadísticamente significativa ($P < 0.00001$), así como la relación entre el genotipo RAPD-PCR y el origen geográfico ($P < 0.008$). Estos dos datos se analizaron posteriormente en mayor detalle y los aislamientos se agruparon tanto por su fenotipo SDS-PAGE como por su genotipo RAPD-PCR, y se calcularon los valores medios de las variables consideradas anteriormente, sobresaliendo la correlación entre SDS-PAGE y RAPD-PCR con el origen geográfico.

Asimismo, el análisis de los resultados agregados sugería que podría existir una correlación entre el fenotipo SDS-PAGE o el genotipo RAPD-PCR de los aislamientos con la condición inmunológica del paciente. Se observaron relaciones estadísticamente significativas entre: (a) los aislamientos agrupados en el fenotipo SDS-PAGE I y la condición de ICL ($P = 0.0006$), además entre el fenotipo III y la condición de ICS-VIH(-) de los pacientes ($P = 0.041$); (b) los aislamientos agrupados en el genotipo RAPD-PCR I y la condición ICL ($P = 0.000004$), además entre el genotipo IX y la condición de ICS-SIDA de los pacientes ($P = 0.00002$).

Finalmente, se analizó si existía alguna asociación entre los perfiles SDS-PAGE y RAPD-PCR. Se construyeron tablas de contingencia y se probó la hipótesis nula de que no hubiera asociación entre ellos, es decir, que un aislamiento con un determinado perfil de SDS-PAGE podría tener cualquier perfil RAPD-PCR. Esta hipótesis fue descartada por el valor extremadamente bajo de P ($P = 4.132 \times 10^{-7}$), lo que sugiere que a pesar de que numerosas celdas de la matriz original contenían valores igual a cero, la asociación entre SDS-PAGE y RAPD-PCR puede considerarse real.

DISCUSIÓN

No obstante que existen trabajos dirigidos a comparar diferencias morfológicas, fisiológicas y genéticas entre aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* obtenidos de pacientes ICS con histoplasmosis asociada, sobre todo a SIDA, éste es el primer estudio donde se confrontan las características antes mencionadas en conjunto, y en un número elevado de aislamientos de tres países latinoamericanos (AR, MX y GT). En estos países, la histoplasmosis es endémica y debería ser considerada un problema de Salud Pública. En MX/GT, con frecuencia, la forma epidémica es la predominante y está relacionada con el mayor riesgo de desarrollar enfermedad leve a grave en residentes de zonas urbanas y rurales, debido a ciertas actividades ocupacionales, así como las relacionadas al ecoturismo y la espeleología [García-Vázquez *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 1996; 1997a; 1997b; 2000b; 2000c; 2005b]. En AR, los brotes epidémicos son raros, aunque recientemente se ha descrito uno inusual en un área no endémica de histoplasmosis y con características geográficas no compatibles con el hábitat de *H. capsulatum* [Canteros *et al.*, 2005a]. Sin embargo, la frecuencia de casos asociados a SIDA parece ser mayor que en MX/GT, a pesar del gran sesgo en la información referente a esta patología en los registros epidemiológicos originados en los Organismos Estatales de Salud de estos países.

Independientemente del origen geográfico, en el actual estudio, la mayoría de los aislamientos provinieron de sangre y/o MO, probablemente debido al elevado número de aislamientos obtenidos de pacientes con ICS, donde el hongo actúa como oportunista y produce formas diseminadas agudas. En pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA, diagnosticados en AR, se obtuvieron un importante número de aislamientos provenientes de lesiones cutáneas. Esta manifestación clínica de la histoplasmosis es común en todo el Cono Sur de América, donde las formas cutáneas oscilan entre valores de 45-75 % en pacientes infectados con el virus del VIH [Karimi *et al.*, 2002; Negroni *et al.*, 1994; Pietrobon *et al.*, 2004; Unis *et al.*, 2004]. A diferencia de lo informado por Karimi *et al.* [2002], no se encontró en el presente estudio una correlación significativa entre el origen geográfico y la lesión en piel de los pacientes. La explicación para este hallazgo se debe probablemente a una mayor dispersión en el tipo de material clínico de origen de los aislamientos en los pacientes de AR. Interesantemente, aun comparando las proporciones de aislamientos de piel en ambas regiones geográficas (AR vs. MX/GT), la relación no arroja un valor significativo ($P = 0.067$). La discrepancia con los resultados de Karimi *et al.* [2002] posiblemente se deba a que, en este último estudio, el diagnóstico de histoplasmosis muestra un sesgo muy grande, puesto que compararon pacientes de EU diagnosticados por métodos

inmunológicos y/o microbiológicos contra los de Brasil, que solamente fueron diagnosticados por cultivo. En el grupo clasificado como MX/GT sólo un aislamiento fue recuperado de piel y otro de mucosa, confirmando la baja frecuencia de estas lesiones en los países del hemisferio norte del continente americano [Reyes *et al.*, 2003; Wheat, 1996]. Aunque recientemente se han informado porcentajes de lesiones de piel entre 10 y 17 % en pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA en MX [Reyes *et al.*, 2003], estos valores siguen siendo muy bajos comparados con los del Cono Sur.

En este estudio se incluyeron deliberadamente múltiples aislamientos de un mismo paciente para obtener información de posibles infecciones con un único o múltiples fenotipos de *H. capsulatum*, y conocer eventuales relaciones con el material clínico de origen del aislamiento. Esta decisión fue adecuada, ya que se pudieron develar resultados inéditos que serán motivo de discusión en los párrafos posteriores.

Es oportuno señalar que en este trabajo no se pretendió realizar un estudio de relaciones filogenéticas, sino obtener agrupaciones de aislamientos con base en sus similitudes fenotípicas para luego poder relacionar estas características con el origen geográfico, el estado inmunológico del paciente y el material clínico que le dio origen al aislamiento.

FENOTIPOS

El polimorfismo fenotípico observado en *H. capsulatum* llamó la atención de algunos investigadores desde los primeros trabajos que desafiaron el gran vacío de información sobre la macro- y la micromorfología de la fase M, geofílica-saprobica e infectiva, de este hongo. Berliner [1968], además de describir los morfotipos coloniales A y B, observó otros tipos intermedios a los que arbitrariamente denominó C y D, sin hacer mayor referencia o descripción de ellos. Desde entonces, y hasta la fecha, los investigadores no se dedicaron con el debido interés a la observación sistematizada de las características de los primoaislamientos de la fase M. La falta de registro de los fenotipos macro- y microscópicos de los aislamientos recién obtenidos ha llevado a concepciones erróneas y contrapuestas entre los diferentes grupos de investigadores. Uno de los problemas derivados de la ausencia de esta información es que la mayoría de los aislamientos y/o cepas después de sucesivos pasajes *in vitro* sufren un cambio, algunas veces unidireccional, mal denominado “pleomorfismo”, lo que se traduce en un micelio algodonoso, pérdida de la pigmentación y de la conidiación [Kwon-Chung & Bennett, 1992]. En este estudio, se trabajó con aislamientos con un bajo número de subcultivos, por lo que la mayoría tuvieron características

macro- y micromorfológicas que definen la especie *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Sin embargo, algunos aislamientos mostraron diferencias en el morfotipo colonial, así como en la micromorfología, hecho que ratifica la existencia de morfotipos diferentes en la naturaleza.

La capacidad de *H. capsulatum* de modificar su apariencia no sólo depende de la “domesticación en el laboratorio”, puesto que en este estudio se tuvo un aislamiento proveniente de un paciente con SIDA de AR (01730) que, en su primocultivo, semejava a la cepa de referencia G186B, con medio siglo de existencia. La presencia de morfologías poco sugestivas para la especie *H. capsulatum* var. *capsulatum* entorpece, a veces, el diagnóstico. Esto puede surgir a consecuencia de la existencia de colonias del patógeno con morfologías aberrantes que rememoran un hongo de micelio hialino (contaminantes ambientales) y que puede estar ocurriendo en laboratorios de análisis microbiológicos [Lacaz *et al.*, 1999; Sandin *et al.*, 1993; Sutton *et al.*, 1997; Zuiani *et al.*, 2005]. La existencia de colonias con pigmento rojo aisladas de fuentes naturales y de pacientes con histoplasmosis asociada a SIDA [Morris *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1999], aunado a la deficiencia de algunas cepas para formar estructuras de reproducción asexual típicas, críticas en la identificación del patógeno, lleva a especular que *H. capsulatum* puede pasar, en ocasiones, inadvertido incluso para expertos. Por tal motivo, la identificación de las cepas que difieren en mayor o menor grado del carácter común fundamental de *H. capsulatum*, debe ser confirmada por la presencia de bandas de precipitación H y M en IDD y/o WB, conversión dimórfica, inoculación experimental y más recientemente, por la caracterización molecular [Kwon-Chung & Bennett, 1992; Sandin *et al.*, 1993; Standard & Kaufman, 1976]. Algunos de estos procedimientos fueron estrictamente respetados en el presente estudio; ejemplo de ello es que el aislamiento más aberrante (01730) en su aspecto macro- y micromorfológico fue incluido en el trabajo con base en su capacidad de producir exoantígenos y de convertir a fase L. El insistir en este aspecto parece importante debido a que estos aislamientos merecen en el futuro más atención de los expertos y ameritan estudios dirigidos para definir su frecuencia y su posible asociación con el ambiente tanto natural como del huésped.

Dos morfotipos predominaron en la mayoría de los aislamientos, el I, distribuido homogéneamente en AR y MX/GT, y el IV, dominante en el Cono Sur de América y menos frecuente en países del hemisferio norte.

Todos los morfotipos descritos estuvieron presentes en los aislamientos provenientes de pacientes ICS-SIDA de AR. El hecho de que los morfotipos menos frecuentes (II, V, VI y IX), fueron encontrados únicamente en pacientes ICS-SIDA, puede deberse a que: (a) estos pacientes

estuvieron sometidos a múltiples tratamientos que podrían alterar la morfología del hongo; y (b) los pacientes con ICS-SIDA sean más susceptibles a aislamientos que no producen infección en pacientes con ICL. Refuerza la primera observación la presencia de un importante número de aislamientos con macroconidios de diámetro inferior a la media referida para la especie (8-15 μm) en pacientes ICS-SIDA (**Tablas 1 y 2**); esta particularidad fue referida por Kwong-Chung y Bennett [1992] y relacionada a los tratamientos antifúngicos. Apoya la segunda observación que un estado de ICS en el huésped aumenta el riesgo de adquirir infecciones por microorganismos que normalmente son considerados de baja o nula virulencia [Ponton *et al.*, 2000; Walsh & Groll, 1999]. Aunque estos cambios fenotípicos pudieran estar relacionados a posibles selecciones o presiones del huésped, no se puede descartar la existencia en la naturaleza de una mayor variabilidad fenotípica de *H. capsulatum* que la descrita hasta el momento.

A diferencia de lo previamente observado por Berliner [1968], tanto las colonias de los aislamientos tipo A como B desarrollaron hifas delgadas y produjeron ambos tipos de conidios. Observaciones realizadas en otros laboratorios confirman lo anterior [Taylor ML, comunicación personal]. Lo que es indudable es el hecho de que de un mismo paciente se pueden aislar morfotipos coloniales diferentes, coincidiendo con una temprana observación de Berliner [1968].

Los macroconidios mayoritariamente exhibieron prolongaciones digitiformes y sólo en pocos aislamientos fueron lisos. Además, llama la atención las diferencias significativas en el tamaño de los macroconidios y la presencia de diferentes morfotipos coloniales derivados de un mismo paciente (**Tabla 2**). Las características fenotípicas observadas en aislamientos procedentes de un mismo paciente pueden estar asociadas a presiones del microambiente del huésped o a infecciones simultáneas con más de un fenotipo.

No existen evidencias ni estudios que relacionen la tasa de crecimiento de la fase M de *H. capsulatum* con la capacidad de infectar y enfermar a pacientes con diferentes tipos de inmunocompromiso. Sin embargo, el hallazgo de que 11 aislamientos, todos pertenecientes a pacientes ICS, con μ inferiores a la media (0.61-1.10 día^{-1}) es muy llamativo. En el presente trabajo, se sugiere que los aislamientos con valores bajos de μ podrían ser considerados de baja virulencia, hecho que explicaría su asociación con pacientes con ICS. Tal propuesta se apoya en los resultados encontrados en el grupo con baja μ , donde se ubicó la cepa Downs ($\mu = 0.69 \pm 0.02 \text{ día}^{-1}$) que es considerada prototipo de baja virulencia [Spitzer *et al.*, 1990], y el aislamiento EH-317 ($\mu = 1.04 \pm 0.12 \text{ día}^{-1}$), también de baja virulencia para el modelo murino [Martínez-Rivera, 1998]. En el otro extremo se encontraron seis aislamientos pertenecientes a pacientes

clasificados como ICL, con $\mu > 1.82 \text{ día}^{-1}$ (Tabla 11). Dos de ellos, EH-46 y EH-53, con valores de $\mu = 2.13 \pm 0.05$ y $2.15 \pm 0.06 \text{ día}^{-1}$, respectivamente, fueron aislados de pacientes mexicanos relacionados a brotes epidémicos de la enfermedad y referidos como virulentos [Martínez-Rivera, 1998].

Las diferencias estadísticas observadas entre las μ de algunos aislamientos obtenidos de un mismo paciente apoyan una vez más la idea vertida de que un mismo individuo puede estar infectado con más de un aislamiento o que éstos sufran cambios fenotípicos y/o genotípicos por presión del huésped [Eissenberg & Goldman, 1991; 1994].

Aunque los valores bajos de μ no pudieron ser asociados estadísticamente con la condición ICS de los pacientes, los datos encontrados son sugestivos de que tal asociación podría darse con un mayor muestreo, aunado a un estudio colateral de determinación de virulencia de los aislamientos involucrados. Por tal motivo, estudiar sistemáticamente la relación de μ versus estados ICS/ICL de los pacientes y/o virulencia de los aislamientos respondería en un futuro esta interrogante.

Se cree que los brotes epidémicos están relacionados a inhalaciones masivas de conidios en lugares cerrados, aunque estos también ocurren en espacios abiertos [Byrd *et al.*, 1975; Chamany *et al.*, 2004; García-Vásquez, 2005; Morgan *et al.*, 2003; Schlech *et al.*, 1993; Stobierski *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2005b; Walkman *et al.*, 1983; Wheat *et al.*, 1981]. Actualmente, algunos investigadores han asociado genotipos del parásito con la virulencia y las formas epidémicas de la histoplasmosis [Durkin *et al.*, 2004; Karimi *et al.*, 2002]. Sin embargo, no se pueden olvidar los factores inherentes al paciente que son muy importantes en el balance de la relación huésped-parásito [Pedroza-Seres *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1997a; 2000b]. Estudios sistemáticos de la asociación del fenotipo y genotipos con la virulencia de los aislamientos, sumados a las características del huésped, permitirían esclarecer si el espectro clínico de la histoplasmosis es originado por un complejo multifactorial representado por cepas de diferentes virulencias, por inhalaciones masivas de propágulos y las características intrínsecas del huésped.

Una observación previa que refuerza la opinión de distintas virulencias entre las cepas de los hemisferios norte y sur de América, fue la alta efectividad de las sulfamidas y la combinación de sulfimetoxazol con trimetropin en el tratamiento de la histoplasmosis en el Río de La Plata [Rubinstein & Negroni, 1981]. En contraste, estas drogas no resultaron eficaces en el tratamiento de la enfermedad en otros países [Torres-Rodríguez, 1987]. Actualmente, desde el advenimiento de drogas antifúngicas, como los azoles y la anfotericina B, las sulfamidas cayeron en desuso. Tal

vez, en un futuro, las pruebas de sensibilidad *in vitro* a sulfamidas permitan revelar diferencias de virulencia entre los aislamientos del Cono Sur versus los del resto de América.

La obtención de la fase L *in vitro* en *H. capsulatum* es difícil y es una preocupación compartida por muchos grupos de investigación que trabajan este modelo fúngico. Berliner [1968], quien dedicó muchos años a estudiar los morfotipos de este hongo, refiere en un estudio que sólo pudo obtener esta fase en 39 % (14:36) de los aislamientos. Con el conocimiento de los requerimientos nutricionales y los avances realizados sobre la fisiología del hongo, estos porcentajes de conversión aumentaron, aunque no llegan a cifras totales. En este estudio se pudo convertir completamente el 74 % de los aislamientos procesados. Estos datos coinciden con los referidos en estudios minuciosos de tipo fisiológico, donde se alcanzó el 64 % (25:39) de transición de fase M a L [Sahaza-Cardona, 2004].

En algunos casos ocurre una transición dimórfica incompleta, con desarrollo simultáneo de hifas y levaduras. Cuando es imprescindible realizar la conversión, lo recomendado es la inoculación experimental; sin embargo, en este estudio no se recurrió a esta estrategia porque se sometería el aislamiento a la presión selectiva de un nuevo huésped, hecho que podría alterar las características de los primoaislamientos procedentes del huésped primario y tergiversar los resultados.

En el presente estudio no se encontró una explicación aislada entre la habilidad de conversión dimórfica y el origen geográfico de los aislamientos, aunque los datos estadísticos lo sugieren; sin embargo, se podría proponer que esta asociación estaría dada por las características genéticas de los aislamientos, las que se ven plasmadas *a posteriori* en los estudios de genotipificación. Los datos estadísticos reflejan que no hay una relación entre la transición de fase M a L *in vitro* y el material clínico de origen. Sin embargo, esto no quiere decir que *in vivo* el tejido, las células y moléculas particulares del huésped, puedan tener un papel crítico en el dimorfismo de *H. capsulatum*, como sugieren resultados recientes de Suárez-Alvarez *et al.* [2005].

Con referencia a la morfología colonial de la fase L, la literatura describe dos morfotipos, liso y rugoso, que han sido asociados a cepas de baja y alta virulencia, respectivamente [Campbell & Berliner, 1973]. Se conoce que el morfotipo rugoso está asociado a la presencia de α -1,3 glucana en la pared celular de la levadura, mientras que el liso a la ausencia de este carbohidrato [Eisenberg & Goldman, 1991; Klimpel & Goldman 1987]. En este estudio, las colonias en fase L fueron todas rugosas, incluyendo las cepas de referencia (Downs y G186B), sin embargo, no se realizaron pruebas de virulencia para el morfotipo colonial rugoso de los aislamientos estudiados.

