



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“INFECCIÓN DEL MURCIÉLAGO MIGRATORIO *Tadarida brasiliensis*  
POR *Histoplasma capsulatum* EN LATINOAMÉRICA.  
PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EPITELIALES  
ASOCIADAS AL NALT Y A LA MUCOSA NASAL DEL MURCIÉLAGO  
EN LOS PRIMEROS EVENTOS DE LA INFECCIÓN”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ROBERTO OSVALDO SUÁREZ ALVAREZ

DIRECTORA DE TESIS: DOCTORA MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

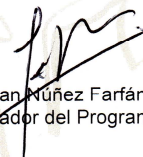
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **SUÁREZ ALVAREZ ROBERTO OSVALDO** con número de cuenta **92238383** con la tesis titulada: "**INFECCIÓN DEL MURCIELAGO MIGRATORIO TADARIDA BRASILIENIS POR HISTOPLASMA CAPSULATUM EN LATINOAMERICA. PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EPITELIALES ASOCIADAS AL NALT Y A LA MUCOSA NASAL DEL MURCIELAGO EN LOS PRIMEROS EVENTOS DE LA INFECCIÓN**".

Realizada bajo la dirección del **DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO:**

Presidente:	DR. ARMANDO PEREZ TORRES
Vocal:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal:	DR. MIGUEL ARMANDO ULLOA SOSA
Vocal:	DRA. MARIA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Secretario:	DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO
Suplente:	DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
Suplente:	DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 25 de marzo de 2010.

  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
HONGO	<b>20</b>
OBTENCIÓN DEL INÓCULO FÚNGICO	<b>20</b>
ANIMALES	<b>21</b>
INOCULACIÓN INTRANASAL	<b>22</b>
REISLAMIENTO DEL HONGO DE LOS ANIMALES INOCULADOS	<b>23</b>
HISTOLOGÍA PARA IDENTIFICAR <i>H. capsulatum</i> EN TEJIDOS INFECTADOS	<b>23</b>
Descalcificación de la estructura nasal para procedimientos histológicos	<b>23</b>
Procedimientos histológicos de rutina	<b>24</b>
Métodos inmunohistoquímicos (IHQ) específicos	<b>24</b>
Inmunoperoxidasa simple	<b>25</b>
Inmunoperoxidasa doble	<b>26</b>
ESTUDIOS MOLECULARES PARA REVELAR <i>H. capsulatum</i>	<b>27</b>
PCR-anidada para el marcador Hcp100	<b>27</b>
Amplificación del marcador específico de <i>H. capsulatum</i>	<b>28</b>
RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	<b>30</b>
Extracción de RNA total	<b>30</b>
RT-PCR para genes específicos de fase de <i>H. capsulatum</i>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
REISLAMIENTO DEL HONGO DE LOS ANIMALES INOCULADOS	<b>33</b>

HISTOLOGÍA PARA IDENTIFICAR <i>H. capsulatum</i> EN TEJIDOS INFECTADOS	33
ESTUDIOS MOLECULARES PARA REVELAR <i>H. capsulatum</i>	35
PCR-anidada para el marcador Hcp100	35
RT-PCR para genes específicos de fase de <i>H. capsulatum</i>	36
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>54</b>
Fig. 1- Reaislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de murciélagos inoculados	54
Fig. 2- Levaduras de <i>H. capsulatum</i> en NALT de murciélagos y ratones	55
Fig. 3.- Levaduras de <i>H. capsulatum</i> en MN y GLC de murciélagos y de ratones	56
Fig. 4.- Levaduras de <i>H. capsulatum</i> en GLC de murciélagos	57
Fig. 5.- Levaduras de <i>H. capsulatum</i> en pulmón e hígado de murciélagos y de ratones	58
Fig. 6.- PCR-anidada del DNA de órganos de murciélagos infectados intranasalmente con <i>H. capsulatum</i>	59
Fig. 7.- PCR-anidada del DNA de órganos de ratones infectados intranasalmente con <i>H. capsulatum</i>	60
Fig. 8.- Expresión de los transcritos de los genes <i>MS8</i> (fase M) y <i>YPS3</i> (fase L) a partir de cultivos puros, mediante RT-PCR	61
Fig. 9.- Expresión <i>in vivo</i> mediante RT-PCR de los transcritos de <i>MS8</i> y <i>YPS3</i> en MN de murciélagos, a diferentes tiempos post-infección con <i>H. capsulatum</i>	62
Fig. 10.- Expresión <i>in vivo</i> mediante RT-PCR de los transcritos de <i>MS8</i> y <i>YPS3</i> en MN de ratones, a diferentes tiempos post-infección con <i>H. capsulatum</i>	63
Fig. 11.- Expresión <i>in vivo</i> mediante RT-PCR de los transcritos de <i>MS8</i> y <i>YPS3</i> en GLC de murciélagos, a diferentes tiempos post-infección con <i>H. capsulatum</i>	64
Fig. 12.- Expresión <i>in vivo</i> mediante RT-PCR de los transcritos de <i>MS8</i> y <i>YPS3</i> en GLC de ratones, a diferentes tiempos post-infección con <i>H. capsulatum</i>	65

## RESUMEN

Murciélagos machos adultos, de la especie *Tadarida brasiliensis*, capturados al azar en la naturaleza y ratones singénicos machos adultos, de la cepa BALB/c, fueron infectados intranasalmente con propágulos miceliales (principalmente microconidios y fragmentos hifales) de *Histoplasma capsulatum* (*Hc*). Ambas especies animales fueron sacrificadas a diferentes tiempos post-infección (10, 20, 40 min, 1, 2 y 3 h) y se les disecaron la mucosa nasal (MN) y los ganglios linfáticos cervicales (GLC). Se obtuvieron reaislamientos del hongo de GLC de murciélagos mediante cultivo y su identidad genética, con el inóculo original, fue confirmada por RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction). La MN, incluyendo el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) y los GLC fueron procesados por diferentes métodos histológicos como hematoxilina-eosina y ácido peryódico de Schiff e inmunohistoquímica (IHQ) simple y doble. Por estas metodologías, a partir de las 2-3 h post-infección fueron observadas células fúngicas intracelulares compatibles con la fase levaduriforme de *Hc*, tanto en el epitelio de la MN como en los GLC. Se observaron posibles levaduras dentro de células dendríticas asociadas a la MN y a los GLC mediante doble IHQ, utilizando suero anti-*Hc* así como un anticuerpo monoclonal anti-DEC-205. Por PCR-anidada, en la cual se utilizó un fragmento de un gen que codifica para la proteína Hcp100, un marcador molecular único para *Hc*, fueron observados productos amplificados del DNA fúngico a partir de las 2 h post-infección, tanto en MN como en GLC de ambas especies animales estudiadas. Sin embargo, sólo en murciélagos a las 3 y 6 h post-infección se detectó evidencia de diseminación fúngica en pulmón, hígado y bazo mediante esta técnica. Los hallazgos de la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) para los genes *MS8* (específico de fase micelial) y *YPS3* (específico de fase levaduriforme), apoyan que la transición dimórfica del hongo comienza en la MN a 1 h post-infección y que a las 3 h sólo los transcritos de *YPS3* son detectados tanto en murciélagos como en ratones. Estos resultados enfatizan la importancia de la MN y de los GLC como sitios iniciales para la transición dimórfica de *Hc* y su subsiguiente diseminación.

## ABSTRACT

Adult male *Tadarida brasiliensis* bats, randomly captured in nature, and adult male syngeneic BALB/c mice were intranasally infected with *Histoplasma capsulatum* (*Hc*) micelial propagules (mainly microconidia and small hyphal fragments). They were killed at different times after infection (10, 20, 40 min, 1, 2, and 3 h) and subsequently nasal mucosa (NM) and cervical lymph nodes (CLN) were dissected. The fungus was re-isolated from bat CLN after infection using culture medium and the genetic identity of the original inoculum and the fungus recovered from CLN was confirmed by RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction). The NM, including nasal associated lymphoid tissue (NALT), and CLN were processed by histological methods, such as hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff, and single and double immunohistochemistry (IHC). Since 2-3 h post-infection, intracellular fungal cells compatible with *Hc* yeast-phase were observed by these methodologies; either in nasal mucosa epithelium or in CLN. Dendritic cells, containing yeast-like cells, associated with NM and CLN were observed by double IHC, using anti-*Hc* serum and anti-DEC-205 monoclonal antibody. By nested-PCR using a fragment of Hcp100 protein coding gene, a molecular marker unique for *Hc*, amplified *Hc*-DNA products were observed since 2 h post-infection, either in NM or CLN of both animal models tested. However, only in bats at 3-6 h post-infection, evidence of fungal dissemination was found in lung, liver and spleen using nested-PCR. The RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) for *MS8* (mycelium-phase specific) and *YPS3* (yeast-phase specific) genes, supports that fungal dimorphic transition begins in the NM at 1 h post-infection; and at 3 h later only the transcripts of *YPS3* are detected either in bats and mice. These results emphasize the importance of the NM and the CLN as initial sites for *Hc* dimorphic transition and its subsequent dissemination.

## INTRODUCCIÓN

El hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, Darling 1906, es el agente etiológico de la micosis sistémica conocida actualmente como “histoplasmosis capsulati”. La mayoría de los casos de infección por *H. capsulatum* han sido registrados, en el pasado, en zonas con climas templados y tropicales (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Recientemente, asociados con el cambio climático, se han reportado brotes epidémicos dentro de una área geográfica ubicada entre los paralelos 54° 05' Norte (Anderson *et al.*, 2006) y 38° 55' Sur (Canteros *et al.*, 2005b).

El anamorfo de *H. capsulatum* se clasifica en el filo Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Onygenales, familia Onygenaceae y/o Ajellomycetaceae (Hibbett *et al.*, 2007; *Index Fungorum*, 2010; James *et al.*, 2006). En 1972, Kwon-Chung (1972a; 1972b) descubrió la forma heterotálica del hongo y la nombró *Emmonsella capsulata*. McGinnis y Katz (1979) consideraron a *E. capsulata* en sinonimia con *Ajellomyces capsulatus*. Actualmente, el teleomorfo de *H. capsulatum* es la especie *Ajellomyces capsulatus*, que posee dos tipos de compatibilidad sexual (+) y (-). *Ajellomyces capsulatus* fue capaz de crecer y conservar su virulencia en competencia con la microbiota natural, observándose una relación 1:1 entre los tipos sexuales (+):(-), mientras que en aislamientos de pacientes, la relación (+):(-) fue de 1:7, asimismo, el tipo (-) se convirtió más fácilmente a levadura *in vitro*, con lo que se consideró más virulento (Kwon-Chung & Bennett, 1992). A la fecha, estos datos están siendo cuestionados debido al bajo tamaño de muestras con que fueron descritos, además de las nuevas aportaciones de datos moleculares (Taylor ML., com. pers.).



*Histoplasma capsulatum* comprende tres variedades taxonómicas identificadas por su micromorfología, distribución geográfica, especificidad para el hospedero y cuadro clínico (Tewari *et al.*, 1998):

***H. c. var. capsulatum* - Darling, 1906**; es la más distribuida y se describen casos autóctonos en todo el mundo, en diferentes especies de mamíferos.

***H. c. var. duboisii* (Vanbreuseghem, 1957) - Ciferri, 1960**; es endémica de África y produce infección en humanos y más raramente en animales, incluyendo el murciélago.

***H. c. var. farciminosum* (Rivolta, 1873) - Weeks, Padhye, et Ajello, 1985**, es endémica de Asia y África, además está asociada a hospederos equinos.

Esta clasificación taxonómica se ha complementado con información reciente generada por estudios de genotipificación del hongo, con el apoyo de herramientas moleculares (Keath *et al.*, 1992; Spitzer *et al.*, 1989; 1990; Vincent *et al.*, 1986). Mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del DNA genómico e hibridación con sondas del mtDNA y de un fragmento del gen *YPS3*, *H. capsulatum* está agrupado en seis clases y cuatro subclases, estas últimas dentro de la clase-5 (Keath *et al.*, 1992).

Más recientemente, con base en las secuencias parciales de DNA de cuatro genes *ARF*, *H-ANTI*, *OLE1* y *TUB1* que codifican las proteínas, factor de ribosilación de ADP, precursor del antígeno H, desaturasa  $\Delta-9$  de ácido graso y  $\alpha$ -tubulina, respectivamente, Kasuga *et al.* (2003) plantearon una clasificación filogenética y/o filogeográfica utilizando 137 aislamientos procedentes de 25 países, de los cuales la mayoría fue de *H. c. var. capsulatum*, seis de *H. c. var. duboisii* y 13 de *H. c. var. farciminosum*. Estos autores describieron ocho poblaciones genéticas (clados) asociadas al origen geográfico: Norte América clase 1 (NAm 1) y clase 2 (NAm 2),

Latinoamérica grupo A (LAm A) y grupo B (LAm B), Australia, Holanda (Indonesia), Eurasia y África. De los clados descritos, siete representan especies filogenéticas, a excepción del clado Eurasia que está incluido en LAm A.

Los hábitat naturales de *H. capsulatum* lo constituyen lugares cerrados, húmedos y oscuros, como cuevas, grutas y minas abandonadas, así como varios tipos de construcciones deshabitadas como túneles, puentes, alcantarillas, torres de iglesias, etc. El hongo también ha sido aislado de lugares abiertos como parques, patios y plazas públicas, donde se encuentran estorninos, zanates, golondrinas, palomas y aves de corral (gallinas, pavos, etc.). La presencia de altas concentraciones de nitrógeno, fósforo y oligoelementos, permite que *H. capsulatum* crezca favorablemente en el guano de murciélagos y aves. Las condiciones físicas como poca luz (que favorece la esporulación), temperaturas óptimas tanto de suelo como del ambiente que fluctúan en un rango de 25-30 °C y una humedad relativa >60%, son factores abióticos que junto con los bióticos, representados principalmente por la microbiota asociada incluyendo insectos y ácaros micófagos, conforman el nicho ecológico ideal para este patógeno fúngico (Lappe *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999a; 2000a; Ulloa *et al.*, 1998; 2006). En estos ambientes, *H. capsulatum* desarrolla su fase micelial (M), geofílica y saprobia, la cual es infectiva produciendo propágulos que al ser aerosolizados e inhalados por hospederos susceptibles pueden producir la infección inicial (primaria) con curso clínico de leve a grave en la infección establecida (enfermedad).

La fase M se caracteriza por mostrar hifas delgadas que miden de 1.2 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con dos tipos de conidios solitarios: los microconidios, redondos o piriformes de 1.4 x 2.6  $\mu\text{m}$ , que pueden estar fijos a la hifa o unidos a ellas por pequeños

conidióforos, y los macroconidios de paredes gruesas, por lo general redondos de 8-14  $\mu\text{m}$  de diámetro, con proyecciones digitiformes de diferentes tamaños, típicas de la especie. Los macroconidios están adheridos a las hifas por conidióforos cortos que, con frecuencia, forman un ángulo aproximado de  $90^\circ$  con la hifa principal. El hongo crece en su fase levaduriforme (L) y virulenta, tanto como parásito intracelular (especialmente de macrófagos, polimorfonucleares y células epiteliales) de hospederos susceptibles o como levaduras libres en medios de cultivo sintéticos o complejos a  $37^\circ\text{C}$ . La micromorfología de las levaduras está representada por células individuales uninucleadas de 2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente unigemantes con brotación de base estrecha (Tewari *et al.*, 1998).

Los hongos no son participantes pasivos en los procesos de infección. Actualmente, se les atribuye un conjunto de factores de virulencia dependiente de la interacción entre el patógeno y el ambiente que afecta profundamente la variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica (Rappleye & Goldman, 2006). Se ha argumentado que todos los requerimientos para establecer una enfermedad por estos patógenos podrían ser considerados determinantes de virulencia (Casadevall & Pirofski, 1999). La virulencia fúngica es expresada, de preferencia, en hospederos susceptibles y no debe ser considerada como una variable microbiana independiente, sino como un complejo multifactorial (Romani *et al.*, 2002). Odds *et al.* (2001) proponen que sólo los factores que interactúan directamente con células hospederas de mamíferos podrían ser considerados verdaderos factores de virulencia, concepto cuestionable si sólo se refiere a hospederos mamíferos.

