



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Extracción de DNA y amplificación de los *loci*  
*arf*, *anti-H*, *ole* y *tub* de *Histoplasma*  
*capsulatum*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

**STEVEN MENDEZ RAMOS**

Directora de Tesis:  
Dra. Rosa Areli Martínez Gamboa

Asesoras: Dra. Raquel Retana Ugalde  
Mtra. Yolanda Flores Cabrera



Ciudad de México

septiembre 2021



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.

## **Agradecimientos.**

Agradezco a Dios que me ha mostrado el camino y me permitió gozar de salud durante el desarrollo de este proyecto. Que Dios bendiga a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Microbiología Clínica hoy y siempre.

Gracias a la Dra. Areli por su apoyo, los consejos y paciencia que me ha brindado. Su forma de trabajo me oriento hacia la organización no solo en lo académico sino también en mi experiencia laboral. Gracias por su confianza y ánimo para poder trabajar y realizar mi Tesis.

A Araceli y Ernesto que a los pocos meses de entrar en el laboratorio con el propósito de titularme confiaron en mí, me ayudaron a tener empleo en el INCMNSZ, gracias. Contratos que gracias a Dios se han ido renovando cada vez.

A Janet, mi esposa, mi mejor amiga, mi persona, mi compañera, mi colega, gracias porque siempre estuviste ahí para echarme porras, animarme y también regañarme, gracias ya que además de ser testigo de cada etapa en este camino compartimos cada experiencia, como olvidar nuestro primer sueldo.

A los integrantes de las áreas que conforman el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, a cada uno les agradezco sus consejos y enseñanzas que me sirvieron para mejorar tanto en lo profesional como en lo personal. Así como a los amigos y amigas que realizaron su servicio social otros sus prácticas profesionales, colocaron su granito de arena en este proyecto.

# Índice

Resumen.	1
1. Introducción.	3
2. Marco teórico.	5
2.1 Características de <i>H. capsulatum</i> .	5
2.2 Patogenia.	6
2.3 Manifestaciones clínicas de la histoplasmosis.	6
2.4 Reactivación de la histoplasmosis.	7
2.5 Epidemiología de histoplasmosis en el mundo.	8
2.6 Epidemiología de la histoplasmosis en México.	8
2.7 Métodos de tipificación usados para el análisis epidemiológico de <i>H. capsulatum</i> .	10
2.8 Estudios moleculares en México.	14
2.9 Características de los Clados de <i>H. capsulatum</i> descritos a nivel mundial.	15
2.10 Extracción de DNA.	18
2.11 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	20
2.12 Secuenciación de DNA.	20
3. Planteamiento del problema.	22
4. Justificación.	23
5. Hipótesis.	24
6. Objetivo.	24
7. Material y Métodos.	25
7.1 Recuperación de los aislados de <i>H. capsulatum</i> del cepario.	25
7.2 Subcultivo de <i>H. capsulatum</i> para extracción de DNA.	25
7.3 Lisis celular para extracción de DNA.	26
7.3.1 Extracción y purificación de DNA mediante el uso del kit GeneAII Exgene Plant SV mini.	26
7.3.2 Extracción y purificación de DNA mediante el uso del Fungal DNA Isolation kit.	27
7.4 Amplificación de los <i>loci</i> ITS, <i>arf</i> , <i>antiH</i> , <i>ole</i> y <i>tub</i> .	27
7.5 Purificación de los productos de amplificación.	29

<b>7.6</b>	<b>Secuenciación.</b>	29
<b>7.7</b>	<b>Alineamiento y edición de secuencias.</b>	30
<b>7.8</b>	<b>Concatenado de las secuencias amplificadas (<i>arf</i>, <i>anti-H</i>, <i>ole</i> y <i>tub</i>).</b>	30
<b>8.</b>	<b>Resultados.</b>	31
<b>8.1</b>	<b>Recuperación de aislados del cepario y subcultivo.</b>	31
<b>8.2</b>	<b>Extracción de DNA.</b>	38
<b>9.</b>	<b>Discusión.</b>	40
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.</b>	43
<b>11.</b>	<b>Perspectivas.</b>	44
<b>12.</b>	<b>Referencias.</b>	45
	<b>Glosario.</b>	49

## Resumen.

El hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* es conocido por ser la causa más frecuente de micosis sistémica en pacientes inmunocomprometidos, principalmente pacientes con VIH, la histoplasmosis es endémica prácticamente en todo México así como en muchos países del mundo. Es así que para tener información actualizada de áreas con alta o baja prevalencia, nichos o focos potencialmente infecciosos, la existencia de brotes, infecciones mixtas, saber de la posibilidad de reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas en el pasado, identificar aislados con virulencia mayor, resistencias a antifúngicos, asociación de poblaciones específicas de pacientes a clados específicos del hongo o bien entender las manifestaciones clínicas particulares dependientes del clado de *Histoplasma capsulatum* es necesaria la asociación de características moleculares dentro de su genoma con el comportamiento epidemiológico y clínico de poblaciones particulares, algo que los métodos fenotípicos de caracterización, para este propósito, carecen de utilidad actual. Es importante mencionar que lo enriquecedor de este trabajo para la epidemiología de *H. capsulatum* en el país, radica en poseer 150 aislados clínicos con los que se cuenta con toda la información clínica/epidemiológica de los pacientes de los que fueron recuperados. Los aislados se encuentran en un cepario preservado a -70 °C, estos se hicieron crecer en Caldo Dextrosa Sabouraud por varios días a una temperatura de 30 °C, una vez obtenida la biomasa requerida se lavó tres veces con agua destilada para retirar todo el caldo, enseguida se extrajo su DNA al romper el hongo con una mezcla de buffer de lisis, perlas de cerámica y vidrio, homogeneizándolos con el equipo Precellys Evolution Homogenizer terminando el proceso de extracción de material genético con el Fungal DNA Isolation Kit.

Con base a los antecedentes de análisis filogenéticos del hongo que ayudan a discriminar aislados en distintos clados actualmente descritos, los marcadores utilizados fueron fragmentos de los *loci arf*, *anti-H*, *ole* y *tub* además del fragmento del gen ITS, siguiendo las condiciones de amplificación del trabajo de Kasuga y col. de 1999, se obtuvo por PCR en punto final amplicones de peso molecular ya

descrito, tras un proceso de purificación con el PCR-QIAquick kit (QIAGEN) se secuenció cada producto de amplificación de cada uno de los aislados clínicos, sumando un total de 750 productos de amplificación. De tal modo que se logró la exitosa lisis celular y extracción de DNA de *H. capsulatum* que nos permitirá iniciar el análisis filogenético de estos aislados clínicos con los que cuenta el laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ.

# 1. Introducción.

La histoplasmosis es una micosis ocasionada por un hongo dimorfo, *Histoplasma capsulatum*, este hongo forma micelio a temperatura ambiente, mientras que a temperatura del cuerpo humano se presenta como una levadura. *H. capsulatum* es endémico de áreas tropicales, subtropicales y templadas en todo el mundo y se adquiere por la inhalación de microconidios. La histoplasmosis es la micosis de mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos, principalmente en pacientes con VIH, presentándose como histoplasmosis diseminada y progresiva, sin embargo, también es capaz de causar histoplasmosis pulmonar aguda en personas inmunocompetentes si el inóculo es suficientemente grande. Se ha estimado la existencia de 40 millones de enfermos con histoplasmosis y se calculan al menos 200,000 nuevos casos al año. Las áreas endémicas más importantes se sitúan en el continente americano<sup>1</sup>.

Desde 1980, numerosos estudios han evaluado la diversidad genética de la población de *H. capsulatum*, mediante el uso de técnicas de tipificación como el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), el Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR), la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) basada en el análisis de cuatro *loci arf*, *anti-H*, *ole* y *tub*. Estos estudios han demostrado consistentemente una fuerte asociación entre los grupos filogenéticos y el origen geográfico del hongo, además de reconocer la existencia de ocho Clados principales dentro de este organismo<sup>2</sup>.

Es fundamental conocer la epidemiología molecular de *H. capsulatum*, ya que esto nos permite identificar áreas con alta o baja prevalencia, nichos o focos potenciales de infección, conocer la existencia de brotes, infecciones mixtas, la posibilidad de reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas en el pasado, identificar aislados con características particulares relacionadas con virulencia, resistencia, asociación con poblaciones específicas de pacientes, asociación con manifestaciones clínicas particulares, etc.

Para realizar cualquier estudio molecular, es fundamental contar con el ácido desoxirribonucleico (DNA). En el caso de *H. capsulatum* se debe romper la pared celular, la cual consiste en una estructura suficientemente rígida como para no ser lisada por los métodos de lisis convencionalmente utilizados en otros microorganismos. A lo largo de los años se han utilizado diferentes métodos de extracción de DNA, todos ellos con ventajas y desventajas particulares.

En este trabajo se planteó el objetivo de extraer el DNA de los aislados de *H. capsulatum* para posteriormente realizar la amplificación por PCR, de los *loci arf*, *anti-H*, *ole* y *tub*, para en un trabajo subsiguiente, realizar el análisis mediante MLST, de los aislados de *H. capsulatum* con los que se cuenta en el laboratorio y de los que se tiene toda la información clínica y epidemiológica.

## 2. Marco teórico.

La histoplasmosis es una enfermedad causada por *Histoplasma capsulatum*. La presencia de este hongo es extensa en varios lugares del mundo, principalmente en países de clima tropical donde se favorece su desarrollo. El primer avistamiento de la histoplasmosis tuvo lugar durante la construcción del canal de Panamá, en Martinique, donde varios obreros nativos murieron de una enfermedad febril con hepatoesplenomegalia y anemia; Samuel Darling trabajó en las autopsias y describió las formas parasitarias como un protozooario encapsulado, surgiendo así el nombre que hasta hoy conocemos. Tiempo después, distintos investigadores conocieron su verdadera naturaleza fúngica<sup>3</sup>.

### 2.1 Características de *H. capsulatum*.

*Histoplasma capsulatum sensu lato* es un ascomiceto saprobio geofílico que pertenece al Reino fungi, Sub Reino Dikaryomycota, Filo Ascomycota, Clase Eurotiomycetes, Orden Onygenales, familia Onygenaceae, género *Histoplasma*, especie *capsulatum* (en estado teleomorfo se conoce como: *Ajellomyces capsulata*)<sup>4</sup>. Se encuentra en suelos enriquecidos con nitrógeno y fosfatos necesarios para su desarrollo. Es un hongo dimorfo que crece en forma filamentosa a temperatura de 22 °C a 30 °C, al microscopio se observa como hifas septadas, hialinas, macro sifonadas de aproximadamente 1.2-1.5 µm de diámetro, produce microconidios (estructuras lisas de 2-4 µm) y macroconidios o conidios tuberculados de 8-15 µm; macroscópicamente a menudo se observa como colonias con aspecto algodonoso, elevadas, blancas, conocidas como colonias Albinas o de tipo A, o bien, se pueden observar colonias con aspecto veloso, planas, color marrón conocidas como cepa Brown o tipo B, las cuales de forma gradual adquieren las características de las colonias tipo A<sup>5</sup>. Por otro lado, la forma levaduriforme solo se encuentra en el hospedador dentro de macrófagos y células reticuloendoteliales, o bien, en cultivo de sangre entre 35 °C a 37 °C. Las levaduras son ovaladas, con 1-3 µm de diámetro, con estructura no capsulada<sup>6</sup>.

## **2.2 Patogenia.**

Al inhalar los macroconidios o segmentos de la hifa, éstas llegan a los pulmones y bronquiolos terminales donde macrófagos alveolares los fagocitan. Dentro de ellos, *Histoplasma* encuentra las condiciones adecuadas para transformarse a su fase levaduriforme y multiplicarse mediante gemación. Si éste no es contenido en los pulmones por el sistema inmune celular, las levaduras se liberan del fagosoma e infectan otras células, viajan por la linfa y se disemina a otros órganos causando histoplasmosis diseminada<sup>7,8</sup>.

La manifestación de la enfermedad es multifactorial, va a depender de la concentración del hongo inhalado, estado del sistema inmune del hospedador, edad, virulencia y patogenicidad de la cepa, así como factores ambientales y genéticos<sup>9</sup>. Pacientes con un sistema inmune comprometido por trasplante de órgano sólido, lupus eritematoso y VIH/SIDA son los más afectados. En Latinoamérica cerca del 30% de las personas que viven con VIH/SIDA pueden morir por histoplasmosis si no se obtiene un diagnóstico y tratamiento adecuado y oportuno<sup>10</sup>.

## **2.3 Manifestaciones clínicas de la histoplasmosis.**

La exposición a *H. capsulatum* es extremadamente común en personas que viven en zonas endémicas, aunque la gran mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas, o bien, llegan a presentarlos solo como malestares similares a un resfriado común<sup>1</sup>.

En la histoplasmosis pulmonar aguda, los síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, debilidad, malestar en pecho y tos seca. En placa radiográfica se observan nódulos linfáticos hiliares y mediastínicos engrandecidos. La mejoría es rápida en la mayoría de los casos<sup>11</sup>.