Aunque actualmente está demostrada la asociación de la α -1,3 glucana con la virulencia de *H. capsulatum* [Rappleye *et al.*, 2004; Woods, 2005], es oportuno recordar que la virulencia en los patógenos fúngicos, así como en otros microorganismos, es un complejo multifactorial [Casadevall & Pirofski, 1999; 2001; Magee *et al.*, 2003; Rooney & Klein, 2002].

Los estudios realizados utilizando SDS-PAGE complementan el estudio del polimorfismo fenotípico de *H. capsulatum*, inicialmente caracterizado por la macro- y micromorfología, además de otros aspectos estudiados, como la tasa específica. Esta técnica mostró una asociación entre los fenotipos SDS-PAGE con el origen geográfico y la enfermedad de base del paciente, en coincidencia con los hallazgos de Reyes-Montes [1999]. Sin embargo, no se encontró relación con el material clínico de origen. Se debe prestar atención a que, al igual que lo observado en el morfotipo colonial, los aislamientos de pacientes ICS-SIDA de AR tuvieron todos los fenotipos SDS-PAGE, reafirmando que los huéspedes con ICS-SIDA pueden adquirir la enfermedad por casi cualquier fenotipo SDS-PAGE o que estos pacientes estuvieron sometidos a múltiples tratamientos que podrían alterar la morfología del hongo [Kwong-Chung & Bennett, 1992; Ponton *et al.*, 2000; Walsh & Groll, 1999].

En los casos de algunos múltiples aislamientos del mismo paciente, se observaron perfiles SDS-PAGE distintos, reafirmando una vez más lo dicho anteriormente, de que un mismo paciente puede estar infectado con dos cepas diferentes, o bien, que éstas pueden sufrir cambios feno- y/o genotípicos por presión del huésped [Eissenberg & Goldman, 1991].

Es importante señalar que todos los aislamientos mostraron bandas H y M, identificadas tanto en el perfil SDS-PAGE como por el revelado en WB, lo que corrobora que estas moléculas son excelentes marcadores para la identificación de *H. capsulatum*, en ausencia de otras características típicas de la especie [Pizzini *et al.*, 1999; Zancopé-Oliveira *et al.*, 1994; 1999]. El hecho de que algunas bandas nítidas de los exoantígenos, observadas en los perfiles de SDS-PAGE, no reaccionaran con suero hiperinmune anti-*H. capsulatum* de conejo, puede deberse a que estos antígenos no fueran inmunogénicos para el conejo, o bien que estuvieran ausentes en la cepa de origen utilizada para inmunizar el animal.

GENOTIPOS

El método de RAPD-PCR demostró que los aislamientos de pacientes de AR presentaron un genotipo con alto porcentaje de similitud (IX) y ningún aislamiento de pacientes de MX/GT

segregó en este grupo. En cambio, los genotipos revelados por RAPD-PCR de los aislamientos de pacientes MX/GT fueron más polimórficos. Estos resultados ratifican los hallazgos de otros investigadores que utilizaron la misma combinación de iniciadores, relacionando estrechamente el perfil obtenido con el origen geográfico de las cepas [Canteros *et al.*, 2005c; Chávez-Tapia *et al.*, 2005; Sahaza-Cardona, 2004; Taylor *et al.*, 2000a; 2005a].

La gran similitud observada entre aislamientos de pacientes argentinos confirmó la homogeneidad genética de los aislamientos del Cono Sur de América en un amplio número de especímenes fúngicos, reforzando lo referido por Kasuga *et al.*, [2003], quienes propusieron la clonalidad de las cepas de origen clínico estudiadas de AR, al utilizar la secuencia de fragmentos de cuatro genes que codifican para proteínas de *H. capsulatum*. Sahaza-Cardona [2004], encontró resultados similares con otro grupo de cepas de AR, al utilizar las mismas secuencias génicas que Kasuga *et al.* [2003], además de RAPD-PCR con doble iniciador. Los resultados del presente trabajo también destacan la homogeneidad genética de los aislamiento de AR, tanto en RAPD-PCR con doble iniciador (donde el perfil IX presentó varios subgrupos monomórficos muy relacionados), como en PFGE donde el perfil VI, que encierra la mayoría de los aislamientos de AR, también presentó subgrupos con Eks idénticos.

Aunque hay un comportamiento homogéneo de los aislamientos del Cono Sur en los diferentes análisis genotípicos realizados, no hay que olvidar que las cepas aisladas a partir de humanos llevan algunas veces interpretaciones erróneas, por el sesgo de información que tienen algunas historias clínicas. Prueba de ello, es el caso de dos aislamientos de pacientes de AR que agruparon fuera del genotipo RAPD-PCR IX, y tuvieron un perfil más relacionado a aislamientos de MX/GT. La explicación para este hallazgo, aunque especulativa, podría deberse a que estos aislamientos procedieron de pacientes que contrajeron la infección en otras regiones fuera del territorio argentino (hecho no registrado en sus historias clínicas). Además, la ausencia de lesiones cutáneas y la evolución fulminante de la enfermedad, características de las formas clínicas de histoplasmosis del hemisferio norte, podrían apoyar esta explicación [Karimi *et al.*, 2002; Negroni *et al.*, 1994; Wheat, 1996].

En pacientes con múltiples aislamientos, no se pudo evidenciar diferencias notables en los perfiles genéticos revelados por RAPD-PCR, sin embargo, en tres de ellos, los aislamientos no presentaron perfil polimórfico idéntico. Es probable que éste no sea el mejor método para evidenciar la existencia de infección múltiple por *H. capsulatum*. Pocos fueron los estudios tendientes a detectar infección por más de un genotipo [Carter *et al.* 1996; de Medeiros-Muniz *et*

al., 2001; Poonwan *et al.*, 1998]. Hasta el momento, sólo Poonwan *et al.* [1998] informaron, por RAPD-PCR con tres iniciadores, diferencias entre aislamientos de distintos materiales clínicos en un mismo paciente, sin embargo, sus resultados son cuestionables.

Los estudios del cariotipo electroforético revelaron un importante CLP entre aislamientos de *H. capsulatum*; lo que fue referido en publicaciones previas [Canteros *et al.*, 2005d; Romero-Martínez *et al.*, 2004], confirmando lo previamente notificado por Steele *et al.* [1986]. Estos últimos autores, utilizando una metodología similar a la empleada en este trabajo, determinaron el número de bandas cromosómicas de tres cepas de laboratorio, Downs con 6 bandas cromosómicas, G186B con 4 y G217B con 3. Sin embargo, en el presente estudio, a diferencia de lo informado por Steele *et al.* [1989], tanto la cepa Downs como G186B presentaron 5 bandas cromosómicas. Es probable que las diferencias en la visualización de bandas se deban a divergencias metodológicas sutiles y/o a la utilización de aparatos con características más avanzadas que aumentan la sensibilidad del ensayo. Inclusive, Steele *et al.* [1989], ya habían observado diferencias en el número de bandas de una misma cepa al utilizar dos métodos de PFGE (CHEF y FIGE). Otra posibilidad es que la discrepancia en el número de bandas observadas entre los diferentes estudios se deba a eventos de co-migración de las bandas cromosómicas, acontecimiento que puede ocurrir algunas veces. De cualquier manera, para corroborar el número real de cromosomas suelen realizarse pruebas de hibridación, ensayo que no se efectuó en este trabajo puesto que el objetivo del mismo fue comparar perfiles de Ek entre aislamientos. No obstante, resulta sumamente interesante el haber encontrado sólo un aislamiento con 3 y otro con 7 bandas, hecho que tal vez indique que estos números de bandas cromosómicas sean reales y menos frecuentes. Es conveniente recordar que el aislamiento 01730, con 7 bandas cromosómicas corresponde a un paciente de AR, con morfotipo colonial idéntico a la cepa de referencia G186B, sin macroconidios y con una $\mu = 0.61 \pm 0.03$; asimismo, el aislamiento 01752, con 3 bandas cromosómicas, tuvo un morfotipo poco común, no presentó macroconidios y fue uno de los aislamientos que no segregó en el genotipo IX RAPD-PCR, característico de los aislamientos de AR. Sin duda alguna, en un futuro estos dos aislamientos serán estudiados con más detalles por sus peculiaridades.

A pesar de que no se encontró relación estadística entre el número de bandas cromosómicas versus el origen geográfico, el estado ICS/ICL de los pacientes y el material clínico de origen, el hecho de que un grupo (genotipo VI) con Eks de 100 % de similitud fuera de aislamientos de pacientes argentinos (**Figura 15**), es una evidencia más de que los aislamientos de AR presentan alta homogeneidad genética en sus Eks. Aunque el cariotipo no agrupó los aislamientos con

respecto a su origen geográfico, a diferencia del RAPD-PCR y la secuenciación de genes [Canteros *et al.*, 2005b; Carter *et al.*, 2001, de Medeiros-Muniz *et al.*, 2001; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Perrotta *et al.*, 2001; Poonwan *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Sahaza-Cardona, 2004; Taylor *et al.*, 2000a; 2005a] permitió tener una idea más concreta sobre la compleja organización del genoma de este importante patógeno eucariótico.

De la comparación de los genotipos RAPD-PCR y PFGE (Eks), y el fenotipo SDS-PAGE (**Figura 16**), se puede inferir que aunque los genotípicos entre múltiples aislamientos de un mismo paciente sean idénticos se presentan variabilidades en la expresión fenotípica, hecho explicable por mecanismos de regulación génica (**Figura 16 a**). Sin el embargo, el hallazgo de Eks con disimilitudes importantes, entre los aislamientos de un mismo paciente, que no fueron detectadas en los genotipos RAPD-PCR y que mostraron cambios en sólo 2 bandas proteicas en el fenotipo SDS-PAGE (**Figura 16 b**), nos lleva a especular que los cambios cromosómicos entre aislamientos de un mismo huésped pueden tener una función regulatoria aún por dilucidar.

El hecho de que únicamente cuatro Eks (V, VI, VII y IX) fueron encontrados en pacientes ICL, reforzó la idea de que estos pacientes tienen mayor riesgo de ser infectados por aislamientos con determinados perfiles. Por otro lado, hay que considerar la posibilidad de que los múltiples tratamientos a los que son sometidos los pacientes con ICS, o la misma inestabilidad del cariotipo de *H. capsulatum*, puedan ser responsables de la variabilidad en los Eks del hongo, tal como fue demostrado en otros patógenos fúngicos [Fries *et al.*, 1996; Sukroongreung *et al.*, 1999; 2001]. En este estudio, se observó inestabilidad de los Eks de dos aislamientos de *H. capsulatum* después de múltiples subcultivos *in vitro*, sin embargo, no se profundizó en establecer si este fenómeno se debió a un reordenamiento cromosómico o a cambios en la ploidía del patógeno.

Un punto a discutir de los resultados, es el polimorfismo tanto cromosómico como colonial, entre aislamientos de un mismo o diferente episodio clínico de histoplasmosis, que se demuestra por primera vez en este trabajo. Los polimorfismos fenotípicos y genotípicos observados entre aislamientos de un mismo paciente podrían deberse a infección por distintas clonas del hongo o a rearrreglos genómicos [Fierro & Martín, 1999; Fries *et al.*, 1996; Sukroongreung *et al.*, 2001; Zolan, 1995]. Si se tratara de rearrreglos, éstos podrían ocurrir *in vivo*, en el transcurso de la infección, como consecuencia de presión selectiva del huésped o bien *in vitro* durante los subcultivos en el laboratorio. Este última propuesta fue comprobada en dos aislamientos de este estudio (**Figura 17**) y permitió inferir que algunos aislamientos poseen un genoma muy versátil. Este evento no fue observado, hasta el momento, en cepas de otros laboratorios, a pesar de su domesticación.

Estos hallazgos son una evidencia más de la complejidad y la variabilidad genética de *H. capsulatum* y cuestionan si la secuenciación del genoma de las dos cepas de referencia de *H. capsulatum*, G217B y G186AR (<http://www.genome.wustl.edu/projects/hcapsulatum>; Magrini *et al.*, 2004), actualmente en desarrollo, es realmente válida como representativa de la especie.

Recientemente [Fux *et al.*, 2005], han cuestionado el uso de cepas de referencia excesivamente subcultivadas, para la realización de experimentos de fisiopatogenia, puesto que ellas posiblemente no representen el prototipo de la especie por la plasticidad adaptativa de su genoma. Si bien, esto se debate en bacterias, mucho más válido podría ser para hongos, donde una misma especie puede diferir en número y tamaño de bandas cromosómicas [Zolan, 1995], hecho que ya se comprobó en *H. capsulatum* [Canteros *et al.*, 2005d; Romero-Martínez *et al.*, 2004; Steele *et al.*, 1989]. A pesar que estudios previos demostraron tamaños genómicos variables entre aislamientos de *H. capsulatum* (24 y 37 Mbp) [Canteros *et al.*, 2005d] no se pudo descartar que las diferencias entre los tamaños genómicos calculados para las cepas de laboratorio G186AS (\cong 23 Mbp), Downs (\cong 32 Mbp) y G217B (43.5 Mbp), estas últimas con 8 % y 17 % de secuencias repetitivas de DNA [Carr & Sherer, 1998; Magrini *et al.*, 2004], quizás se deban a cambios en la ploidía ocurridos durante los sucesivos pasajes *in vitro* (cepas con 50 años de historia), y tal vez no tengan nada que ver con la realidad de los aislamientos silvestres (primoaislamientos) de *H. capsulatum*.

Existen muchos interrogantes con respecto a la relación *H. capsulatum*-huésped, sin embargo, uno de los más intrigantes es el papel que juega el patógeno y sus estrategias o armas para producir enfermedad, lo que se resume en la pregunta ¿Un mismo feno-genotipo de *H. capsulatum* es responsable del espectro de manifestaciones clínicas y lesiones en los huéspedes de diferentes áreas geográficas? La respuesta por ahora es ambigua; los diferentes estudios existentes sólo proponen respuestas parciales para estos cuestionamientos. La virtud del presente trabajo fue el de utilizar un número importante de aislamientos de *H. capsulatum*, cuyo origen clínico-geográfico fue cuidadosamente determinado y cuya caracterización feno-genotípica se realizó comparativamente, lo que permitió concluir que algunos feno-genotipos de *H. capsulatum* son capaces de infectar y enfermar a un huésped con ICS, aunque no se pudo establecer relación con el tropismo de los aislamientos por determinado órgano y/o tejido.

Los contrastes encontrados entre las características feno- y genotípicas ponen en evidencia que el uso de diferentes técnicas dan una visión parcial de la biología de *H. capsulatum*; por lo que es difícil lograr una conclusión precisa utilizando una sola metodología. Sin embargo, el combinar

características morfológicas, fisiológicas y genéticas de *H. capsulatum* permitió tener una visión más amplia y aportar información desde diferentes ángulos sobre la complejidad de las relaciones biológicas entre el binomio *H. capsulatum* y su huésped.

Muchos enigmas quedan por investigar sobre este patógeno, sin embargo, la versatilidad de su genoma hace que se plantee si es correcto, confiable y próximo a la realidad, realizar cualquier tipo de experimento empleando cepas domesticadas.

Para concluir esta discusión sería interesante plasmar dos ideas, manifestadas por una de las pioneras en el estudio del polimorfismo de *H. capsulatum*, que reflejan que los problemas de esta especie fúngica son más viejos de lo que se cree.

.....“La mayoría de los estudios sobre *H. capsulatum* han sido realizados sobre cultivos mantenidos por largo tiempo en el laboratorio, los cuales, indudablemente están genotípicamente muy alejados del aislamiento primario. Quizás los factores claves en la infectividad y antigenicidad relacionados al fenotipo han sido perdidos, subestimados o inadvertidamente descartados durante los repetidos subcultivos”.

.....“Si es que pretendemos establecer alguna correlación significativa entre origen, morfología, patogenicidad, antigenicidad, y habilidad termodimórfica de *H. capsulatum* (un organismo tan exasperantemente variable en su morfología y fisiología), el único abordaje lógico es el análisis de cepas recién aisladas y con una historia conocida”.

BERLINER, 1968

CONCLUSIONES

- Se confirmó la amplia diversidad (polimorfismo) fenotípica y genotípica entre los aislamientos clínicos de *H. capsulatum* con nueve morfotipos coloniales, seis electrotipos SDS-PAGE, nueve perfiles RAPD-PCR y diez Eks, entre 3 y 7 bandas cromosómicas.
- Los aislamientos de pacientes con ICS, en especial los ICS-SIDA, tienen mayor diversidad fenotípica que los aislamientos de pacientes con ICL. Esta conclusión apoya la hipótesis propuesta en el presente trabajo.
- Se observó que tanto las colonias y las estructuras microscópicas características de la especie pueden presentar morfología aberrante en los primoaislamientos.
- Se describió la presencia de macroconidios de un diámetro menor al referido para la especie, y se demostró una estrecha relación entre estos diámetros y la condición ICS-SIDA de los pacientes.
- Se demostró la existencia de aislamientos con baja tasa específica de crecimiento, obtenidos de pacientes con ICS, independientemente del origen geográfico.
- Se confirmó la alta frecuencia de aislamientos con tropismo cutáneo en pacientes ICS-SIDA de AR.
- Se encontró que la mayoría de los aislamientos de AR presentaban 5 bandas y un Ek predominante, demostrando la existencia de un mayor CLP que el referido en trabajos previos.
- Se evidenció que algunos aislamientos provenientes del mismo o diferente episodio clínico de un mismo paciente fueron fenotípicamente distintos.
- Se observó en algunos múltiples aislamientos de un mismo paciente que, genotipos idénticos (Eks y RAPD-PCR) revelaron disimilitudes en los fenotipos SDS-PAGE, y asimismo, Eks diferentes de otros múltiples aislamientos se asociaron tanto con genotipos RAPD-PCR como con fenotipos SDS-PAGE idénticos.
- Se detectó variaciones en los Eks después de sucesivos subcultivos *in vitro* de un mismo aislamiento.

- Se demostró que el origen geográfico de los aislamientos se relacionó significativamente con el fenotipo SDS-PAGE y el genotipo RAPD-PCR, pero no se pudo establecer esta asociación con los Eks.
- No se pudo establecer ninguna asociación entre el fenotipo y/o genotipo con el material clínico del cual el hongo fue aislado.
- Se obtuvieron resultados sugestivos de asociación entre el fenotipo SDS-PAGE, el genotipo determinado por RAPD y la condición inmunológica de los pacientes.

PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO

- Localizar las secuencias génicas de interés en filogenia y en patogénesis en las bandas cromosómicas reveladas por PFGE.
- Utilizar la secuenciación de genes “específicos del hongo”, o la secuencia de marcadores microsatélites, para confirmar posibles infecciones por múltiples aislamientos de *H. capsulatum*.