Aunque la mayoría de las infecciones por *H. capsulatum* cursan como asintomáticas, la “histoplasmosis capsulati” en humanos presenta formas clínicas diversas que varían de leves a graves (infección diseminada progresiva) y eventualmente conlleva a la muerte (Tewari *et al.*, 1998). La forma clínica más frecuente en México, generalmente asociada a epidemias, es la histoplasmosis pulmonar primaria que afecta principalmente adultos y tiene el más alto porcentaje de letalidad en el mundo. El mayor riesgo humano, en la adquisición de esta enfermedad, está asociado con individuos que entran o trabajan en espacios cerrados que son utilizados por murciélagos como refugios permanentes y/o temporales. En estos ambientes, los individuos son susceptibles a inhalar aerosoles con propágulos del hongo en altas concentraciones. Por tal motivo, espeleólogos, biólogos, geólogos, arqueólogos, antropólogos y, particularmente, trabajadores rurales como mineros, limpiadores de minas y colectores de guano, son la población laboral con más alto riesgo de infección por *H. capsulatum* (Taylor *et al.*, 2000b).

Desde hace varios años se conoce que los murciélagos pueden infectarse con *H. capsulatum* (Constantine, 1988; Taylor *et al.*, 1994; 1999a). Existen 1116 especies de murciélagos en el mundo, y de ellas casi 140 han sido reportadas en México (Medellín R., com. pers.), de los cuales, aproximadamente el 50% están asociados a ambientes cavernícolas como refugio permanente, alternativo u ocasional (Arita, 1993; Medellín *et al.*, 1997). Diversos trabajos apoyan el papel de los murciélagos como reservorio natural de *H. capsulatum*. Klite y Diercks (1965) proponen que *H. capsulatum* es eliminado al ambiente a través de las heces de los murciélagos, hecho confirmado por McMurray y Greer (1979), quienes recuperaron el patógeno de heces de murciélagos intranasalmente infectados. Taylor *et al.* (1999a; 2000a), han aislado *H. capsulatum* de

murciélagos (migratorios y residentes) de diferentes especies naturalmente infectadas y sugieren que *H. capsulatum* también puede integrarse al ambiente por medio de los cadáveres de murciélagos infectados, ya que las levaduras del hongo revierten a la fase M geofílica al descender la temperatura corporal, igualándose a la ambiental (Taylor *et al.*, 2005a). La estrecha relación entre *H. capsulatum* y los quirópteros, con respecto a los mecanismos de dispersión del hongo en la naturaleza, ha sido registrada en los trabajos de algunos investigadores (Hoff & Bigler, 1981; Klite & Diercks, 1965; McMurray & Greer, 1979; Taylor *et al.*, 1999a; 2000a; 2005a), y asimismo, ha motivado el interés tanto de mastozoólogos como de microbiólogos en la utilización de ciertas características del binomio hongo-murciélago para estudios puntuales de: 1) ubicación de sitios de mayor o menor riesgo de infección por *H. capsulatum*; 2) rastreo de la distribución del hongo en la naturaleza en áreas muy amplias, promoviendo un mapeo epidemiológico; y 3) definición de rutas migratorias de estos mamíferos. Para esto, se han empleado métodos de genotipificación del hongo para precisar biomarcadores en la naturaleza, en particular, en murciélagos infectados y capturados al azar en diferentes sitios (Canteros *et al.*, 2005a; Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2000a, 2005a). De las especies de murciélagos que viven en América, el migrador de larga distancia *Tadarida brasiliensis*, es posiblemente la especie más comprometida con la dispersión del hongo a lo largo de todo el continente.

Los componentes de la respuesta de defensa de un hospedero ante infecciones fúngicas son muy variados, van desde los no específicos hasta los sofisticados mecanismos de la respuesta adaptativa, los cuales producen efectores (moléculas o células) específicamente inducidos durante la infección y/o la enfermedad en curso.

Así, el delicado balance de la interacción en el binomio hospedero-patógeno fúngico, puede ir desde una infección leve hasta una enfermedad severa, según la condición inmunológica del hospedero (Romani, 2002).

Se conocen muchos de los eventos que median la interacción de *H. capsulatum* con diferentes células parasitadas, los cuales han sido estudiados tanto en humanos como en ratones (Allen & Deepe, 2005; Allendoerfer *et al.*, 1997; Bullock, 1993; Bullock & Wright, 1987; Duarte-Escalante *et al.*, 2003; Dumond & Robert, 1970; Eissenberg *et al.*, 1988; 1991; 1993; Eissenberg & Goldman, 1991; Gorocica *et al.*, 2009; Jeréz & Taylor, 1989; Lane *et al.*, 1994; León *et al.*, 1989; Marion *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 1990; 1992; 1993; 1994; Retallack & Woods, 1999; Schaffner *et al.*, 1986; Schunur & Newman, 1990; Shi *et al.*, 2008; Strasser *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1989; 1998; Taylor & Duarte-Escalante, 1995; Wolf & Massof, 1990; Wolf *et al.*, 1989; 1992a; 1992b; Woods, 2002; Woods *et al.*, 2001). No obstante, el conocimiento de la interacción entre murciélago e *H. capsulatum* aún es muy pobre. Se conoce que los murciélagos, presuntos reservorios del hongo en la naturaleza, son susceptibles de desarrollar e incluso resolver la infección por *H. capsulatum* (Canteros *et al.*, 2005a; Chávez-Tapia *et al.*, 1998; 2005; Constantine, 1988; Fernández-Andreu, 1988; Fernández-Andreu & Martínez-Machin, 1992; Taylor *et al.* 1994; 1999a; 2000a; 2005a; Vargas-Yañez *et al.*, 1998). Sin embargo, la interacción célula hospedera-célula parásito ha sido prácticamente inexplorada en este modelo animal y el único antecedente descrito se refiere a un patrón de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a células y/o tejidos de ratón y murciélago (Suárez-Alvarez *et al.*, 2010). Por otro lado, observaciones histopatológicas en varios tejidos de diferentes especies

de murciélagos infectados, mostraron la presencia de levaduras intracelulares compatibles con la fase parasitaria de *H. capsulatum*, especialmente en macrófagos intra-alveolares. A la fecha, los estudios histopatológicos de murciélagos natural y experimentalmente infectados con *H. capsulatum* muestran una escasa reacción inflamatoria en los órganos infectados, particularmente en pulmón, hígado y bazo, lo que sugiere que el murciélago resuelve la infección por el hongo de un modo diferente que el humano y el ratón. Asimismo, no se han observado huellas consistentes de una importante reacción inflamatoria localizada, a pesar de la presencia del parásito en el tejido infectado, por lo que estos mamíferos constituyen un modelo interesante para la investigación de la relación hospedero-parásito en la infección por *H. capsulatum* (Taylor *et al.*, 1999a).

Las levaduras de *H. capsulatum* tienen afinidad por el sistema fagocítico mononuclear del hospedero. Actualmente, se considera que las células dendríticas (CD) y los macrófagos, en armonía con la respuesta inmune innata y adaptativa, son los efectores celulares más importantes para la eliminación intracelular del parásito en el hospedero infectado (Gorocica *et al.*, 2009; Newman, 2005).

Algunos autores (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 2005, Rappleye & Goldman, 2006) proponen que la infección del hospedero con *H. capsulatum* ocurre mediante la inhalación de conidios y/o fragmentos hifales que se acumulan en los bronquiolos terminales y alvéolos. Sugieren que después de la inhalación, los conidios se convierten a la fase L dentro de los macrófagos alveolares, en los cuales, las levaduras neutralizan el microambiente hostil y son capaces de multiplicarse, iniciando el establecimiento de la infección. Cuando estos macrófagos alveolares son destruidos,

las levaduras son fagocitadas por macrófagos circulantes reclutados al sitio de infección. Estos autores proponen que este ciclo se repite varias veces, lo que facilita la diseminación del parásito hacia órganos linfáticos y otros tejidos del cuerpo, en los cuales se suele resolver la infección si se trata de hospederos inmunocompetentes (Gildea *et al.*, 2001).

Es conocido que la sobrevivencia y replicación de levaduras de *H. capsulatum* dentro de macrófagos es esencial para la patogénesis de la histoplasmosis. Después de la ingestión por los macrófagos, las levaduras pueden sintetizar nuevas proteínas para modificar rápidamente el ambiente fagosomal y obtener nutrientes, particularmente hierro para la sobrevivencia intracelular (Newman *et al.*, 1992, 1994). En la actualidad, se propone que la ATPasa vacuolar es necesaria para mantener la homeostasis de los iones de hierro intracelularmente, además de participar en la replicación y virulencia de *H. capsulatum* en macrófagos murinos (Hilty *et al.*, 2008). Por otro lado, Zarnowski *et al.* (2008) han presentado evidencia de que *H. capsulatum* secreta una  $\gamma$ -glutamyltransferasa que juega un papel importante en el proceso de reducción enzimática de hierro extracelular.

En macrófagos humanos, las levaduras de *H. capsulatum* inhiben la fusión fagolisosomal y regula el pH interno como parte de su estrategia de sobrevivencia, no obstante, no requieren de la acidificación fagosomal para degradar y matar levaduras de este hongo como sucede en ratones (Newman *et al.*, 2006).

Entre los principales receptores para levaduras y conidios de *H. capsulatum* en macrófagos humanos, están algunas moléculas de adhesión como las integrinas. Se conoce que *H. capsulatum* se une preferentemente a la fracción CD18 de las integrinas



de la familia  $\beta 2$ , CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (CR3 ó MAC-1) y CD11c/CD18 (p150,95 ó CR4) para poder ser internalizado por neutrófilos, macrófagos cultivados de monocitos y por macrófagos alveolares humanos (Bullock & Wright, 1987; Newman *et al.*, 1990).

Las células dendríticas (CD) inmaduras humanas, diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos circulantes, pueden fagocitar estructuras fúngicas de *H. capsulatum* a través de CD18, no obstante, el reconocimiento del hongo por las CD se realiza principalmente por uno de los receptores para fibronectina, la integrina VLA-5 (Very Late Antigen-5).

Datos recientes han demostrado que VLA-5 de CD, también reconoce a una proteína de 20 kDa identificada como ciclofilina A (CypA) la cual está presente sobre la superficie de levaduras de *H. capsulatum* (Gómez *et al.*, 2010). Además, Deepe *et al.* (2008) han demostrado en ensayos *in vivo* que una subpoblación de CD residente con el fenotipo CD11<sup>+</sup>, F4/80<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> y CD205<sup>+</sup>, es la responsable de fagocitar levaduras de *H. capsulatum* en pulmón de ratones C57BL/6.

Se propone que las CD degradan y procesan antígenos *H. capsulatum*-específicos y los presentan a linfocitos T (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 1999). Las CD son consideradas mejores procesadoras y presentadoras de antígenos que los macrófagos y al igual que éstos, pueden desencadenar la respuesta inmune adaptativa conduciendo a la activación de la inmunidad mediada por células, la cual jugaría un papel preponderante en el mecanismo específico de protección contra la histoplasmosis, al estimular la producción de citocinas que directa o indirectamente

activan a macrófagos que inhiben la proliferación y matan a las levaduras intracelulares (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 1999).

Los macrófagos, siendo las principales células efectoras del hospedero, también sirven como donadoras de antígenos para las CD. Las células T CD8 *Histoplasma*-específicas son estimuladas por CD que presentan antígenos exógenos de *H. capsulatum*, sea por ingestión directa o por la captación de antígeno fúngico asociado a macrófagos apoptóticos, proceso conocido como presentación cruzada (Lin *et al.*, 2005).

Las CD derivan de la médula ósea, tanto de las células madre linfáticas como mieloides y están presentes en todos los órganos linfoides como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, asimismo, en casi todos los órganos y tejidos no linfoides. Su localización estratégica en los tejidos, en particular, piel y mucosas, facilita que estas células puedan captar y transportar antígenos, procesarlos y presentarlos a linfocitos T de los ganglios linfáticos regionales que drenan el organismo. En el sistema respiratorio, las CD se localizan en los epitelios de la mucosa, en la lámina propia de las vías de conducción, en el intersticio del parénquima pulmonar y las paredes alveolares, así como alrededor de los vasos sanguíneos (Lotze & Thomson, 2001).

En las vías respiratorias superiores que sirven de entrada a diversos patógenos existe el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT -por sus siglas en inglés), hasta hace poco sólo había sido observado en roedores (Bienenstock & McDermott, 2005; Zuercher *et al.*, 2002) y recientemente en murciélagos (Suárez-Alvarez *et al.*, 2009). El NALT consiste de un tejido linfoide pareado, localizado en el piso de la cavidad nasal, cubierto por una capa de epitelio cilíndrico ciliado y se ha postulado como un posible equivalente funcional, en el tracto respiratorio superior, a las placas de Peyer en el

íleon cuyas células epiteliales permiten el paso y transporte de estructuras endocitadas hacia el tejido linfoide subyacente que también contiene CD (Heritage *et al.*, 1997). Esta equivalencia funcional se sustenta, primero, por la semejanza en las densidades poblacionales de células B y T; segundo, porque el epitelio que recubre los folículos linfoides puede servir como sitio de entrada para diferentes patógenos; y tercero, porque el NALT funciona como la primer barrera linfoide contra antígenos internalizados en la mucosa nasal (MN) (Suárez-Alvarez *et al.*, 2009).

En algunas infecciones fúngicas asociadas a parásitos dimórficos se ha propuesto que ciertos morfotipos son detectados por el sistema inmune del hospedero, en una forma morfotipo-específica. Así, las CD son capaces de decodificar información asociada a la fase M o L de algunos hongos, lo que conlleva a diferentes respuestas inmunes dependientes de las células T (Th1 o Th2), estudiadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Fè-d'Ostiani *et al.* 2000; Montagnoli *et al.*, 2002; Newman & Holly, 2001; Romani, 2002).

En el modelo de *H. capsulatum* la información sobre la transición dimórfica *in vivo* y las interacciones morfotipo-específicas con el hospedero son muy escasas, a la fecha la única evidencia experimental se refiere a ensayos de fagocitosis de microconidios, fragmentos hifales y levaduras por macrófagos alveolares y peritoneales de ratón cultivados, donde el evento fagocítico se registró entre 4-6 h después de la infección de los macrófagos, mientras que la transición M-L se observó entre 6–7 h de incubación de los cultivos a 37 °C (Kimberlin *et al.*, 1981).

Actualmente, no existen antecedentes que comprometan a la MN y sus principales componentes (NALT, células epiteliales y CD) en la transición dimórfica y la diseminación de *H. capsulatum*. Debido a que este hongo infecta a mamíferos por la

vía respiratoria, estos componentes de la MN podrían jugar un papel clave, aún desconocido, como primera línea de defensa del hospedero contra este parásito fúngico en la fase inicial de la infección.

## JUSTIFICACIÓN

La primoinfección por *H. capsulatum* se realiza al inhalar conidios y/o fragmentos hifales capaces de aprovechar pequeñas rutas de aire que van desde la nariz del hospedero hasta los macrófagos alveolares, no obstante, existen discrepancias sobre el sitio de la primera interacción hospedero-parásito en el tránsito del hongo por la ruta respiratoria. Tradicionalmente, algunos autores proponen al pulmón como única opción del sitio de transición del morfotipo M (inóculo infectivo) al morfotipo L (fase parasitaria intracelular facultativa) y del inicio de la diseminación fúngica, particularmente, en los macrófagos alveolares (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 2005). Sin embargo, no se ha investigado si existen otros sitios de captación, transición dimórfica y tiempos asociados a este evento, además de otras rutas de diseminación del hongo a partir de la primera interacción de las estructuras infectivas con los tejidos del tracto respiratorio superior, concretamente, con la MN que incluye al NALT. Con base en lo anterior, el presente trabajo monitoreó el sitio y tiempo de transición M-L, las células comprometidas con los eventos fagocíticos y la diseminación de *H. capsulatum* en la MN. Para el desarrollo de estos ensayos, se seleccionó el murciélago que es considerado un reservorio natural del hongo y como testigo al ratón, que es el modelo experimental más utilizado en la histoplasmosis.