La histoplasmosis pulmonar cavitaria crónica ocurre principalmente en pacientes ancianos, y causa enfisema e inflamación intersticial involucrando los segmentos apicales. Los síntomas incluyen fatiga, fiebre, sudoración por las noches, anorexia

y pérdida de peso, tos, producción de esputo, hemoptisis y disnea. En placas radiográficas se aprecian nódulos calcificados. El diagnóstico no oportuno lleva a la insuficiencia pulmonar progresiva, o a la muerte por una infección abrumadora como consecuencia del daño pulmonar<sup>11</sup>.

Posterior a una infección pulmonar, la levadura puede dirigirse al bazo, hígado y ganglios linfáticos ocurriendo una diseminación hematógena asintomática a través del sistema reticuloendotelial por medio de los macrófagos infectados. El desarrollo de la histoplasmosis diseminada es dependiente del hospedador, es frecuente en pacientes que se encuentran inmunosuprimidos quienes son incapaces de implementar una inmunidad celular efectiva contra el hongo, por ejemplo, VIH/SIDA, enfermedades hematológicas, trasplante de órganos sólidos, trasplante de células hematopoyéticas, tratamiento inmunosupresor (corticoesteroides), deficiencias congénitas en células T (deficiencia en receptor de interferón gamma). Los síntomas incluyen, fiebre, anorexia y pérdida de peso, en la examinación física a menudo se encuentra hepatoesplenomegalia, linfadenopatías, palidez y pancitopenia, algunos pacientes presentan ulceraciones en membranas mucosas, así como úlceras en piel. En infantes y pacientes con VIH/SIDA se encuentra sepsis con hipotensión, coagulación intravascular diseminada, falla renal y dificultad respiratoria aguda<sup>11</sup>.

#### **2.4 Reactivación de la histoplasmosis.**

Durante la histoplasmosis, el macrófago es la célula más comúnmente infectada, sin embargo, el hongo puede escapar y proliferar en otras células como las endoteliales, que a su vez actúan como reservorio y permanecen ahí cuando la infección ha sido controlada. Con esta capacidad de invadir distintos tipos de células, la infección puede diseminarse por vía linfohematógena a otros órganos. Aunque el sistema inmune del hospedador sea capaz de controlar la infección pueden quedar remanentes en varios órganos, conocidos como reservorios, situación similar a la tuberculosis, así que, años más tarde, si el sistema inmune se deprime, *H. capsulatum* se reactivará desde los reservorios dando manifestaciones clínicas. Así que, es común que se encuentren pacientes con histoplasmosis en áreas no endémicas, varios años después de que visitaron áreas que sí lo son. Por

otro lado, en pacientes que residen en áreas endémicas, no es posible acertar si se trata de una enfermedad consecuencia de una infección reciente o de la reactivación de una infección antigua<sup>11,12</sup>.

## **2.5 Epidemiología de histoplasmosis en el mundo.**

La endemicidad de la histoplasmosis varía ampliamente. En Europa y Oceanía se ha registrado una prevalencia baja, en África (áreas endémicas: Sur de África, Tanzania, Zimbabue y el oeste/centro de África) y el Sur de Asia (existen pocos reportes en China, India, Tailandia, Malasia, Indonesia, Myanmar y Filipinas) ha sido moderada, mientras que en América, ha sido alta en el norte (regiones del medio oeste y sureste de EUA, específicamente en los ríos Ohio, St. Lawrence y Mississippi, los cuales se consideran altamente endémicos) y Latinoamérica desde México hasta Uruguay<sup>10</sup>.

Se sugiere que algunos brotes epidémicos en Estados Unidos han sido producto de vientos formados por huracanes, y debido al lavado del suelo por lluvias intensas que dispersan el hongo desde los focos de infección<sup>13,14</sup>. Además, el transporte del hongo puede también suceder por el movimiento de animales (como murciélagos y aves negras) en la naturaleza, quienes llevan al hongo en sus vientres y después lo depositan en cualquier lugar cuando excretan, aumentando así, eventualmente, las áreas de infección y brotes<sup>13,15</sup>.

## **2.6 Epidemiología de la histoplasmosis en México.**

Si bien el descubrimiento de la histoplasmosis tuvo lugar en Panamá por el Dr Darling en 1906, en México ya existían reportes de padecimientos similares desde años más atrás. El Dr. Aguirre Pequeño encontró en el libro de Actas de Salubridad Pública del Estado de Nuevo León, asentada en 1895, se mencionó de un padecimiento muy similar al reportado en la histoplasmosis<sup>16</sup> González Ochoa apoyó la idea de que la enfermedad pudo haberse conocido desde la época colonial y que afectaba principalmente a mineros y recolectores de guano, por lo que la

consideraron como enfermedad ocupacional, debido a que afectaba a personas que desempeñaban trabajos relacionados a minas y cuevas<sup>14</sup>.

En México el primer panorama epidemiológico de la histoplasmosis fue hecho por el micólogo mexicano González-Ochoa en 1963, él detalló la prevalencia en 22 estados de la república con base en la prueba de la histoplasmina. Posteriormente se recopiló información de distintos brotes y casos aislados que se presentaron en un lapso de cerca de 50 años. En esa época la explotación de minas en México era muy extensa y desafortunadamente la enfermedad no era de notificación oficial, por lo que se asume que el número de casos de histoplasmosis fue mayor a los registrados<sup>17</sup>.

Por su parte la Dirección General de Epidemiología (DGE), a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, registró de 1988 a 1994, 1065 casos de forma epidémica, concentrados en su mayoría en Veracruz, Oaxaca, Colima, Campeche, Tabasco y el centro del país, este último fue debido a la gran densidad poblacional y mayor cantidad de centros hospitalarios que reportaron la enfermedad<sup>14</sup>. En México, desde 1995 no es de carácter oficial el reporte de los casos de histoplasmosis, dejando así las publicaciones de carácter científico, como única manera de saber de la enfermedad en el país, enmascarando así el problema, y subestimando la enfermedad<sup>14</sup>. Sin embargo, dado que esta micosis está estrechamente asociada con el VIH/SIDA<sup>18</sup> se asume que la epidemia de la histoplasmosis ha incrementado junto con el SIDA<sup>14</sup>.

Mientras tanto, en 1950 médicos norteamericanos ya consideraron la histoplasmosis como una enfermedad asociada a minas, campo y recolección de guano<sup>19</sup>. Dentro de la república mexicana existe una gran cantidad de minas abandonadas, cuevas habitadas por murciélagos que son visitadas por mineros, espeleólogos, campesinos, recolectores de guano, peones limpiadores de minas, excursionistas, antropólogos y geólogos, volviéndose vulnerables a la infección<sup>20</sup>. Sin embargo, también se ha descrito la posibilidad de la presencia del hongo en áreas urbanas como parques, patios de casas, huecos de troncos, alrededor de hoteles o debajo de puentes<sup>20,21,22</sup> que pueden estar contaminados con este hongo

debido a la propagación indirecta por murciélagos, aves o por las mismas personas que trasladan el guano contaminado para su uso como fertilizante para plantas, convirtiéndolos en una fuente potencial de infección<sup>23</sup>.

## **2.7 Métodos de tipificación usados para el análisis epidemiológico de *H. capsulatum*.**

El panorama epidemiológico de las micosis en el mundo necesita detectar zonas de alta y baja prevalencia para definir el origen preciso de las fuentes de infección, por lo que emplea diferentes métodos de tipificación para el estudio de la diversidad, marcaje y distribución geográfica de aislados en la naturaleza para implementar medidas efectivas de prevención y control de su transmisión<sup>24</sup>.

*H. capsulatum* ha sido objeto de análisis por varios métodos fenotípicos y genotípicos con el objetivo de comprender su situación epidemiológica. En un principio se aplicaron métodos fenotípicos, sin embargo, debido a su baja capacidad de diferenciación y dificultades en la reproducibilidad de los resultados, dejaron de utilizarse<sup>25</sup>. Actualmente, los métodos moleculares para el estudio de la diversidad genética de *H. capsulatum* ha permitido un análisis más robusto tanto a nivel local como global. Con ellos se han obtenido mayores ventajas, el intercambio de bases de datos con gran cantidad de información, entre distintos laboratorios en varios continentes para lograr definir brotes, transmisión y relación paciente-fuente de infección, enriqueciendo los estudios epidemiológicos en cada región<sup>26</sup>.

Los métodos moleculares usados en *H. capsulatum*, han sido la Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE), Electroforesis en Gel por Campo Pulsado (PFGE), el Análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), Polimorfismos del DNA amplificado al azar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR), secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 por mencionar algunas<sup>24</sup>. Cada una, muestra la gran variabilidad genética que *H. capsulatum* posee, siendo la Tipificación por Secuenciación de Múltiples Locus (MLST) el método que ha dado el mayor panorama filogenético a nivel mundial<sup>2,10,15</sup>.

El estudio pionero de la fenotipificación de *H. capsulatum* fue realizado por Gaur y col. en 1980, quien analizó 369 aislados del suelo de EU por MLEE. Este método se fundamenta en perfil electroforético de ocho enzimas específicas. Los investigadores descubrieron gran variabilidad dentro y entre los aislados de varios puntos geográficos, incluso notaron la posibilidad de que pacientes vulnerables puedan ser infectados por varios aislados genéticamente distintos<sup>27</sup>.

Otro de los métodos utilizados en el estudio de la diversidad de *H. capsulatum* es el RFLP. Este método se basa en la digestión del DNA con endonucleasas de restricción, seguido de un Southern blot e hibridación con sondas específicas marcadas<sup>24</sup>. Esta técnica fue usada por Vincent y col<sup>28</sup>, después por Spitzer y col<sup>29</sup> y en otro estudio por Keath y col<sup>30</sup>. Los tres trabajos analizaron varios aislados de suelo, de animales y clínicos de varios países de América (EUA, Panamá y Puerto Rico)<sup>28</sup>. Los autores describieron que los polimorfismos de los diferentes aislados de *Histoplasma*, permitieron el agrupamiento de los aislados en seis clases, cada una de ellas con características fenotípicas y patogénicas distintas: Clase 1, aislados con menor virulenta, similares a la cepa Downs<sup>31</sup> y con asociación a pacientes con VIH/SIDA<sup>32</sup>; Clase 2, aislados relativamente más virulentos, asociados con histoplasmosis diseminada o pulmonar crónica, no asociada a SIDA, localizados en siete sitios geográficos distintos en EUA; Clase 3, aislados del Centro y Sur de América; Clase 4, constituida por un solo aislado del suelo de Florida<sup>29</sup>; Clase 5, aislados de pacientes con SIDA que vivían en Norteamérica, los cuales tienen un patrón similar a un aislado de Panamá; Clase 6, integrada por un solo aislado de Latinoamérica<sup>30</sup>.

Este método abrió la puerta a nuevos estudios epidemiológicos moleculares sobre histoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos, estudios de aislados de brotes en zonas endémicas, así como de casos aislados en zonas donde la histoplasmosis no es endémica, y proponer la situación de reactivación de una infección previamente adquirida.

Pronto el método de RAPD-PCR, ayudó a detectar más diferencias entre aislados de la misma clase de RFLP. Este método se fundamenta en la amplificación del

DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa con el uso de oligonucleótidos de alrededor de 10 pares de bases, llamados oligonucleótidos degenerados. Este método al final muestra una gran cantidad de productos de amplificación proporcional a los polimorfismos del DNA<sup>24</sup>. Kersulyte y col<sup>33</sup> en 1992 y Woods y col<sup>34</sup> en 1993, analizaron por RAPD-PCR aislados clínicos identificados por el método RFLP como Clase 2. A pesar de que la mayoría de los aislados se mantuvo en un perfil RAPD-PCR particular, un pequeño número presentó un patrón distinto, mostrando así, la mayor capacidad de discriminación de esta técnica. Poonwan y col. en 1998<sup>35</sup> analizaron aislados clínicos tailandeses y encontraron un perfil RAPD-PCR distinto a los descritos en Norteamérica, dando lugar a la sugerencia de que el perfil RAPD-PCR de cada aislado está relacionado con el sitio geográfico de donde se aísla.