Tabla 1. Datos de los aislamientos de *H. capsulatum* estudiados.

Nº de registro	Origen	Sexo del paciente	Material clínico	Causa de inmunocompromiso	Condición de inmunocompromiso	Morfotipo colonial	Microconidios	Macroconidios (µm)					µ día ⁻¹	± DS	Fase L	Fenotipo SOS PAGE	Genotipo RAPD PCR	PFGE	
								diámetro promedio	± DS	Nº conidios	diámetro máximo	diámetro mínimo						Nº bandas cromosómicas	EK
01558	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	II	A	8.3	1.0	10	10.0	7.5	1.49	0.10	No	II	IX	ND	ND
01559	AR	F	Sangre	VIH (+)	ICS	IV	P	7.3	1.0	50	10.0	6.3	1.40	0.09	Si	V	IX	6	VI
01730	AR	M	Sangre	VIH (+)	ICS	VI	P	-	-	0	-	-	0.61	0.03	Si	III	IX	7	IV
01731	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	V	P	-	-	0	-	-	0.96	0.03	Si	III	IX	4	VII
01732	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	I	P	7.9	0.8	50	10.0	6.3	0.80	0.11	Si	III	IX	6	VII
01733	AR	M	Mucosa	Diabetes	ICS	I	P	9.1	1.5	50	12.5	6.3	1.84	0.09	No	III	IX	ND	ND
01734	AR	F	Piel	VIH (+)	ICS	II	P	7.6	0.5	36	8.8	6.3	1.94	0.12	No	III	IX	ND	ND
01737	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	II	P	6.9	0.7	50	8.8	6.3	1.12	0.05	No	III	IX	ND	ND
01740	AR	M	Mucosa	VIH (+)	ICS	II	P	8.9	1.3	26	12.5	7.5	1.87	0.27	No	III	IX	ND	ND
01741	AR	M	Mucosa	VIH (+)	ICS	IV	P	7.5	1.4	50	11.3	6.3	1.50	0.05	No	III	IX	ND	ND
01742	AR	M	Mucosa	s/c	ICL	IV	P	9.9	1.8	50	12.5	6.3	1.53	0.08	Si	III	IX	5	IX
01743	AR	M	Lavado broncoalveolar	s/c	ICL	IV	P	10.8	1.1	26	12.5	7.5	1.79	0.06	No	III	IX	ND	ND
01746	AR	M	Piel	Trasplante renal	ICS	IV	P	-	-	0	-	-	1.66	0.05	No	III	IX	ND	ND
01747	AR	M	Médula ósea	VIH (+)	ICS	I	P	7.5	1.3	50	10.0	6.3	1.69	0.14	Si	I	VIII	4	VI
01752	AR	F	Hígado	VIH (+)	ICS	V	P	-	-	0	-	-	1.18	0.16	Si	II	V	3	I
01753	AR	M	Sangre	Trasplante renal	ICS	IX	P	7.5	1.1	50	10.0	6.3	0.71	0.04	Si	III	IX	4	VII
01754	AR	M	Sangre	Hepatitis autoinmune	ICS	IX	P	7.4	1.1	50	10.0	6.3	1.32	0.18	Si	III	IX	5	VI
01755	AR	M	Sangre	VIH (+)	ICS	IV	P	10.8	1.0	50	12.5	10.0	1.34	0.04	Si	III	IX	5	VI
01756	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	IV	P	7.1	1.3	50	10.0	6.3	1.47	0.09	Si	II	IX	5	VI
01766	AR	M	Sangre	VIH (+)	ICS	IV	P	11.1	1.2	50	12.5	7.5	1.53	0.07	No	III	IX	ND	ND
01842	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	IX	P	7.2	1.4	50	10.0	6.3	0.89	0.12	Si	III	IX	5	VI
01862	AR	F	Lavado broncoalveolar	Trasplante renal	ICS	IV	P	10.6	1.9	50	13.8	6.3	1.63	0.09	Si	III	IX	5	VI
01868	AR	F	Líquido paravertebral	Lupus eritematoso sistémico	ICS	IV	P	10.8	1.1	50	12.5	7.5	1.43	0.12	Si	III	IX	5	II
01892	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	IV	P	9.8	1.5	50	13.8	7.5	1.56	0.18	Si	III	IX	4	VI
01893	AR	M	Piel	Lupus eritematoso sistémico	ICS	IV	P	11.6	1.1	50	12.5	10.0	1.50	0.12	Si	III	IX	5	VI
02925	AR	F	Piel	Linfoma no Hodgking	ICS	II	P	9.0	1.5	50	12.5	6.3	1.79	0.02	Si	III	IX	4	VIII
02926	AR	M	Sangre	VIH (+)	ICS	IX	P	7.1	0.8	50	8.8	6.3	1.21	0.04	Si	III	IX	5	IX
02927	AR	F	Sangre	VIH (+)	ICS	I	P	8.2	1.1	50	10.0	6.3	1.30	0.20	No	III	IX	ND	ND

CONTINUACIÓN TABLA 1

N° de registro	Origen	Sexo del paciente	Material clínico	Causa de inmunocompromiso	Condición de inmunocompromiso	Morfotipo colonial	Microconidios	Macroconidios (µm)						Fase L	Fenotipo SDS PAGE	Genotipo RAPD-PCR	PFGE			
								diámetro promedio	±DS	N° contados	diámetro máximo	diámetro mínimo	µ día ⁻¹				±DS	Bandas cromosómicas	EK	
02928	AR	M	Piel	VIH (+)	ICS	I	P	9.2	1.5	50	12.5	7.5	1.42	0.12	SI	III	IX	5	VI	
02929	AR	F	Ganglio	VIH (+)	ICS	IX	P	11.6	1.4	50	13.8	10.0	1.03	0.12	SI	III	IX	5	VI	
02930	AR	M	Biopsia de pulmón	Transplante renal	ICS	IV	P	8.7	1.5	50	12.5	6.3	1.27	0.12	SI	III	IX	5	VI	
02931	AR	M	Lavado broncoalveolar		VIH (+)	ICS	I	P	8.2	1.7	50	12.5	6.3	1.53	0.03	SI	III	IX	5	VI
02932	AR	M	Sangre		VIH (+)	ICS	VII	P	8.5	1.2	50	11.3	7.5	1.47	0.18	SI	III	IX	5	VI
02933	AR	M	Médula ósea		VIH (+)	ICS	I	P	10.6	1.7	50	12.5	6.3	1.53	0.07	SI	III	IX	5	VI
02934	AR	M	Lavado broncoalveolar		VIH (+)	ICS	III	P	7.3	1.2	50	11.3	6.3	1.12	0.07	SI	III	IX	6	VI
02935	AR	M	Sangre		VIH (+)	ICS	I	P	7.1	0.7	27	8.8	6.3	1.47	0.08	SI	IV	IX	6	VI
90455	AR	M	Mucosa	s/c	ICL	VII	P	8.7	1.8	41	12.5	6.3	1.27	0.17	No	II	IX	ND	ND	
EH-46	MX	M	Hígado	s/c	ICL	I	P	8.2	1.5	50	11.3	6.3	2.13	0.05	SI	I	I	5	V	
EH-53	MX	F	Sangre	s/c	ICL	III	P	8.9	1.5	50	12.5	6.3	2.15	0.06	No	II	I	ND	ND	
EH-303	GT	M	Espuito	s/c	ICL	IV	P	10.0	1.4	50	12.5	7.5	1.19	0.17	No	I	IV	ND	ND	
EH-316	MX	M	Sangre		VIH (+)	ICS	III	P	7.0	0.6	50	7.5	6.3	1.62	0.08	SI	II	V	4	IV
EH-317	MX	M	Sangre		VIH (+)	ICS	IX	P	10.0	1.7	50	12.5	7.5	1.04	0.12	SI	II	I	5	VI
EH-318	MX	M	Sangre		VIH (+)	ICS	I	P	6.8	0.9	50	10.0	6.3	1.71	0.09	No	II	VII	ND	ND
EH-325	MX	F	Líquido peritoneal		VIH (+)	ICS	IX	P	8.1	1.3	50	10.0	6.3	1.11	0.08	SI	I	VI	6	IX
EH-359	MX	M	Mucosa	s/c	ICL	I	P	7.5	1.4	50	10.0	6.3	1.91	0.05	No	I	I	ND	ND	
EH-363	GT	ND	Líquido peritoneal	s/c	ICL	IV	P	11.0	1.2	37	12.5	10.0	1.42	0.05	SI	I	I	6	VI	
EH-364	GT	M	Piel	s/c	ICL	IV	P	7.5	1.4	7	10.0	6.3	1.99	0.12	SI	II	VII	6	VI	
EH-379	MX	F	Espuito	s/c	ICL	I	P	7.8	1.5	50	10.0	6.3	1.67	0.15	No	I	I	ND	ND	
EH-380	MX	M	Espuito		VIH (+)	ICS	I	P	8.8	1.6	50	12.5	6.3	1.66	0.08	SI	II	I	5	VI
EH-409	MX	M	Espuito	s/c	ICL	IV	P	11.6	1.1	50	12.5	10.0	1.81	0.07	SI	II	VI	4	VI	
EH-410	MX	M	Biopsia de pulmón	s/c	ICL	I	P	11.1	1.5	50	12.5	7.5	1.98	0.05	No	II	I	ND	ND	
EH-448	MX	M	Sangre		VIH (+)	ICS	II	P	7.1	1.2	13	10.0	6.3	1.74	0.02	No	II	VII	ND	ND
EH-523	MX	M	Médula ósea	Fibrosis esplénica	ICS	I	P	9.5	2.1	50	12.5	6.3	1.73	0.13	No	II	VII	ND	ND	
EH-557	MX	M	Sangre	s/c	ICL	III	P	11.7	1.5	50	15.0	10.0	1.33	0.08	No	III	I	ND	ND	
G186B	PA	ND	ND	s/c	ND	VI	A	-	-	0	-	-	0.89	0.14	SI	IV	II	5	X	
Downs	EU	F	Mucosa	Diabetes	ND	VIII	A	-	-	0	-	-	0.69	0.02	SI	II	III	5	VI	

µ: tasa específica de crecimiento, AR: Argentina, MX: México, GT: Guatemala, EU: Estados Unidos, PA: Panamá, M: masculino, F: femenino, s/c: sin causa referida de inmunocompromiso, ICS: inmunocompromiso severo, ICL: inmunocompromiso leve, ND: no determinado, A: ausente, P: presente. Nota: los múltiples aislamientos de un mismo paciente están referidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los múltiples aislamientos de un mismo paciente.

Paciente No.	N° de registro	Fecha del aislamiento	Sexo del paciente	Material clínico	Causa de inmunocompromiso	Condición de inmunocompromiso	Fenotipo colonial	Microconidios	Macroconidios (µm)					Fase L	Fenotipo SDS PAGE	Genotipo RAPD PCR	FFGE			
									diámetro promedio	± DS	N° contactos	diámetro máximo	diámetro mínimo				µ día ¹	± DS	Bandas cromosómicas	Ex
1	00205	22/01/00	M	Sangre	VIH (+)	ICS	I	P	8.1	1.8	10	10.0	6.3	1.48	0.08	SI	III	IX	5	VI
	Piel			8.4					2.0	11	12.5	6.3	0.86	0.06	SI	III	IX	5	VI	
2	01735	10/07/98	F	Líquido articular	VIH (+)	ICS	I	P	6.6	0.5	7	7.5	6.3	1.85	0.07	SI	VI	IX	4	VI
	Piel	6.8		0.7					9	7.5	6.3	1.97	0.20	SI	III	IX	4	V		
3	01738	28/06/01	F	Piel	VIH (+)	ICS	I	P	8.3	1.2	50	12.5	7.5	1.40	0.45	SI	III	IX	5	VI
	Sangre			9.0					1.7	50	12.5	6.3	1.34	0.05	SI	III	IX	5	VI	
4	01744	13/08/99	M	Piel	VIH (+)	ICS	I	P	8.4	1.3	50	12.5	6.3	1.37	0.14	SI	III	IX	6	IV
	Sangre			9.5					2.2	50	12.5	6.3	1.18	0.29	SI	III	IX	5	IV	
5	01748	24/10/00	M	Mucosa lengua	s/c	ICL	IV	P	6.7	1.0	33	10.0	6.3	1.45	0.11	SI	III	IX	4	VII
	Mucosa paladar			6.5					0.9	16	10.0	6.3	1.52	0.09	SI	III	IX	4	VII	
	Piel			9.4					1.6	50	15.0	6.3	2.06	0.09	SI	III	IX	4	VII	
6	01751	12/10/01	M	Sangre	Nefropatía tratada con altas dosis de corticoides	ICS	IV	P	8.1	1.3	50	10.0	6.3	1.61	0.10	SI	III	IX	6	VI
	01869	09/11/01		Espuito					11.0	1.1	50	12.5	7.5	1.47	0.05	SI	III	IX	6	III
	01870	09/11/01		Médula ósea					11.3	1.1	50	12.5	10.0	1.41	0.16	SI	III	IX	5	IX
	01894*	07/02/02		Médula ósea					7.6	1.4	50	10.0	6.3	1.48	0.10	SI	III	IX	6	VI
7	02923	04/02/02	M	Mucosa	Neuro-granulomatosis	ICS	IV	P	9.7	1.6	50	12.5	7.5	1.40	0.14	SI	III	IX	5	VI
	02924	19/02/02		Piel					13.9	3.4	50	20.0	7.5	1.89	0.08	SI	III	IX	5	VI
8	02936	16/01/02	F	Sangre	VIH (+)	ICS	IV	P	8.1	1.7	50	12.5	6.3	1.72	0.07	SI	V	IX	5	VI
	02937	16/01/02		Médula ósea					7.1	1.0	50	10.0	6.3	1.62	0.03	SI	V	IX	5	VI
	02938	30/01/02		Ganglio					6.5	0.5	50	7.5	6.3	1.63	0.10	SI	V	IX	6	VI

En esta tabla se resumen las características y resultados de los múltiples aislamientos obtenidos de un mismo paciente durante el mismo o diferente episodio de la enfermedad.

µ: tasa específica de crecimiento, AR: Argentina, MX: México, GT: Guatemala, EU: Estados Unidos, PA: Panamá, M: masculino, F: femenino, s/c: sin causa referida de inmunocompromiso, ICS: inmunocompromiso severo, ICL: inmunocompromiso leve, C: control, ND: no determinado, P: presente.

*Obtenido después de tres meses de tratamiento con antifúngicos (anfotericina B durante un mes e intratratamiento con itraconazol).

Tabla 3. Protocolos de PFGE utilizados para la separación de bandas cromosómicas en hongos de diferentes tamaños genómicos*.

DNA de referencia, tamaño de bandas cromosómicas (Mbp)	Concentración de agarosa (%)	Tiempo de pulso (s)	Tiempo de corrida (h)	Voltaje (V cm ⁻¹)	Ángulo (°)	Temperatura (°C)	Amortiguador
<i>Dirtyostelium discoidesum</i> (3.6-9.0)	0.8	2000-9600	150	1.8-1.5	120	14	TAE 0.25X
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (3.5-5.7)	0.8	1800	72	1.5	106	14	TAE 1X
<i>Candida albicans</i> (1.0-4.0)	0.8	500	48	3.0	106	14	TAE 1X

*Cox *et al.*, 1990.

Tabla 4. Protocolos probados durante la estandarización del PFGE.

Protocolo	Concentración de agarosa	Tiempo de pulso (s)	Tiempo de corrida (h)	Voltaje (V cm ⁻¹)
1	0.8%	3000-720	72	2.0
		3400-2400	40	1.5
2	0.8%	2400-1400	16	2.5
		1400-300	16	3.5
3	1.0%	3000-720	72	2.0
4	1.0%	3000-720	72	3.0
5	1.0%	3000-720	96	2.0
6	1.0%	3400-1000	48	2.0
		1000-300	24	3.0
7	1.0%	4500	24	1.5
		3600-2700	30	1.5
		2700-750	18	1.8
8	0.7%	3000-720	72	2.0
9	0.7%	3600-720	72	2.0
		720-450	16	1.5
10	0.7%	4500	24	1.5
		3600-2700	30	1.5
		2700-750	18	1.8

Tabla 5. Relación entre la procedencia geográfica, la condición de inmunocompromiso del paciente y el material clínico de origen de los aislamientos.

Procedencia	Condición de inmunocompromiso	Material de origen					Total
		Sangre y/o médula ósea	Piel	Mucosa	Tracto respiratorio	Otros	
México y Guatemala N = 17	ICS-SIDA	4			1	1	6
	ICS-VIH(-)	1					1
	ICL	2	1	1	4	2	10
Argentina N = 57	ICS-SIDA	15	13	2	2	4	36
	ICS-VIH(-)	5	4	2	3	1	15
	ICL		1	4	1		6
Total		27	19	9	11	8	74

Tabla 6. Relación entre la procedencia geográfica, la condición de inmunocompromiso del paciente y el morfotipo colonial de los aislamientos.

Procedencia	Condición de inmunocompromiso	Morfotipos									Total
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	2	1	1						2	6
	ICS-VIH(-)	1									1
	ICL	4		2	4						10
Argentina N = 57	ICS-SIDA	12	4	1	10	3	1	1		4	36
	ICS-VIH(-)	2	1		10					2	15
	ICL				5			1			6
EU									Downs		1
PA							G186B				1

Tabla 7. Relación entre el material clínico de origen y el morfotipo colonial de los aislamientos.

Material de origen	Morfotipos									Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX		
Sangre /MO	8	1	3	8		1	1	5	27	
Piel	5	4		7	2			1	19	
Mucosa	2	1		5			1		9	
Tracto respiratorio	4		1	6					11	
Otros	2			3	1			2	8	

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente; el morfotipo VIII no figura en la tabla por ser exclusivo de la cepa Downs.

Tabla 8. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y el diámetro de los macroconidios de los aislamientos.

Procedencia	Condición de Inmunocompromiso	Macroconidios			
		Nº de aislamientos	Diámetro (promedio)	Diámetro (intervalo)	± DS
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	6	8.0	6.8-10.0	1.2
	ICS-VIH(-)	1	7.5	6.3-10.0	1.4
	ICL	10	9.5	7.5-11.7	1.7
Argentina N = 53	ICS-SIDA	33	8.3	6.5-11.6	1.3
	ICS-VIH(-)	14	9.7	7.4-13.9	1.9
	ICL	6	8.7	6.5-10.8	1.8

Nota: en el grupo ICS-SIDA de AR tres aislamientos no presentaron macroconidios, y asimismo un aislamiento del grupo ICS-VIH(-) de AR.