## **HIPÓTESIS**

*Histoplasma capsulatum* infecta y parasita al murciélago migratorio *T. brasiliensis* y a partir de los primeros eventos de la infección establece una estrecha interacción con la mucosa nasal y sus componentes; iniciando así el cambio dimórfico, el tránsito tisular y la diseminación, sucesos que facilitan la colonización de este hospedero.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la interacción de células de *H. capsulatum* con los componentes de la mucosa nasal (incluyendo el NALT), asimismo, con los ganglios linfáticos cervicales del murciélago, a partir de los primeros eventos de la captación y diseminación fúngica en este hospedero natural, utilizando técnicas histológicas para microscopía óptica y electrónica, así como moleculares.

## OBJETIVOS PARTICULARES

⇒ Identificar mediante diferentes métodos histológicos, la presencia de células de *H. capsulatum* en mucosa nasal y ganglios linfáticos cervicales.

⇒ Examinar los primeros eventos de tránsito transepitelial de *H. capsulatum* en la mucosa nasal y determinar en que fase morfológica se encuentra el hongo, utilizando métodos histológicos y moleculares.

⇒ Demostrar la posible participación de las CD de la mucosa nasal en un evento de infección por *H. capsulatum* en el murciélago migratorio *T. brasiliensis*.

⇒ Identificar el tiempo y el sitio en donde posiblemente se realiza la transición dimórfica de *H. capsulatum*, utilizando las técnicas referidas anteriormente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **HONGO**

Se empleó la cepa EH-53 de *H. capsulatum*, aislada de un paciente infectado en una cueva de Hidalgo-México. La cepa está depositada en la “Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM”. Se puede acceder a la información sobre las cepas de la colección en un catálogo (Taylor *et al.*, 1999b) o en la página de internet: [www.histoplas-mex.unam.mx](http://www.histoplas-mex.unam.mx). Esta colección se encuentra registrada en la base de datos del Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Centre on Microorganisms, WDCM) de la Federación Mundial para Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collections, WFCC) bajo el acrónimo LIH-UNAM WDCM817.

La fase M de la cepa se cultivó en agar-micobiótico (Bioxón, Becton-Dickinson, México DF) a 25-28 °C, mientras que la fase L se cultivó a 37 °C en caldo de infusión-cerebro-corazón (BHI-líquido) (Bioxón) suplementado con 0.1 % de L-cisteína y 1 % de glucosa.

### **OBTENCIÓN DEL INÓCULO FÚNGICO**

A partir de la fase M del hongo obtenida en agar-micobiótico, se realizaron resiembras en agar-BHI (Bioxón) no suplementado, incubando a 25-28 °C. Después de tres semanas de crecimiento, se cosecharon conidios e hifas por lavado gentil de la



superficie de la colonia con solución salina (SS) estéril. La suspensión celular fue filtrada en lana de vidrio y posteriormente en papel filtro Whatman 45, para dejar pasar preferencialmente microconidios y fragmentos hifales, con el fin de homogeneizar el inóculo. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estrictas de esterilidad en una campana de bioseguridad nivel 3. El inóculo se centrifugó a 3000 rpm por 15 min en SS, valorando la presencia de microconidios y fragmentos hifales en el botón del tubo, por microscopía óptica. La suspensión de estos propágulos fúngicos fue ajustada a 0.5 de densidad óptica. A partir de esta concentración, la suspensión fue observada en cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (0.05%) para determinar la viabilidad de las células. El inóculo se ajustó a  $8 \times 10^7$  propágulos fúngicos/ml. Una porción de éste fue sembrada en agar-BHI para confirmar la viabilidad de los propágulos fúngicos.

## **ANIMALES**

Se emplearon murciélagos machos, adultos, de la especie *Tadarida brasiliensis*, colectados en la cueva “El Salitre” en el Municipio de Metztitlán, estado de Hidalgo, México. Éstos fueron capturados con una red especial (mist-net) para quirópteros, posteriormente se transfirieron a sacos de manta para transportarlos hasta el bioterio del laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM, expresamente adaptado para mantenimiento a corto plazo de estos animales y en donde fueron alimentados con larvas de tenebrios y agua *ad libitum* hasta su uso experimental.

Ratones machos BALB/c de ocho semanas de edad, fueron utilizados como testigo de los ensayos realizados en murciélagos. Los ratones fueron mantenidos en óptimas condiciones en el bioterio del laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM alimentados con Purina (Purina de México, México DF) y agua *ad libitum*.

Tanto los murciélagos como los ratones fueron procesados de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Usos y Cuidados de Animales de Laboratorio, de la Facultad de Medicina de la UNAM, con base en la Guía Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999).

### **INOCULACIÓN INTRANASAL**

Se inocularon 100  $\mu$ l de una suspensión de  $8 \times 10^7$  propágulos fúngicos/ml de SS en las narinas de cada animal. El procedimiento se realizó utilizando una micropipeta y puntas estériles, depositando una microgota del inóculo (10  $\mu$ l/2 min) en la narina de cada animal. Enseguida, se le permitió libre ventilación para la inhalación adecuada de los propágulos infectivos ya que ningún animal fue previamente anestesiado. Los animales inoculados se sacrificaron a los 10, 20, 40 min y 1, 2, 3 h, respectivamente. Al momento de la toma de las muestras se lavó intensivamente cada tejido y/o órgano utilizado para garantizar que sólo el hongo que logró penetrar en el tejido fuera analizado. Se utilizaron animales sin inocular como testigos de no infección (TNI). Cada ensayo se realizó por duplicado.

## REAISLAMIENTO DEL HONGO DE LOS ANIMALES INOCULADOS

Fragmentos obtenidos de MN y GLC de cada tiempo post-infección, fueron inmediatamente sembrados en placas de agar-micobiótico (Bioxón) e incubados durante 3-4 semanas a 28 °C. Al cabo de este tiempo, se identificó el hongo por los métodos de rutina en el laboratorio, según Taylor *et al.* (1999b). La comprobación genotípica de los aislamientos se efectuó a partir del DNA total obtenido de la cepa original y de los reaislamientos procesados por el método de RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) según lo descrito por Canteros *et al.* (2005a). Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se utilizó el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) como marcador de tamaño molecular. Los geles fueron visualizados con un transiluminador-UV Gel Doc 1000 Biomedical Imagen (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) y las imágenes fueron capturadas en formato TIFF, utilizando el programa Molecular analysit TM. Versión 1.5 (Bio-Rad).

## HISTOLOGÍA PARA IDENTIFICAR *H. capsulatum* EN TEJIDOS INFECTADOS

### Descalcificación de la estructura nasal para procedimientos histológicos

Para los ensayos histológicos de la estructura nasal fue necesario descalcificarla primero, para esto, se sacrificaron y se decapitaron los animales de cada tiempo

seleccionado. Enseguida, se retiró la piel junto con los músculos y demás tejidos blandos de cada cabeza, asimismo, los huesos supraorbitales, el cráneo, el cerebro, el maxilar inferior y la lengua, hasta dejar expuesto el conducto nasofaríngeo completo de cada animal procesado. Se procedió a fijar el conducto nasofaríngeo con paraformaldehído al 4% en Tris-HCl 0.1M (pH 7.4) durante 8 h; posteriormente se lavó el material con Tris-HCl y se sumergió en EDTA al 10% en solución salina balanceada, durante 2 semanas.

### **Procedimientos histológicos de rutina**

A partir del conducto nasofaríngeo descalcificado, se realizaron cortes gruesos transversales de la cavidad nasal, limitando la zona media entre los incisivos y los molares del maxilar superior de cada animal, donde se ubica el NALT. Se realizaron disecciones para obtener muestras de MN (incluyendo el NALT) y GLC (previamente fijados con paraformaldehído al 4% en Tris-HCl durante 8 h). Se lavó cada muestra, por separado, con Tris-HCl y se incluyó en parafina para seguir con los métodos histológicos utilizados en el presente estudio. Inicialmente, se emplearon las tinciones de rutina hematoxilina-eosina (HE) y ácido peryódico de Schiff (PAS).

### **Métodos inmunohistoquímicos (IHQ) específicos**

A partir de las muestras incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de grosor y se colocaron en portaobjetos especiales con cargas positivas, Superfrost Plus (Shandon Inc. Pittsburgh, PA). Se procedió a desparafinar cada preparación de manera secuencial: primero por calentamiento a 55-60  $^{\circ}\text{C}$ , 30-40 min, después por adición de

xilol, seguido de etanol absoluto, al 96°, 70° y 50° durante 1 min cada uno y finalmente se mantuvieron las preparaciones en agua destilada hasta empezar las inmunohistoquímicas con peroxidasa.

**Inmunoperoxidasa simple:** Se bloqueó la peroxidasa endógena en cada preparación, adicionando peróxido de hidrógeno 1% en metanol (1:10), durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y en cámara húmeda (CH). Se lavó cada preparación tres veces por 5 min con Tris-HCl. Se bloquearon los sitios no reactivos con Tris-HCl /Triton X100 0.1% /Albúmina Sérica Bovina 1%, 1 h a TA y en CH. Se decantó la solución bloqueadora de todas las preparaciones y se incubaron con un suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (anticuerpo primario) diluido 1:100 en Tris-HCl, durante toda la noche a 4 °C en CH. El suero hiperinmune fue probado previamente en inmunoensayo enzimático (ELISA) (Voller *et al.*, 1979) dando títulos >1:640 para la histoplasmina. Al mismo tiempo, un duplicado de los cortes de MN y GLC fueron incubados con el monoclonal anti-CD, NLDC-145 (anticuerpo primario) (Serotec, Co. UK) obtenido en rata y diluido 1:40 en Tris-HCl, para identificar el receptor tipo lectina de las CD denominado DEC-205, con especificidad para manosa.

Al día siguiente, se lavaron los cortes tres veces por 5 min y se incubaron por separado, durante 1 h a TA en CH, con los anticuerpos secundarios biotinilados respectivos, diluidos 1:100 en Tris-HCl; es decir, conjugado biotinilado anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) para revelar *H. capsulatum* o conjugado biotinilado anti-IgG de rata obtenido en cabra (ICN Biomedicals, Inc.) para revelar las CD. Se lavaron ambas series de preparaciones y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa diluido 1:100 en Tris-HCl durante 30 min

a TA. En seguida, se lavaron de nuevo y se incubaron 2-3 min con solución de aminoetilcarbazol (AEC) (Zymed Laboratories, St. Francisco, CA) hasta obtener una coloración rojiza. Posteriormente, se lavaron las series de preparaciones en agua corriente y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 30 s para después montarlas con resina hidrosoluble.

**Inmunoperoxidasa doble:** Se emplearon también cortes de MN y GLC para realizar métodos de doble localización, tanto de *H. capsulatum* como de CD, en el mismo corte. Se procedió inicialmente de forma similar a la inmunoperoxidasa simple y se modificó únicamente el cromógeno: diaminobenzidina (DAB) (Zymed) como cromógeno para *H. capsulatum* que produce un color café claro y AEC (Zymed) como cromógeno para CD que produce un color rojo.

Como testigos positivos se utilizaron: cortes de ganglio peripancreático de una paciente que murió de histoplasmosis diseminada fulminante procesados con el suero anti-*H. capsulatum* y cortes de timo (donde las CD corticomedulares y epiteliales expresan el marcador DEC-205) procesados con el monoclonal NLDC-145. Como testigos negativos, se incubaron preparaciones con suero normal del animal en el que fueron obtenidos los anticuerpos primarios y, en lo sucesivo, se procesaron de la misma forma que se describe en la inmunoperoxidasa simple.

Todas las imágenes de los ensayos histológicos fueron observadas y fotografiadas con el microscopio óptico Olympus BX 40 (Olympus American Inc., Miami, FL) acoplado con una cámara automática Olympus SC 35, empleando una película Kodak Pro-Image 100 de 35 mm.

## ESTUDIOS MOLECULARES PARA REVELAR *H. capsulatum*

### PCR-anidada para el marcador Hcp100

A partir de cortes parafinados (3  $\mu\text{m}$  grosor) de MN y de GLC de los animales infectados y sacrificados a diferentes tiempos, se procedió a hacer un raspado de las muestras utilizando una navaja de bisturí estéril para cada una. Muestras de pulmón, hígado, bazo e intestino, fueron también procesadas para obtener evidencia de la diseminación fúngica. Cada muestra de tejido parafinado fue colocada en un tubo de centrífuga de 1.5 ml al cual se agregó 1 ml de xilol absoluto y se agitó en vortex durante 20 s. Se centrifugó a 12000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante cuidando de no disgregar el botón. Este procedimiento se repitió una vez con xilol y dos veces con alcohol absoluto. Finalmente, se procedió a extraer el DNA previo secado del botón de tejido desparafinado en estufa a 37 °C.

Para la extracción del DNA se utilizó el QIAamp tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Brevemente, a cada muestra se adicionaron 180  $\mu\text{l}$  de amortiguador ATL del kit (Qiagen) y 20  $\mu\text{l}$  de proteinasa K a 1 mg/ml y se incubó a 55 °C con agitación, durante toda la noche. Al día siguiente, para romper la pared celular de las levaduras de *H. capsulatum* presentes en los tejidos procesados, cada muestra se expuso a congelación con nitrógeno líquido por tres veces alternando con tres ebulliciones de 1 min. Se estabilizó la muestra a TA y de nuevo se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de proteinasa K y se incubó otra vez a 55 °C con agitación durante 1 h. Posteriormente, se agitó cada muestra durante 15 s y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador AL del kit (Qiagen). Se mezcló y se incubó inmediatamente a 70 °C por 10 min para obtener una solución

homogénea. En seguida, se adicionaron 200 µl de etanol absoluto frío y se mezcló por agitación mecánica. Cada muestra se transfirió con micropipeta a una columna Dneasy Mini Spin colocada en tubo de colecta del kit. Se centrifugó a 6000 g durante 1 min. Se eliminó el eluído y el tubo colector de cada muestra y cada columna fue colocada en nuevo tubo colector y se adicionaron 500 µl del amortiguador AW1 del kit (Qiagen) y se centrifugó a 6000 g durante 1 min. Se recuperó cada columna en nuevo tubo colector y se adicionaron 500 µl de amortiguador AW2 del kit (Qiagen). Se centrifugó cada columna a 12000 g durante 3 min para secar la membrana con DNA. Finalmente, para eluir el DNA, cada columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de amortiguador AE de Qiagen (Tris-Cl 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0) previamente calentado a 65 °C, sobre la membrana con DNA, seguido de incubación a TA por 1 min y de centrifugación a 6000 g durante 1 min. El DNA obtenido, de cada muestra, se cuantificó por espectrofotometría, se ajustó a 10 ng/µl y se guardó a -20 °C hasta su uso.

**Amplificación del marcador específico de *H. capsulatum*:** Se realizó una PCR-anidada para un fragmento del gen que codifica para una proteína co-activadora de 100 kDa (Hcp100). Se utilizaron dos grupos de iniciadores, descritos por Bialek *et al.* (2002). Para la primera PCR: Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3') y Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3') que amplifican un producto de 391 bp. Para la segunda reacción (anidada): Hc III (5'-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') y Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3') que amplifican un producto de 210 bp, único de *H. capsulatum*.



