

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



**“Caracterización genotípica de *Histoplasma capsulatum* aislado de  
pacientes con histoplasmosis en el Hospital Escuela y Hospital  
Cardiopulmonar en Tegucigalpa- Honduras. Diciembre 2010-Julio  
2011”**

TESIS SUSTENTADA POR:

**CARMEN MARIA GALO, M.Q.C**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO  
DE MASTER EN CIENCIAS EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA M.D.C.

26 de Marzo del 2012

HONDURAS C.A

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y**  
**ZOONÓTICAS**

RECTORA

**JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.**

VICERRECTORA ACADÉMICA

**RUTILIA CALDERÓN, Ph.D.**

DIRECTOR DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**OLGA MARINA JOYA, Ph.D.**

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

**MIRNA MARIN, Ph.D.**

COORDINADORA ACADÉMICA DE CARRERA

DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONÓTICAS

**MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y**  
**ZOONÓTICAS**

**ASESORA DE TESIS**

ANA LOURDES SÁNCHEZ, Ph.D. (Brock University)

**CO-ASESOR DE TESIS**

GUSTAVO FONTECHA, Ph.D. (UNAH)

**TERNA EXAMINADORA**

GUSTAVO FONTECHA, Ph.D. (UNAH)

LILIAN FERRUFINO, Ph.D. (UNAH)

ANABELLE FERRERA Ph.D. (UNAH)

# CONTENIDO

PORTADA.....	I
CONTENIDO.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	VI
LISTA DE CUADROS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
CAPITULO I:.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	5
CAPITULO 2:.....	6
1. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	6
2.1. BIOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE HISTOPLASMA CAPSULATUM .....	6
2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	6
2.1.2. DIMORFISMO DE <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i> .....	8
2.1.3. VARIABILIDAD FENOTÍPICA CELULAR Y COLONIAL .....	10
2.2. VARIABILIDAD GENÉTICA .....	11
2.3. ECOLOGÍA DE <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i> .....	21
2.4. EPIDEMIOLOGÍA DE HISTOPLASMA CAPSULATUM.....	22
2.4.1. EPIDEMIOLOGÍA GLOBAL.....	22
2.4.2. EPIDEMIOLOGÍA EN EL CONTINENTE AMERICANO.....	23
2.4.3. EPIDEMIOLOGÍA EN HONDURAS .....	25
2.5. HISTOPLASMOSIS .....	28
2.5.1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA .....	28
2.5.2. PRESENTACIONES CLÍNICAS .....	29
2.5.3. HISTOPLASMOSIS PULMONAR AGUDA.....	31
2.5.4. HISTOPLASMOSIS PULMONAR CRÓNICA.....	31
2.5.5. HISTOPLASMOSIS DISEMINADA.....	32
2.6. INMUNOPATOGÉNESIS.....	34
2.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA HISTOPLASMOSIS .....	39
2.7.1. CULTIVO EN MEDIOS ARTIFICIALES .....	40
2.7.2. PRUEBAS SEROLÓGICAS .....	41
2.7.3. PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (HISTOPLASMINA) .....	42
2.7.4. DIAGNÓSTICO UTILIZANDO TÉCNICAS MOLECULARES .....	43
2.8. NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN EN HONDURAS .....	44

CAPITULO 3:.....	46
1. METODOLOGÍA.....	46
1.1. RECAPITULACIÓN DE LOS OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN .....	46
1.2. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	46
1.3. OBTENCIÓN DE AISLADOS .....	47
1.4. METODOLOGÍA DE LABORATORIO .....	48
1.5. TRANSPORTE DE AISLAMIENTOS AL LABORATORIO DE MICOLOGÍA.....	48
1.6. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.....	49
1.7. EXTRACCIÓN DE ADN.....	50
1.8. GENOTIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE HISTOPLASMA CAPSULATUM.....	51
1.9. ANÁLISIS DE DATOS .....	55
CAPITULO 4:.....	58
1. RESULTADOS .....	58
CAPITULO 5:.....	92
1. DISCUSIÓN.....	92
CAPITULO 6:.....	103
1. CONCLUSIONES.....	103
CAPITULO 7:.....	105
1. RECOMENDACIONES .....	105
REFERENCIAS	
ANEXOS	

## AGRADECIMIENTOS

*“Si el Señor no construye la casa, en vano se cansan los constructores”. Salmo 127.*

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 *“Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”*. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** ([www.ghri.ca](http://www.ghri.ca)). Fondos complementarios para la realización de este estudio han sido provistos por la Dirección de Investigación Científica de la UNAH.