Tabla 9. Relación entre el material clínico de origen de los aislamientos y el diámetro de los macroconidios de los aislamientos.

Material de origen	Macroconidios			
	Nº de aislamientos	Diámetro (promedio)	Diámetro (Intervalo)	± DS
Sangre /MO	26	8.6	6.8-11.7	1.5
Piel	17	8.7	6.8-13.9	1.8
Mucosa	9	8.3	6.5-9.9	1.2
Tracto respiratorio	11	9.6	7.8-11.6	1.5
Otros	7	9.0	6.5-11.6	2.1

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente y no formar macroconidios.

Tabla 10. Tasa específica de crecimiento de los aislamientos en cultivos.

Aislamientos		μ día ⁻¹	
		superficie	sumergido
1	EH-303	1.19	0.07
2	01737	1.12	0.13
3	01730	0.61	0.05
4	EH-316	1.62	0.16
5	00335	0.86	0.10
6	00205	1.48	0.07
7	01893	1.50	0.16
8	01869	1.47	0.14
9	Downs	0.69	0.06
10	02931	1.53	0.11
11	01738	1.40	0.09

Ver detalles de los cultivos y cálculos de μ en Materiales y Métodos.

Tabla 11. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y la tasa específica de crecimiento de los aislamientos.

Procedencia	Condición de Inmunocompromiso	Número de aislamientos			Total
		μ día ⁻¹			
		baja (< 1.14)	Media (1.14-1.82)	Alta (> 1.82)	
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	2	4		6
	ICS-VIH(-)		1		1
	ICL		5	5	10
Argentina N = 57	ICS-SIDA	8	23	5	36
	ICS-VIH(-)	1	12	2	15
	ICL		5	1	6
EUA		Downs			1
PA		G186B			1

Tabla 12. Relación entre el material clínico de origen y la tasa específica de crecimiento de los aislamientos.

Material de origen	Número de aislamientos			Total
	μ día ⁻¹			
	Baja (< 1.14)	Media (1.14 -1.82)	Alta (> 1.82)	
Sangre /MO	4	22	1	27
Piel	4	9	6	19
Mucosa		6	3	9
Tracto respiratorio	1	9	1	11
Otros	2	4	2	8

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente.

Tabla 13. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y la capacidad de conversión *in vitro* a la fase L de los aislamientos.

Procedencia	Condición de Inmunocompromiso	Conversión dimórfica		Total de aislamientos
		SI	NO	
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	4	2	6
	ICS-VIH(-)		1	1
	ICL	4	6	10
Argentina N = 57	ICS-SIDA	28	8	36
	ICS-VIH(-)	13	2	15
	ICL	4	2	6

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de datos completos.

Tabla 14. Relación entre el material clínico de origen y la capacidad de conversión *in vitro* a la fase L de los aislamientos.

Material de origen	Conversión dimórfica		Total de aislamientos
	SI	NO	
Sangre /MO	20	7	27
Piel	14	5	19
Mucosa	4	5	9
Tracto respiratorio	7	4	11
Otros	8		8

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente.

Tabla 15. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y el fenotipo SDS-PAGE de los aislamientos.

Procedencia	Condición de inmunocompromiso	Fenotipos SDS-PAGE						Total
		I	II	III	IV	V	VI	
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	1	5					6
	ICS-VIH(-)		1					1
	ICL	5	4	1				10
Argentina N = 57	ICS-SIDA	1	3	26	1	4	1	36
	ICS-VIH(-)			15				15
	ICL		1	5				6
EU		Downs						1
Panamá		G186B						1

Tabla 16. Relación entre el material clínico de origen y el fenotipo SDS-PAGE de los aislamientos.

Material de origen	Fenotipos SDS-PAGE						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
Sangre /MO	1	6	16	1	3		27
Piel		3	16				19
Mucosa	1	1	7				9
Tracto respiratorio	2	3	6				11
Otros	3	1	2		1	1	8

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente.

Tabla 17. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y el genotipo RAPD-PCR de los aislamientos.

Procedencia	Condición de inmunocompromiso	Genotipos RAPD-PCR									Total
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
México/ Guatemala N = 17	ICS-SIDA	2				1	1	2			6
	ICS-VIH(-)							1			1
	ICL	7			1		1	1			10
Argentina N = 57	ICS-SIDA					1			1	34	36
	ICS-VIH(-)									15	15
	ICL									6	6
EU				Downs							1
Panamá			G186B								1

Tabla 18. Relación entre el material clínico de origen y el genotipo RAPD-PCR de los aislamientos.

Material de origen	Genotipos RAPD-PCR							Total
	I	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
Sangre/ MO	3		1		3	1	19	27
Piel	1						18	19
Mucosa	1						8	9
Tracto respiratorio	3	1		1			6	11
Otros	2			1			5	8

Nota: Los genotipos II y III no aparecen porque corresponden a las cepas de referencia.

Tabla 19. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y el número de bandas cromosómicas de los aislamientos.

Procedencia	Condición de inmunocompromiso	Número de bandas cromosómicas					Total
		3	4	5	6	7	
México/ Guatemala N = 8	ICS-SIDA		1	2	1		4
	ICL		1	1	2		4
Argentina N = 46	ICS-SIDA	1	5	16	6	1	29
	ICS-VIH(-)		2	8	3		13
	ICL		3	1			4
EU				Downs			1
Panamá				G186B			1

El número de bandas cromosómicas fue detectado por PFGE, ver detalles en Materiales y Métodos

Nota: no se incluyeron en la tabla datos de los aislamientos ICS-VIH(-) de MX/GT, por carecer de la información pertinente.

Tabla 20. Relación entre el material clínico de origen y el número de bandas cromosómicas de los aislamientos.

Material de origen	Número de bandas cromosómicas					Total
	3	4	5	6	7	
Sangre/ MO		3	12	4	1	20
Piel		5	7	3		15
Mucosa		2	2			4
Tracto respiratorio		1	4	2		7
Otros	1	1	3	3		8

El número de bandas cromosómicas fue detectado por PFGE, ver detalles en Materiales y Métodos.

Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs y G186B, por carecer de la información pertinente.

Tabla 21. Relación entre el origen geográfico, la condición de inmunocompromiso del paciente y el Ek de los aislamientos.

Procedencia	Condición de Inmunocompromiso	Eks										Total
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
México/ Guatemala N = 8	ICS-SIDA				2		1			1		4
	ICL					1	3					4
Argentina N = 46	ICS-SIDA	1			3	1	22	1		1		29
	ICS-VIH(-)		1	1			8	1	1	1		13
	ICL							3		1		4
EU						Downs					1	
Panamá										G186B		1

Los Eks fueron revelados por el análisis de UPGMA de los perfiles obtenidos por PFGE, ver detalles en Materiales y Métodos.
Nota: no se incluyeron en la tabla datos de los aislamientos ICS-VIH(-) de MX/GT, por carecer de la información pertinente.

Tabla 22. Relación entre el material clínico de origen y el Ek de los aislamientos.

Material de origen	Eks									Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
Sangre/ MO				4		13	1		2	20
Piel				1	1	10	2	1		15
Mucosa						1	2		1	4
Tracto respiratorio			1			6				7
Otros	1	1			1	4			1	8

Los Eks fueron revelados por el análisis de UPGMA de los perfiles obtenidos por PFGE, ver detalles en Materiales y Métodos.
Nota: no se incluyeron en la tabla los datos de las cepas de referencia Downs (Ek VI) y G186B (Ek X, exclusivo de esta cepa), por carecer de la información pertinente.

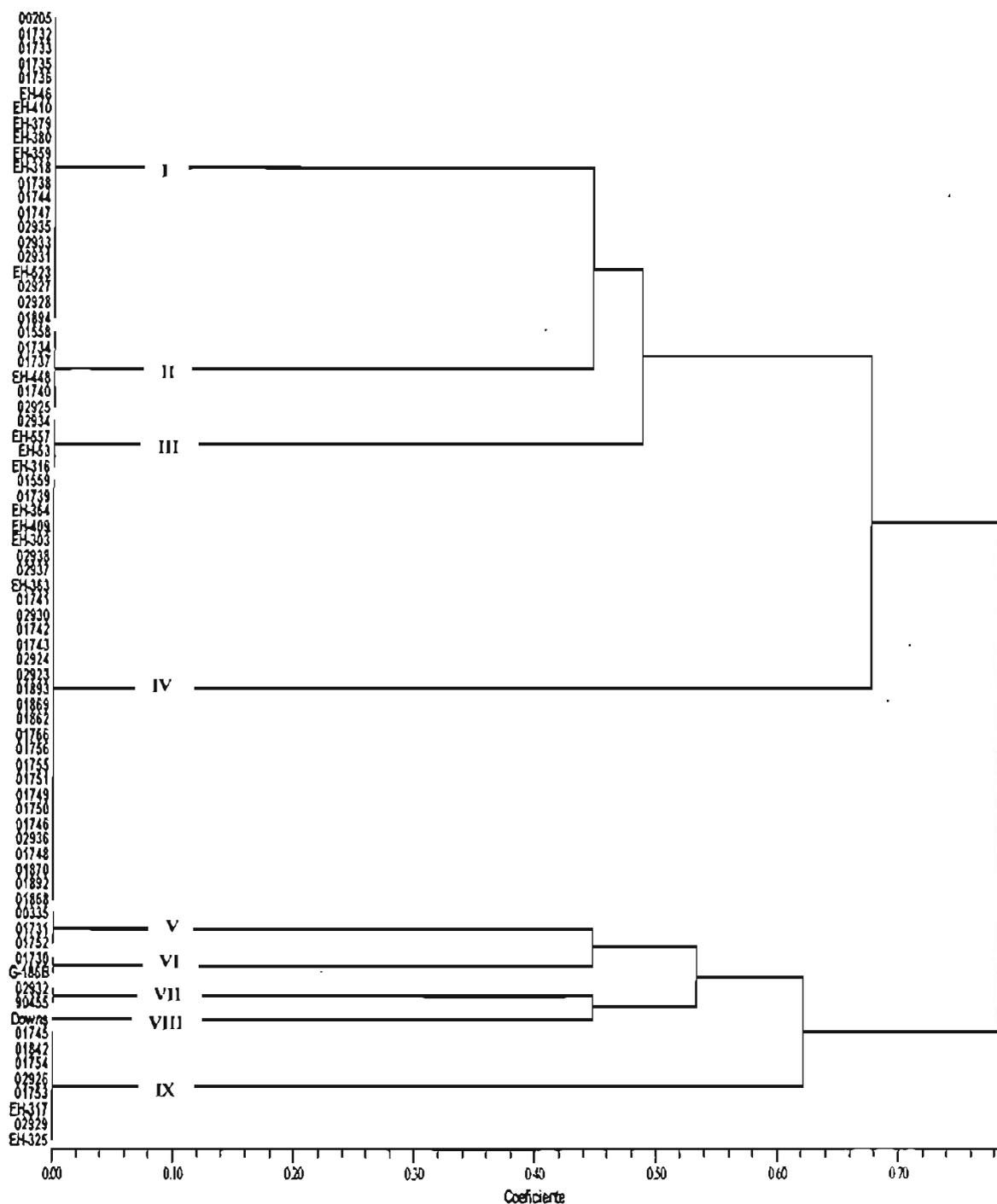


Figura 1. Dendrograma originado del análisis por UPGMA de los aislamientos según las características macromorfológicas de las colonias. El mismo fue realizado en NTS\Spv ver 2.02] utilizando coeficiente de distancia "taxonómica".

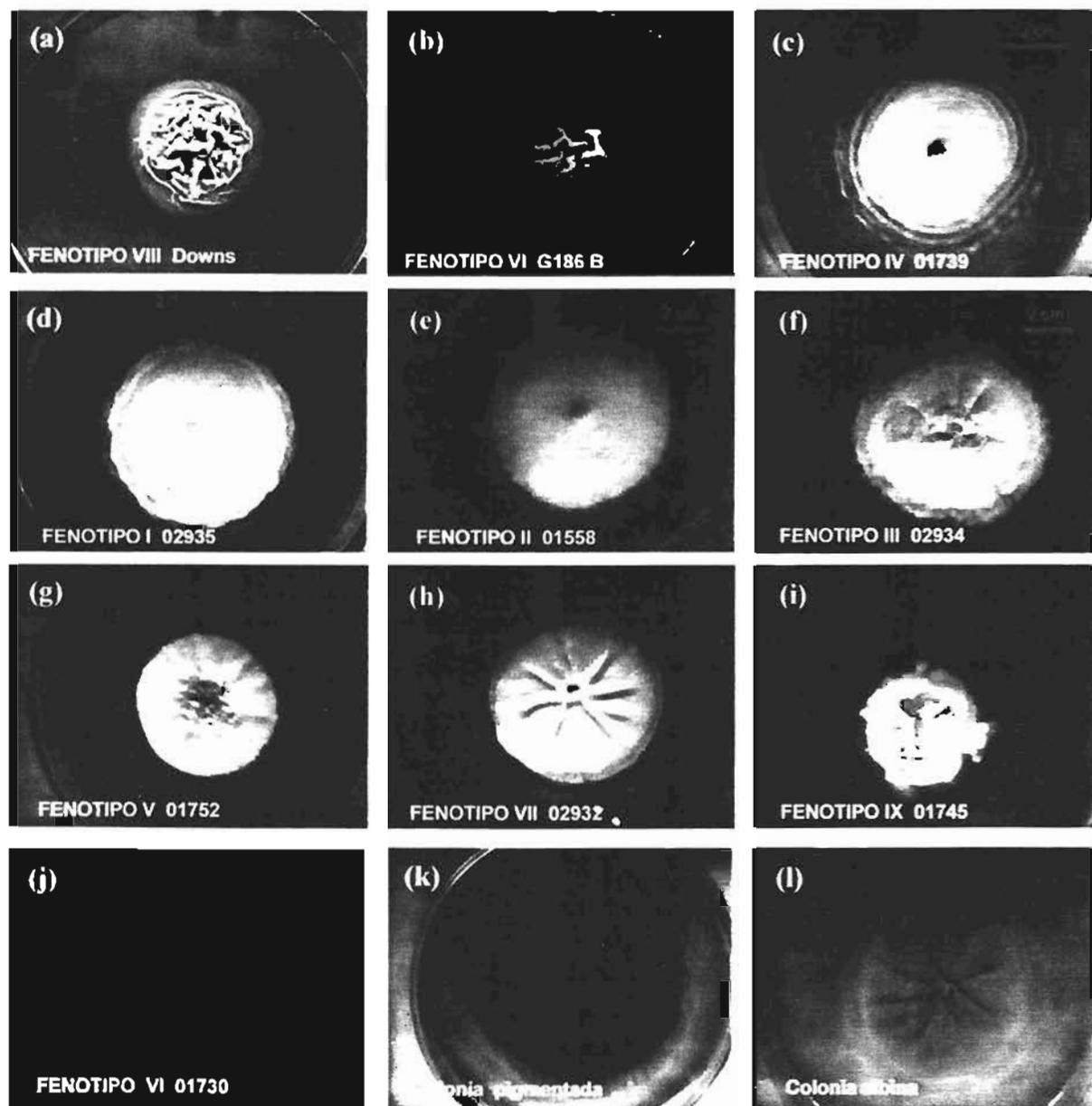


Figura 2 (a-l). Macromorfología de las colonias de cada uno de los grupos formados en el análisis por UPGMA. Se utilizó el programa NTSYSpc ver 2.02j, (a-i) anversos de colonias con diferentes morfotipos, (j-l) reverso de colonias con distinta pigmentación.

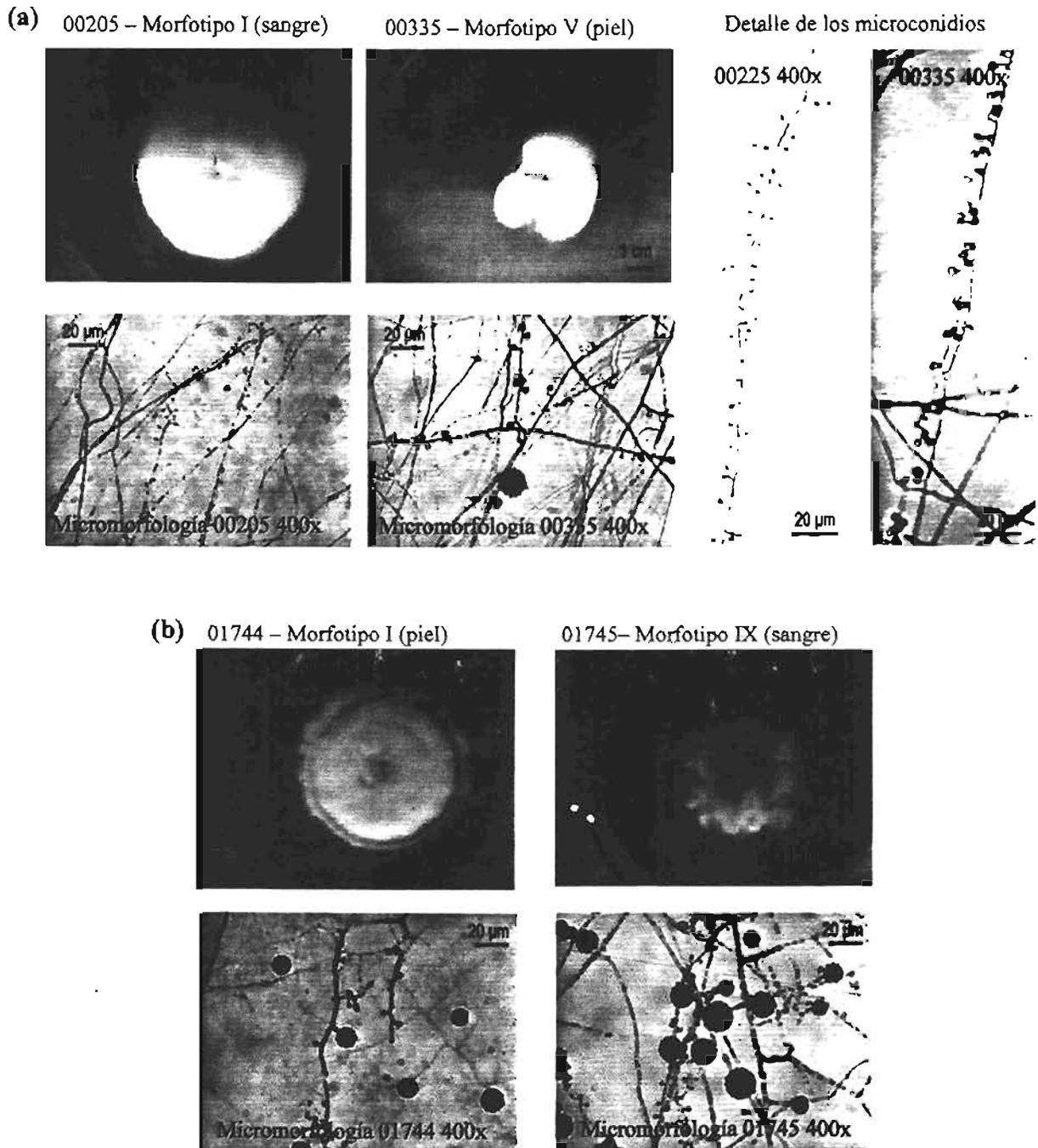


Figura 3 (a y b). Macro- y micromorfología de múltiples aislamientos de *H. capsulatum* de un mismo paciente. (a) Paciente N° 1: aislamiento 00205 proveniente de sangre y el 00335 de piel. (b) Paciente N° 4: aislamiento 01744 de piel y 01745 de sangre.