La técnica molecular que ha dado resultados más detallados de la diversidad genética de *H. capsulatum* ha sido la Tipificación por Secuenciación de Múltiples Locus, la cual consiste en definir las secuencias nucleotídicas parciales de cuatro *loci housekeeping*: *arf* (factor de ribosilación del ADP), *tub1* (alfa tubulina), *ole* (desaturasa de ácidos grasos 1-delta 9) y *anti-H*, (precursor del antígeno H)<sup>36</sup>. Después de la obtención de la secuencia nucleotídica parcial de los cuatro *loci*, estas se alinean y se calcula el grado de similitud entre ellas, para finalmente agrupar en Clados aquellas con mayor similitud<sup>15</sup>. Uno de los primeros estudios que usaron esta técnica fue el de Kasuga y col en 1999, quienes analizaron 46 aislados clínicos, ambientales y de animales, de las tres variedades de *Histoplasma*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, var. *duboisii* y var. *farcinosum* de varios países. Por medio de análisis filogenéticos de los cuatro *loci*, llegaron a proponer que *Histoplasma* alberga 6 variedades, en lugar de 3, como se había propuesto anteriormente: (i) Norteamericana Clase 1 *H. capsulatum* var. *capsulatum*, (ii) Norteamericana Clase 2 *H. capsulatum* var. *capsulatum*, (iii) Centroamericana *H. capsulatum* var. *capsulatum*, (iv) Sudamericana grupo A *H. capsulatum* var. *capsulatum*, (v) Sudamericana grupo B *H. capsulatum* var. *capsulatum* y (vi) *H. capsulatum* var. *duboisii*. Es importante mencionar que la mayor proporción de aislados fueron recuperados en América. Los autores observaron que los aislados

se agruparon conforme a las diferentes regiones analizadas, región norte, centro y sur de América, así como, un grupo perteneciente a África, el cual se conformó únicamente por aislados de la variedad *duboisii*. Cabe mencionar que el Clado sudamericano se encontró conformado tanto por la variedad *capsulatum*, como por la *farCIMINOSUM*<sup>15</sup>.

Años más tarde, Kasuga y col.<sup>2</sup> ampliaron el estudio y analizaron mediante MLST, 137 aislados (45 de los 46 analizados en su trabajo de 1999 más 92 aislados nuevos) representando las tres variedades procedentes de 25 países, como Australia, Brasil, Argentina, Tailandia, China, México, así como, de algunos países europeos y africanos. Al contar con un mayor número de aislados, los autores, ahora, definieron ocho Clados: (i) Clado Norteamericano Clase 1, (ii) Clado Norteamericano Clase 2, (iii) Clado Latinoamericano grupo A, (iv) Clado Latinoamericano grupo B, (v) Clado australiano, (vi) Clado Países Bajos, (vii) Clado Euroasiático y (viii) Clado Africano<sup>2</sup>. En esta ocasión los análisis mostraron que casi todos los aislados de la variedad *farCIMINOSUM* se agruparon en un Clado, el Euroasiático, junto con aislados de la variedad *capsulatum*, este pequeño Clado está estrechamente cercano al Clado Latinoamericano Grupo A por lo que se asume que surgió de este. El Clado africano agrupó a todos los aislados de la variedad *duboisii*, mientras que el resto de los aislados de la *var. capsulatum* se agruparon en el resto de los Clados<sup>2</sup>.

El uso de MLST con los cuatro *loci* continuó siendo una técnica precisa y para el 2016 Texeira y col<sup>10</sup>. mostraron un análisis aún más extenso, donde analizaron 234 aislados, incluyendo los aislados analizados por Kasuga y col. en 2003, además, de una gran cantidad de aislados de los Clados Latinoamericanos<sup>2,15,27</sup>. En el nuevo análisis propusieron seis nuevos Clados<sup>10</sup>: Clado Latinoamericano grupo A1 (LAm A1) aislados de América Central, Clado Latinoamericano grupo A2 (LAm A2) aislado de Colombia, Clado Latinoamericano grupo B1 (LAm B1) aislado de Argentina y Colombia, Clado Latinoamericano grupo B2 (LAm B2) aislados de los Estados de Rio Grande do Sul y Espírito Santo en Brasil, Clado Rio de Janeiro (RJ) aislados de

los Estados de Rio de Janeiro y Sao Paulo en Brasil y Clado asociado a murciélagos (BAC-1) aislados de México<sup>10</sup>.

Los resultados obtenidos con la técnica MLST tienen la ventaja de poder compartirse como bases de datos digitales, lo que permite el intercambio de información a nivel mundial. Así mismo, los resultados observados por variados trabajos de genotipificación demuestran que el MLST tiene la capacidad de reconocer la relación genética de aislados recuperados de distintas regiones geográficas, de discriminar entre aislados de un mismo lugar o incluso predecir agrupaciones por medio de linajes independientes<sup>36</sup>.

## **2.8 Estudios moleculares en México.**

El primer análisis molecular fue llevado a cabo en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina, UNAM en 1998, en el cual usaron la técnica RAPD-PCR con el oligonucleótido 1281 (utilizado en otros trabajos internacionales) en una considerable cantidad de aislados de murciélago (biopsias de pulmón, riñón e intestino), de guano, del suelo de cuevas de Guerrero, Morelos y Sinaloa, así como, de aislados clínicos asociados con SIDA. Propusieron esta técnica como un marcador epidemiológico para determinar los orígenes de aislados de *H. capsulatum* que afectan a pacientes con SIDA, así como, para observar el desplazamiento de los aislados en la naturaleza, ocasionado principalmente por murciélagos<sup>20</sup>. Un año después, Reyes-Montes y col.<sup>38</sup> trabajaron con los aislados previamente mencionados, más uno procedente de Colombia y otro de Panamá, ambos recuperados de histoplasmosis humana. En ellos aplicaron el análisis mediante RAPD-PCR (prueba genotípica), además de analizar el corrimiento electroforético de la histoplasmina producida por cada uno de los aislados (prueba fenotípica). La relación entre los patrones producidos por la técnica fenotípica fue distinta a la de la técnica genotípica, ya que encontraron mayor variabilidad con la prueba genotípica<sup>38</sup>. El problema intrínseco en las técnicas fenotípicas permitió a la genotipificación tomar ventaja como herramienta eficaz para estudios epidemiológicos.

En 1998 se caracterizaron por RFLP, aislados clínicos asociados a SIDA en pacientes del Hospital “la Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social, obtenidos durante febrero de 1992 a septiembre de 1993, los perfiles de RFLP de estos aislados fueron comparados con los de murciélagos previamente descritos por Taylor y col. y con los representativos de las clases 1 (cepa Downs), 2 (cepa G217B), 3 (G186) y 4 (FLs1) de RFLP. Los autores observaron que los aislados mexicanos formaban 10 tipos de perfiles distintos donde solo un tipo era similar a la clase 1 de RFLP descrita en EUA<sup>39</sup>. Con este trabajo los autores mostraron que en México (31 aislados) existía más diversidad genética que en la numerosa cantidad de aislados ya descritos en ese entonces, en EUA y Panamá.

### **2.9 Características de los Clados de *H. capsulatum* descritos a nivel mundial.**

Actualmente, se han descrito dos Clados dentro de EUA, el Norteamericano Clase 1 (NAm 1) y Norteamericano Clase 2 (NAm 2), la principal diferencia entre ellos está en los tipos de hospedadores que infectan. Las cepas del Clado NA1 se han aislado solo de pacientes infectados con el VIH<sup>15</sup>, (sin embargo, recientemente se describió el primer caso de histoplasmosis diseminada, ocasionada por una cepa del Clado NA 1, en una paciente sin VIH<sup>31,15</sup>, Actualmente este aislado es conocido como cepa Downs); mientras que el Clado NA2 afecta tanto a pacientes infectados con VIH como a los que no lo están<sup>2,15</sup>. Los aislados de ambos Clados están asociados a estorninos (*Sturnus vulgaris*), debido a que las áreas de Norteamérica, endémicas de *Histoplasma*, también son áreas de alta concentración de estas aves negras<sup>15</sup>.

En el Sur y Centro de América se encuentran dos grandes Clados, el Latinoamericano A (LAm A) y Latinoamericano B (LAm B), reconocidos como especies filogenéticas<sup>2</sup>. Los aislados del Clado LAm B están presentes en Argentina, Colombia y Brasil. Dentro de los aislados de Brasil, se han encontrado nuevos linajes con características patogénicas distintas al resto de los aislados del continente<sup>40</sup>. Por otro lado, el Clado LAm A se ha encontrado en México, Guatemala, Honduras, Panamá, Colombia y Brasil; este Clado es el de mayor diversidad

genética, y del que se asume surgió el Clado Euroasiático. También se han descrito especies crípticas, como la RJ obtenida de aislados clínicos y de suelo de Brasil, en los estados de Rio de Janeiro y Sau Paulo<sup>10</sup>.

En 2014 Taylor y col. analizaron las secuencias parciales de los *loci arf*, *anti-H*, *ole*, *tub* y el microsatélite (GA)<sub>n</sub> de 22 aislados de *Histoplasma* de distintos murciélagos capturados en cavernas de México. Los autores descubrieron un Clado endémico del continente americano (principalmente en México) asociado al murciélago *Tadarida brasiliensis*. Describieron que este Clado presenta diferencias genéticas con respecto al resto de los aislados de otros murciélagos<sup>41</sup>. Estos resultados fueron apoyados por el trabajo de Texeira y col<sup>10</sup>, donde se le describió con el nombre BAC-1 (Clado asociado con murciélagos)<sup>5</sup>.

El Clado africano alberga los aislados de *H. capsulatum var. duboisii*, patógeno causal de la histoplasmosis africana. Su prevalencia abarca el Oeste y Centro de África (Madagascar, Guinea, Liberia, Senegal, República Democrática del Congo, Bélgica, Suelo de Nigeria)<sup>2</sup>. El diagnóstico de histoplasmosis en África es poco preciso e ineficiente por lo que en ocasiones los pacientes viajan a Europa para ser atendidos<sup>10</sup>, esto provoca que se reporten casos de histoplasmosis en lugares no endémicos, al mismo tiempo que se enmascara la verdadera prevalencia en el continente africano<sup>42</sup>.

A pesar de que la histoplasmosis no es endémica de Europa, se han reportado casos como consecuencia de la infección por VIH. La mayoría de estos casos son atribuidos a una reactivación endógena de una infección latente, adquirida en el pasado en áreas endémicas de los alrededores<sup>30,42</sup>.

El Clado Euroasiático contiene aislados de Europa (Inglaterra, Alemania y Polonia), Asia (Tailandia, China, India e Israel) y del Norte de África (Egipto), la mayoría de los aislados son de la variedad *farciminosum*<sup>2</sup>. El Clado es prevalente en el norte de Egipto, se ha aislado principalmente de caballos y otros equinos, aunque se han reportado casos en humanos de manera muy esporádica<sup>15</sup>.

La histoplasmosis en Oceanía es rara, la incidencia se ha visto restringida solo a personas que han visitado cuevas, como la caverna Wee Jasper donde habitan murciélagos infectados con *Histoplasma*. Se han reportado sólo un poco más de una docena de aislados y son los que integran el Clado australiano<sup>2</sup>.

Por otro lado, el Clado de Países Bajos, está integrado solamente por dos aislados, los cuales carecen de información de origen geográfico, es importante mencionarlo pues la histoplasmosis no es endémica de esta región. Kasuga y col<sup>2</sup> sugieren que posiblemente estos aislados provenían de colonias holandesas establecidas en Indonesia en aquel entonces.

Aunque ambos Clados (australiano y de Países Bajos) están integrados por pocos aislados, ambos, se encuentran bien soportados por un Bootstrap del 92%, por lo que la diversidad genética es suficiente como para alejarlos del resto de los aislados y ubicarlos como grupos hermanos<sup>2,10</sup>.

Todos los conocimientos previamente descritos han sido posibles gracias a los análisis moleculares de *H. capsulatum*. Sin duda, es primordial continuar realizando esta clase de estudios con el objetivo de seguir identificando áreas con alta o baja prevalencia, nichos o focos potencialmente infecciosos, conocer la existencia de brotes, infecciones mixtas, la posibilidad de reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas en el pasado, identificar aislados con características particulares relacionadas con virulencia, resistencia, asociación con poblaciones específicas de pacientes, asociación con manifestaciones clínicas particulares, etc. Todas las enseñanzas que vayamos obteniendo de estudios de este tipo, nos permitirá conocer mejor el comportamiento de *H. capsulatum*, dándonos la oportunidad, en un futuro, de establecer medidas de prevención, buscar marcadores candidatos para vacunas, blancos para tratamientos y diagnóstico, etc.

Como se describió previamente, los pocos estudios existentes al respecto en México se basan principalmente en aislados de murciélagos o ambientales (suelo, guano), y solo unos cuantos aislados clínicos.

## 2.10 Extracción de DNA.

A lo largo de los años en los que se han realizado análisis moleculares de *H. capsulatum* se han usado distintos métodos para lograr la lisis de la rígida pared celular del hongo con el fin de obtener el DNA. La pared celular de *Histoplasma* está compuesta por quitina, sacáridos (80% en peso seco), siendo la glucosa el más abundante tanto en la fase filamentosa como levaduriforme, seguido de manosa y galactosa. Dependiendo de la fase en la que se encuentre el hongo, su pared contendrá distintas cantidades de quitina y sacáridos, los cuales pueden agruparse en estructuras variadas como,  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\alpha$ -1,3-glucanos, galactomananos, componentes similares a la lecitina y un conjunto de proteínas y lípidos que le proveen estabilidad<sup>9</sup>.