La mezcla de la primera reacción de PCR, con un volumen total de 25 µl por tubo, consistió en 1 µl de cada desoxinucleósido trifosfato (DNTPs) a 200 U/µl (Promega, Madison, WS), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, 1 µl de cada iniciador Hc I y Hc II a 1 µM (Roth, Karlsruhe, Alemania), 0.2 µl de *ampliTaq* DNA polimerasa a 1 U/µl (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 2 µl de DNA extraído/muestra de tejido, 2 µl de Tris-HCl a 10 mM (pH 8.3) y se completó el volumen con 13.8 µl de agua milliQ. La mezcla de la reacción anidada fue idéntica, excepto que se utilizó como templado 1 µl del producto de la primera reacción, los iniciadores Hc III y Hc IV, además de 1 µl adicional de agua milliQ para completar los 25 µl del volumen de reacción. Ambas reacciones de PCR se corrieron con el siguiente programa: un ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Las PCR fueron realizadas en un termociclador BIO-RAD iCycler™ (Bio-Rad). Los productos de las PCR fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1 X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8.0), a 100 V y en un tiempo de corrida de 60 min, teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador-UV Gel Doc 1000 Biomedical Imagen (Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas en formato TIFF, utilizando el programa Molecular analysit™. Versión 1.5 (Bio-Rad).

En cada ensayo se utilizó, como testigo positivo, el DNA de la cepa de referencia EH-53 de *H. capsulatum* y, como testigo negativo, agua milliQ y el tejido de animal no infectado experimentalmente. Como marcador de tamaño molecular se empleó el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

## **RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)**

### **Extracción de RNA total**

Para la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa, muestras de MN y de GLC, de cada animal infectado y sacrificado a los diferentes tiempos post-infección (10, 20, 40 min, 1, 2 y 3 h), así como de cultivos de las fases M y L, fueron procesadas para extracción de RNA total, con el propósito de detectar la presencia de transcritos de cada morfotipo fase-específico de *H. capsulatum*. Se incluyó un tiempo cero (testigo), sólo para MN por ser el primer tejido del hospedero en contacto con el hongo.

Brevemente, a 10 mg de cada muestra se adicionó 1 ml del reactivo TRIzol® (Invitrogen) y se incubó durante 20 min a TA. Se agitó cada muestra en vortex y se incubó durante 10 min a TA. A cada una, se adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitó levemente en vortex y se incubó durante 3 min a TA. Se centrifugó cada muestra a 12000 g por 15 min a 4 °C y en seguida se separó la fase acuosa resultante, a la cual se adicionaron 500 µl de isopropanol a 4 °C, se agitó levemente y se incubó durante 10 min a TA. Se centrifugó cada muestra a 12000 g durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, cuidando de no alterar el botón precipitado. Se adicionó, a cada muestra, etanol al 75% y se agitó suavemente. Se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante de cada muestra y se secó hasta la humedad en campana de vacío durante 10-15 min a TA. Por último, se resuspendió el botón de cada muestra con 13 µl de agua milliQ y se calentó durante 10 min a 55-60 °C. Se

cuantificó por espectrofotometría para valorar el RNA total y se colocó cada muestra en hielo para ser utilizada inmediatamente.

### **RT-PCR para genes específicos de fase de *H. capsulatum***

A partir de 1 µg de RNA total extraído de cada muestra, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) correspondiente a cada marcador de morfotipo fúngico utilizado y simultáneamente se amplificó su cDNA con el kit de un sólo paso SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen). Para cada morfotipo, se utilizaron iniciadores (100 pmol/iniciador) de genes específicos de fase (Invitrogen) para la fase L, el iniciador YPS-FWD (5'-TCTGCGGCACCTGCAACCCTAT-3') y el YPS-REV (5'-CCGCTTCGTGTTATCGTCGC-3') que generan un fragmento de 230 bp del gen *YPS3* que expresa una proteína de 17.4 kDa localizada en la pared celular del hongo; para la fase M, el iniciador MS8-FWD (5'-GGGTTCTTCGAACTTCCTTG-3') y el MS8-REV (5'-TGAAGATATGCGGTACAACA-3') que generan un fragmento de 153 bp del gen *MS8* que expresa una proteína que actúa en el crecimiento apical de las hifas.

El programa de termociclado inicialmente generó la síntesis del cDNA seguido inmediatamente de la amplificación de éste. Brevemente, para la síntesis: un ciclo de 50 °C, 30 min y un ciclo de 94 °C, 2 min; para la amplificación: 35 ciclos de 94 °C, 15 s, 55 °C, 30 s y 72 °C 1 min cada uno, con extensión final de 72 °C, 7 min. Los productos de la RT-PCR se almacenaron a 4 °C hasta la revelación en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1 X, a 100 V, durante 45-50 min, teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizados como se describe anteriormente.

Como testigo de los marcadores de morfotipos M y L se empleó RNA extraído de las células fúngicas en cultivos puros de cada una de las fases de *H. capsulatum*. Como

testigo del sistema se empleó RNA de MN y GLC con iniciadores específicos para una proteína muy conservada en mamíferos, la  $\beta$ -actina (100 pmol/iniciador), el iniciador FWD (5'-CCAACTGGGACGACATGG-3') y el REV (5'-GGTGGTACCACCAGACAGC-3'), sintetizados en el Instituto de Fisiología, UNAM, México DF, que generan un fragmento de 648 bp. Como testigo negativo, se utilizó agua milliQ así como MN y GLC de animales no infectados experimentalmente (TNI). Como marcador de tamaño molecular se empleó el 123 bp DNA Ladder (Invitrogen).

## RESULTADOS

### REISLAMIENTO DEL HONGO DE LOS ANIMALES INOCULADOS

A partir de los cultivos de fragmentos de MN y de GLC obtenidos de cada tiempo post-infección e incubados en agar-micobiótico a 28 °C, se recuperó el hongo en fase M, únicamente en GLC de murciélagos sacrificados a las 2 y 3 h post infección (Fig. 1 A), así como en ratones a las 3 h post-infección (dato no mostrado). La identidad genética de los reislamientos de GLC fue corroborada al comparar por RAPD-PCR sus perfiles polimórficos del DNA genómico con el de la cepa original inoculada (Fig. 1 B).

### HISTOLOGÍA PARA IDENTIFICAR *H. capsulatum* EN TEJIDOS INFECTADOS

Mediante tinción con HE, por primera vez en la literatura, se demostró la ubicación anatómica del NALT en el murciélago (Fig. 2 A), semejante al del modelo murino (Fig. 2 C). El NALT se presenta como un tejido pareado, dispuesto a ambos lados del septo nasal, en el tercio medio del piso de la cavidad y en el ángulo formado entre el hueso del paladar y el del cornete inferior. En murciélagos, este linfopitelio tiene aproximadamente 1 a 1.2 mm de largo y 200 a 250 µm de ancho (Fig. 2 A).

En los cortes transversales del conducto nasofaríngeo descalcificado, se observaron células compatibles con levaduras de *H. capsulatum* evidenciadas con HE y PAS en el epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado de la MN asociada al NALT tanto en

murciélagos sacrificados a las 2 h post-infección como en ratones a las 3 h (Fig. 2 B y D).

Mediante inmunoperoxidasa se observaron células de *H. capsulatum* (posibles levaduras) en MN no asociada a NALT en murciélagos sacrificados a las 2 y 3 h post infección (Fig. 3 A) y en ratones a partir de las 3 h (Fig. 3 B), respectivamente. Es importante destacar que la cantidad de levaduras observadas en la MN de murciélagos fue notablemente menor que la observada en ratones. Por doble inmunoperoxidasa, con suero hiperinmune anti-*H. capsulatum* y el monoclonal NLDC-145, realizada en cortes de MN de murciélagos a partir de 2 h post-infección y en ratones a las 3 h, se encontró reacción específica tanto para *H. capsulatum* como para CD subepiteliales e intersticiales, destacando la presencia de levaduras dentro de CD o extracelulares (datos no mostrados). Los cortes histológicos de los GLC de murciélagos sacrificados a partir de las 2 h post-infección evidenciaron, tanto por doble inmunoperoxidasa como por PAS, la presencia de grandes cantidades de estructuras fúngicas. Mientras que en ratones, células compatibles con levaduras de *H. capsulatum* fueron observadas sólo a partir de las 3 h y en menor cantidad que en murciélagos. La figura 3, destaca la presencia de posibles células levaduriformes de *H. capsulatum* extracelulares adheridas a fagocitos (Fig. 3 C) o dentro de CD (Fig. 3 D) de GLC de murciélago y de ratón, respectivamente. La figura 4 (A-D) ilustra los hallazgos histológicos de levaduras intracelulares en GLC de murciélago a las 2 h post-infección, destacando un gran número de estas células por el método de inmunoperoxidasa, observado por microscopia de luz en campo claro y con un filtro de polarización.

La observación histológica de otros órganos mostró la presencia de levaduras de *H. capsulatum* en pulmón e hígado de murciélagos sacrificados a las 3 h (Fig. 5 A y C) sin reacción inflamatoria aparente, mientras que en ratones, en estos mismos órganos y en los mismos tiempos post-infección, no se encontró la presencia de levaduras (Fig. 5 B y D).

El ganglio peripancreático de una paciente con diagnóstico *postmortem* de histoplasmosis, utilizado como testigo positivo, presentó numerosas estructuras fúngicas intra- ó extracelulares (dato no mostrado). Los cortes de tejidos de animales sanos, procesados con suero anti-*H. capsulatum*, así como los tejidos de animales infectados a diferentes tiempos procesados con suero normal de conejo, resultaron negativos.

## **ESTUDIOS MOLECULARES PARA REVELAR *H. capsulatum***

### **PCR-anidada para el marcador Hcp100**

Por este método, la obtención de amplicones correspondientes al fragmento del gen que codifica a la proteína Hcp100, específica de *H. capsulatum*, fue revelada por bandas de 210 bp en geles de agarosa que identificaron la presencia del hongo en MN y GLC de murciélagos sacrificados a partir de las 2 post-infección (Fig. 6), así como de ratones sacrificados a las 3 h (Fig. 7 A). Asimismo, en murciélagos sacrificados en tiempos posteriores a las 3 h, se obtuvieron bandas en otros órganos distintos a los mencionados, como el pulmón, el hígado y el bazo, aunque el intestino resultó negativo

incluso hasta las 6 h (Fig. 6). Mientras que en ratones sacrificados a 3 y 6 h, no se encontró evidencia molecular del hongo en pulmón, hígado, bazo e intestino (Fig. 7 B).

### **RT-PCR para genes específicos de fase de *H. capsulatum***

Se estandarizó el método de RT-PCR para *H. capsulatum* con el RNA extraído de las células fúngicas de cada morfotipo, los cuales mostraron una concentración promedio para los transcritos del gen *MS8* (fase M) de 194 µg/ml y para los transcritos del gen *YPS3* (fase L) de 228 µg/ml. Lo que confirmó una óptima extracción de RNA para proceder a las RT-PCR correspondientes. La obtención de los productos de cada RT-PCR se visualizó en geles de agarosa que revelaron repetitivamente la presencia de las bandas de cDNA respectivas para los genes expresados de cada fase morfológica del hongo; la de 153 bp para la fase M y la de 230 bp para la fase L (Fig. 8).

En la RT-PCR realizada en órganos de murciélagos sacrificados en todos los tiempos estudiados, en la MN se observó una banda amplificada correspondiente al fragmento de cDNA esperado de 153 bp para el marcador de fase M (*MS8*) desde los 40 min hasta 1 h post-infección, la cual nunca fue observada a las 2 y 3 h. Por otro lado, para el marcador de fase L (*YPS3*) la banda del fragmento de cDNA esperado de 230 bp se reveló sólo a partir de 1 h y hasta las 3 h post-infección (Fig. 9 A y B). Mientras que en ratones, los transcritos del gen *MS8* sólo se expresaron a la 1 y 2 h post-infección y los del gen *YPS3* presentaron un comportamiento similar al observado en murciélagos (Fig. 10 A y B).

En relación con la RT-PCR de GLC, tanto de murciélagos como de ratones, no se observaron las bandas de cDNA del marcador de fase M (*MS8*) en ninguno de los



tiempos ensayados (Figs. 11 A, B y 12), en contraste el marcador para la fase L (*YPS3*) se expresó desde las 2 h post-infección (Figs. 11 B y 12).

En todos los ensayos se expresó el marcador de la  $\beta$ -actina (fragmento de cDNA esperado de 648 bp), lo que le dio confiabilidad a los ensayos de RT-PCR realizados.

## DISCUSIÓN

En todos los casos de infecciones por patógenos que utilizan la vía aérea para entrar y acceder tanto a vías respiratorias altas y bajas como a otros órganos internos del hospedero, la MN representa el primer sitio de interacción hospedero/parásito. La mucosa es un complejo organizado interactivo de tejidos donde suceden múltiples eventos de la respuesta inmune, como adherencia, reconocimiento, fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos.

En los primeros pasos de la infección respiratoria el patógeno encuentra en la superficie de la MN una amplia área de contacto, la cual se multiplica debido a los pliegues de los cornetes nasales y los senos paranasales, lo que permite que diversos microorganismos interactúen directamente con el epitelio de la mucosa. Sin embargo, el hospedero cuenta con armas necesarias para ofrecer resistencia ante la invasión del patógeno, como la presencia bajo el epitelio nasal de numerosos fagocitos profesionales, como macrófagos, polimorfonucleares y células dendríticas que cumplen la función de defensa contra diferentes agresores.

La interacción con la MN puede representar un papel crucial como primera línea de defensa para patógenos de vías respiratorias altas y bajas y, en consecuencia, definir el curso clínico de la infección asociada en hospederos, según sus características inmunológicas.

La MN además, cumple con las características físicas de temperatura y humedad requeridas para que ciertos patógenos fúngicos dimórficos, como *H. capsulatum*, lleve a cabo su transición de morfotipo M-L. La transición al morfotipo L en este hongo es

crucial para su acción patógena y le permite recurrir a una serie de estrategias que le facilitan sobrevivir a los ambientes hostiles intra- y extracelulares del hospedero.

En este trabajo en particular, se utilizaron diversas técnicas histológicas y moleculares, para evaluar la infección por *H. capsulatum* y el papel de la MN (incluyendo el NALT) y los GLC, de murciélagos y de ratones, durante los eventos de cambio dimórfico y de diseminación del hongo en los modelos animales experimentalmente infectados vía intranasal.

El análisis integral de los resultados, resalta que ambos modelos animales difieren en los tiempos necesarios para que se lleven a cabo estos eventos. Por microscopia de luz, utilizando tinciones de rutina y de inmunohistoquímica, se encontraron hallazgos histológicos diferenciales en cuanto a tiempos de aparición y cantidad de células fúngicas, dependiendo de los modelos animales estudiados. En murciélagos, destaca que en MN se observaron células fúngicas compatibles con levaduras de *H. capsulatum* sólo a partir de las 2 y 3 h post-infección, aunque en poca cantidad; mientras que, en estos mismos tiempos, los GLC presentaron una mayor cantidad de levaduras intracelulares. Por otro lado, en ratones, las observaciones de la MN mostraron levaduras sólo a partir de las 3 h y en mayor cantidad que en la mucosa de murciélagos, mientras que, en este mismo tiempo post-infección, los GLC de ratón mostraron menor cantidad de levaduras que la observada en los GLC de murciélagos.

Para evidenciar histológicamente el proceso de diseminación de *H. capsulatum* se estudiaron otros órganos, los cuales mostraron levaduras intracelulares en pulmón e hígado de murciélagos sacrificados a las 3 h sin evidencias de reacción inflamatoria, mientras que en ratones, en estos mismos órganos y tiempos post-infección no se

encontraron células fúngicas compatibles con el morfotipo levaduriforme. Esto sugiere que el proceso de diseminación en el murciélago puede ser más rápido que en el ratón. Este planteamiento fue corroborado mediante los resultados de las PCR-anidadas con un marcador de alta sensibilidad y único para *H. capsulatum* (Hcp100), realizadas en MN, GLC y otros órganos internos de murciélagos y ratones. Este método molecular confirmó la presencia del hongo en todos los tejidos analizados de murciélagos a excepción de intestino, mientras que en ratón se detectó la presencia de *H. capsulatum* en MN así como en GLC y nunca en otros órganos internos, incluso hasta las 6 h post-infección. Tanto la PCR-anidada como la recuperación del hongo en cultivo a partir de los GLC de murciélagos a las 2 y 3 h post infección demostraron el éxito del proceso infeccioso, lo que apoya la viabilidad del inóculo así como el evento de diseminación de *H. capsulatum*.