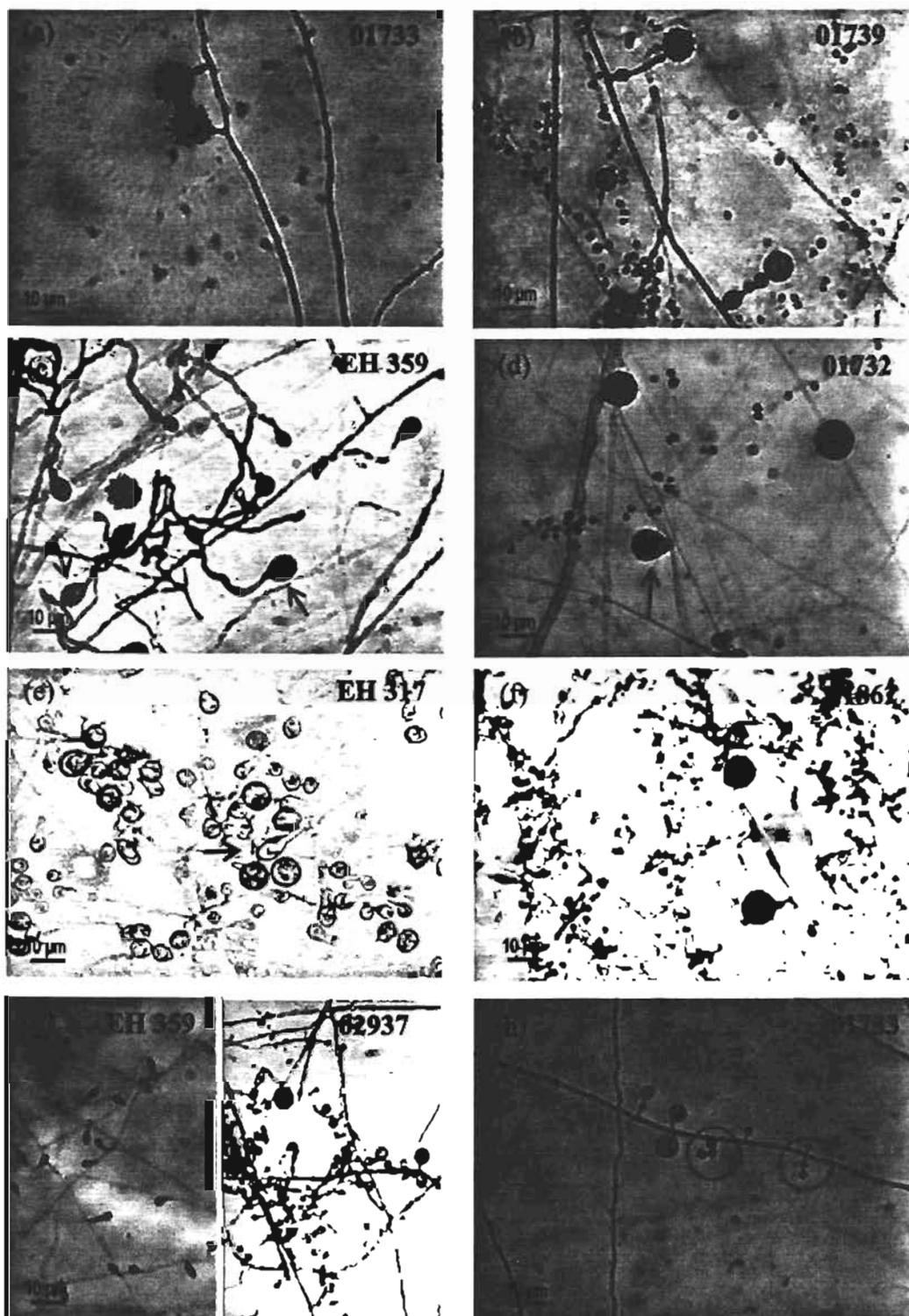


Figura 4 (a-h). Micromorfología en fase M de algunos aislamientos de *H. capsulatum*. Azul de lactofenol, 400x. Las flechas en las figuras c-e, señalan macroconidios piriformes con paredes lisas o con proyecciones. Los círculos en la figura h, encierran microconidios en cadenas cortas.

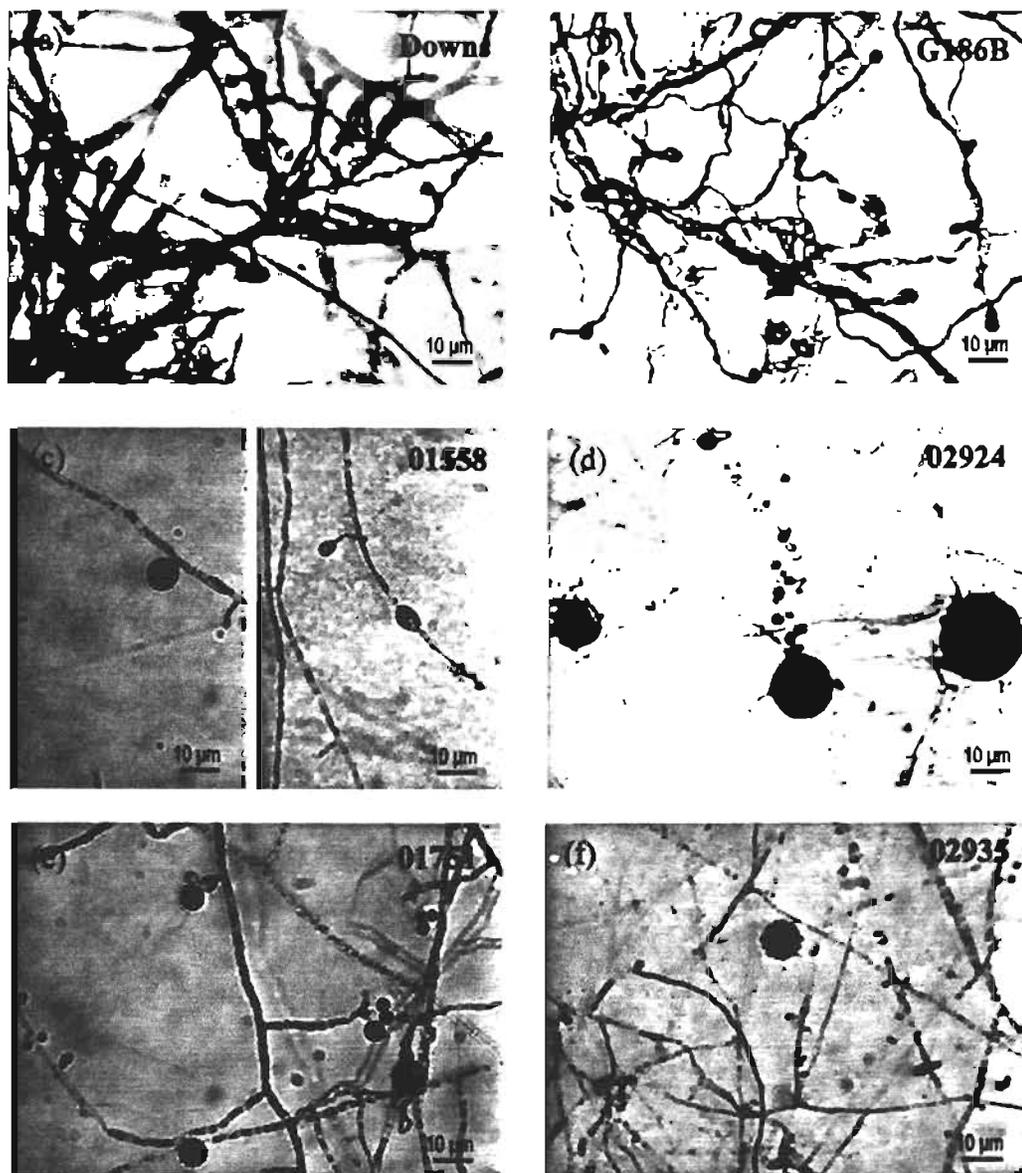


Figura 5 (a-f). Micromorfología en fase M de las cepas de referencia y de algunos aislamientos de *H. capsulatum*. Azul de lactofenol, 400x.

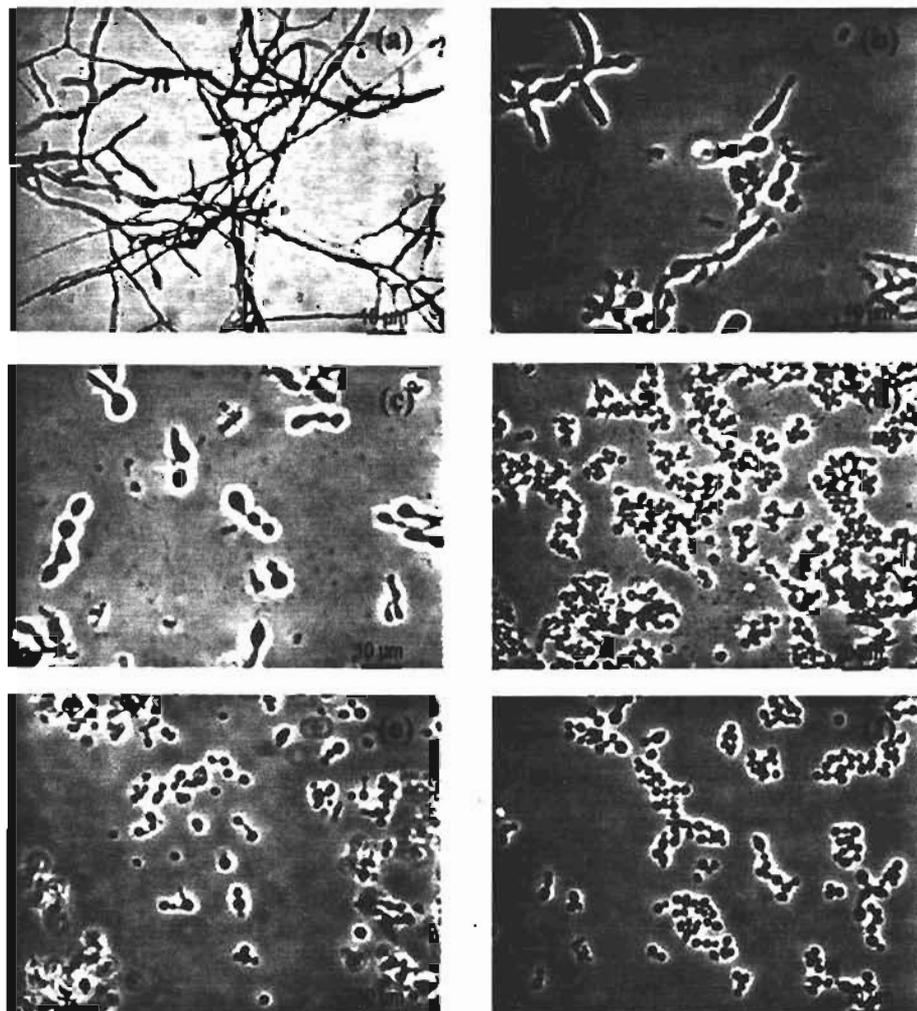


Figura 6 (a-f). Etapas en la conversión termodimórfica. (a) fase M, (b, c) estadio intermedio de algunos aislamientos con micelio rudimentario, (d-f) fase L. Azul de lactofenol, 400x.

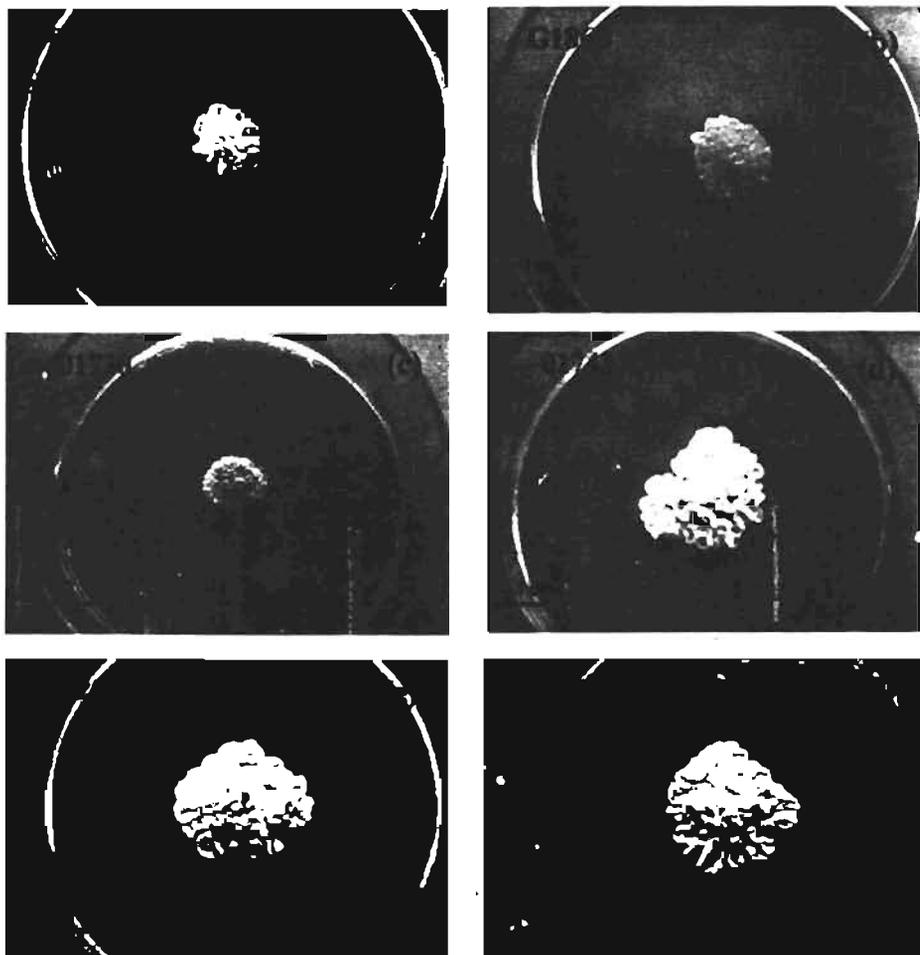


Figura 7 (a-f). Macromorfología de la fase L de diferentes aislamientos y de las cepas de referencia. Las fotos están amplificadas 2x con respecto a las de las colonias en la fase M.

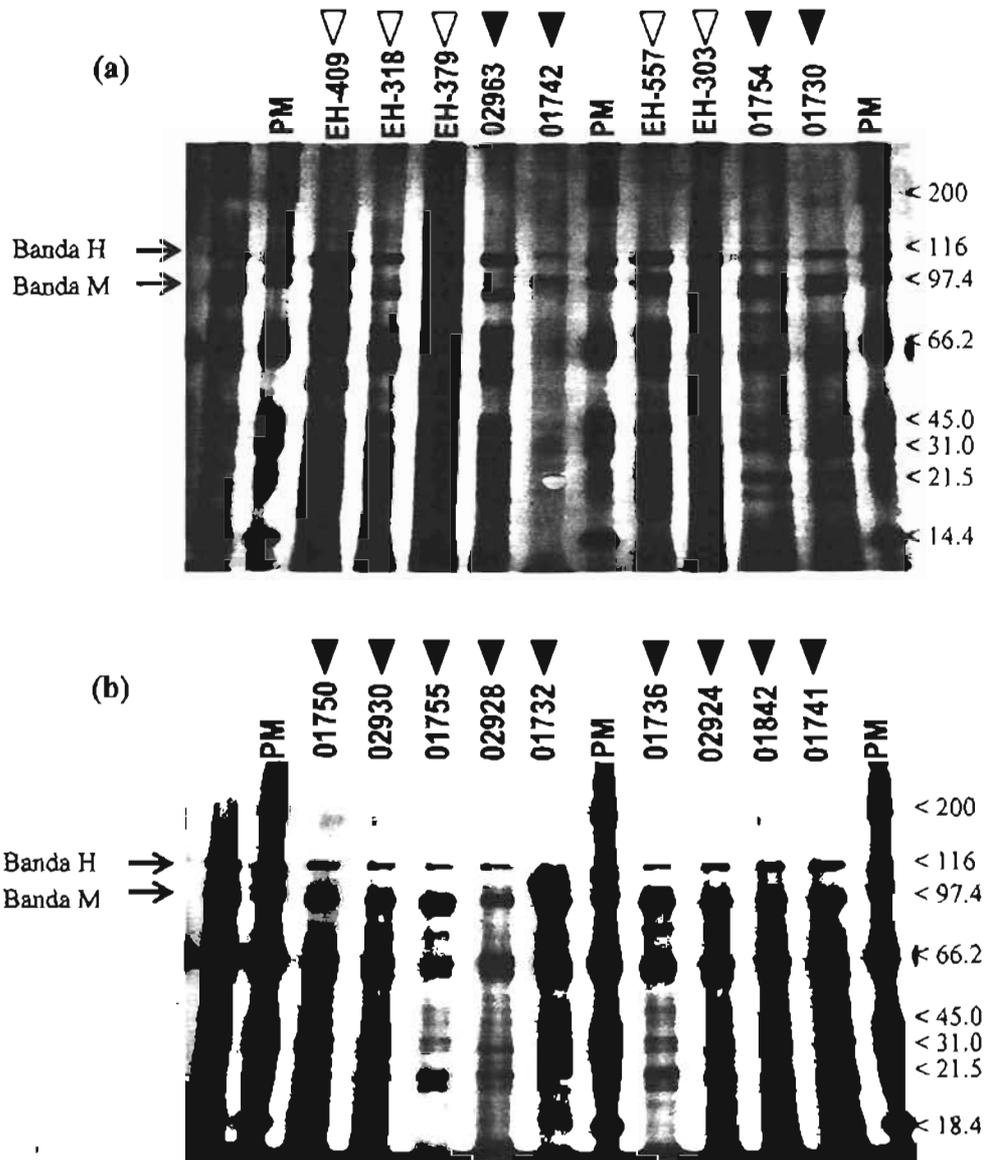


Figura 8 (a y b). SDS-PAGE de los exoantígenos de *H. capsulatum* revelados con tinción de plata. Las bandas antigénicas H y M se señalan a la izquierda de las figuras a y b. El primer carril de ambos gels corresponde a un antígeno de referencia, elaborado en el INEI-ANLIS. Estándar de peso molecular (PM) de 6.5–200 kDa. A la derecha de las figuras se indican los pesos moleculares de las bandas (kDa). ▼ Aislamientos de pacientes de AR; ▽ Aislamientos de pacientes de MX/GT.