Los métodos de extracción de DNA comúnmente utilizados en las bacterias como lo son el método de salting out (altas concentraciones de sales), Chelex 100 (resina quelante que no requiere de una digestión previa con enzimas como proteinasa K) o choque térmico, no son útiles para la extracción de DNA a partir de *Histoplasma* debido a que como se mencionó previamente, su pared celular es mucho más rígida<sup>43</sup>. Otro ejemplo es el de las micobacterias, en las cuales también se han requerido métodos más agresivos dado la complejidad de su pared celular. En este género, la lisis ha consistido en inactivar el aislado por calor para posteriormente realizar la extracción por acción mecánica con perlas de vidrio<sup>44</sup> o bien, por medio de sonicación<sup>45</sup>.

En el caso de los hongos, particularmente *Histoplasma*, se han utilizado métodos de lisis más agresivos como, el macerado en mortero con pistilo y nitrógeno líquido, el cual fue utilizado con éxito a inicios de los análisis moleculares de este organismo. Si bien la pared celular de la fase levaduriforme es relativamente menos rígida que la fase filamentosa, se requiere de condiciones estrictas en el laboratorio para poder obtener la levadura, lo cual complica el proceso de manera muy importante<sup>6</sup>. Recientemente se ha comprobado que la obtención de DNA de la fase micelial de *H. capsulatum* es más sencilla que la extracción de su fase levaduriforme<sup>24</sup>. El proceso consiste en hacer crecer al hongo en caldo dextrosa Sabouraud con

agitación constante, para evitar la aparición de micelio aéreo (estructura de difícil rompimiento), una vez que el cultivo presenta suficiente biomasa, ésta se separa del caldo por filtración o centrifugación, para posteriormente solidificarla con nitrógeno líquido y macerarla en mortero. Dentro de la sencillez del método y ventaja de obtención de una buena concentración de DNA, existe el riesgo de quemaduras por el uso de nitrógeno líquido<sup>46</sup>.

Otros métodos que se han adaptado para lograr la lisis del hongo son los mecánicos. En el mercado se encuentran equipos como el Precellys Evolution Homogenizer (Bertin Instruments)<sup>47</sup> o el Fastprep-24 (MP Biomedical)<sup>48</sup>. Ambos equipos ejercen una agitación vigorosa sobre la biomasa de *Histoplasma*, la cual se mezcla con un buffer de lisis y perlas de distintos materiales y tamaños, lo que ocasiona la lisis celular, dando lugar a una mezcla homogénea de buffer, DNA, y restos celulares.

Cada fabricante realiza recomendaciones sobre el tipo de perlas a usar (composición y tamaño) dependiendo de la rigidez de la célula a tratar. Para la lisis del hongo, el fabricante de Precellys Evolution Homogenizer recomienda el uso de perlas de vidrio de 0.5 mm o 0.1 mm, perlas de cerámica de 1.4 mm y una perla de vidrio de 4 mm<sup>49</sup>; por otro lado, el fabricante de Fastprep-24, recomienda el uso de perlas de cerámica de 1/4 pulgada (6.35 mm)<sup>50</sup>. A partir de la mezcla homogénea resultante, se procede a finalizar el proceso de extracción. Existen métodos caseros en los que se usan solventes orgánicos, como fenol, cloroformo, alcohol isoamílico y/o metanol. El tratamiento con estos compuestos da lugar a tres capas, una lipídica u orgánica (desechos celulares), la acuosa (donde se encuentra el DNA, RNA), y la capa intermedia (donde se encuentran las proteínas). Uno de los principales problemas con este método de extracción, es la contaminación del DNA con trazas de proteínas<sup>46</sup>. Otros métodos que han mejorado el rendimiento de recuperación de DNA, así como su pureza, son los kits comerciales, los cuales usan columnas de separación por intercambio iónico. Entre ellos se encuentran el GeneAll Exgene Plant SV mini y Fungal DNA Isolation kit (Omega Bio-Tek Inc) y PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), cada uno de ellos con rendimientos similares.

### **2.11 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La PCR es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, la cual permite la amplificación exponencial de una molécula de DNA hasta generar millones de copias de un fragmento específico<sup>51</sup>. Es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular dada su aplicación en campos como la clonación, mutagénesis, secuenciación, etc<sup>52</sup>. Consta de tres pasos, 1) Desnaturalización del DNA, que consiste en la separación de las dos hebras de DNA, por exposición a 95 °C por unos minutos, 2) Alineamiento, la cual consiste en la hibridación o unión específica de los oligonucleótidos o primers a la secuencia blanco, la temperatura aplicada en este paso dependerá de la longitud del primer y su contenido de GC (Guanina y Citosina), 3) Elongación de la cadena de DNA, normalmente se lleva a cabo a 72 °C, temperatura óptima a la cual, la Taq Polimerasa inicia la formación de la cadena complementaria, el tiempo invertido en este paso dependerá de la longitud del templado a amplificar, generalmente se considera que la Taq Polimerasa acopla 1000 bases por minuto. Al término de cada ciclo la cadena de DNA construida servirá como templado para el siguiente ciclo<sup>53</sup>. Es a partir de este producto, que la secuenciación, permite estudiar los polimorfismos en una secuencia específica y determinar así, la relación que tiene con el resto de los individuos de su especie. En el caso particular de *H. capsulatum*, uno de los métodos más usados en los últimos años, ha sido el análisis por MLST, el cual involucra, como se mencionó previamente, la amplificación de cuatro *loci -arf, antiH, ole y tub-* los cuales han demostrado su utilidad en el análisis filogenético de este hongo<sup>2</sup>.

### **2.12 Secuenciación de DNA.**

La secuenciación es una técnica que nos permite determinar el orden de las bases nucleotídicas en un DNA de nuestro interés<sup>52</sup>. En 1977 fueron creados dos métodos de secuenciación de DNA, el primero hecho por Maxam y Gilbert, que se fundamentó en romper esta cadena utilizando químicos, y el segundo, la secuenciación enzimática tipo Sanger, la cual utiliza un templado de DNA de cadena sencilla para construir la hebra complementaria que termina en posiciones específicas<sup>51</sup>. El método de Maxam y Gilbert, fue muy útil en su momento, sin

embargo, debido a su complejidad, tiempo requerido, entre otras limitaciones, cayó en desuso.

El método usado hoy en día es la secuenciación enzimática tipo Sanger. Utiliza la DNA Polimerasa para construir fragmentos de todos los tamaños posibles, cada uno de ellos quedando marcado por un residuo terminal específico, los ddNTPs o dideoxynucleotidos (nucleótidos especiales que carecen del grupo OH en el carbono 3' de la desoxirribosa, deteniendo así, la formación de los enlaces fosfodiéster en el momento de la síntesis de la cadena complementaria de DNA)<sup>52</sup>. Cada uno de estos ddNTPs, está conjugado con un fluorocromo único. En la mezcla de reacción, la proporción de ddNTPs es menor que la de los dNTP, por lo que su incorporación a la cadena es al azar, obteniéndose así, fragmentos de distintos tamaños. Posteriormente, los fragmentos se separan, en un polímero desnaturante, por electroforesis capilar, y dependiendo de su tamaño van migrando hasta llegar a un láser que excita los fluorocromos, provocando el desprendimiento de luz, de tal modo que se infiere el tipo de nucleótido de acuerdo con su propia longitud de onda<sup>51</sup>. Actualmente, existen varios secuenciadores automatizados que permiten realizar el análisis de la secuencia en menor tiempo<sup>52</sup>.

### 3. Planteamiento del problema.

La histoplasmosis es la micosis endémica más frecuente en el mundo. *H. capsulatum* es endémico en los estados del oeste de Estados Unidos, particularmente a lo largo del Río Mississippi y Ohio. Se han estimado 40 millones de enfermos y se calculan al menos 200,000 nuevos casos al año. Las áreas endémicas más importantes se sitúan en el continente americano, y México ocupa un papel muy importante en este sentido. El número de casos de histoplasmosis se ha incrementado dramáticamente como consecuencia de la epidemia del VIH/SIDA.

Desde hace ya varios años se han realizado estudios mediante el uso de diferentes herramientas moleculares con el fin de conocer el comportamiento genético de *H. capsulatum*. Una de las herramientas que se ha usado con mayor frecuencia en los últimos años es el MLST de los *loci arf, anti-H, ole y tub*, el cual tiene la ventaja de que los resultados pueden ser fácilmente comparados con los de otros estudios realizados alrededor del mundo.

Nuestro laboratorio cuenta con una gran cantidad de aislados de *H. capsulatum* recuperados de pacientes con VIH/SIDA de diez centros de salud de la república mexicana, así como, con aislados de pacientes del INCMNSZ con otras inmunosupresiones, de los cuales contamos con toda la información clínica y epidemiológica, por lo que podemos realizar análisis moleculares de estos, con el fin de comprender su comportamiento.

Para realizar el análisis mediante MLST, es necesario, en primer lugar, lograr la extracción del DNA para posteriormente realizar la amplificación de los *loci arf, anti-H, ole y tub*. La pared celular de *H. capsulatum* consiste en una estructura suficientemente rígida que no puede ser lisada por los métodos de lisis convencionalmente utilizados para otros microorganismos.

## 4. Justificación.

Mediante el análisis molecular de los aislados de *Histoplasma* de alrededor del mundo, se han podido identificar áreas con alta o baja prevalencia, nichos o focos potencialmente infecciosos, conocer la existencia de brotes, infecciones mixtas, la posibilidad de reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas en el pasado, identificar aislados con características particulares relacionadas con virulencia, resistencia, asociación con poblaciones específicas de pacientes y asociación con manifestaciones clínicas particulares.

Este trabajo forma parte de la base de un trabajo subsiguiente, en el que se pretende realizar el análisis genético de aislados de *H. capsulatum* que se encuentran en el cepario de nuestro laboratorio, y de los cuales contamos con toda la información clínica/epidemiológica de los pacientes de los que fueron recuperados. Esto nos permitirá relacionar las características moleculares con su comportamiento epidemiológico y clínico en estas poblaciones particulares. Todas las enseñanzas que vayamos obteniendo de estudios de este tipo, nos permitirá conocer mejor el comportamiento de *H. capsulatum* en el ser humano, dándonos la oportunidad, en un futuro, de establecer medidas de prevención, buscar marcadores candidatos para vacunas, blancos para tratamientos, diagnóstico, etc.

## **5. Hipótesis.**

La extracción de DNA y amplificación de los *loci arf, anti-H, ole y tub* de aislados *H. capsulatum* se logrará empleando la metodología adecuada para realizar el análisis genético de estos organismos.

## **6. Objetivo.**

Con base en los anteriores estudios lograr la extracción del DNA y la amplificación por PCR, de las secuencias parciales de los *loci arf, anti-H, ole y tub* de aislados de *H. capsulatum* y tener bases para un análisis genético posterior.

## **7. Material y Métodos.**

El estudio presentado está diseñado como una investigación observacional descriptiva transversal, el universo estudiado comprende aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* a los que se les extraerá DNA por medio de métodos mecánicos y se amplificarán *loci* específicos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El estudio no implicó la realización de análisis estadísticos.

### **7.1 Recuperación de los aislados de *H. capsulatum* del cepario.**

Los aislados clínicos de *H. capsulatum* originalmente se encontraban en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ. Se encontraban crecidos en medio agar dextrosa Sabouraud, en refrigeración entre 2-4 °C embebidos en aceite mineral. Dentro del Laboratorio con nivel de bioseguridad 3 se sembraron en placas de agar dextrosa Sabouraud y se incubaron a temperatura ambiente de 2 a 3 semanas. Se observó el crecimiento de cada una de las placas para asegurarnos de que los cultivos se encontraban puros, por lo que se realizó el análisis de la morfología macroscópica y en el caso de ser necesario, también se revisó la morfología microscópica. En caso de encontrar aislados de *H. capsulatum* con contaminación, se realizaron las separaciones necesarias en placas de agar dextrosa Sabouraud hasta obtener el cultivo puro.

### **7.2 Subcultivo de *H. capsulatum* para extracción de DNA.**

Los aislados puros de *H. capsulatum* se sembraron en 25 mL de caldo Sabouraud y se incubaron a 37 °C con movimiento constante, tratando de disminuir la formación de micelio aéreo, hasta obtener una cantidad de hongo suficiente. Por medio de centrifugación a 13,300 rpm por 6 minutos se concentró todo el hongo en microtubos y se desechó el caldo. Posteriormente, el hongo fue lavado tres veces con agua destilada estéril mediante centrifugación a 13,300 rpm por 6 minutos en cada ocasión y desechando el sobrenadante con una micropipeta para finalmente obtener una masa fúngica húmeda.

### **7.3 Lisis celular para extracción de DNA.**

La masa fúngica húmeda se transfirió a un tubo de 2 mL, se agregó una mezcla de perlas de cerámica de ¼ de pulgada (MP Biomedicals, LLC) y un volumen de perlas de vidrio igual a 200 µL. Inicialmente se usaron dos kits comerciales, el GeneAll y el Fungal DNA Isolation kit.