Ensayos puntuales realizados por algunos investigadores han contribuido con información fehaciente sobre el dimorfismo de este hongo en condiciones *in vitro*, utilizando cultivo especiales asociados a cambios de temperatura y al potencial de óxido-reducción (Maresca & Kobayashi, 1989; Medoff *et al.*, 1987). Sin embargo, en condiciones *in vivo* hay muy poca información que permita aportar datos fidedignos sobre el proceso dimórfico en animales que cursan la infección. Sin lugar a dudas el presente trabajo es pionero en el estudio dimórfico en animales experimentales, debido a que es el primero que ha buscado estos cambios a nivel de vía respiratoria alta, por considerarla comprometida con las etapas iniciales de la interacción hospedero/parásito.

Para estudiar el cambio dimórfico del hongo *in vivo*, en este trabajo se diseñó una estrategia elegante utilizando el método de RT-PCR que evidenció la presencia de los transcritos específicos de cada morfotipo de *H. capsulatum* en sitios y tiempos definidos. La RT-PCR de los genes *MS8* (específico de la fase M) y *YPS3* (específico de la fase L), reveló las bandas esperadas correspondientes para cada gen tanto en la MN como en los GLC de murciélagos y de ratones. La observación cronológica de las bandas correspondientes a cada morfotipo de *H. capsulatum*, mostró que el marcador *MS8* aparece desde los 40 min y hasta 1 h post-infección en la MN de murciélagos, lo que sugiere que los propágulos miceliales del hongo persisten hasta este tiempo. Inversamente, los transcritos del marcador *YPS3* se incrementaron a partir de 1 h post-infección, lo que sugiere que las células levaduriformes del hongo iniciaron su cambio desde este tiempo y persistieron en los tiempos subsiguientes. Por otro lado, en ratones, los transcritos del gen *MS8* se expresaron más tardíamente y desaparecen totalmente a las 2 h, mientras que los del gen *YPS3* presentaron un comportamiento similar al observado en murciélagos, lo que sugiere que el cambio dimórfico de *H. capsulatum* en condiciones experimentales *in vivo* es más temprano en murciélagos que en ratones. Asimismo, la cronología de la aparición de bandas de cada morfotipo del hongo en GLC evidenció que en ningún tiempo analizado, tanto en murciélagos como en ratones, se expresó el marcador *MS8*, lo que sugiere que todo el inóculo micelial se convirtió a levaduras previo a su llegada a ganglio, ya que en éste sólo se revelaron las bandas correspondientes al marcador *YPS3*.

Los resultados del presente trabajo, aportan pruebas fehacientes de que *H. capsulatum* puede iniciar el cambio dimórfico y la diseminación a partir del epitelio de la MN,

incluyendo el NALT. Este linfoepitelio, en particular, puede jugar un papel importante en la ruta de infección aérea y en la diseminación del patógeno, ya que está altamente vascularizado hemática y linfáticamente. La presencia de levaduras en los GLC de ambas especies animales estudiadas, plantea la posibilidad de que las CD observadas en la MN y el NALT transporten al hongo a través de los vasos sanguíneos y linfáticos que drenan a estos tejidos. Por esta vía, podrían llegar a los ganglios linfáticos regionales más cercanos, donde algunas levaduras serían procesadas *in situ* con la participación, además, de células residentes presentadoras de antígenos (CD y macrófagos), disparando desde el ganglio linfático la respuesta inmune adaptativa. Es posible además que algunas levaduras extra- o intracelulares que no fueron procesadas en los ganglios continuarían su viaje vía hemática y/o linfática, para alcanzar la diseminación sistémica a otros órganos del hospedero. Es interesante destacar el hecho ya conocido de que los murciélagos no presentan una reacción inflamatoria importante ante la infección por *H. capsulatum* (McMurray & Greer, 1979; Taylor *et al.*, 1999a), como la que se observa en tejidos de humano y murino.

Sin embargo, cabría destacar, la importancia de un análisis más preciso del papel que juega el NALT en este evento de infección, ya que es posible que en este mismo tejido se monte una respuesta rápida de defensa una vez que cuenta con todos los elementos necesarios para ésta, con lo que la infección se resolvería dependiendo de diversos factores como la cantidad del inóculo fúngico, la virulencia de la cepa, el estado inmunológico del hospedero, entre otros.

El papel de las CD en el reconocimiento, transporte, procesamiento y destino de *H. capsulatum* ha sido ampliamente estudiado por otros investigadores (Gildea *et al.*,

2001; Newman, 2005). En este trabajo, las CD son las candidatas ideales para explicar la movilización del hongo desde la MN de los animales infectados hasta sus GLC, considerando que CD subepiteliales e intersticiales con levaduras intracelulares fueron identificadas en MN, asimismo, se encontraron CD con levaduras fagocitadas en GLC de ambos modelos animales. Si bien, *H. capsulatum* puede utilizar otros mecanismos para transportarse (McMahon *et al.*, 1995; Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2004), hacerlo mediante CD resulta ser la ruta menos complicada para llegar a los ganglios linfáticos y de ahí a otros órganos internos.

Los hongos en general poseen una variedad de “patrones moleculares asociados a patógenos”, los cuales son capaces de interactuar con diversos fagocitos e inducir la fagocitosis activando diferentes rutas de señalización al ser reconocidos por diferentes receptores como los  $\beta$ -glucánicos (Dectin-1 entre otros), los del complemento, los tipo-lectinas que unen manosa y los receptores tipo Toll (TLRs), principalmente TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 (Acorci-Valério *et al.*, 2010; Bellocchio *et al.*, 2004; Kesh *et al.*, 2005; Montagnoli *et al.*, 2002; Roeder *et al.*, 2004; Romani, 2002; Romani *et al.*, 2002; 2004; Sassá *et al.*, 2009; Schorey, 1997; Zhang *et al.*, 2006). En particular, en *H. capsulatum* se ha comprometido la participación de TLR-2 en pacientes con SIDA (Sorgi *et al.*, 2009) y se encontró que la proteína específica de fase levaduriforme Yps3 induce señalización a través de TLR-2 (Aravalli *et al.*, 2008).

Los resultados de este trabajo, que conjunta análisis morfológicos, inmunohistoquímicos y moleculares, en tejidos de murciélagos y ratones infectados sugieren: 1) que *H. capsulatum* presenta una vía alterna de cambio dimórfico y diseminación que compromete vías respiratorias altas (MN) y GLC, y difiere de la

tradicionalmente aceptada que sólo involucra al pulmón como único órgano blanco; 2) que el dimorfismo fúngico y la diseminación a órganos internos inician más temprano de lo que proponen algunos investigadores (Gildea *et al.*, 2001; Kimberlin *et al.*, 1981; Newman, 2005), donde Kimberlin *et al.* (1981) han observado, en ensayos *ex vivo*, que estos eventos se llevan a cabo en un tiempo estimado de 6 h.

La escasa cantidad de levaduras evidenciadas en la MN de murciélago y la mayor cantidad de células fagocíticas observadas en sus GLC, sugieren que en este mamífero volador, el tránsito del parásito fúngico es aparentemente más rápido, o bien, que tiene un destino diferente al observado en el modelo murino. Por lo anterior, se podría proponer que: 1) existe una posible adaptación co-evolutiva entre *Tadarida* sp. e *H. capsulatum* que empezó desde el Plioceno tardío con el hallazgo de fósiles de especies del género *Tadarida* (Morgan, 1987) y que continúa en el Pleistoceno tardío donde se describió el primer fósil de *T. brasiliensis* (Morgan, 1985) tomando en cuenta que *H. capsulatum* apareció en el Mioceno (18 Ma) y se radió desde Sudamérica hace 3-13 Ma (Kasuga *et al.*, 2003); y 2) las constantes re-infecciones exógenas de murciélagos mantendrían su sistema inmunológico activado para el continuo procesamiento del parásito. Con el apoyo de la biología molecular, se propone que, en la MN del murciélago migratorio *T. brasiliensis*, los propágulos infectivos de *H. capsulatum* son transformados a células levaduriformes a partir de 1 h post-infección y que en esta fase *H. capsulatum* continúa su diseminación hasta alcanzar, a las 2 h post-infección los GLC mediante células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente CD.



Es necesario señalar que en este trabajo no se excluye la ruta clásica de acceso de propágulos infectivos aerosolizados directamente a pulmón, donde algunos investigadores sugieren que se llevan a cabo el cambio dimórfico y la diseminación de *H. capsulatum* (Gildea *et al.*, 2001; Kimberlin *et al.*, 1981; Newman, 2005). Sin embargo, con base en los datos encontrados en la presente investigación se propone que la transición dimórfica y la diseminación de *H. capsulatum* también puede iniciarse antes de llegar al pulmón.

## BIBLIOGRAFÍA

**Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, De Campos Soares AMV.** 2010. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paraccoccidioides brassiliensis*. *Scan J Immunol* 71(2): 99-108.

**Allen HL, Deepe GS Jr.** 2005. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* 115: 2875–2885.

**Allendoerfer R, Biovin GP, Deepe GS Jr.** 1997. Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis. *J Infect Dis* 175: 905-914.

**Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuk C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S.** 2006. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. *Emerg Infect Dis* 12: 163-165.

**Aravalli RN, Hu S, Woods J, Lokensgard JR.** 2008. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *J Neuroinflammation* 5(30): 1-7.

**Arita H.** 1993. Conservation biology of the cave bats of Mexico. *J Mammal* 74: 693-702.

**Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford B, Pitzurra L, Romani L.** 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 173(2): 7406-7415.

**Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling, Robertson V, Knobloch J, Hohle R.** 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 40: 1644–1647.

**Bienenstock J, McDermott MR.** 2005. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev* 206: 22-31.

**Bullock WE.** 1993. Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. *Arch Med Res* 24: 219-223.

**Bullock WE, Wright SD.** 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95 in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med* 165: 195-210.

**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.** 2005a. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. *Rev Argent Microbiol* 37(1): 46-56.

**Canteros CE, Zuiani MF, Davel G, Schmidt G, Ritacco V, Taylor ML** 2005b Brote de histoplasmosis en la Patagonia: identidad genética de los aislamientos. V Congreso Latinoamericano de Micología ALAM, Resumen 258, Brasilia, Brasil.

**Casadevall A, Pirofski LA.** 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67: 3703-3713.

**Chávez-Tapia CB, Peña-Sandoval G, 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 Micol* 20: 61-70.

**Chávez-Tapia** CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, 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 Méx 11: 187-191.

**Constantine** DG. 1988. Health precautions for bat researchers, In T. H. Kunz (ed.), Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats, London: Smithsonian Institution Press, pp. 491-528.

**Deepe Jr** GS, Gibbons RS, Smulian AG. 2008. *Histoplasma capsulatum* manifests preferential invasion of phagocytic subpopulations in murine lungs. J Leuk Biol 84: 669-678.

**Duarte-Escalante** E, Zenteno E, Taylor ML. 2003. Interaction of *Histoplasma capsulatum* yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. Arch Med Res 34(3): 176-183.

**Dumond** A, Robert A. 1970. Electron microscopic study of phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* by hamster peritoneal macrophages. Lab Invest 23: 278-286.

**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, Schlesinger PH. 1993. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. J Exp Med 177: 1605-1611.

**Eissenberg** LG, Schlesinger PH, Goldman WE. 1988. Phagosome-lysosome fusion in P388D1 macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. J Leukocyte Biol 43: 483-491.

**Eissenberg** LG, West JL, Woods JP, Goldman WE. 1991. Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cells by *Histoplasma capsulatum*: selection of avirulent variants and their potential role in persistent histoplasmosis. Infect Immun 59: 1639-1646.

**Fè-d'Ostiani**, C, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. J Exp Med 191: 1661-1674.

**Fernández-Andreu** CM. 1988. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos en Cuba. Rev Cub Med Trop 40: 36-43.

**Fernández-Andreu** CM, Martínez-Machin G. 1992. Fuentes de infección en La Isla de la Juventud, Cuba. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 34: 441-446.

**Gildea** LA, Morris RE, Newman SL. 2001. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. J Immunol 166: 1049-1056.

**Gómez** FJ, Pilcher-Roberts R, Alborzi A, Newman SL. 2010. *Histoplasma capsulatum* cyclophilin A mediates attachment to dendritic cell VLA-5. J Immunol 181: 7106-7114.

**Gorocica** P, Taylor ML, Alvarado-Vasquez N, Pérez-Torres A, Lascurain R, Zenteno E. 2009. Interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: its relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(3): 492-496.

**Heritage** P, Underdown B, Arsenault A, Snider D, Dermott M. 1997. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. Am J Respir Crit Care Med 156: 1256-1262.

- Hibbett DS**, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten-Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111: 509-547.
- Hilty J**, Smulian G, Newman SL. 2008. The *Histoplasma capsulatum* vacuolar ATPase is required for iron homeostasis, intracellular replication in macrophages and virulence in a murine model of histoplasmosis. *Mol Microbiol* 70(1): 127–139.
- Hoff GL**, Bigler WJ. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J Wildlife Dis* 17: 191-196.
- Index** Fungorum. 2010. <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=417609>.
- James TY**, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Jeréz ME**, Taylor ML. 1989. Estudio del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de levaduras de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Mex Mic* 5: 241-259.
- 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, Negróni 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 polymorphism in a nuclear gene. *J Clin Microbiol* 30: 2104-2107.
- Kesh S**, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, Van Den Brink M, O'reilly R, Pamer E, Satagopan J., Papanicolaou GA. 2005. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann NY Acad Sci* 1062: 95–103.
- Kimberlin C**, Harri A, Hempel H, Goodman N. 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.
- Klite PD**, Diercks FH. 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats

in the canal zone. *Am J Trop Med Hyg* 14: 433-439.

**Kwon-Chung** KJ. 1972a. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 175: 326.

**Kwon-Chung** KJ. 1972b. *Emmonsia capsulata*: perfect state of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 177: 368-369.

**Kwon-Chung** KJ, Bennett JE. 1992. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

**Lane** TE, Wu-Hsieh BA, Howard DH. 1994. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 62: 1940-1945.

**Lappe** P, Ulloa M, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 1998. Levaduras asociadas con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 11(3): 162-172.

**León** ME, Zepeda A, Oliva E, Barrios R, Taylor ML. 1989. Cinética de infección de la línea celular de M $\phi$  J774.2 con *Histoplasma capsulatum*: estudio por microscopía electrónica. *Rev Lat-Amer Microbiol* 31: 23-29.

**Lin** JS, Yang CW, Wang DW, Wu-Hsieh BA. 2005. Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 174: 6282-6291.

**Lotze** M, Thomson A. 2001. *Dendritic cells*. 2<sup>a</sup> ed. London: Academic Press.

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

**Marion** CL, Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. 2006. An  $\alpha$ -(1,4)-amylase is essential for  $\alpha$ -(1,3)-glucan production and virulence in

*Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol* 62(4): 970-83.

**McGinnis** MR, Katz B. 1979. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsia*. *Mycotaxon* 8: 157-164.

**McMahon** JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin II WJ. 1995. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J Clin Invest* 96: 1010-1017.

**McMurray** DN, Greer DL. 1979. Immune responses in bats following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. *Am J Trop Med Hyg* 28: 1036-1039.

**Medellín** RA, Arita HT, Sánchez O. 1997. Identificación de los murciélagos de México, clave de campo. México, D.F.: Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C., publicaciones especiales Número 2, 83 pp.

**Medoff** G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S. 1987. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 55: 1355-1358.

**Mendes-Giannini** MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, Escalante ED, Hanna AS, Lenzi HL, Machado MP, MM Monteiro, Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Trochin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. 2000. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38: 113-123.

**Montagnoli** C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Romani L. 2002. The interaction of fungi with dendritic cells: Implications for Th immunity and vaccination. *Curr Mol Med* 2: 485-505.

**Morgan** GS. 1985. Fossil bats (Mammalia: Chiroptera) from the late Pleistocene and Holocene Vero fauna, Indian River County, Florida. *Brimleyana* 11: 97-117.