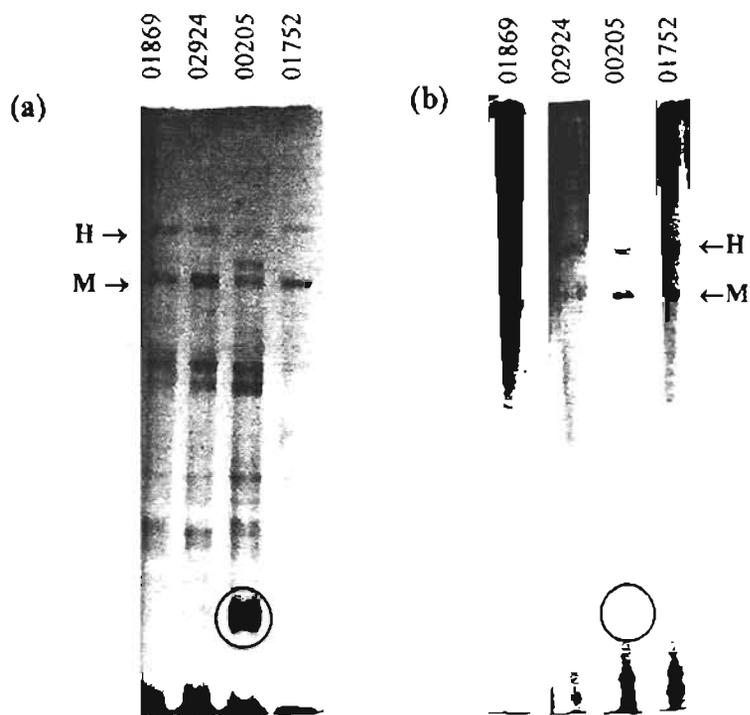


Figura 9 (a y b). SDS-PAGE y WB de los exoantígenos de cuatro aislamientos representativos del estudio. Las flechas señalan las bandas H y M, tanto en el perfil SDS-PAGE (a) como en el revelado por WB (b). Los círculos encierran la banda de 15 Kda en SDS-PAGE y destacan su ausencia en WB.

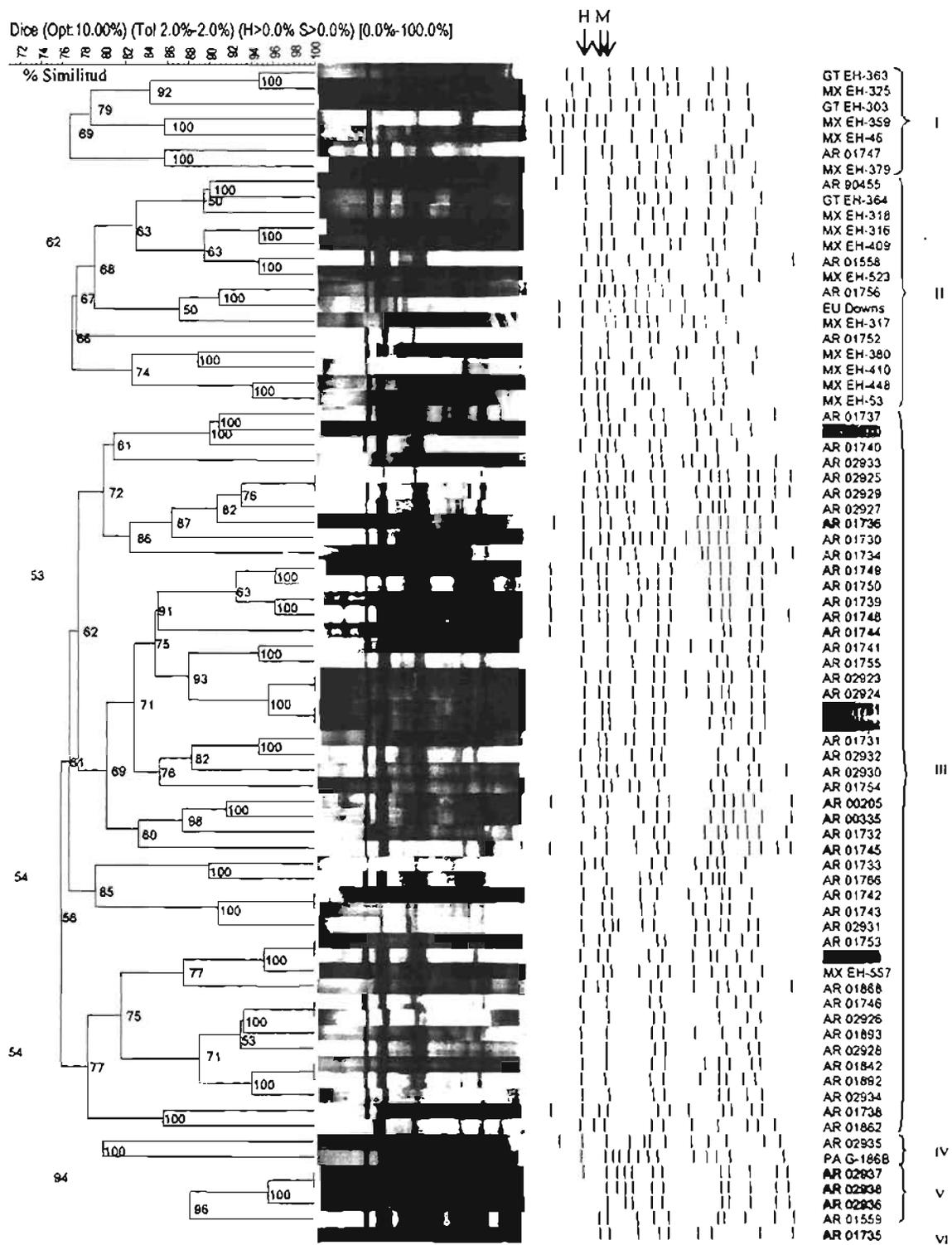


Figura 10. Dendrograma, gel normatizado y expresión gráfica de las bandas obtenidas por SDS-PAGE. Los datos mostrados proceden del análisis por UPGMA. En cada nodo del árbol se señala el valor de correlación cofenética según lo referido en Materiales y Métodos. Los colores idénticos representan múltiples aislamientos del mismo paciente. Las flechas en la parte superior de la expresión gráfica señalan las bandas H y M, esta última en duplete.

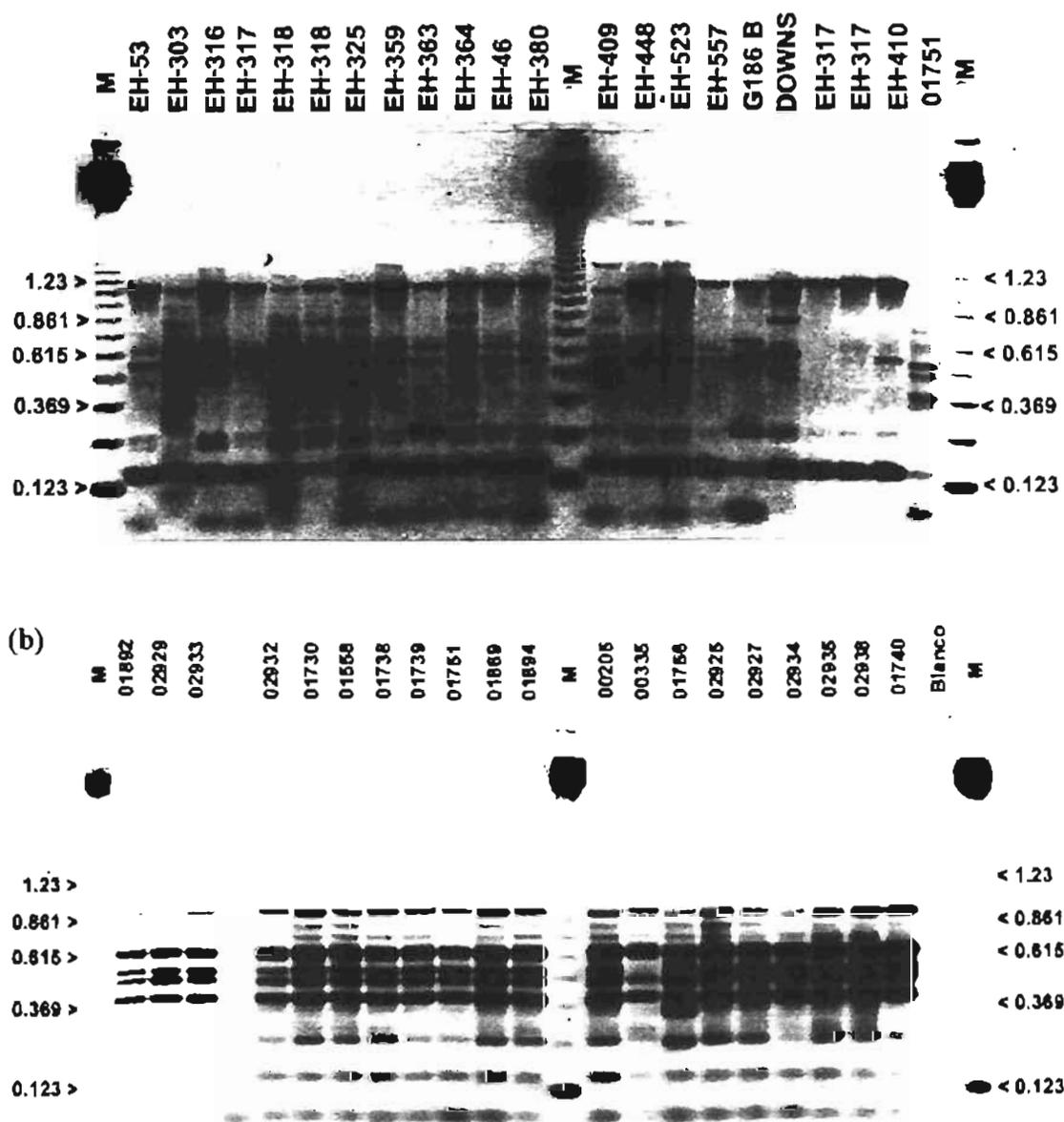


Figura 11 (a y b). Perfiles del RAPD-PCR obtenidos con doble iniciador. Se utilizaron los iniciadores 1281-1283 según las condiciones descritas en Materiales y métodos. M: estándar de pares de bases (123 bp DNA Ladder). Los tamaños de los fragmentos están indicados en los extremos de cada gel (Kb). (a) aislamientos de pacientes de MX/GT (-EH), cepas de referencia (G186B y Downs), 01751 aislamientos de paciente de AR; (b) aislamientos de pacientes de AR.

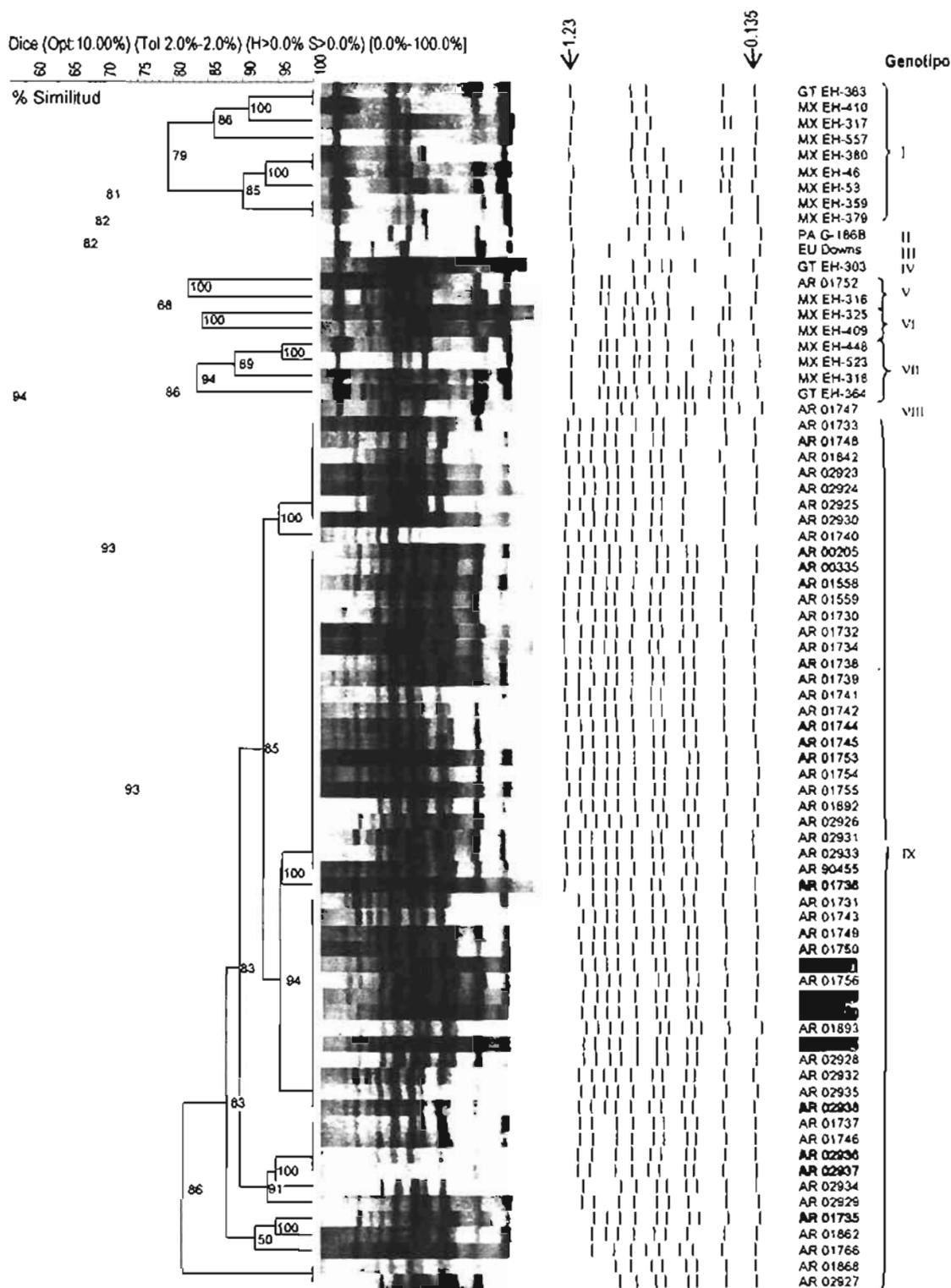


Figura 12. Dendrograma, gel normalizado y expresión gráfica de las bandas obtenidas por RAPD-PCR. Los datos mostrados proceden del análisis por UPGMA. En cada nodo del árbol se señala el valor de correlación cofenética según lo referido en Materiales y Métodos. Los colores idénticos representan múltiples aislamientos de un mismo paciente. Las flechas en la parte superior de la expresión gráfica señalan las bandas de 0.135 y 1.23 Kb.

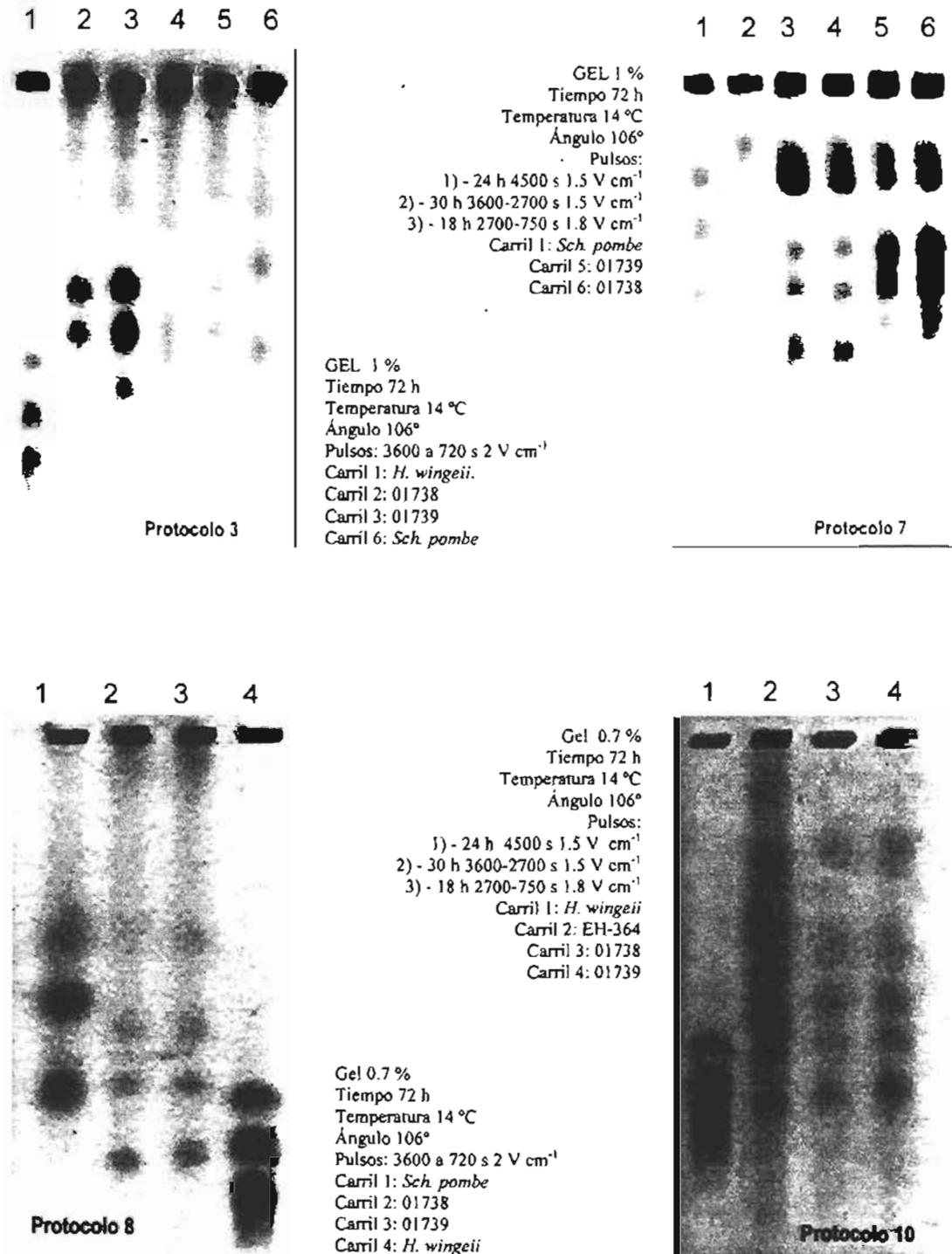


Figura 13. Visualización de bandas cromosómicas con diferentes protocolos de PFGE. Los detalles de cada protocolo se indican en los cuadros laterales.