#### **7.3.1 Extracción y purificación de DNA mediante el uso del kit GeneAll Exgene Plant SV mini.**

Al tubo previamente mencionado, se agregaron 400 µL del Buffer de lisis PL (GeneAll. 2009 Geneall Biotechnology., LTD. Banseok Bld., 128 Oguem-dong, Songpa-gu, Seoul, KOREA 138-859) más 4 µL de RNasa a 100 mg/mL. Posteriormente, la mezcla se agitó vigorosamente con el equipo Precellys Evolution Homogenizer (Bertin Instruments. Bertin Technologies SAS Parc d'activités du Pas du Lac. 10 bis, avenue Ampère. 78 180 Montigny-le-Bretonneux. France), durante 8 ciclos de 30 segundos cada uno a una velocidad de 6500 rpm. El lisado resultante se incubó a 65 °C por 15 minutos, tiempo durante el cual se mezcló tres veces. Se adicionaron 140 µL del Buffer PD y permaneció en hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 13,300 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recolectó en una columna de filtración EzSep (azul) con el cuidado de no tomar restos celulares, y se centrifugó por dos minutos a 13,300 rpm. El filtrado se recuperó y trasvasó a un microtubo nuevo, se agregaron 675 µL de Buffer BD y se mezcló inmediatamente. Esta mezcla se colocó dentro de una columna SV (verde) y se centrifugó por 30 segundos a 13,300 rpm. El filtrado se desechó y el contenido de la columna se lavó con 700 µL de Buffer CW en dos ocasiones, cada vez se centrifugó por 30 segundos a 13,300 rpm. Posteriormente, se adicionaron 50 µL del Buffer de elución AE, justo en el centro de la membrana de la columna, y se incubó 5 minutos a 65 °C, para finalmente ser centrifugado a 13,300 rpm por 1 minuto. Posteriormente la cantidad de DNA se cuantificó en Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **7.3.2 Extracción y purificación de DNA mediante el uso del Fungal DNA Isolation kit.**

Al tubo con la masa fúngica y perlas se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de Buffer FG1 (Omega Bio-Tek Inc), esta mezcla se agitó vigorosamente con el equipo Precellys Evolution Homogenizer durante 8 ciclos de 30 segundos a una velocidad de 6500 rpm.

El lisado resultante se incubó a 65 °C durante 10 minutos y durante ese tiempo se agitó en dos ocasiones, después se añadieron 180  $\mu\text{L}$  del Buffer FG2 y se mezcló por vortex, enseguida se incubó en hielo por 5 minutos para posteriormente ser centrifugado a 13,300 rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante, evitando tomar restos del lisado, a un nuevo microtubo de 1.5 mL para mezclarlo inmediatamente con 490  $\mu\text{L}$  de isopropanol. A continuación, se centrifugó a 13,300 rpm por 2 minutos, el sobrenadante se retiró con cuidado evitando perturbar el pellet y se dejó secar por 1 minuto. Una vez seco el pellet se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, previamente calentada a 65 °C, para suspenderlo, se necesitó de incubación a 65 °C por 5 minutos y durante ese tiempo se agitó. Se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de RNasa a 100 mg/ $\mu\text{L}$ , posteriormente se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de Buffer FG3 y 300  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se mezcló en vortex. Esta mezcla resultante se transfirió a la mini columna HIBIND DNA con un tubo de colección de 2 mL para centrifugar a 13,300 rpm por 1 minuto, el filtrado junto con el tubo de colección se desechó para sustituirlo por uno nuevo. La columna se lavó en dos ocasiones con 650  $\mu\text{L}$  del DNA Wash Buffer y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto. La columna se sometió a un centrifugado más para retirar el resto del Wash Buffer, finalmente, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del Buffer de elución, se incubó a 65 °C por 5 minutos y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto. Posterior a ello, se cuantificó el DNA por medio de un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **7.4 Amplificación de los *loci* ITS, *arf*, *antiH*, *ole* y *tub*.**

Para la amplificación de los cuatro *loci* -*arf*, *anti H*, *ole* y *tub*- tomamos en cuenta lo descrito por Kasuga y col. La secuencia de los oligonucleótidos usados está descrita en la Tabla 1. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , con una

concentración de MgCl<sub>2</sub> al 1.5 mM, dNTPs a 200 μM, 0.3 μM de cada pareja de los oligonucleótidos y 2.5 U de DNA Polimerasa. Los cuatro *loci* tuvieron el mismo programa de amplificación: Desnaturalización inicial a 95 °C por 7 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 30 seg, 72 °C por 45 seg y una elongación final de 72 °C por 7 min.

La amplificación también se realizó para el *loci ITS* en cada uno de los aislados, con el propósito de realizar una identificación molecular del hongo y confirmar su identidad. La reacción se llevó a cabo en 50 μL, con una concentración de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs a 100 μM, 2.5 U de Taq DNA Polimerasa, más 0.5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos. El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 7 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 58 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min y una elongación final de 72 °C por 7 min.

<b>Locus</b>	<b>Región o proteína codificante</b>	<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>	<b>Longitud del producto</b>
<b><i>arf</i></b>	Factor de ribosilación de ADP	arf 1	5'-AGAATATGGGGCAAAAAGGA-3'	459 pb
		arf 2	5'-CGCAATTCATCTTCGTTGAG-3'	
<b><i>anti-H</i></b>	Precursor del antígeno H	anti-H 3	5'-CGCAGTCACCTCCATACTATC-3'	408 pb
		anti-H 4	5'-GCGCCGACATTAACCC-3'	
<b><i>ole</i></b>	Desaturasa de ácidos grasos Delta-9	ole 3	5'-TTTAAACGAAGCCCCCACGG-3'	424 pb
		ole 4	5'-CACCACCTCCAACAGCAGCA-3'	
<b><i>tub1</i></b>	Alfa tubulina	tub 1	5'-GGTGGCCAAATCGCAAATC-3'	278 pb
		tub 2	5'-GGCAGCTTTCCGTTCCCTCAGT-3'	
<b><i>ITS</i></b>	Espacios transcritos primarios	ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	608 pb
		ITS-5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	

**Tabla 1. Oligonucleótidos que se usaron para la amplificación parcial de los *loci arf, anti-H, ole, tub e ITS*.**

Al término de la amplificación, realizamos electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Green. Para confirmar el tamaño del producto de amplificación se usó el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Thermo

Fisher). La electroforesis se llevó a cabo con buffer TBE al 0.5X a 100 voltios durante 60 minutos. Finalmente, se tomó una fotografía con cámara Polaroid.

### **7.5 Purificación de los productos de amplificación.**

Cada uno de los productos de amplificación se purificaron por medio del QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY) de manera breve, a todo el volumen del producto de amplificación se adicionó 250  $\mu$ L de buffer, se mezcló y vertió en la columna de separación, la cual se centrifugó a 13,300 rpm por un minuto, posteriormente se lavó en dos ocasiones con el buffer PE. Finalmente, se agregó Buffer EB con el fin de recuperar el DNA. La concentración del producto de amplificación se cuantificó mediante el uso del equipo Nanodrop 1000 y los purificados fueron almacenados a  $-70$  °C para su posterior análisis por secuenciación.

### **7.6 Secuenciación.**

Para el proceso de secuenciación de cada uno de los *loci*, se utilizaron 4  $\mu$ L de BigDye (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L del oligonucleótido forward específico a 5 pmol, 4  $\mu$ L de agua desionizada y 1  $\mu$ L de DNA a 10 ng/ $\mu$ L. En cada ensayo se introdujo el control de secuenciación PGEM recomendado por el fabricante. Esta mezcla de reacción se sometió al programa de amplificación: 96 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos 96 °C por 10 segundos y 50 °C por 5 segundos, para terminar con un ciclo a 60 °C por 4 minutos.

El producto se sometió a purificación mediante el uso de 10  $\mu$ L de XTerminator solution y 45  $\mu$ L del SAM solution (BigDye XTerminator Purification Kit, Applied Biosystems). Esta mezcla se agitó en vortex por 30 minutos. Posteriormente, la placa se centrifugó a 2500 rpm por 2 minutos, para finalmente ser introducida al secuenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **7.7 Alineamiento y edición de secuencias.**

El secuenciador generó archivos tipo (.ab1), uno por cada secuencia, cinco por cada aislado. Cada una de las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit v7.0.5 (Tom Hall. Ibis Therapeutics. A division of Isis Pharmaceuticals. 1891 Rutherford Road. Carlsbad, CA 92008. 760-603-2375). Se analizó puntualmente cada uno de los nucleótidos de cada una de las secuencias y en los casos en los que se requirió, se realizaron las ediciones necesarias. Se formaron así cinco archivos donde cada uno tuvo agrupado las secuencias del mismo *loci*.

### **7.8 Concatenado de las secuencias amplificadas (*arf*, *anti-H*, *ole* y *tub*).**

Conforme al trabajo de Kasuga y col<sup>2</sup>, las secuencias nucleotídicas de *arf*, *anti-H*, *ole* y *tub* editadas, se ensamblaron o concatenaron usando el programa Mesquite: A modular system for evolutionary analysis v.3.6 (David R. Maddison & Wayne P. Maddison. 2018) con archivos transformados a tipo NEXUS, de acuerdo a lo descrito en <https://www.youtube.com/watch?v=unZ48A60yfs&t=101s>. Este proceso se realizó para cada uno de los aislados incluidos en este estudio.

## 8. Resultados.

### 8.1 Recuperación de aislados del cepario y subcultivo.

Se recuperaron 150 aislados de *H. capsulatum* provenientes de diversas muestras clínicas, tal como se muestra en la Tabla 1.

Analizamos las características macroscópicas de los 150 cultivos, la mayoría de ellos mostraron colonias elevadas, algodonosas, de color blanco y sin pigmento al reverso, mientras que unos cuantos aislados presentaron colonias planas, de aspecto veloso color café o marrón. En la imagen 1 se muestran las características macroscópicas de algunos cultivos representativos.

Número de aislado	Tipo de muestra	Procedencia	Número de muestra
1	Mielocultivo		14024532
2	Mielocultivo		14037686
3	Mielocultivo		14051304
4	Hemocultivo por lisis		14059464
5	Mielocultivo		14060509
6	Hemocultivo por lisis		14081626
7	Mielocultivo		14082207
8	Lavado Bronquioalvolar		15018175
9	Hemocultivo por lisis		15062899
10	Hemocultivo por lisis	INER	16008728
11	Hemocultivo por lisis	INER	16008729
12	Mielocultivo	INER	16008747
13	Biopsia Piel	GUADALAJARA	16015524
14	Mielocultivo	GUADALAJARA	16015526
15	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16015528
16	Hemocultivo por lisis	PUEBLA	16016564
17	Mielocultivo	PUEBLA	16016568
18	Mielocultivo	PUEBLA	16017428
19	Hemocultivo por lisis	INER	16019229
20	Mielocultivo	INER	16019231
21	Mielocultivo	GUADALAJARA	16021546
22	Mielocultivo	INER	16027090
23	Hemocultivo por lisis	INS	16033335
24	Hemocultivo por lisis	INS	16033336
25	Mielocultivo	INS	16034008
26	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16042718
27	Hemocultivo por lisis	VERACRUZ	16044228
28	Mielocultivo	VERACRUZ	16044232

29	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16045459
30	Hemocultivo por lisis	INS	16050068
31	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16050766
32	Mielocultivo	GUADALAJARA	16050769
33	Biopsia Ganglio	GUADALAJARA	16050770
34	Mielocultivo	GUADALAJARA	16051133
35	Hemocultivo por lisis	PUEBLA	16059442
36	Mielocultivo	PUEBLA	16059444
37	Hemocultivo por lisis	INS	16060544
38	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16071725
39	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	16074378
40	Mielocultivo	GUADALAJARA	16075883
41	Mielocultivo	VERACRUZ	16090634
42	Mielocultivo	GUADALAJARA	16093216
43	Mielocultivo	GUADALAJARA	16093225
44	Biopsia Piel (cuantitativa)	GUADALAJARA	16093230
45	Mielocultivo	OAXACA	16094706
46	Biopsia Piel (cuantitativa)		16095113
47	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	16095705
48	Mielocultivo	VERACRUZ	16097320
49	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17001171
50	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	17001172
51	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17001174
52	Mielocultivo	GUADALAJARA	17008763
53	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	17009687
54	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17010587
55	Mielocultivo	GUADALAJARA	17010589
56	Mielocultivo	GUADALAJARA	17013455
57	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17014184
58	Mielocultivo	GUADALAJARA	17014187
59	Mielocultivo	GEA	17015318
60	Mielocultivo	INER OJO	17018883
61	Hemocultivo por lisis	OAXACA	17019623
62	Hemocultivo por lisis	INER	17019989
63	Mielocultivo	INER	17019991
64	Hemocultivo por lisis	INER	17021380
65	Mielocultivo	INER	17021382
66	Mielocultivo	GUADALAJARA	17023647
67	Mielocultivo	OAXACA	17023651
68	Hemocultivo por lisis	OAXACA	17023653
69	Mielocultivo	OAXACA	17023655
70	Mielocultivo	GUADALAJARA	17026970
71	Mielocultivo	VERACRUZ	17027381
72	Hemocultivo por lisis	VERACRUZ	17027383
73	Mielocultivo	PUEBLA	17028653
74	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17035220