This thesis project has been possible thanks to a study and research scholarship granted by the Honduras-Canada Teasdale-Corti Project 2007-2012 *“Increasing Capacity to Achieve Millennium Development Goal # 6 in Honduras: Combating Infectious Diseases”*, funded by the Teasdale-Corti Global Health Research Partnership Program of the **Global Health Research Initiative** (GHRI), Canada ([www.ghri.ca](http://www.ghri.ca)). Complementary funds have been provided by DICU-UNAH.

Un agradecimiento especial a la Dra. Sandra Montoya encargada del laboratorio de Micología del Hospital Escuela y al Dr. Iván Rodríguez encargado de los análisis de Micología del Hospital Cardiopulmonar, quienes muy gentilmente donaron los

aislamientos de *H. capsulatum* para este estudio. Sin su apoyo este estudio no hubiese sido posible.

A los profesores de la Escuela de Microbiología que en determinado momento me ofrecieron su colaboración a través de sus conocimientos, su apoyo o su amistad.

Dra. Ivette Lorenzana de Rivera

Dra. Irma Gloria Enamorado

Dra. Vilma Espinoza

Dra. Gina Laitano

Dr. Jorge Carrasco

Dra. Milena Vanegas

Dra. Ada Zelaya de Perdomo

Mi profundo agradecimiento a mis asesores Dra. Ana Sánchez y Dr. Gustavo Fontecha por su dedicación, apoyo y por el conocimiento transmitido.

A mi familia, gracias por permitir el tiempo robado

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	Resumen de la variabilidad genética de <i>Histoplasma capsulatum</i> encontrada en estudios realizados entre 1981 y 2008	19
<b>Cuadro 2</b>	Aislamientos de <i>H. capsulatum</i> en el período del 2004 al 2010 en el Hospital Escuela	28
<b>Cuadro 3</b>	Aislados de <i>Histoplasma capsulatum</i> utilizados en este estudio	60
<b>Cuadro 4</b>	Número de posiciones variables de los 7 genes estudiados.	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
<b>Figura 1</b>	Cultivo de <i>Histoplasma capsulatum</i> donde se observa micelio hialino con macroconidios tuberculadas. Cuadro inserto: forma levaduriforme	9
<b>Figura 2</b>	Morfología celular de cepas aberrantes de <i>H. capsulatum</i> : (a) hifas hialinas ligeramente engrosadas, septadas, con clamidoconidios solitarios terminales (b) clamidoconidio intercalar (c) hifas hialinas flexuosas. Coloración de lactofenol azul de algodón, 400 aumentos.	11
<b>Figura 3</b>	Zonas altamente endémicas de histoplasmosis en América	25
<b>Figura 4</b>	Esquema de las regiones ITS de <i>H. capsulatum</i> amplificadas por la técnica de PCR anidado	55
<b>Figura 5</b>	Amplificación de genes <i>arf</i> , <i>H-anti</i> , <i>tub</i> y región ITS por la técnica de PCR	61
<b>Figuras 6-19</b>	Arboles filogenéticos de secuencias de aislados en Honduras	63
<b>Figuras 20-29</b>	Arboles filogenéticos de secuencias de aislados de Honduras y otros países.	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
DHL	Deshidrogenasa láctica
DRK1 (gen)	Quinasa reguladora del dimorfismo (por sus siglas en inglés)
Gen <i>H Anti</i>	Antígeno H (gen que codifica para antígeno H de <i>Histoplasma capsulatum</i> )
LAm Hcc A	<i>H. capsulatum</i> Latinoamérica clase A
Gen <i>Ole</i>	Gen Delta 9- <i>desaturase oleic acid</i> (gen que codifica para enzima reguladora de fluidez de membrana en <i>Histoplasma capsulatum</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)
PCR-RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción por reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
Gen <i>arf</i>	Gen que codifica para la proteína Factor ribosomal de ADP involucrada en transporte vesicular en eucariotas.
RAPD-PCR	Amplificación al azar de ADN polimórfico por PCR
RPY1 (gen)	Proteína de fase levaduriforme (por sus siglas en inglés)
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (por sus siglas en inglés)
SAm Hcc A	<i>H. capsulatum</i> de Sur América clase A
SAm Hcc B	<i>H. capsulatum</i> de Sur América clase B
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Gen <i>tub</i>	Gen que codifica para la expresión de la proteína tubulina, presente en microtúbulos.