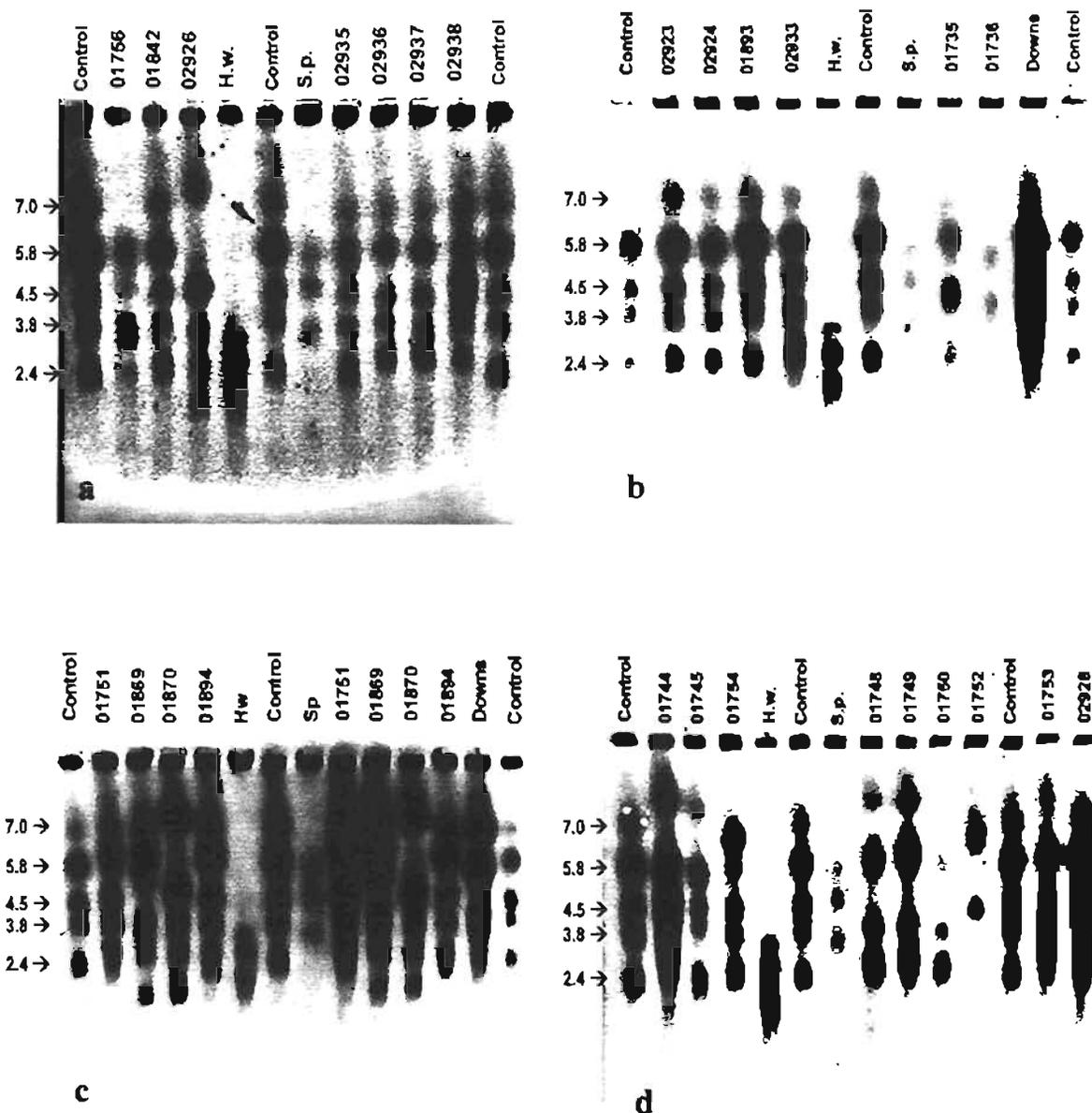


Figura 14 (a-d). Perfiles de bandas cromosómicas de algunos de los aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos por PFGE. Los diferentes ejemplos de perfiles se ilustran en los gels a-d. A la izquierda de cada gel se señalan los tamaños estimados de las bandas de la cepa denominada "Control" (Mbp). H.w.- *H. wingei* (3.13-1.05 Mbp); S.p.- *Sch. pombe* (5.7-3.5 Mbp).

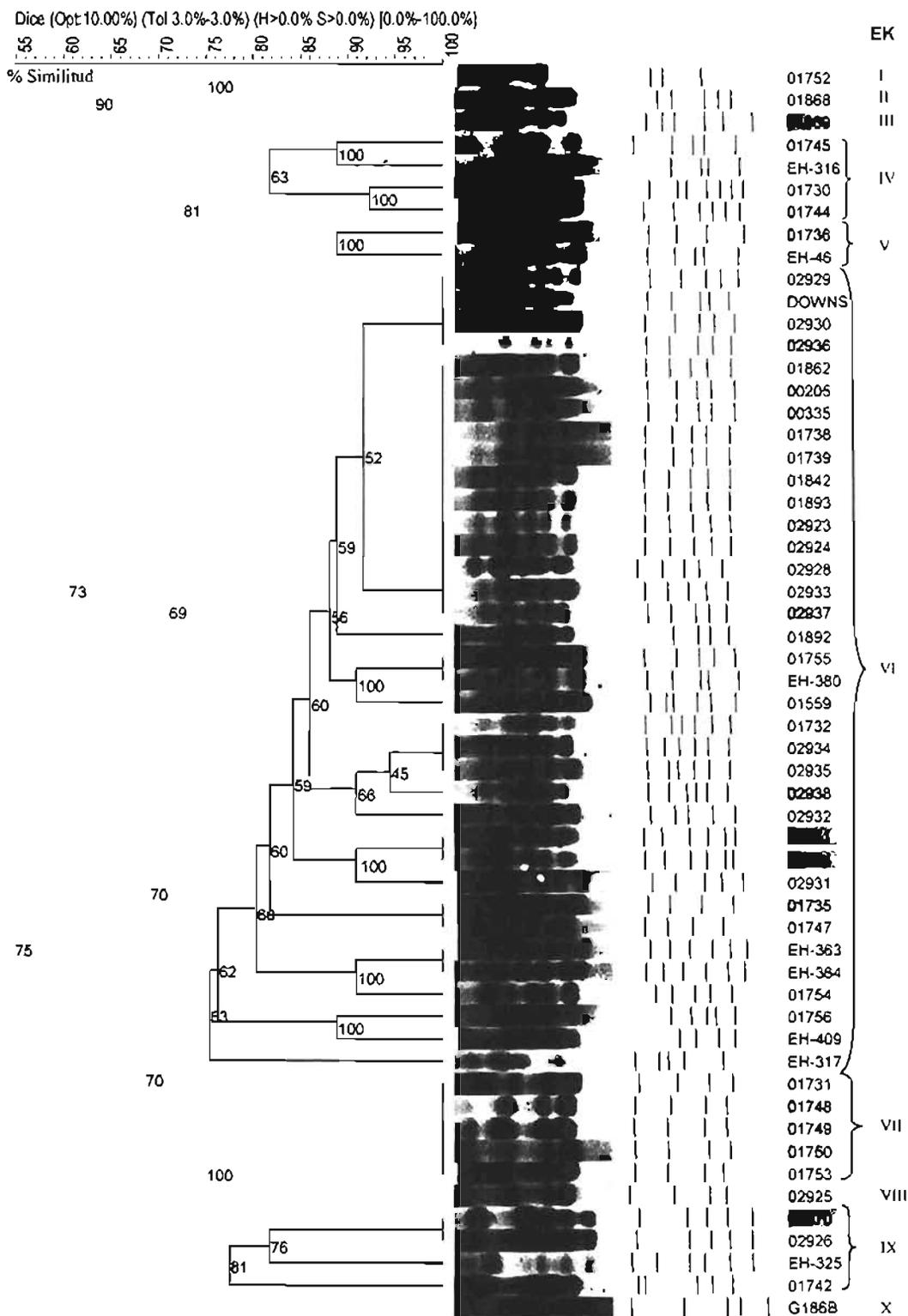


Figura 15. Dendrograma, gel normalizado y expresión gráfica de las bandas cromosómicas obtenidas por PFGE. Los datos mostrados proceden del análisis por UPGMA. En cada nodo del árbol se señala el valor de correlación cofenética según lo referido en Materiales y Métodos. Los colores idénticos representan múltiples aislamientos.

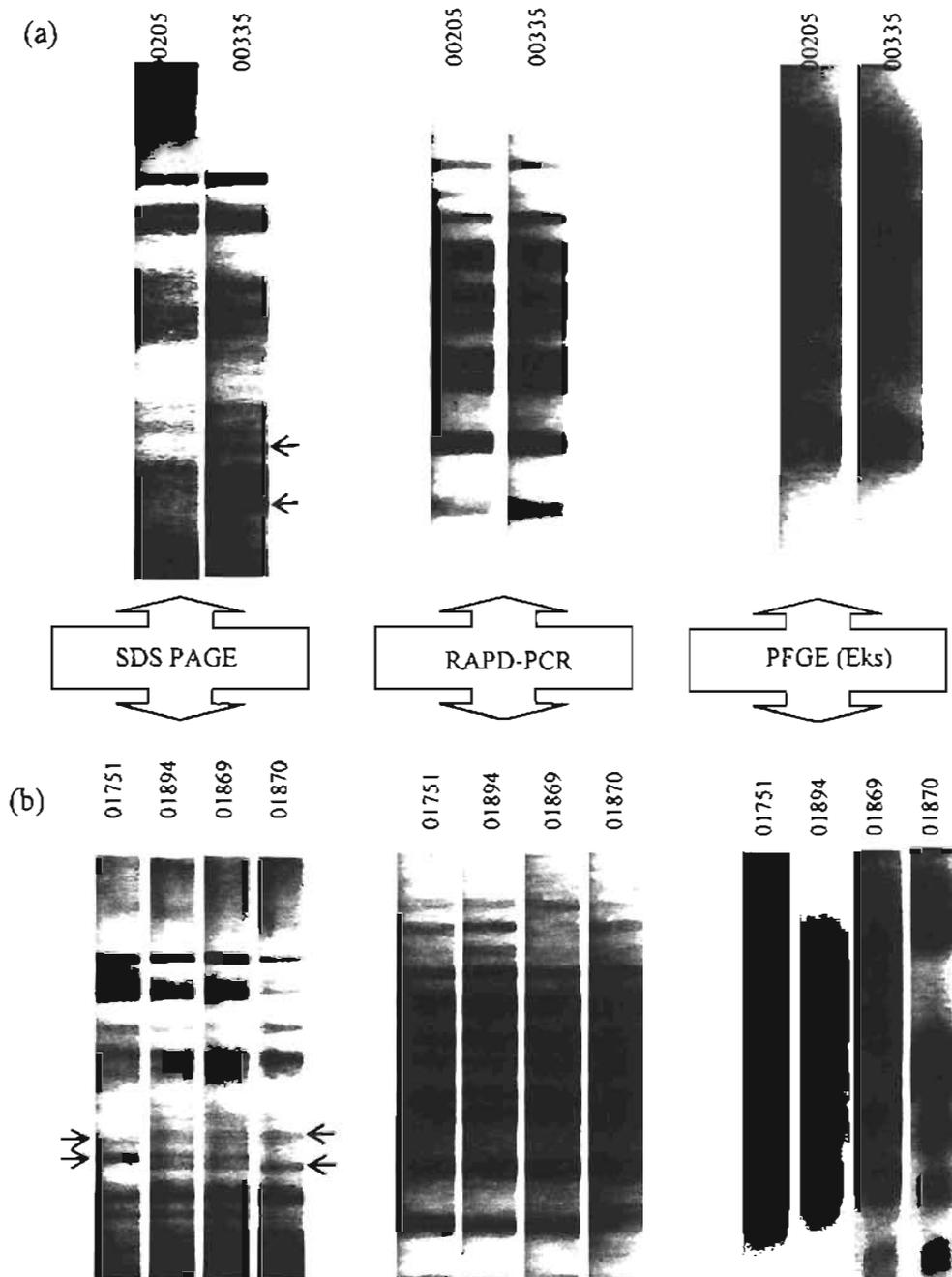


Figura 16. Comparación entre el fenotipo SDS-PAGE y los genotipos RAPD-PCR y PFGE (Eks), de algunos múltiples aislamientos de un mismo paciente. La figura muestra los perfiles observados de las pruebas señaladas obtenidos de (a) paciente N° 1 y (b) paciente N° 6. Las flechas señalan las bandas proteicas (SDS-PAGE) que difieren entre los aislamientos.

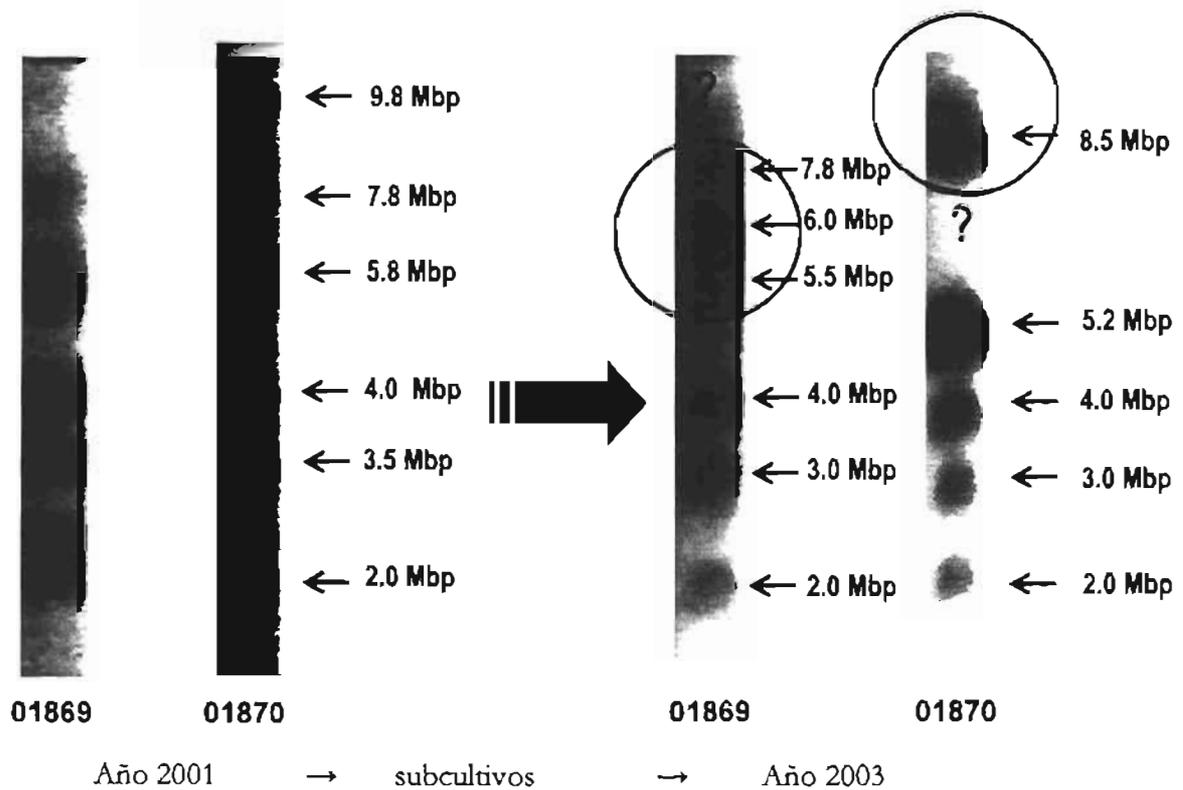


Figura 17. Cambios en las bandas cromosómicas durante la domesticación de dos aislamientos. Los aislamientos 01869 y 01870 fueron mantenidos por subcultivos semanales durante el tiempo de desarrollo del presente estudio. Los círculos y los signos ? indican cambios de las bandas cromosómicas en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bava AJ (1995) Histoplasmosis in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **37**: 531-535.
- Beadle J, Wright M, McNeely L, Bennett JW (2003) Electrophoretic karyotype analysis in fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **53**: 243-270.
- Berliner MD (1968) Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*. I. Macro and micro-morphology of the mycelial phase. *Sabouraudia*. **6**: 111-118.
- Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA, Lebeau B, Viviani MA, Chapuis F, Bastide JM, Grillot R, Mallie M, European Research Group on Biotype and Genotype of *Aspergillus* (2001) Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1731-1737.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Byrd RB, Leavey R, Trunk G (1975) The Chanute histoplasmosis epidemic. New variations of urban histoplasmosis. *Chest*. **68**: 791-795.
- Campbell CC, Berliner M (1973) Virulence differences in mice of type A and B *Histoplasma capsulatum* yeasts grown in continuous light and total darkness. *Infect. Immun.* **8**: 677-678.
- Cano VC, Hajjeh RA (2001) The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* **16**: 109-118.
- Canteros CE (2005a) Brote de histoplasmosis, Mesa redonda 11, micosis endémicas. X Congreso Argentino de Micología, XX Jornadas Argentinas de Micología, Buenos Aires, Argentina.
- Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Snaiderman L, Martínez M, Paladino M, Cicuttin G, Varela E, Alcoba E, Zuiani F, Sahaza JH, Taylor ML, Davel G (2005b) Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. *Rev. Argent. Microbiol.* **37**: 46-56.
- Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrotta D, Rodero L, Davel G, Grupo EMMB (2004) Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: estudio multicéntrico en la República Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **36**: 68-74.
- Canteros CE, Zuiani MF, Davel G, Schmidt G, Ritacco V, Taylor ML (2005c) Brote de histoplasmosis en la Patagonia: identidad genética de los aislamientos. V Congreso Latinoamericano de Micología ALAM, Resumen 258, Brasilia, Brasil.
- Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, Perrotta DE, Reyes-Montes MR, Granados J, Zúñiga G, Taylor ML, Davel G (2005d) Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**: (in press).
- Carr J, Shearer JR (1998) Genome size, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* **24**: 6697-6703.
- Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ (1996) Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2577-2584.
- Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ (2001) Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genet. Biol.* **34**: 37-48.
- Casadevall A, Pirofski LA (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concept of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**: 3703-3713.
- Casadevall A, Pirofski LA (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* **184**: 337-344.
- Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, Howell JF, Lenhart SW, Mortimer VD, Phelan MA, Lindsley MD, Iqbal NJ, Wheat LJ, Brandt ME, Warnock DW, Hajjeh RA (2004) A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**: 909-914.
- Chávez-Tapia CB, Peña-Sandoval GR, Rodríguez-Arellanes G, Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Taylor ML (2005) Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en los murciélagos *Desmodus rotundus* (no migratorio) y *Tadarida brasiliensis* (migratorio de larga distancia): Primeros registros en México. *Rev. Mex. Mic.* **20**: 61-70.

- Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML (1998) I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11:187-191.
- Cox EC, Vocke CD, Walter S, Gregg KY, Bain ES (1990) Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8247-8251.
- Daniels LS, Berliner MD, Campbell C (1968) Varying virulence in rabbits infected with different filamentous types of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 96: 1535-1539.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (2000) Atlas of Clinical Fungi, pp. 708-711. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili. Reus, Spain.
- de Medeiros-Muniz M, Vera-Pizzini C, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira R (2001) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4487-4494.
- Durkin MM, Connolly PA, Karimi K, Wheat E, Schnizlein-Bick C, Allen SD, Alves K, Tewari RP, Keath E (2004) Pathogenic differences between North American and Latin American strains of *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* in experimentally infected mice. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4370-4373.
- Eissenberg LG, Goldman WE (1991) *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on histoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 411-421.
- Eissenberg LG, Goldman WE (1994) The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* 1: 265-283.
- Fierro F, Martín JF (1999) Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 25: 1-17.
- Fressatti R, Dias-Siqueiras VL, Svidzinski TI, Herrero F, Kimmelmeier C (1992) A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87: 53-58.
- Fries BC, Chen F, Currie BP, Casadevall A (1996) Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1531-1534.
- Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW (2005) Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol.* 13: 58-63.
- Gandhi BM (1986) A dot immunobinding assay (DLA) on nitrocellulose membrane for the serological detection of antibodies to *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 883-885.
- García-Vázquez E, Velasco M, Gascón J, Corachán M, Mejías T, Torres-Rodríguez JM (2005) Infección por *Histoplasma capsulatum* en un grupo de cooperantes en Guatemala. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23: 274-276.
- Gaur P, Lichtwardt RW, Hamrick JL (1981) Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Environ. Mycol.* 5: 69-77.
- Goodman NL, Larsh HW (1967) Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopath. Mycol. Appl.* 33: 145-156.
- Goodwin JE, Lloyd R, Des Prez R (1981) Histoplasmosis in normal host. *Medicine* 60: 231-266.
- Graybill JR (1998) Histoplasmosis and AIDS. *J. Infect. Dis.* 158: 623-626.
- Haynes KA, Sullivan DJ, Coleman DC, Clarke JC, Emilianus R, Atkinson C, Cann KJ (1995) Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 33: 99-102.
- Hu J, Van-Eysden J, Quiros CF (1995) Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions, pp. 346-351. In: PCR Methods and Applications. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, Eimen T, Lindsley MD, Cali S, Conover CS, Dworkin MS (2005) Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. *Health Perspect.* 113: 585-589.
- Ignatov A, Keath EJ (2002) Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 349-361.
- Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, Alves K, da Silva Lacaz C, Keath E

- (2002) Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J. Infect. Dis.* **186**: 1655-1660.
- Kasuga T, Taylor JW, White TJ (1999) Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 653-663.
 - Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva-Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Zhenyu Q, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Taylor JW (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* **12**: 3383-3401.
 - Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G (1992) Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2104-2107.
 - Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE (1992) Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* **174**: 7075-7079.
 - Kimberlin CL, Hariri AR, Hempel HO, Goodman NL (1981) Interactions between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **34**: 6-10.
 - Klimpel KR, Goldman WE (1987) Isolation and characterization of spontaneous avirulent variants of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **55**: 528-533.
 - Kwon-Chung KJ, Bennett JE (1992) Histoplasmosis, pp. 464-513. In: *Medical Mycology*. 3^{ra} ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
 - Lacaz CD, Del Negro GM, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, Santos RF, Martins MA, Ozaki MM, Romiti R, Proenca R, Castro LG (1999) Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child, caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **41**: 195-202.
 - Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 - Lappe P, Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Torriello C, Taylor ML (1998) Levaduras asociadas con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* **11**: 162-172.
 - Latini O (1985) Encuesta nacional de micosis broncopulmonares. Informe final. *Rev. Arg. de Tuberculosis, Enfermedades pulmonares y Salud Pública* **XLVI N°4**: 27-41.
 - Magee PT (1993) Variations in chromosome size and organization in *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *Trends Microbiol.* **1**: 338-342.
 - Magee PT, Gale C, Berman J, Davis D (2003) Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect. Immun.* **71**: 2299-2309.
 - Magrini V, Warren WC, Wallis J, Goldman WE, Xu J, Mardis ER, McPherson JD (2004) Fosmid-based physical mapping of the *Histoplasma capsulatum* genome. *Genome Res.* **14**: 1603-1609.
 - Mahvi TA (1970) Factors governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopath. Mycol. Appl.* **41**: 167-176.
 - Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusano G, Gorodner J (1996) Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **38**: 349-353.
 - Marticorena BE, Borletto N, Negroni R (1991) Estudio de un área endémica de micosis profundas en el norte de la Provincia de Córdoba. *Rev. Arg. Micología* **14**: 20-23.
 - Martínez-Rivera MA (1998) Estudios fenotípicos y genotípicos de aislados de *Histoplasma capsulatum* de pacientes con histoplasmosis y de aislados de diversos orígenes. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional México DF.
 - Masih D, Marticorena B, Borletto N, Fariás C, Negroni R (1987) Epidemiologic study of bronchopulmonary mycosis in the Province of Córdoba, Argentina. *Rev. Med. Trop. Sao Paulo* **29**: 59-62.
 - McKinsey DS, Spiegel RA, Hutwagner L, Stanford J, Driks MR, Brewer J, Gupta MR, Smith DL, O'Connor MC, Dall L (1997) Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: Incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 1195-1203.
 - Medoff G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S (1987) Morphogenesis and pathogenicity of

- Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **55**: 1355–1358.
- Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, Carratu L (1986) Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.* **78**: 1638-1647.
 - Menotti J, Waller J, Meunier O, Letscher-Bru V, Herbrecht R, Candolfi E (2005) Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Hosp. Infect.* **60**: 61-68.
 - Morgan J, Cano MV, Feikin DR, Phelan M, Monroy OV, Morales PK, Carpenter J, Weltman A, Spitzer PG, Liu HH, Mirza SA, Bronstein DE, Morgan DJ, Kirkman LA, Brandt ME, Iqbal N, Lindsley MD, Warnock DW, Hajjeh RA; Acapulco Histoplasmosis Working Group (2003) A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**: 663-669.
 - Morris PR, Terreni AA, DiSalvo AF (1986) Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**: 231-233.
 - Negroni R, Robles AM, Arechavala A (1994) Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. *Rev. Arg. Micología* **17**: 14-21.
 - Negroni R, Robles AM, Arechavala A, Taborda A (1991) Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA. Su evolución y tratamiento. *Rev. Arg. Micología* **14**: 5-12.
 - Negroni R, Taborda A, Benetucci J, Da Bouza J, Macías J (1990) Manifestaciones cutaneomucosas de la histoplasmosis en pacientes con SIDA. *Rev. Arg. Derm.* **71**: 71-78.
 - Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361–363.
 - Ouchterlony O, Nilsson LA (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, pp. 19.1-19.44. In: Weir DM (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 - Pedroza-Seres M, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML (1994) The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: a preliminary study. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 83-92.
 - Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G (2001) Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. *Rev. Argent. Microbiol.* **33**: 160-166.
 - Perrotta D, Rodero L, Demkura H, Canteros C, Davel G (2002) Cariotipos electroforéticos y análisis de fragmentos de restricción de ADN genómico: su utilidad como herramienta en estudios epidemiológicos de *Candida parapsilosis*. *Rev. Argent. Microbiol.* **34**: 29-39.
 - Perrotta D, Vivot W, Lee W, Rivas C, Rodero L, Canteros C, Davel G (1998) Producción de antisueros fúngicos específicos en conejos. *Rev. Argent. Microbiol.* **30**: 115-121.
 - Pietrobon D, Negro-Marquinez, Kilstein J, Galindez J, Greca A, Battagliotti C (2004) Histoplasmosis diseminada y SIDA en un hospital argentino: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* **22**: 156-159.
 - Pizzini CV, Zancoppe-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM (1999) Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**: 20-23.
 - Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, Aldebert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Munoz AJ, Gene J, Pinel C, Stevens DA, Sullivan DJ (2000) Emerging pathogens. *Med. Mycol.* **38** Suppl. 1: 225-236.
 - Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y (1998) Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3073-3076.
 - Porta A, Maresca B (2000) Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. *Med. Mycol.* **38**: 309-406
 - R Development Core Team (2004) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
 - Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE (2004) RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* **53**: 153-165.
 - Retallack DM, Woods JP (1999) Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the

- dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Microbes Infect.* **1**: 817-825.
- Reyes M, Arenas LR, Pichardo P, Vick R, Torres A, Zacarias R (2003) Histoplasmosis cutánea y SIDA. *Gac. Med. Mex.* **139**: 270-275.
 - Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML (1998) Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* **11**: 195-201.
 - Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML (1999) Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1404-1408.
 - Rippon JW (1990) Histoplasmosis (histoplasmosis capsulati) pp. 411-456. En: Tratado de Micología Médica. 3^{era} ed. Nueva Editorial Interamericana-Mc Graw-Hill Inc., México.
 - Rodríguez de Marengo ZJ, Araujo AC, Negroni R, Dubra F, García OE (1979) Encuesta epidemiológica de histoplasmosis en la provincia de Salta. *Rev. Arg. Micología* **2**: 5-10.
 - Rodríguez E, Symoens F, Mondon P, Mallie M, Piens MA, Lebeau B, Tortorano AM, Chaib F, Carlotti A, Villard J, Viviani MA, Chapuis F, Nolard N, Grillot R, Bastide JM (1999) Combination of three typing methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections. European Research Group on Biotype and Genotype of *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.* **48**: 181-194.
 - Romero-Martínez R, Canteros C, Taylor ML (2004) Variabilidad cromosómica intra-específica en hongos patógenos de humanos: aportaciones en el modelo *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**: 168-176.
 - Rooney PJ, Klein BS (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* **4**: 127-137.
 - Rubin H, Furcolow ML, Yates JL, Brasher CA (1959) The course and prognosis of histoplasmosis. *Am. J. Med.* **27**: 278-288.
 - Rubinstein P, Negroni R (1981) Histoplasmosis, pp. 249-290. En: Micosis broncopulmonares del adulto y del niño. 2^{da} Ed. Editorial Beta SRL, Buenos Aires.
 - Rustchenko EP, Rustchenko EP, Howard DH, Sherman F (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J. Bacteriol.* **176**: 3231-3241.
 - Sahaza JH, Reyes-Montes MR, Canteros C, Taylor ML (2003) Termosensibilidad y tiempo de generación como marcadores de fenotipificación de aislamientos de *Histoplasma capsulatum*. IV Congreso Virtual de Micología "Hongos patógenos en América Latina" <http://congresomicologia.ucv.ve>
 - Sahaza-Cardona JH (2004) Relación genética entre aislamientos de *Histoplasma capsulatum* asociados a diferentes formas clínicas y distribución geográfica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México DF.
 - Salas-Ríos MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML (1998) Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* **11**: 202-207.
 - Sambrook J, Russell, DW (2001) Gel electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Electrophoresis, pp. 5.55-5.67. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 - Sandin RL, Isada CM, Hall GS, Tomford JW, Rutherford I, Rogers AL, Washington JA (1993) Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA probe. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **17**: 235-238.
 - Schlech WF 3rd, Wheat LJ, Ho JL, French ML, Weeks RJ, Kohler RB, Deane CE, Eitzen HE, Band JD (1983) Recurrent urban histoplasmosis, Indianapolis, Indiana, 1980-1981. *Am. J. Epidemiol.* **118**: 301-312.
 - Spitzer ED, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G (1990) Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* **162**: 258-261.
 - Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G (1989) Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **57**: 1409-1412.

- Staib F, Grosse G (1996) Brown-red pigment formation by the mycelial phase of a clinical isolate of *Histoplasma capsulatum* on Staib agar. A preliminary report. *Zentralbl. Bakteriol.* **283**: 515-521.
- Standard PG, Kaufman L (1976) Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. Clin. Microbiol.* **3**: 191-199.
- Steele PE, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G (1989) Electrophoretic analyses of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 983-987.
- Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA (1996) Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1220-1223.
- Suárez-Alvarez RO, Pérez-Torres A, Taylor ML (2005) Interacción de conidios y fragmentos hifales de *Histoplasma capsulatum* con el NALT de ratones. X Congreso Argentino de Micología, XX Jornadas Argentinas de Micología, Resumen 97, Buenos Aires, Argentina.
- Sukroongreung S, Eampokalap B, Tansuphawadikul S, Nilakul C, Tantimavanich S (1999) Recovery of *Cryptococcus neoformans* from nasopharynx of AIDS patients. *Mycopathologia* **141**: 131-134.
- Sukroongreung S, Lim S, Tantimavanich S, Eampokalap B, Carter D, Nilakul C, Kulkeratituyut S, Tansuphaswadikul S (2001) Phenotypic switching and genetic diversity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol.* **39**: 2060-2064.
- Sutton DA, Padhye AA, Standard PG, Rinaldi MG (1997) An aberrant variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 734-735.
- Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Reyes-Montes MR (2000a) Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* **30**: 207-12.
- Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Zuñiga G (2005a) Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**: (in press).
- Taylor ML, Granados J, Toriello C (1996) Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* **39**: 375-379.
- Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montañón-Ortiz G, Pedroza-Serés M (2000b) Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gac. Méd. Méx.* **136**: 441-448.
- Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J (1997a) Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* **138**: 137-141.
- Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F (2000c) Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in México, pp. 29-35. In: Benedik M. (ed.). *Research Advances in Microbiology*. Global Research Network, Kerala.
- Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ (1997b) Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* **23**: 58-63.
- Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E (1999) Catálogo de Cepas de *Histoplasma capsulatum*. Editorial Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>).
- Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Alvarez O, Roldán-Aragón Y, Romero-Martínez R, Sahaza-Carmona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval G (2005b) Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis in a hotel in Acapulco state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**: (in press).
- Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C (1994) Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: a biological approach. *Rev. Mex. Mic.* **10**: 49-62.
- Tewari R, Wheat LJ, Ajello L (1998) Agents of histoplasmosis, pp. 373-407. In: Ajello L, Hay RJ (eds.), *Medical Mycology*. Topley & Wilson's,

- Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. Arnold and Oxford University Press, New Cork.
- Tewari RP, Berkhout FJ (1972) Comparative pathogenicity of albino and brown types of *Histoplasma capsulatum* for mice. *J. Infect. Dis.* **125**: 504-508.
 - Tewari RP, Kegel H (1971) Supressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* **44**: 231-240.
 - Torres-Rodríguez JM (1987) Mícosis que afectan piel y mucosas p.112. Doyma Ed. Barcelona.
 - Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Torriello C, Taylor ML (1998) Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **11**: 173-182.
 - Unis G, Oliveira FM, Severo LC (2004) Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 463-468.
 - Vaca-Marín MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ (1998) Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **11**: 208-215.
 - van Gelderen de Komaid A, Duran E, Borges de Kestelman I (1999) Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vipos, La Toma, and Choromoro - Trancas, Tucuman, Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* **15**: 383-388.
 - van Gelderen de Komaid A, Duran EL, Madero AM, Carrizo V (1992) Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucuman. *Eur. J. Epidemiol.* **8**: 206-10.
 - Velasco-Castrejón O (1998) La histoplasmosis pulmonar primaria en México. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* **11**: 221-225.
 - 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.
 - Waldman RJ, England AC, Tauxe R, Kline T, Weeks RJ, Ajello L, Kaufman L, Wentworth B, Fraser DW (1983) A winter outbreak of acute histoplasmosis in northern Michigan. *Am. J. Epidemiol.* **117**: 68-75.
 - Walsh TJ, Groll AH (1999) Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infect. Dis.* **1**: 247-261.
 - Weisburd GJ (1995) Encuesta Nacional de Histoplasmosis. *Rev. Arg. Micología* **18**: 5-7.
 - Wheat L (1996) Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Curr. Trop. Med. Mycol.* **7**: 7-18.
 - Wheat LJ, Slama TG, Eitzen HE, Kohler RB, French ML, Biesecker JL (1981) A large urban outbreak of histoplasmosis: clinical features. *Ann. Intern. Med.* **94**: 331-337.
 - Woods JP (2002) *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet. Biol.* **35**: 81-97.
 - Woods JP (2005) *Histoplasma* hairpins herald hopefulness. *Trends Microbiol.* **13**: 88-91.
 - 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.
 - Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS Jr (1999) Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **67**: 1947-1953.
 - Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM (1994) Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**: 563-568.
 - Zolan ME (1995) Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* **59**: 686-698.
 - Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE (2005) Variantes morfológicas aberrantes de *Histoplasma capsulatum* aisladas de un paciente con SIDA. *Rev. Argent. Microbiol. (en prensa)*.