75	Mielocultivo	GUADALAJARA	17035222
76	Hemocultivo por lisis	PUEBLA	17036804
77	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17036858
78	Mielocultivo		17038384
79	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17040195
80	Mielocultivo	GUADALAJARA	17040199
81	Mielocultivo	GUADALAJARA	17040704
82	Mielocultivo	GEA	17041021
83	Mielocultivo	GUADALAJARA	17041683
84	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17041687
85	Hemocultivo por lisis	GEA	17041801
86	Biopsia	GEA	17041803
87	Hemocultivo por lisis	VERACRUZ	17042344
88	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17051733
89	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	17057336
90	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17057338
91	Hemocultivo por lisis	GUADALAJARA	17059827
92	Mielocultivo	GUADALAJARA	17059832
93	Mielocultivo	INER	17061017
94	Mielocultivo	INER	17062129
95	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17062747
96	Mielocultivo		17064224
97	Mielocultivo	INER	17065566
98	Hemocultivo por lisis	INER	17066263
99	Mielocultivo	INER	17066264
100	Mielocultivo	GEA	17067298
101	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	17067387
102	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17067392
103	Hemocultivo por lisis	INCAN	17072832
104	Mielocultivo		17077606
105	Mielocultivo		17082232
106	Mielocultivo	GUADALAJARA	17082244
107	Hemocultivo por lisis		17085727
108	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	17086444
109	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	17086445
110	Mielocultivo	INER	17086510
111	Hemocultivo por lisis	GEA	17091184
112	Mielocultivo	PUEBLA	17092030
113	Mielocultivo	INER	17092035
114	Hemocultivo por lisis	INER	17092410
115	Mielocultivo	INER	17092412
116	Hemocultivo por lisis	PUEBLA	18002889
117	Mielocultivo	GUADALAJARA	18005598
118	Mielocultivo	OAXACA	18006276
119	Mielocultivo		18006566
120	Hemocultivo por lisis	INS	18007626

121	Mielocultivo	INS	18007877
122	Mielocultivo	VERACRUZ	18014299
123	Hemocultivo por lisis	PUEBLA	18014633
124	Mielocultivo	PUEBLA	18014635
125	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	18015598
126	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	18017335
127	Hemocultivo por lisis	VILLAHERMOSA	18017340
128	Mielocultivo	VILLAHERMOSA	18017341
129	Biopsia Musculo		18030551
130	Lavado Bronquioalveolar	INS	18038101
131	Lavado Bronquioalveolar	INS	18038107
132	Mielocultivo	INS	18038377
133	Hemocultivo por lisis		18049662
134	Hemocultivo por lisis	INS	18049950
135	Lavado Bronquioalveolar	INS	18050240
136	Mielocultivo	H. JUAREZ	18060330
137	Aspirado Endotraqueal	INS	18076484
138	Mielocultivo	GEA	19011186
139	Mielocultivo	INCMNSZ	19013851
140	Lavado Bronquioalveolar	INS	19027078
141	Mielocultivo	INS	19046302
142	Lavado Bronquioalveolar	INS	19046773
143	Lavado Bronquioalveolar	INS	19046783
144	Mielocultivo	H. JUAREZ	19064411
145	Mielocultivo	INS	19064516*
146	Mielocultivo	INS	19067066
147	Concentrado leucocitario	INS	19069304*
148	Hemocultivo por lisis	INN	19069587
149	Mielocultivo	INN	19069657
150	Biopsia Pulmón Izquierdo	INN	20004864

Tabla 1. Listado de los 150 aislados de *H. capsulatum* analizados en este estudio. (\*) Aislados que presentaron ambas morfologías, Albina y Brown.

A



B



Imagen 1. Morfología de colonias de *H. capsulatum* en placas de agar Sabouraud incubadas a temperatura ambiente. (A) Colonia Albinas o del tipo A. (B) Colonias Brown o del tipo B.

Algunos aislados presentaron contaminación con otros hongos, en estos casos, se realizaron las separaciones necesarias hasta lograr obtener un cultivo puro de *H. capsulatum*.

En los aislados 19064516 y 19069304 se observaron dos tipos de colonias características de *Histoplasma*, una con morfología Albina y otra con morfología Brown. Se realizó la separación en placas de agar Sabouraud, donde se confirmó

su identidad, al igual que los demás aislados se realizó la extracción de DNA y amplificación de los *loci* correspondientes de manera independiente.

En la Imagen 2 se muestran las características microscópicas de los aislados de *H. capsulatum* que se tiñeron con azul de lactofenol, con el objetivo de corroborar su identidad.

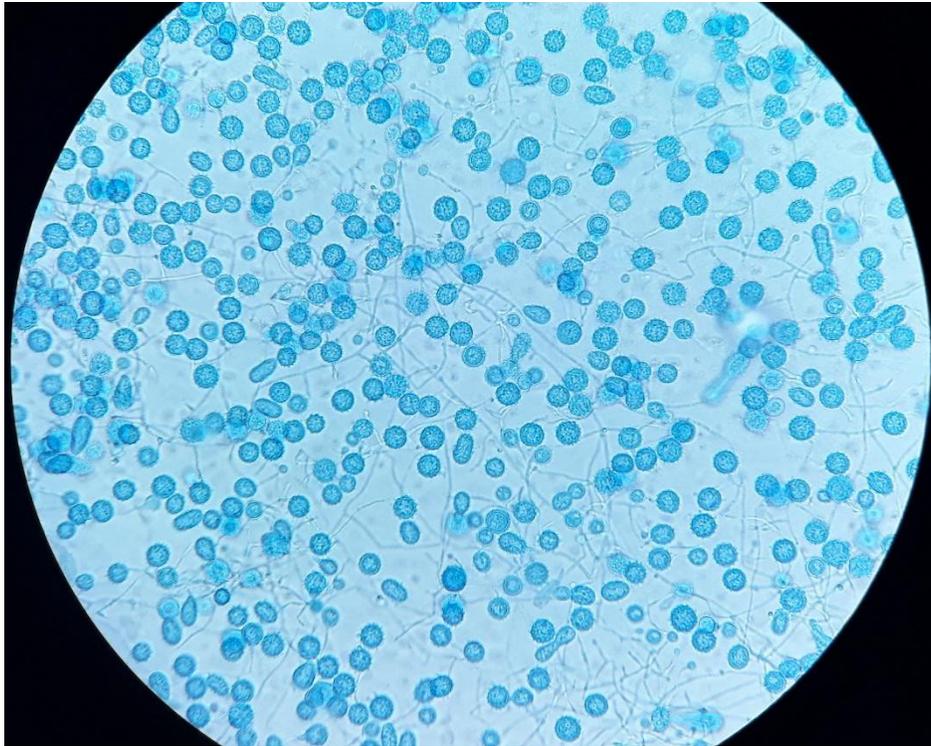


Imagen 2. Morfología microscópica de *H. capsulatum*, teñido mediante la tinción azul de lactofenol.

Por otro lado, el tiempo de incubación de los aislados en el caldo Sabouraud fue heterogéneo, en algunas ocasiones excedió las tres semanas, debido a que no se obtenía la cantidad suficiente del hongo para realizar el proceso de extracción de DNA (Imagen 3).

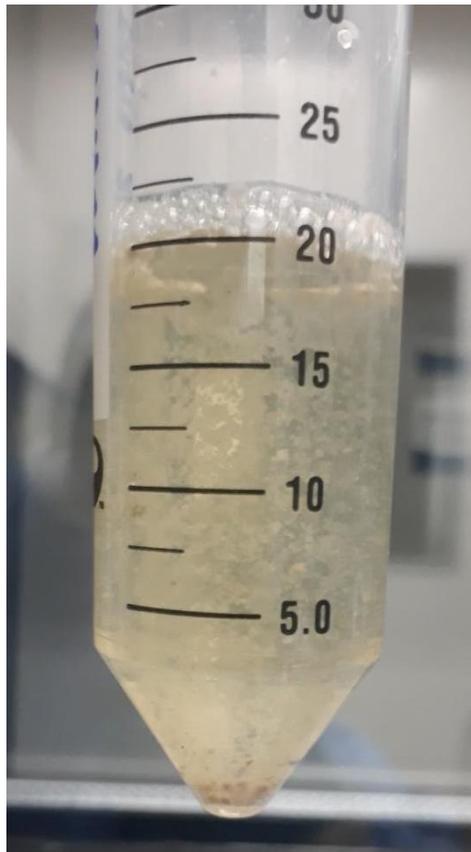


Imagen 3. Desarrollo de *Histoplasma capsulatum* en Caldo Dextrosa Sabouraud

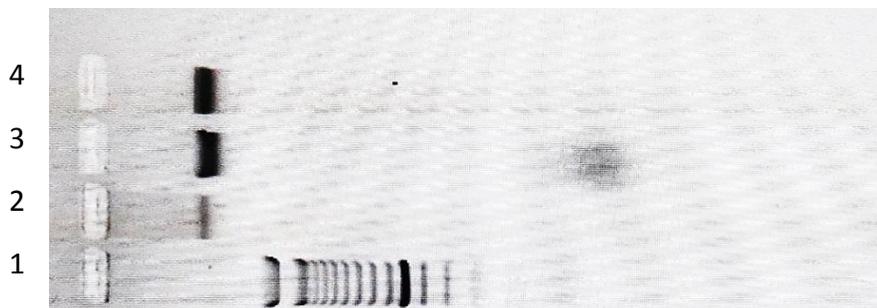


Imagen 4. Integridad del DNA en tres aislados de *Histoplasma capsulatum*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con Buffer TBE al 0.5X. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Invitrogen. TrackIt 100pb Ladder). Carril 2 – 4: DNA de aislados tomados al azar.

## 8.2 Extracción de DNA.

El rendimiento de los dos kits de extracción fue similar, sin embargo, se observó mejor concentración y pureza del DNA (40-100 ng/μL) cuando la extracción se realizaba con el kit Fungal DNA Isolation kit (Omega Bio-Tek Inc), de tal manera que decidimos realizar la extracción del resto de los aislados con mencionado kit.

### Amplificación de los genes.

Logramos la amplificación de los cinco *loci* (*arf*, *tub*, *ole* y *anti-H* e ITS) de los 119 aislados de *Histoplasma*. Al final contamos con 595 productos de amplificación. La Imagen 5 muestra el corrimiento en gel de agarosa de algunos ejemplos representativos de los cinco *loci* amplificados.

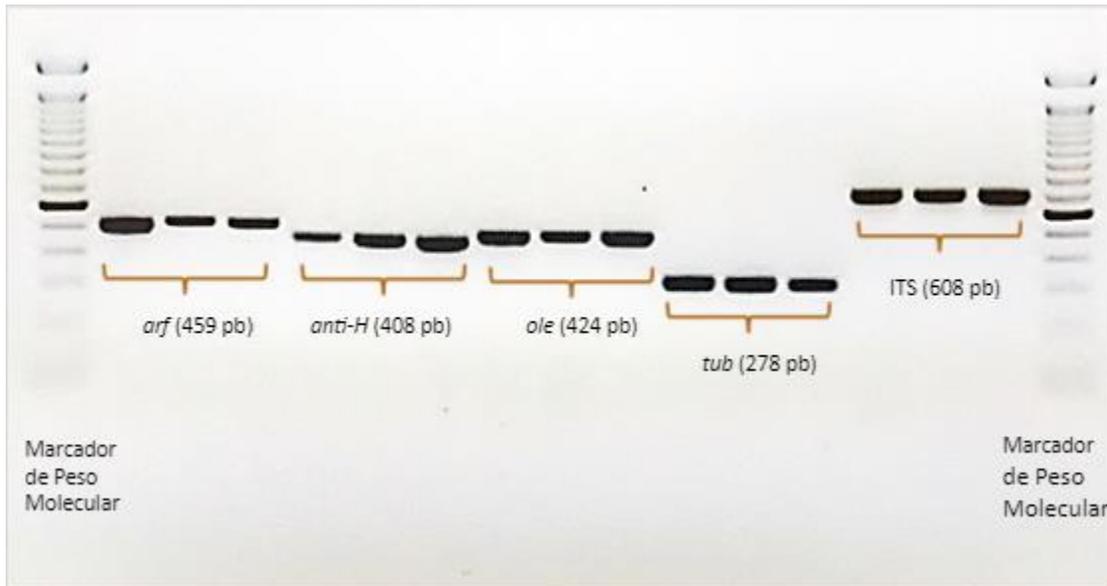


Imagen 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con Buffer TBE al 0.5X. Los carriles 1 y 17 corresponden al Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Invitrogen. TrackIt 100pb Ladder). Los carriles 2-4 corresponden al producto de amplificación del *loci arf* (459 pb), 5-7 a *anti-H* (408 pb), 8-10 a *ole* (424 pb), 11-13 a *tub* (278 pb), y 14-16 a ITS (608 pb), correspondientes a tres aislados diferentes tomados al azar.