**Morgan** GS, Ridgway RB. 1987. Late Pliocene (late Blancan) vertebrates from the St. Petersburg Times site, Pinellas County, Florida, with a brief review of Florida Blancan faunas, Florida. *Paleontology* 1: 1-22.

**Nakamura** L T, Wu-Hsieh B A, Howard DH. 1994. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 62: 680 – 684.

**Newman** SL. 1999. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol* 7: 67-71.

**Newman** SL. 2005. Interaction of *Histoplasma capsulatum* with human macrophages, dendritic cells, and neutrophils. *Methods Mol Med* 118: 181-191.

**Newman** SL, Bucher C, Rhodes J, Bullock WE. 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J Clin Invest* 85: 223-230.

**Newman** SL, Gootee L, Brunner G, Deepe GS. 1994. Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *J Clin Invest* 93(4): 1422-1429.

**Newman** SL, Gootee L, Gabay JE. 1993. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. *J Clin Invest* 92: 624-631.

**Newman** SL, Gootee L, Hilty J, Morris RE. 2006. Human macrophages do not require phagosome acidification to mediate fungistatic/fungicidal activity against *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 176: 1806-1813.

**Newman** SL, Gootee L, Morris R, Bullock WE. 1992. Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeasts by human macrophages. *J Immunol* 149: 574-580.

**Newman** SL, Holly A. 2001. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun* 69: 6813–6822.

**Odds** FC, Gow NAR, Brown AJP. 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol* 2(3): 1009.1-1009.4.

**Rappleye** CA, Goldman WE. 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 69: 281-303.

**Retallack** D, Woods JP. 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Microbes Infect* 1: 817-825.

**Roeder** A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. 2004. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* 42(6): 485-498.

**Romani** L. 2002. Innate immunity against fungal pathogens. In R. A. Calderone, R. L. Chilar (eds.), *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*, New York: Marcel Dekker, pp. 401-432.

**Romani** L, Bistoni F, Gaziano R, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Pitzurra L, Bellocchio S, Velardi A, Rasi G, di Francesco P, Garaci E. 2004. Thymosin 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through Toll-like receptor signaling. *Blood* 103: 4232-4239.

**Romani** L, Bistoni F, Puccetti P. 2002. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 10: 508-514.

- Russell** AL, Medellín RA, McCracken GF. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Mol Ecol* 14(7): 2207-2222.
- Sassá** MF, Saturi AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. 2009. Response of macrophage toll-like receptor 4 to *Sporotrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology* 128(2): 301-309.
- Schaffner** A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AL. 1986. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* 78: 511-524.
- Schorey** JS. 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277: 1091-1093.
- Schunur** RA, Newman SL. 1990. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. *J Immunol* 144: 4765-4772.
- Shi** L, Priscila C, Albuquerque E, Lazar-Molnar, Wang X, Santambrogio L, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008. A monoclonal antibody to *Histoplasma capsulatum* alters the intracellular date of the fungus in murine macrophages. *Euk Cell* 7: 1109-1117.
- Sorgi** CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belangér C, de Medeiros AI, Kashima S, Marleau S, Covas DT, Bozza PT, Faccioli LH. 2009. *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 182(7): 4025-4035.
- 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.
- Strasser** JE, Newman SL, Ciruolo GM, Morris RE, Howell ML, Dean GE. 1999. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 162: 6148-6154.
- Suárez-Alvarez** RO, Taylor ML, Pérez-Torres A. 2009. Identificación histológica del tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) en el murciélago migratorio *Tadarida brasiliensis*. *LAB acta* 21: 5-8.
- Suárez-Alvarez** RO, Pérez-Torres A, ML Taylor. 2010. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. *Mycopathologia* (en prensa).
- Taylor** ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol* 30: 207-212.
- 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: 451-458.
- Taylor** ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. 1999a. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *Am J Trop Med Hyg* 61: 914-919.
- Taylor** ML, Duarte-Escalante E. 1995. Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para

evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos. Rev Invest Clin 47: 499-506.

**Taylor** ML, Duarte-Escalante E, Pérez A, Zenteno E, Toriello C. 2004. *Histoplasma capsulatum* yeast cells attach and agglutinate human erythrocytes. Med Mycol 42: 287-292.

**Taylor** ML, Duarte-Escalante E, Reyes-Montes MR, Elizondo N, Maldonado G, Zenteno E. 1998. Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. Clin Exp Immunol 113: 423-428.

**Taylor** ML, Espinosa-Schoelly ME, Rico-Galindo B, Casasola J, Goodsaid F. 1989. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. Clin Exp Immunol 75: 466-470.

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

**Taylor** ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. 1999b. Catálogo de cepas de "*Histoplasma capsulatum*". México, DF: Facultad de Medicina, UNAM.

**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, In L. Ajello, R. J. Hay (eds.), Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. Volume 4, New York: Arnold and Oxford University Press Inc., pp. 373-393.

**Ulloa** M, Lappe P, Aguilar S, Park H, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 2006. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. Rev Mex Biodiver 77(2): 153-168.

**Ulloa** M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. 1998. Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 11(3): 173-182.

**Vargas-Yañez** R, Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML. 1998. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 11: 192-194.

**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.

**Voller** A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), A Guide with Abstracts of Microplate Applications. London: Dynatech Europe Laboratories Inc.

**Wolf** JE, Abegg AL, Travis SJ, Kobayashi GS, Little JR. 1989. Effects of *Histoplasma capsulatum* on murine macrophage functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst, and antifungal activities. Infect Immun 57: 513-519.

**Wolf** JE, Massof SE. 1990. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. Infect Immun 58: 1296-1300.

**Wolf** JE, Massof SE, Peters SP. 1992a. Alterations in murine macrophage arachidonic acid metabolism following ingestion of nonviable *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 60: 2559-2564.



**Wolf JE**, Massof SE, Sherwin JR, Considine RV. 1992b. Inhibition of murine macrophage protein kinase C activity by nonviable *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 60: 2683-2687.

**Woods JP**. 2002. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol* 35: 81–97.

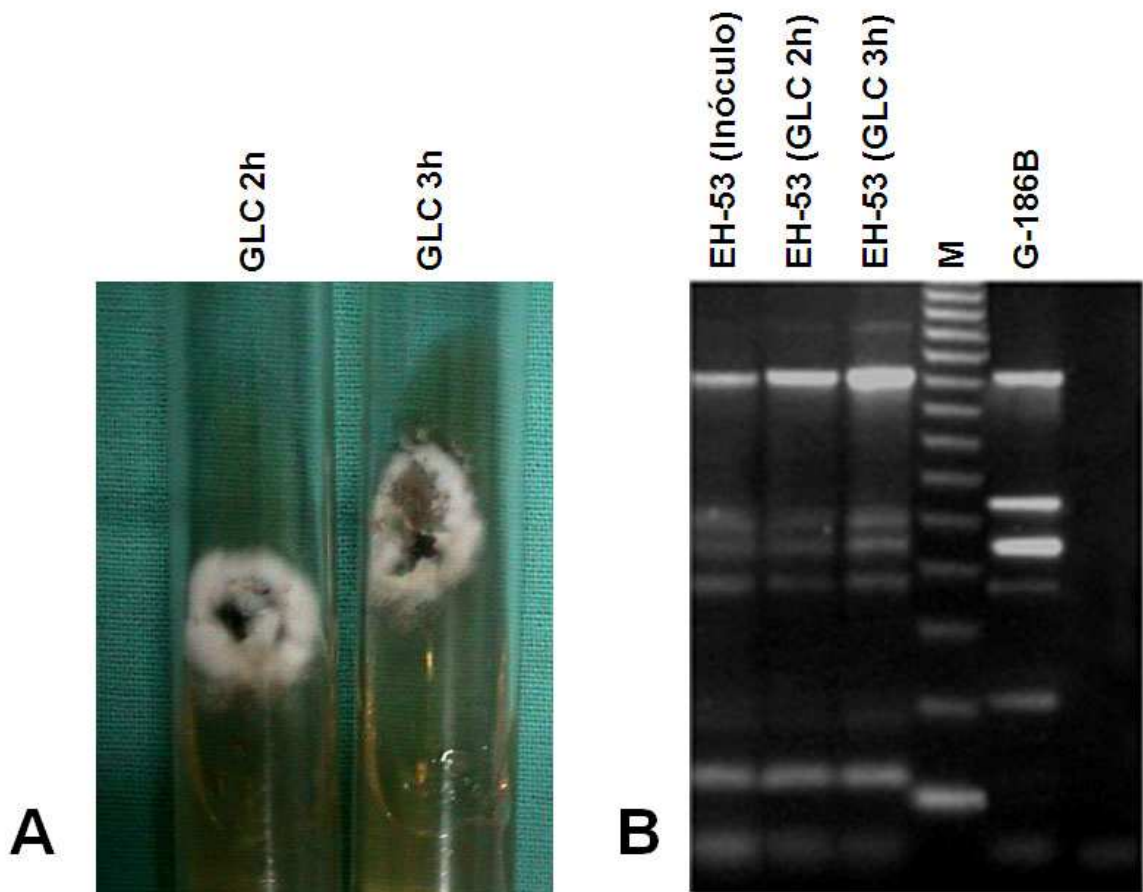
**Woods JP**, Heinecke EL, Luecke JW, Maldonado E, Ng JZ, Retallack DM, Timmerman MM. 2001. Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Sem Resp Infect* 16: 91–101.

**Zarnowski R**, Cooper KG, Schmitt-Brunold L, Calaycay J, Woods JP. 2008. *Histoplasma capsulatum* secreted  $\gamma$ -glutamyltransferase reduces iron by generating an efficient ferric reductant. *Mol Microbiol* 70(2): 352–368.

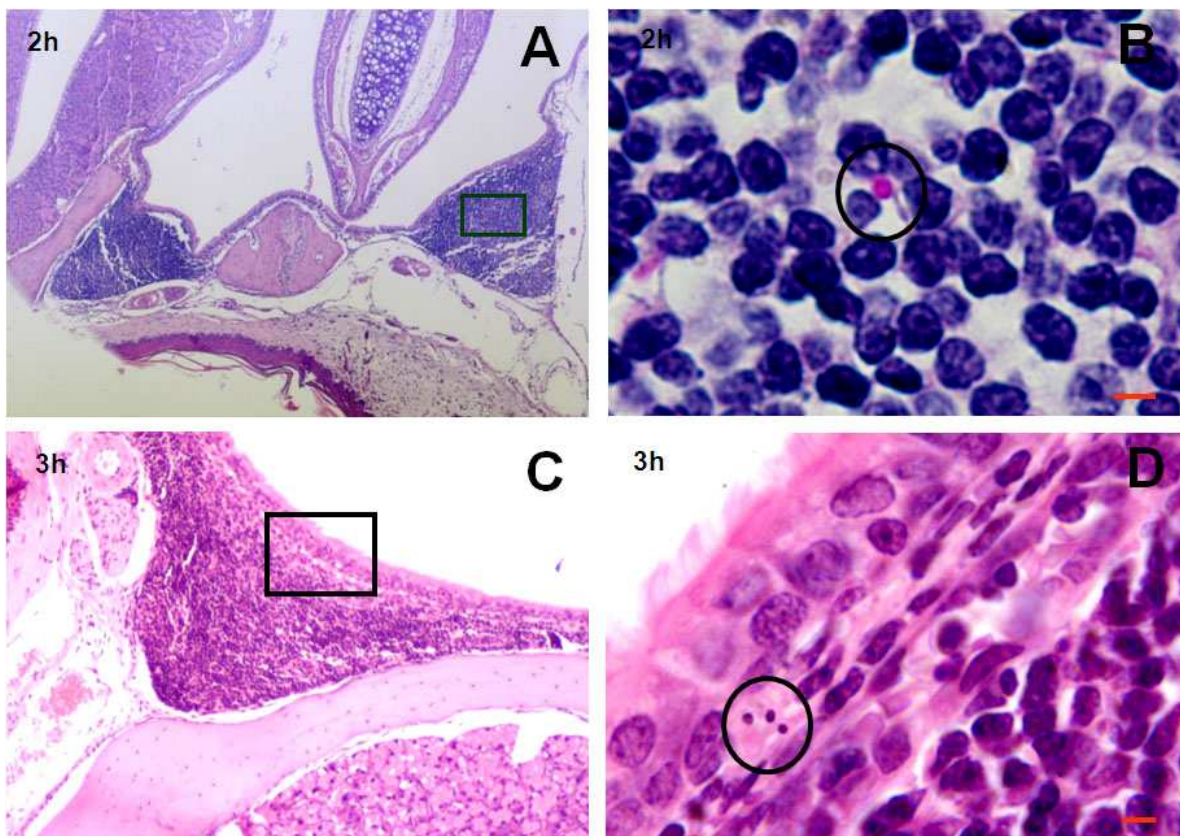
**Zhang C**, Wang SH, Lasbury ME, Tschang D, Liao CP, Durant PJ, Lee CH. 2006. Toll-like receptor 2 mediates alveolar macrophage response to *Pneumocystis murina*. *Infect Immun* 74(3): 1857-1864.

**Zuercher AW**, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. 2002. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J Immunol* 168: 1796-1803.

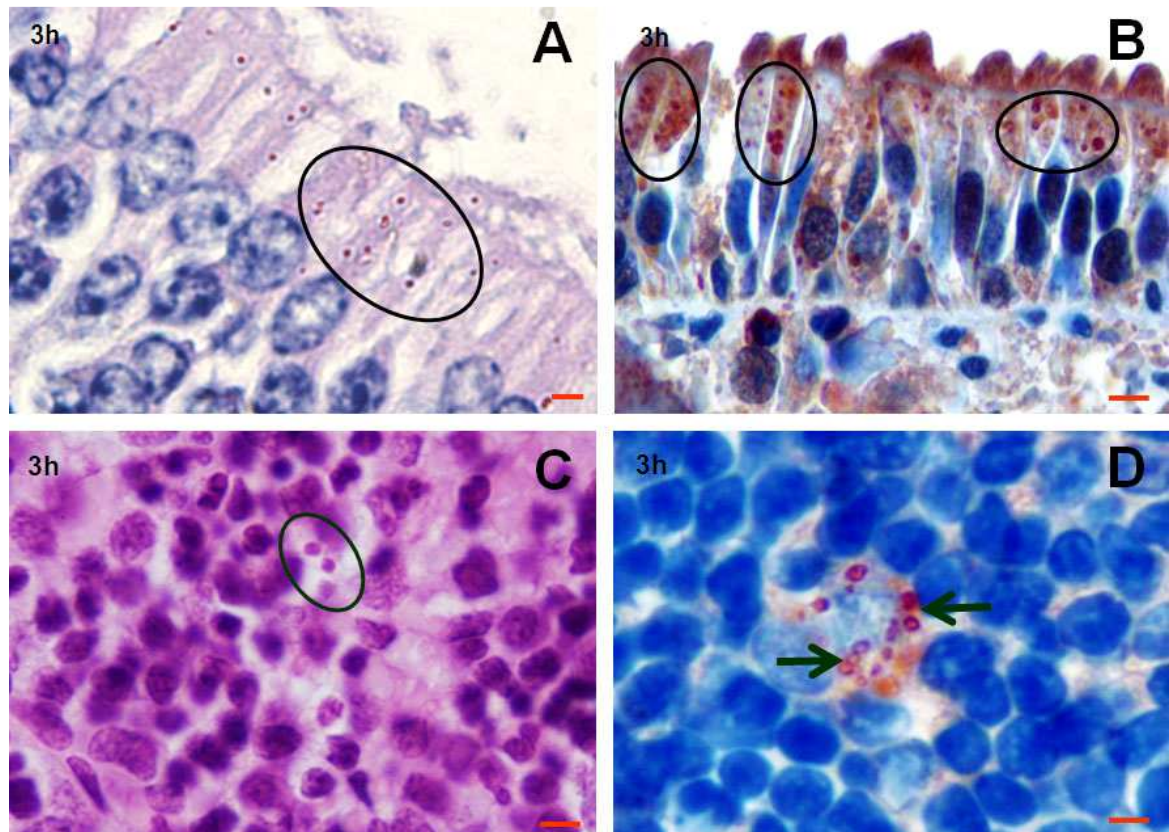
FIGURAS



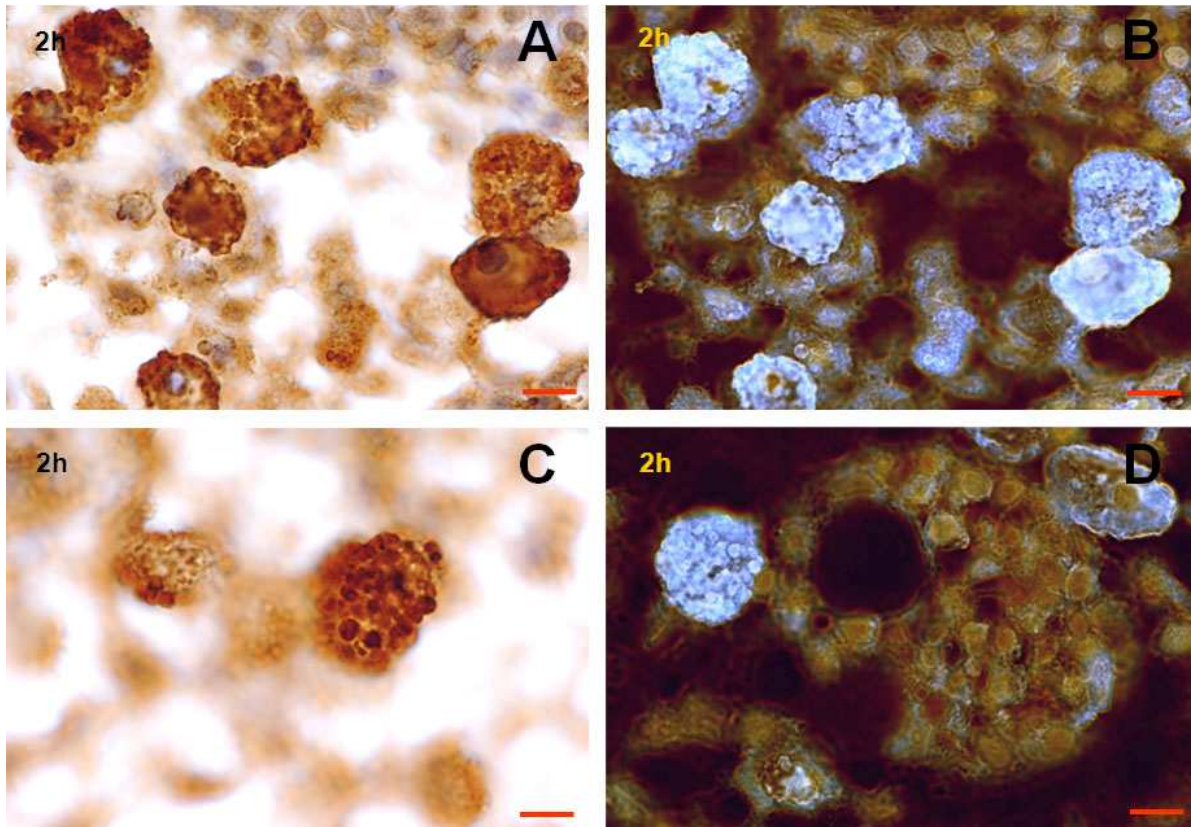
**Fig. 1- Reislamiento de *H. capsulatum* a partir de murciélagos inoculados.** A) Cultivo de agar-micobiótico con la fase micelial del hongo recuperado de fragmentos de GLC de murciélagos sacrificados a las 2 y 3 h post-infección; B) Perfil de RAPD-PCR del inóculo inicial de la cepa EH-53 y de los reislamientos de GLC, utilizando como referencia la cepa G-186B. M: marcador de tamaño molecular (100 bp).



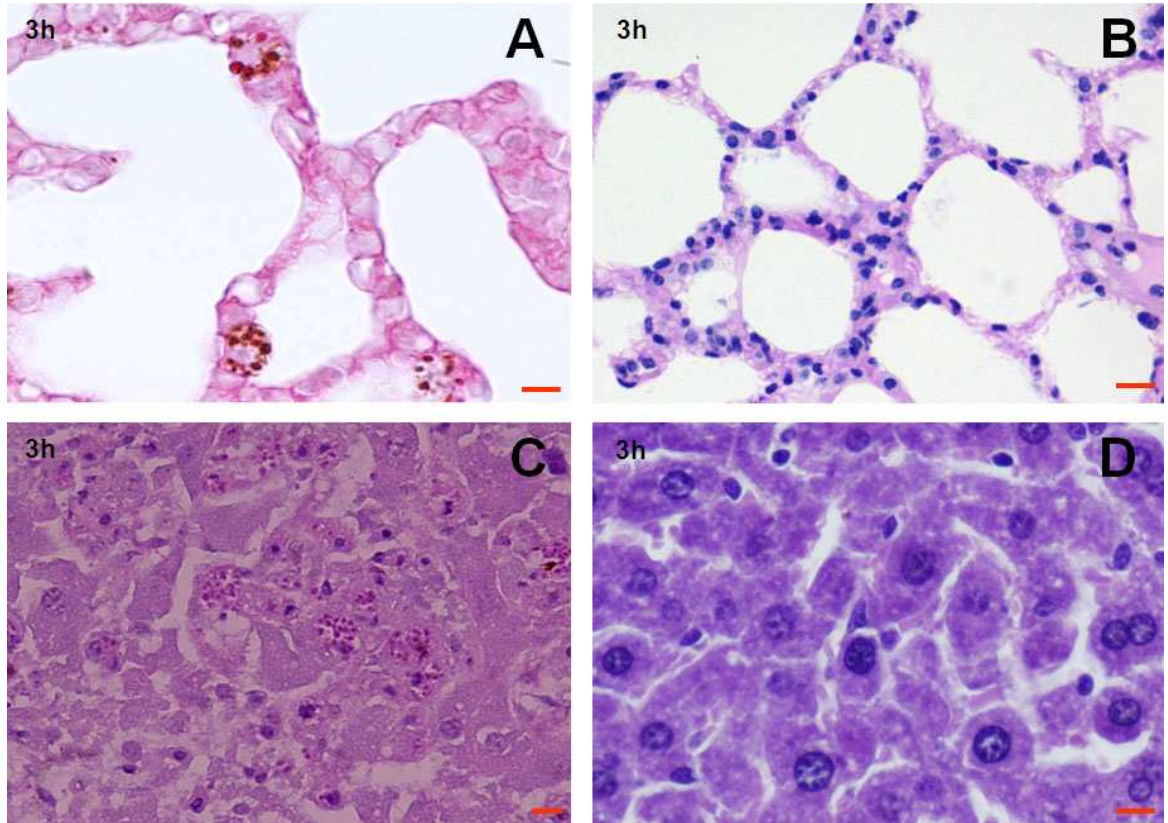
**Fig. 2- Levaduras de *H. capsulatum* en NALT de murciélagos y ratones.** A) NALT de murciélago, 2 h post-infección con micelio de *H. capsulatum*. El recuadro negro está amplificado en la figura 2B, PAS, 100x; B) Levaduras extracelulares de *H. capsulatum* en el NALT de murciélago, PAS, 1000x; C) NALT de ratón, 3 h post-infección con micelio de *H. capsulatum*. El recuadro negro está amplificado en la figura 2D, HE, 100x; D) Levaduras extracelulares de *H. capsulatum* en el NALT de ratón, HE, 1000x. Barras= 10  $\mu$ m. Los círculos encierran levaduras de *H. capsulatum*.



**Fig. 3.- Levaduras de *H. capsulatum* en MN y GLC de murciélagos y de ratones.** A) MN de murciélago, IHQ, 1000x; B) MN de ratón, IHQ, 1000x; C) Levaduras de *H. capsulatum* adheridas a fagocitos en GLC de murciélago, PAS, 1000x; D) Levaduras de *H. capsulatum* intracelulares en una CD en GLC de ratón, doble IHQ, 1000x. Las IHQ, fueron reveladas con AEC (coloración rojiza) y contrateñidas con hematoxilina de Mayer. Los óvalos y las flechas encierran y señalan levaduras de *H. capsulatum*, respectivamente.

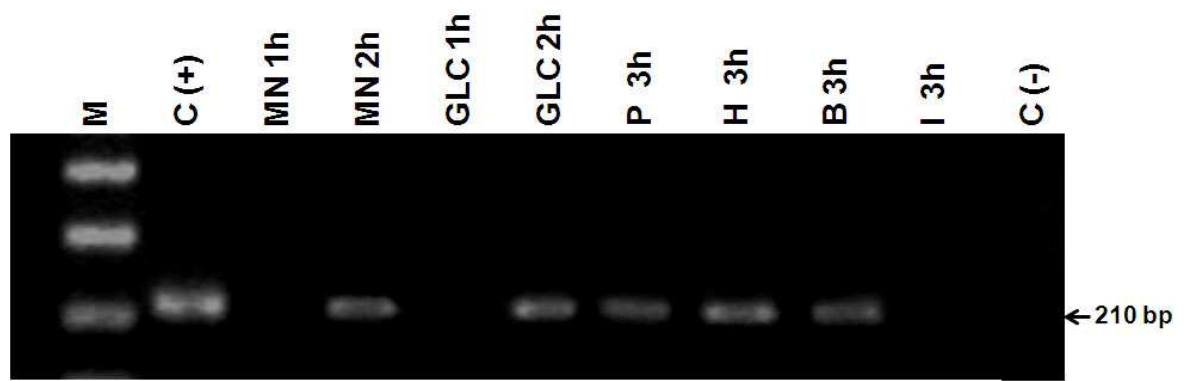


**Fig. 4.- Levaduras de *H. capsulatum* en GLC de murciélagos.** GLC obtenido a las 2 h post-infección. El material fue procesado para IHQ por el método de inmunoperoxidasa simple con suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (ver detalles en Materiales y Métodos). Levaduras intrafagocíticas observadas con campo claro (A y C); en B y D se modificó electrónicamente la saturación del color para acentuar el contraste de la IHQ en relación con el resto del tejido linfoide. Todas las imágenes presentan un aumento de 1000x.

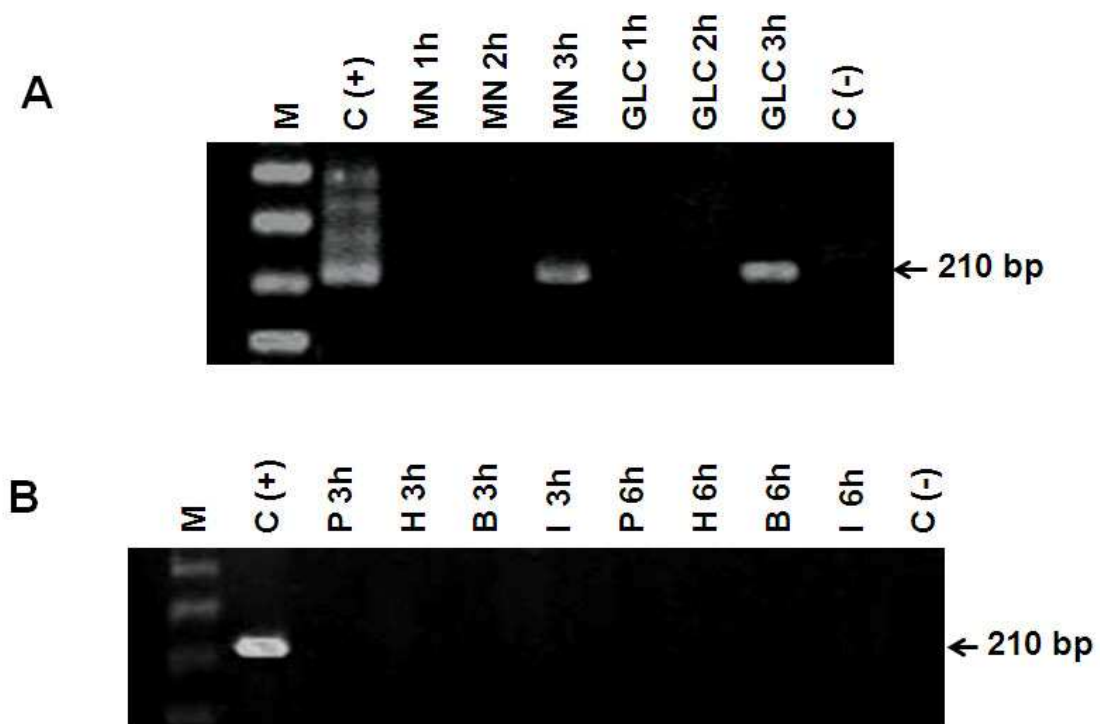


**Fig. 5.- Levaduras de *H. capsulatum* en pulmón e hígado de murciélagos y de ratones.**

Los órganos analizados fueron obtenidos a las 3 h post-infección, los procedimientos previos a las tinciones histológicas de rutina HE y PAS vienen descritos en Materiales y Métodos. A) Parénquima pulmonar de murciélago mostrando levaduras intracelulares en neumocitos, PAS, 1000x; B) Parénquima pulmonar de ratón con ausencia de levaduras, HE, 1000x; C) Hígado de murciélago con numerosas levaduras intracelulares, PAS, 400x; D) Hígado de ratón con ausencia de levaduras, HE, 1000x.

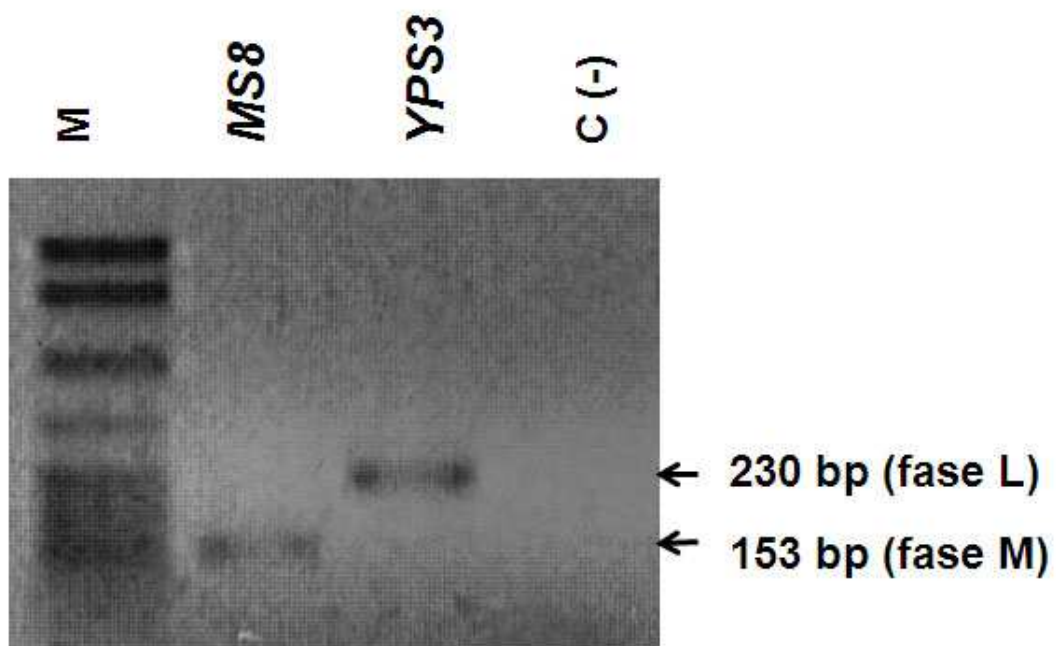


**Fig. 6.- PCR-anidada del DNA de órganos de murciélagos infectados intranasalmente con *H. capsulatum*.** Se siguió el procedimiento para el marcador molecular (Hcp100) que codifica para una proteína co-activadora de 100 kDa, como viene descrito en Materiales y Métodos. MN: mucosa nasal extraída 1 y 2 h post-infección; GLC: ganglio linfático cervical extraído 1 y 2 h post-infección; P: pulmón; H: hígado; B: bazo; I: intestino- extraídos a 3 h post-infección. M: marcador de tamaño molecular (100 bp); C (+): testigo positivo; C (-): testigo negativo (Ver detalles en Materiales y Métodos). La flecha indica las bandas correspondientes al producto amplificado esperado de 210 bp.