### Secuenciación y Alineamiento.

Los cinco archivos generados por el equipo 3500 Genetic Analyzer se trabajaron con el programa BioEdit v7.0.5 y se obtuvo la alineación de las secuencias, los mismos archivos se usaron para concatenar en el programa Mesquite: A modular

system for evolutionary analysis v.3.6. Estos archivos fueron útiles para generar un árbol filogenético.

## 9. Discusión.

La extracción de DNA fue exitosa, la combinación del número y tipo de perlas, así como el número de ciclos utilizados en el equipo Precellys Evolution Homogenizer, fue idóneo para la ruptura de la pared celular de *H. capsulatum*. Así mismo, la amplificación de los cinco *loci* fue adecuada.

En la mayoría de los aislados se observó colonias de aspecto algodonoso, elevadas, de color blanco, sin pigmento al reverso de la placa de Agar Dextrosa Sabouraud concordantes con la morfología colonial tipo A, sin embargo la morfología no es suficiente para conocer el Clado al que pertenecen los aislados. En México se ha descrito que la población prevalente es del Clado Latinoamericano grupo A y que sus características coloniales son las del tipo A, dichos estudios no son a partir de aislados clínicos sino más bien de guano y de murciélagos que fueron capturados en cuevas<sup>20</sup>. Sin duda será interesante determinar si los aislados clínicos en este estudio pertenecen o no al mismo Clado descrito en el país, y tratar así de entender un poco más respecto a la dinámica de transmisión de este hongo. Ya que si los aislados clínicos tienen un parentesco cercano con los aislados obtenidos de cuevas, significa una línea de transmisión y foco de infección.

Interesantemente se observó que en dos aislados clínicos presentaron dos morfologías distintas, la morfología tipo Albina y la tipo Brown, las muestras clínicas son 19064516 y 19069304 escritas en la Tabla 1. La identidad de los hongos observados fue *H. capsulatum* con base a las características microscópicas y macroscópicas descritas en la literatura, pero dicha diferencia morfológica pueda tratarse de histoplasmas de distintos Clados, es decir que los pacientes de donde provenían los aislados tuvieron probablemente una infección mixta. Esta condición de infección mixta de *H. capsulatum* ya fue descrita por Damasceno en el 2019<sup>5</sup>, donde también observaron diferencias en las morfologías coloniales de aislados clínicos del mismo paciente, en ese trabajo se consideró la posibilidad de que en un momento dado los pacientes se infectaron simultáneamente con cepas diferentes, las cuales fueron retenidas por el sistema inmune (convirtiéndose así en una

infección latente), sin embargo cuando el paciente desarrolla un estado de inmunosupresión ambas cepas se reactivan y causan histoplasmosis. De forma prospectiva se sabrá el parentesco de estos aislados en los siguientes estudios.

Dado que la pared celular de *H. capsulatum* está compuesta por quitina, sacáridos agrupados en forma de  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\alpha$ -1,3-glucanos, galactomananos y componentes similares a la lectina estas le confiere rigidez a la pared celular y para lisarla se necesita de procedimientos más agresivos como los descritos por el fabricante de Precellys Evolution Homogenizer<sup>47</sup>. A pesar de eso se decidió aumentar a 8 ciclos por 30 segundos con pausas de 45 segundos a 6500 RPM (en lugar de 2 ciclos de 25 segundos cada uno a 6500 rpm recomendados por el fabricante) así como, usar una combinación de perlas de cerámica de  $\frac{1}{4}$  de pulgada con un volumen de perlas de vidrio de 200  $\mu$ L. Con este procedimiento los resultados fueron los esperados que consisten en tener una integridad ideal de DNA como se observa en la Imagen 4, se aprecia una sola banda que indica al material genético no estar lisado, además las concentraciones del material genético fueron altas, por lo que este procedimiento puede sustituir el método de extracción de DNA con nitrógeno líquido el cual tiene riesgo de quemaduras durante su manipulación, el uso de perlas logro lisar la pared celular de *H. capsulatum* podría también ser útil en microorganismos de similar dureza. Se confirmó la calidad del DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa, se observó que únicamente una banda de alto peso molecular estuvo presente, otro modo es el valor de pureza de la solución, que debe ser cercano a 2.0, las soluciones con DNA de las muestras cumplen satisfactoriamente ambas características.

Las condiciones de amplificación fueron las adecuadas pues los productos de amplificación de los cuatro *loci* requeridos para el análisis filogenético, *arf*, *anti-H*, *ole* y *tub* mas ITS usado también en la identificación de *Histoplasma*, correspondieron a los tamaños esperados<sup>2</sup> que son 459 pb en *arf*, 408 pb de *anti-H*, 424 pb en *ole*, 278 pb en *tub*, y 608 pb en *ITS* como se observa en la Imagen 5 en el que se observan las respectivas bandas de pesos moleculares señalados con lo que se demostró la reproducción de condiciones usadas por Kasuga y col<sup>15</sup>.

La identidad de los aislados fue compatible con *H. capsulatum* a través de su morfología colonial y microscópica, además, estos datos fueron fortalecidos con los resultados generados por la PCR de ITS y su subsecuente análisis informático de las secuencias obtenidas por BLASTn que confirmó una alta homología genética de los aislados y las secuencias de *H. capsulatum* disponibles en su base de datos. Así, se confirmó que cada uno de los aislados trabajados del cepario del Laboratorio de microbiología son perfectamente aptos para este tipo de investigación.

La calidad de los amplicones generados de la PCR específica para *H. capsulatum* fue por medio de un valor de pureza cercano a 2.0 y la presencia de una sola banda en el gel de agarosa después de la electroforesis (ver Imagen 5), aquellos amplicones que no los cumplieron se volvieron a someter al proceso de amplificación.

El árbol filogenético solo es una muestra de los estudios subsecuentes de los resultados obtenidos.

## 10. Conclusiones.

La extracción de DNA en la fase filamentosa de *H. capsulatum* fue útil con el equipo Precellys Evolution Homogenizer.

Se logró de manera exitosa la lisis celular y extracción de una buena concentración de DNA de *Histoplasma capsulatum* a partir del cultivo en Caldo Sabouraud y el uso combinado de perlas de cerámica de ¼ de pulgada y perlas de vidrio.

Los amplicones generados por la PCR específica de los *loci arf, anti-H, ole y tub* e ITS, fueron obtenidos satisfactoriamente y de forma reproducible.

Los hallazgos obtenidos sostienen el inicio del proceso de secuenciación de estos productos de amplificación para el futuro análisis bioinformático, el análisis filogenético, de los aislados de *Histoplasma capsulatum* y comprender el parentesco genético de este gran acervo de aislados clínicos con los reportados en otros estudios.

## 11. Perspectivas.

Secuenciar cada uno de los productos de la PCR específica de *Histoplasma capsulatum* para determinar el parentesco entre estos aislados clínicos por medio de análisis filogenético.

Analizar filogenéticamente el parentesco de estos aislados clínicos con especímenes obtenidos de muestras de animales en México.

Analizar filogenéticamente el parentesco de estos aislados clínicos con especímenes obtenidos de muestras clínicas y de animales en el mundo.

La información obtenida permitirá relacionar las características moleculares con su comportamiento epidemiológico y clínico en estas poblaciones particulares.

## 12. Referencias.

1. Richardson MD. Fungal Infection Diagnosis and management. 4° Edition. Wiley Blackwell.
2. Kasuga T. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Molecular Ecology. 2003;12. 3383-3401.
3. John Willard Rippon. Medical Mycology: The Pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W.B. Saunders Company. 3th edition. 1998.
4. National Center for Biotechnology Information. Disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Damasceno LS. Mixed infection by *Histoplasma capsulatum* isolates with different mating types in Brazilian AIDS-patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2019;61:8.
6. Maresca B. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiological Reviews. 1989;53:2.
7. Allendoerfer R. Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis. J. Infect Dis. 175, 905-914.
8. Martinez BM. Monografías de las micosis sistémicas. Facultad de Medicina. 2011.
9. Guimaraes AJ. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. Frontiers in Microbiology. 2011;2:225.
10. Teixeira MM. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. PLOS. 2016.
11. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20:1. P. 115-132.
12. Eissenberg LG. *Histoplasma* variation and adaptative strategies for parasitism: new perspective on Histoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 1991;4;4.
13. Zeidberg. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. Ame Jou Pub Haelth. 1952.
14. Vaca Marin. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 1998; 3:11.
15. Kasuga T. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. J. Clin. Microbiol. 1999;37:3. Page 653-663.
16. González OA. Histoplasmosis primaria pulmonar aguda. IV Congreso Venezolano de Fisiología y Neumología Valencia- Estado Carabobo. 1959.

17. González OA. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México. *Rev Incest Salud Publ (Mex)* 1971; 31: 74-77.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Citado: 24 de mayo, 2019. [www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/statistics.html](http://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/statistics.html)
19. Skinner JB. Newer occupational diseases. *New Engl J Med* 1950; 243: 482-486.
20. Flores EJJ. Estudio del desplazamiento de cepas mexicanas de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza, por identificación del polimorfismo genético del DNA genómico. Tesis. UNAM. 1998.
21. Corcho BA. Brote inusual de histoplasmosis en residentes del estado de México. *Gaceta Médica de México*. 2011;147:377-84.
22. Taylor ML. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, México. *FEMS*. 2005;45:435-441.
23. Wheat LJ. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses*. 2006;49:274-282.
24. Reyes-Montes MR. Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: una revisión de los hallazgos. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17. Page 121-126.
25. Damasceno LS. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015.
26. International Barcode of Life. <http://www.ibol.org>
27. Gaur PK. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Experimental mycology*. 1980;5. Page 69-77.
28. Vincent RD. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J. Bacteriol*. 1986;165: 3.
29. Spitzer ED. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun*. 1989; 57:5.
30. Keath EJ. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol*. 1992;30:8.
31. Gass M. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch Derm*. 1969;100.
32. Spitzer ED. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolates from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *JID* 1990;162.

33. Kersulyte D. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. J Bacteriol. 1992;174:22.
34. Woods JP. Fast DNA isolated from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. J. Clin. Microbiol. 1993;31:2.
35. Poonwam N. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA method. J. Clin. Microbiol. 1998;36:10.
36. Vazquez JA. *Multilocus sequence typing*: el marcador molecular de la era de Internet. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22(2):113-120.
37. Murata Y. Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. Medical Mycology. 2007:45.
38. Reyes-Montes MR. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. J. Clin. Microbiol. 1999;37:5.
39. Salas RMA. Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociadas al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 1998; 11: 3
40. Brilhante RS. Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. Journal of Medical Microbiology. 2012:61.
41. Taylor ML. Diversidad genética de *Histoplasma capsulatum* asociada a murciélagos cavernícolas. Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2014.
42. Manfredi R. Histoplasmosis capsulati and duboisii in Europe. The impact of the HIV pandemic travel and migration. 1994.
43. Garcia CA, Miranda CA. Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. Universidad Libre Seccional Barranquilla. Revistas Biocientíficas. 2018: 13;2
44. Baldus PJ. Sequence based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. J. Clin. Microbiol. 2000:38
45. Fernández VFA. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Servicio de Microbiología. Control Calidad SEIMEC. Barcelona.

46. Monroy-Vaca EX. Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*. 2014;23:2.
47. Bertin instruments. Monitor the invisible [Internet]. Francia [consultado: 9 dic 2019] Disponible en: <https://www.bertin-instruments.com/product/sample-preparation-homogenizers/precellys-evolution-homogenizer/>
48. MP Biomedicals, LLC. A division of Valiant FC Co Ltd [Internet]. [consultado: 9 dic 2019] Disponible en: <https://www.mpbio.com/life-sciences/lab-instrumentation>
49. Bertin Instruments. Lysing kits. [Internet] [Consultado 9 dic 2019]. Disponible en: <https://www.bertin-instruments.com/product/sample-preparation-homogenizers/precellys-lysing-kits/>
50. MP Biomedicals, LLC. ¼ " esfera de cerámica [Internet] [Consultado 9 dic 2019]. Disponible en <https://www.mpbio.com/116540424-cf-1-4-ceramic-sphere>
51. Necochea CR, Canul JC. Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología. UNAM. 2004.
52. Gómez CAC. Estudio de la implicación de los genes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* de *Mycobacterium tuberculosis* en la resistencia a fármacos. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesis Doctoral. 2013.
53. Cortazar MA, Silva REP. Métodos físico-químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología. UNAM. 2004.

## **Glosario.**

**Aislado.** Espécimen en proceso de caracterización, obtenidos de una clona independiente.

**Alineamiento.** Momento en la PCR donde los oligonucleótidos se hibridan en la secuencia específica de DNA.

**Análisis filogenético.** Indica las relaciones evolutivas de secuencias de DNA entre especies, aportando información como los ancestros comunes, así como las distancias entre ellas.

**Anemia.** Disminución en la cantidad normal en los glóbulos rojos.

**Antropología.** Ciencia que estudia los aspectos físicos y culturales de las comunidades humanas a través del tiempo.

**Ascomiceto.** Son hongos de micelio tabicado que producen ascosporas endógenas. También llamados Ascomycota.

**Autopsias.** Procedimiento médico que implica la disección de un cadáver con el fin de entender la causa de muerte.

**Bootstrap.** Método de fiabilidad para árboles filogenéticos. Consiste en crear una matriz de datos cuyas columnas cambian de manera aleatoria, creando en cada cambio un árbol filogenético, al final se indica el porcentaje de veces que cada nodo del árbol tuvo el mismo resultado.

**Brote epidémico.** Aparición repentina de una enfermedad infecciosa en animales o personas de un lugar específico. La aparición de un solo caso en determinadas zonas puede considerarse brote epidémico.

**Buffer.** Aquella solución que ante la adición de un ácido o base son capaces de mantener el pH específico. También llamado soluciones tampón.

**Células T.** Parte del sistema inmunitario, actuando contra infecciones víricas y rechazo de órganos trasplantados.

**Cepa.** Espécimen bien caracterizado por lo que pueden servir como referencia y que derivan de una colección de especímenes altamente relacionados de la misma especie.

**Cepario.** Colección de microorganismos como bacterias, hongos filamentosos o levaduriformes de interés docente o de investigación.

**Clado.** Agrupación o conjunto de descendientes (actuales o extintos) de un solo antepasado. A cada integrante del clado se le llama linaje.

**Clonación.** Proceso en el que se consiguen, de forma asexual, copias idénticas de un organismo.

**Colonias.** Agrupación o conjunto de microorganismos con las mismas características morfológicas.

**Concatenado.** Unir, enlazar y relacionar, en el contexto de la filogenia, secuencias de DNA.

**Conidio.** Estructura celular producto de la reproducción asexual, utilizada para la identificación rutinaria de hongos filamentosos, es generada en la mayoría de los hongos en condiciones normales. Existen estructuras multicelulares llamadas macroconidios y también unicelulares llamadas microconidios.

**Corticosteroides.** También llamados corticoides son un tipo de hormonas producida por las glándulas suprarrenales utilizada por su efecto antiinflamatorio e inmunosupresor para distintas patologías.

**Cultivo.** Proceso de proliferación de microorganismos al proporcionarles un entorno con condiciones apropiadas.

**Desnaturalización.** Momento en la PCR donde las cadenas de DNA se separan debido al aumento de la temperatura.

**Dimorfo.** Aplicado a los hongos, determinadas especies pueden presentarse bajo dos aspectos morfológicos, fase micelar y fase levadura.

**Disnea.** Sensación de incapacidad, dificultad o incomodidad para respirar.

**Diversidad genética.** Se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de determinada especie o grupo de especies.

**DNA.** Nombre químico de la molécula que contiene información genética de todos los seres vivos. Consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una doble hélice.

**Electroforesis.** Técnica de separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una fase sólida.

**Elongación.** Momento en la técnica de PCR donde la Polimerasa ensambla nucleótidos específicos para formar una cadena nueva de DNA.

**Elución.** Extraer por medio de un líquido apropiado, una sustancia del medio sólido que la ha absorbido.

**Endemicidad.** Concepto que distingue a un microorganismo o grupo biológico nativo de un área geográfica restringida.

**Endonucleasas.** Son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en el interior de una cadena polinucleotídica.

**Enfisema.** Es una afección pulmonar que causa dificultad para respirar, ya que al exhalar los alvéolos no pueden intercambiar aire fresco.

**Enzimas.** Son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, comúnmente son de naturaleza proteica o bien de RNA.

**Epidemiología.** Estudio de la distribución y los determinantes de estados o eventos (en particular de enfermedades) relacionados con la salud y la aplicación de esos estudios al control de enfermedades y otros problemas de salud.

**Especie filogenética.** Definida por la sistemática filogenética como aquella que es descendiente de un ancestro directo, una especie troncal, que guarda relación de parentesco entre los individuos también descendientes del mismo ancestro.

**Especie críptica.** Especie estrechamente relacionada con una que es indistinguible por métodos fenotípicos, es necesaria la sistemática filogenética para diferenciarla.

**Espeleología.** Ciencia que estudia el origen y la formación de las cavidades subterráneas naturales, así como su flora y fauna.

**Estorninos.** *Sturnus vulgaris*, es un ave cantora de plumaje negro iridiscente.

**Fagosoma.** Vacuola formada alrededor de una partícula asimilada por fagocitosis.

**Fenotipificación.** Proceso en el que determina las características observables de un organismo, generalmente relacionado con el genotipo, aunque casi siempre hay factores ambientales que también pueden afectarlo.

**Fertilizante.** Sustancia que mejora la calidad de la tierra y facilita el crecimiento de las plantas.

**Fluorocromo.** Sustancia que absorbe luz ultravioleta para emitirla en forma de luz visible. También llamados marcadores fluorescentes o fluoróforos.

**Galactomanano.** Biopolímeros del tipo polisacárido formados por un esqueleto de manosa con ramificaciones formadas por unidades de galactosa.

**Galactosa.** Monosacárido perteneciente al grupo de las aldosas, un estereoisómero de la glucosa en el carbono 4.

**Gemación.** Forma de reproducción asexual, en el que produce en alguna parte de su cuerpo, una yema o protuberancia que se convierte en un nuevo individuo.

**Genotipificación.** Procedimiento de laboratorio donde se determina el genotipo de una variante en el DNA específico de un organismo.

**Geofílico.** Microorganismo que tiene preferencia en desarrollarse en el suelo.

**Geología.** Ciencia que estudia el origen, formación y evolución de la Tierra, los materiales que la componen y su estructura.

**Glucanos.** Tipo de polisacáridos formados específicamente por unidades de glucosa.

**Guano.** Conjunto masivo del excremento de murciélago, aves marinas en ambientes áridos o de escasa humedad.

**Hematopoyéticas, células.** Células inmaduras que pueden originar todo tipo de células sanguíneas o de tejido corporal.

**Hemoptisis.** Expectoración de sangre proveniente de los pulmones o los bronquios causada por alguna lesión de las vías respiratorias.

**Hepatoesplenomegalia.** Inflamación del hígado y bazo.

**Hialinas.** Relacionado a hifas, aquellas que carecen de pigmento como los hialohifomicetos (*Aspergillus*, *Penicilium*, *Histoplasma*, etc).

**Hibridación.** Vea Alineamiento.

**Hifas.** Vea Micelio.

**Hipotensión.** Ocurre cuando la presión arterial es mucho más baja de lo normal.

**Histoplasmina.** Alergeno utilizado en intradermorreacciones para saber si la persona ha tenido contacto con *Histoplasma capsulatum*.

**Histoplasmosis.** Enfermedad pulmonar primaria que tiene como reservorio el suelo.

**Incubación.** Mantenimiento de un cultivo de un organismo a una temperatura constante, por medios naturales o artificiales, para su desarrollo.

**Infección.** Invasión y multiplicación de agentes patógenos en los tejidos de un organismo hospedador.

**Interferón Gamma.** Tipo de citocina producida por linfocitos T CD4+ y linfocitos NK, con el propósito de activar macrófagos.

**ITS.** Son secuencias que no transcriben proteína, situadas entre la secuencia de la subunidad pequeña y subunidad grande del ARN ribosomal. Del acrónimo en inglés, Internal Transcribed Spacer.

**Laser.** Acrónimo inglés de: light amplification by stimulated emission of radiation; amplificación de luz por emisión estimulada de radiación.

**Lectina.** Proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto, desempeñándose principalmente en el reconocimiento celular o molecular.

**Levadura.** Tipo de hongo microscópico de crecimiento cremoso.

**Linaje.** Dentro de un árbol filogenético, el linaje es una única rama terminal que representa una especie descendiente directamente de una especie ancestral directa.

**Linfa.** Es un líquido transparente que recorre los vasos linfáticos. Contiene líquido intersticial, proteínas, lípidos y linfocitos.

**Linfadenopatía.** Describe la inflamación de los ganglios linfáticos.

***loci housekeeping.*** Son únicas copias dentro del DNA altamente conservadas pero que mantienen la suficiente variabilidad nucleotídica para establecer una relación precisa entre aislados estrechamente relacionados. Usados principalmente en el análisis MLSA.

***loci.*** Plural de locus. Es una posición fija dentro del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de DNA.

**Lupus eritematoso.** Enfermedad donde el sistema inmunitario ataca erróneamente el tejido sano.

**Macrófagos.** Células del sistema inmune que engullen patógenos o células anómalas en un proceso llamado fagocitosis.

**Manosa.** Monosacárido perteneciente al grupo de las aldosas, un estereoisómero de la glucosa en el carbono 2.

**Micelio.** Estructuras propias de los hongos mohosos o filamentosos, desempeñan la función de absorber o transformar nutrientes. También llamadas hifas.

**Micosis.** Enfermedad infecciosa producida por hongos donde pueden afectar a cualquier parte del cuerpo.

**Microbiología.** Ciencia que parte de la Biología que estudia a los microorganismos u organismos microscópicos.

**Microsatélite.** Tándem de una secuencia simple de 10 nucleótidos aproximadamente.

**MLEE.** Método de tipificación fenotípica que usa perfiles electroforéticos de un conjunto de isoenzimas. Del acrónimo en inglés, Multilocus Enzyme Electrophoresis.

**MLST.** Método genotípico para diferenciar individuos aislados de la misma especie por medio del análisis de secuencias parciales de una serie de genes conservados. Del acrónimo en inglés, Multilocus Sequence Typing.

**Morfología.** Disciplina que se ocupa del estudio y descripción de formas externas.

**Mutagénesis.** Producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no.

**Nódulo.** Masa de células, abultada y dura de tejido que puede ser normal o patológica.

**Oligonucleótido.** Secuencia corta de DNA o RNA, compuesta de ácidos nucleicos. Desempeñando distintas funciones, usados como sondas de hibridación, flanquean

secuencias específicas de DNA en una reacción de amplificación y bloqueos específicos de RNA mensajero.

**Pancitopenia.** Disminución en la cantidad normal de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

**Parasitología.** Ciencia que parte de la Biología que estudia los parásitos y su relación con el hospedador.

**Patogenicidad.** Capacidad de un microorganismo de producir una enfermedad en hospedadores susceptibles.

**PCR.** Método molecular que amplifica de forma exponencial la cantidad de DNA específico. Del acrónimo en inglés, Polymerase Chain Reaction.

**PFGE.** Técnica de caracterización molecular de un microorganismo, usa grandes fragmentos de DNA por medio de una electroforesis en campos pulsados. Del acrónimo en inglés, Pulsed Field Gel Electrophoresis.

**Polimerasa.** Enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

**Polimorfismos.** Resulta de una variante genética en la secuencia de DNA entre individuos de la misma especie y se encuentra en una frecuencia mayor al 1%, debajo de esto se le conoce como mutación.

**Prevalencia.** En epidemiología, es la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica determinada.

**Primer.** Vea oligonucleótidos.

**Protozooario.** Organismo unicelular con núcleo definido, también llamado protozoo.

**Quitina.** Sustancia formada por glúcidos nitrogenados, insoluble en agua, constituye parte del material de revestimiento de hongos.

**RAPD.** Método genotípico de amplificación aleatoria de DNA polimórfico. Del acrónimo en inglés, Random Amplification of Polymorphic DNA.

**RFLP.** Método genotípico que usa enzimas de restricción de corte frecuente sobre todo el DNA y sondas marcadas para denotar los segmentos polimórficos específicos. Del acrónimo del inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism.

**Sacáridos.** Hidratos de carbono, carbohidratos o glúcidos son biomoléculas compuestas principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque algunos también contienen nitrógeno, azufre y fósforo.

**Salting out.** Método de purificación que utiliza la reducida solubilidad de ciertas moléculas en una solución saturada de sales.

**Saprobio.** Microorganismo que se desarrolla sobre tejidos orgánicos en descomposición.

**Secuenciación.** Método bioquímico cuya finalidad es la determinación del orden de los ácidos nucleicos (Adenina, Citosina, Guanina, Timina) en un segmento de DNA.

**Septadas.** Tipo de hifa que contiene separaciones por tabiques o septos.

**Sondas.** Los oligonucleótidos conjugados con un fluorocromo, se hibridan en una secuencia específica en la cadena de DNA.

**Sonicación.** Técnica de rompimiento de sustancias por medio de ondas acústicas.

**Southern blot.** Método usado en Biología molecular para la detección de secuencias específicas de DNA en muestras de DNA.

**Tipificación.** Procedimiento de clasificación de un conjunto de organismos.

**Tuberculosis.** Enfermedad infecciosa grave causada por *Micobacterium tuberculosis*, afectando principalmente a los pulmones.

**Virulencia.** Capacidad de un microorganismo de producir una infección en hospedadores nuevos.

**VNTR.** Son repeticiones de secuencias de nucleótidos utilizadas como marcador molecular. Del acrónimo en inglés, Variable Number of Tandem Repeats.