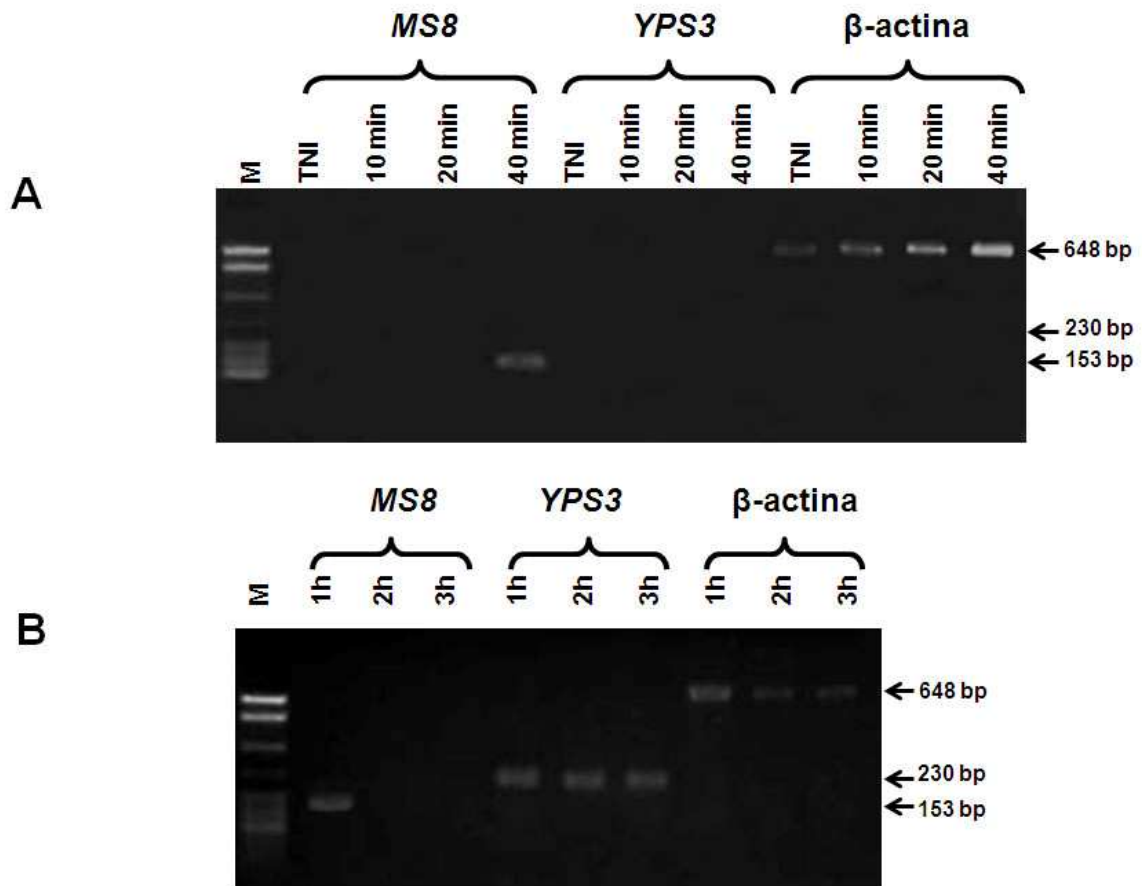


**Fig. 7.- PCR-anidada del DNA de órganos de ratones infectados intranasalmente con *H. capsulatum*.** Se siguió el procedimiento para el marcador molecular (Hcp100) que codifica para una proteína co-activadora de 100 kDa, como viene descrito en Materiales y Métodos. A) MN: mucosa nasal extraída 1, 2 y 3 h post-infección; GLC: ganglio linfático cervical a 1, 2 y 3 h post-infección. M: marcador de tamaño molecular (100 bp); C (+): testigo positivo; C (-): testigo negativo. B) Otros órganos extraídos de ratones sacrificados a 3 y 6 h post-infección, P: pulmón; H: hígado; I: intestino; B: bazo. M: marcador de tamaño molecular (100 bp); C (+): testigo positivo; C (-): testigo negativo (Ver detalles en Materiales y Métodos). Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos amplificados esperados de 210 bp.

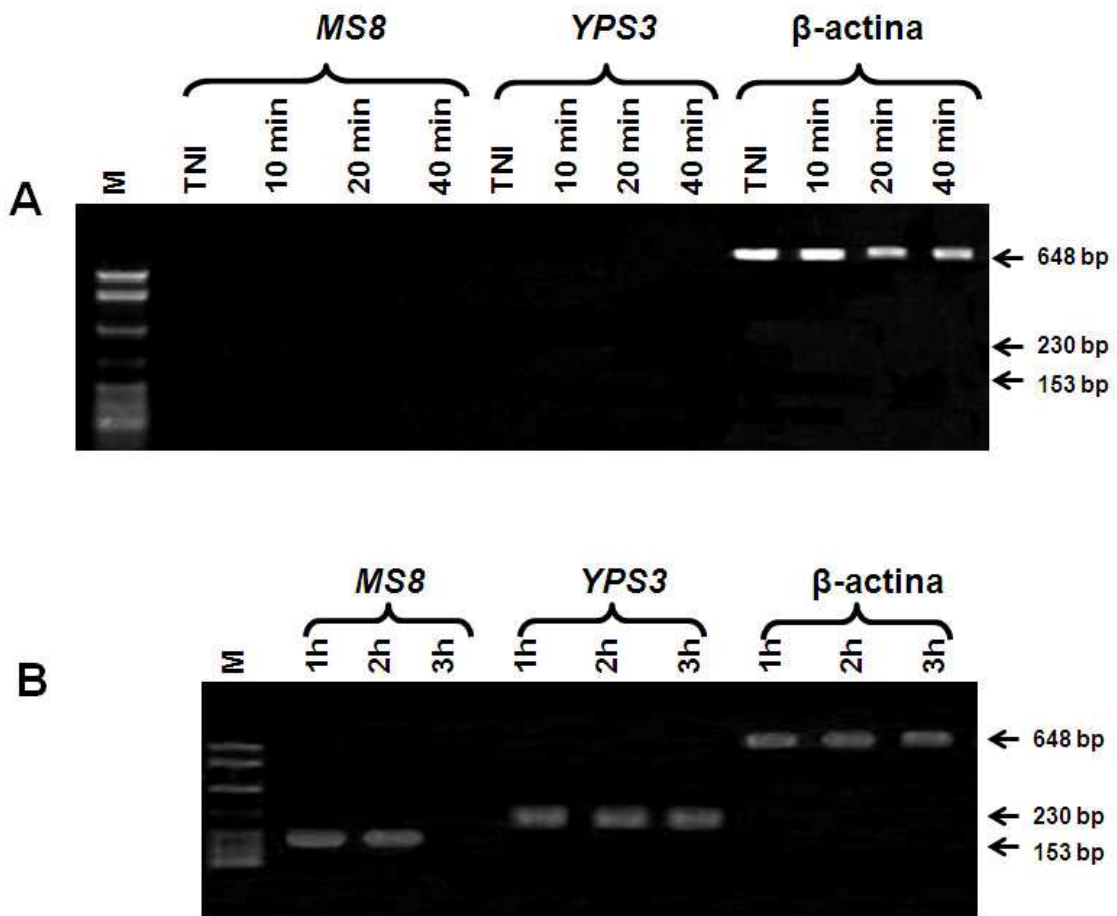




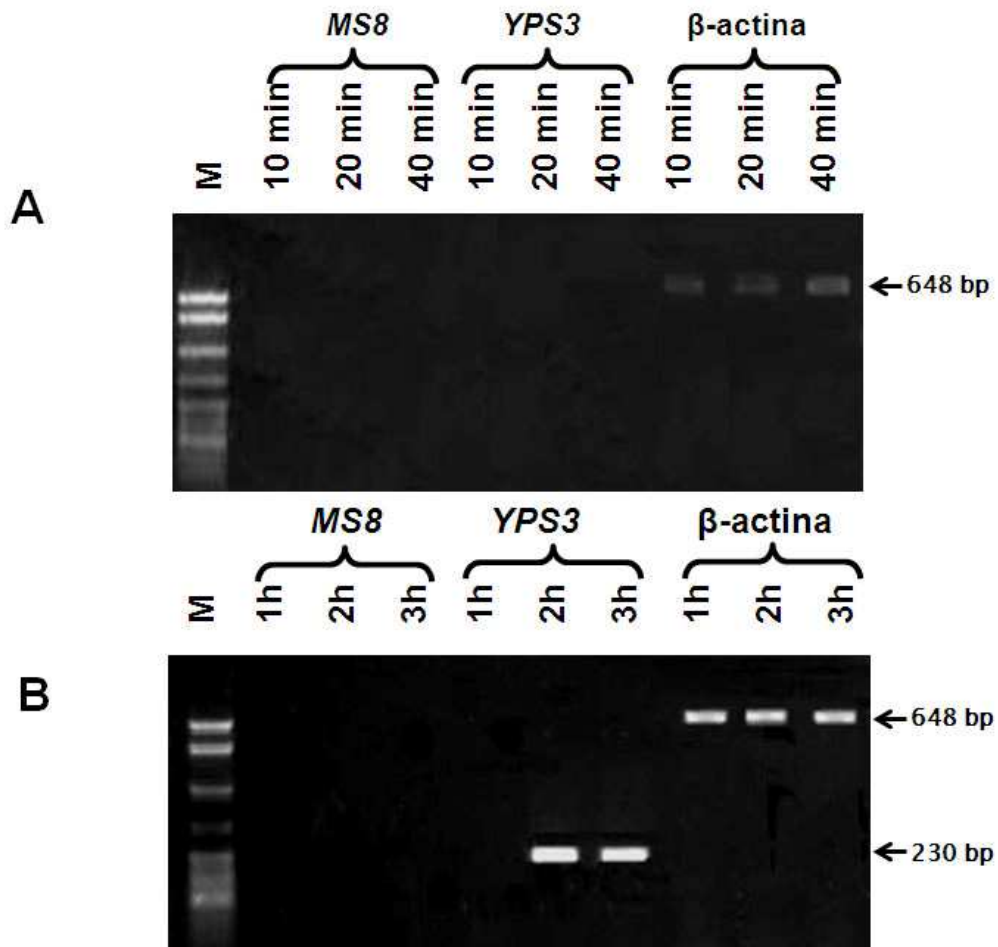
**Fig. 8.-** Expresión de los transcritos de los genes *MS8* (fase M) y *YPS3* (fase L) a partir de cultivos puros, mediante RT-PCR. La biomasa cosechada del cultivo puro de cada morfotipo fue procesada para la obtención del RNA con el kit de un sólo paso SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen). Se siguió el procedimiento según lo descrito en Materiales y Métodos. Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos esperados de los marcadores de fase M (153 bp) y de fase L (230 bp). M: marcador de tamaño molecular (123 bp); C (-) testigo negativo.



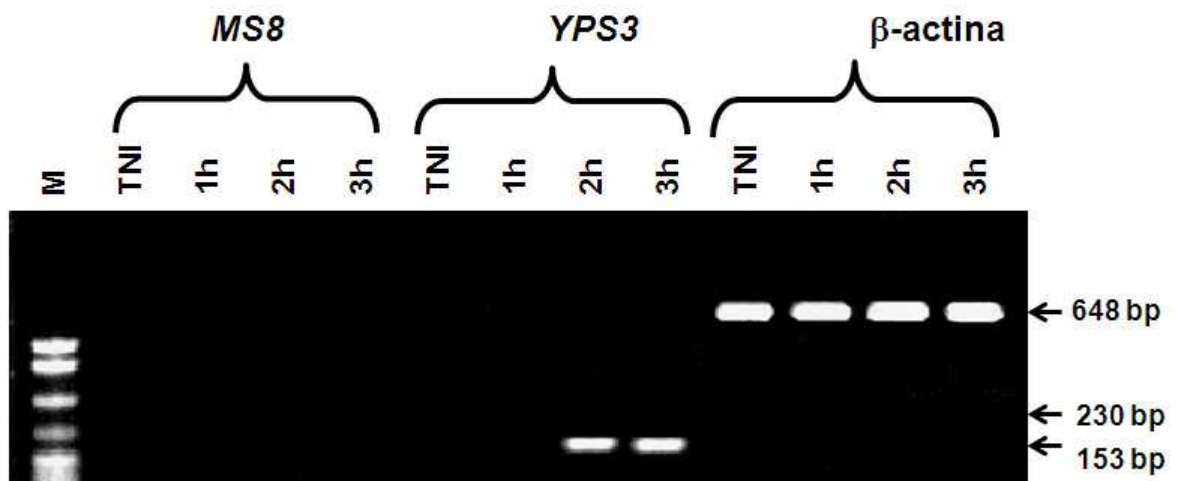
**Fig. 9.- Expresión *in vivo* mediante RT-PCR de los transcritos de *MS8* y *YPS3* en MN de murciélagos, a diferentes tiempos post-infección con *H. capsulatum*.** Se realizó la extracción de RNA total de MN con el propósito de detectar la presencia de transcritos de cada morfotipo fase-específico de *H. capsulatum*. Se utilizó el kit de un sólo paso SuperScript III One-Step RT-PCR System, según lo descrito en Materiales y Métodos. A) Corresponde a los tiempos menores a 1 h post-infección; B) Corresponde a los tiempos mayores de 40 min. Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos esperados de los marcadores de fase M (153 bp) y de fase L (230 bp) y al testigo positivo del sistema de RT-PCR representado por el marcador de la β-actina (648 bp). M: marcador de tamaño molecular (123 bp); TNI: testigo de no infección (negativo).



**Fig. 10.-** Expresión *in vivo* mediante RT-PCR de los transcritos de *MS8* y *YPS3* en MN de ratones, a diferentes tiempos post-infección con *H. capsulatum*. Se realizó la extracción de RNA total de MN y se procedió de manera similar a lo descrito en la figura anterior (ver Materiales y Métodos). A) Corresponde a los tiempos menores a 1 h post-infección; B) Corresponde a los tiempos mayores de 40 min. Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos esperados de los marcadores de fase M (153 bp) y de fase L (230 bp) y al testigo positivo del sistema de RT-PCR representado por el marcador de la  $\beta$ -actina (648 bp). M: marcador de tamaño molecular (123 bp); TNI: testigo de no infección (negativo).



**Fig. 11.- Expresión *in vivo* mediante RT-PCR de los transcritos de *MS8* y *YPS3* en GLC de murciélagos, a diferentes tiempos post-infección con *H. capsulatum*. Se realizó la extracción de RNA total de GLC con el propósito de detectar la presencia de transcritos de cada morfotipo fase-específico de *H. capsulatum*. Se utilizó el kit de un sólo paso SuperScript III One-Step RT-PCR System, según lo descrito en Materiales y Métodos. A) Corresponde a los tiempos menores a 1 h post-infección; B) Corresponde a los tiempos mayores de 40 min. Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos esperados de los marcadores de fase M (153 bp) y de fase L (230 bp) y al testigo positivo del sistema de RT-PCR representado por el marcador de la  $\beta$ -actina (648 bp). M: marcador de tamaño molecular (123 bp).**



**Fig. 12.- Expresión *in vivo* mediante RT-PCR de los transcritos de *MS8* y *YPS3* en GLC de ratones, a diferentes tiempos post-infección con *H. capsulatum*.** Se realizó la extracción de RNA total de GLC y se procedió de manera similar a lo descrito en la figura anterior (ver Materiales y Métodos). En este ensayo sólo se utilizaron los tiempos mayores de 40 min. Las flechas indican las bandas correspondientes a los productos esperados de los marcadores de fase M (153 bp) y de fase L (230 bp) y al testigo positivo del sistema de RT-PCR representado por el marcador de la  $\beta$ -actina (648 bp). M: marcador de tamaño molecular (123 bp); TNI: testigo de no infección (negativo).