## **CAPITULO I:**

### **1. INTRODUCCIÓN**

*Histoplasma capsulatum* es un hongo dimórfico que habita en regiones tropicales y subtropicales y es el agente etiológico de la histoplasmosis. La histoplasmosis es una micosis cuyo espectro clínico depende de la dosis del inóculo y de la competencia inmunológica del huésped, y abarca desde la infección asintomática hasta la infección sistémica que puede causar enfermedad severa e incluso la muerte (Chang, Taira et al. 2007). La histoplasmosis es considerada una micosis oportunista ya que es común en individuos inmunosuprimidos (Hajjeh 1995; Gutierrez, Canton et al. 2005; Huber, Nacher et al. 2008). De hecho, en áreas endémicas la incidencia de esta micosis en pacientes con SIDA puede ser entre 5% y 20% (Jeong, Sohn et al. 2007). La histoplasmosis es considerada la más común de las micosis sistémicas endémicas en individuos con dicho síndrome (Woods 2002).

La histoplasmosis ha sido reportada en más de 60 países ubicados en los diferentes continentes pero su prevalencia es mayor en Norte, Centro y Sur América, regiones donde es considerada endémica (Chang, Taira et al. 2007). Entre las Américas, Estados Unidos es uno de los países que más casos reporta pues contiene áreas geográficas donde la infección es altamente endémica y puede alcanzar hasta medio millón de casos nuevos por año (Woods 2002; Maubon, Simon et al. 2007). En México, la histoplasmosis está ampliamente distribuida, pero existen regiones con mayor prevalencia que otras (Taylor,

Chavez-Tapia et al. 2005). En Centro América, aunque todos los países son considerados endémicos, los reportes publicados de casos autóctonos son escasos. En cambio, varias publicaciones documentan infecciones adquiridas localmente por visitantes extranjeros, la mayoría asociadas a la visita a cuevas habitadas por murciélagos (Sakamoto, Kase et al. 1999; Flor, Estivills et al. 2003; Nygard, Brantsaeter et al. 2006).

La infección por *H. capsulatum* es adquirida mediante la inhalación de sus esporas a partir de partículas de polvo ya que el hongo habita en el suelo, especialmente en aquellos suelos en contacto con grandes cantidades de guano de pájaros, gallinas o murciélagos que suelen contener altas concentraciones de nitrógeno, lo que favorece al crecimiento del hongo (Canteros, Hiachini et al. 2005). El hongo se ha aislado de gallineros, casas viejas o abandonadas y cuevas donde generalmente habitan murciélagos. Es ampliamente conocido que las cuevas habitadas por murciélagos suelen estar altamente infestadas con *H. capsulatum* (Kauffman 2007). Se ha demostrado que además de transportar el hongo mecánicamente, los murciélagos también puede sufrir la infección y ser portadores del mismo (Lenhart, Schafer et al. 2004).

Existen tres variedades de *H. capsulatum*, la variedad *capsulatum*, que se encuentra en América; la variedad *duboissi* que se ha aislado en África y en menor grado en Europa; y la variedad *farminosum* que se ha descrito en caballos en Egipto, otros países de África y Asia (Kauffman 2007).

Diversos estudios demuestran que la variabilidad genética de *Histoplasma* está relacionada con las regiones geográficas donde el hongo habita y que también se puede establecer relación con la fuente de transmisión. (Carter, Burt et al. 1996) (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000). *Histoplasma* se ha clasificado genotípicamente en 7 grupos relacionados con su distribución geográfica a lo largo de las diferentes regiones del mundo (Carter, Taylor et al. 2001) y dentro de éstos se han encontrado diferentes perfiles. Por ejemplo, en México se han reportado hasta 10 perfiles genéticos asociados a regiones geográficas determinadas. Canteros en otro estudio demostró una estrecha relación entre los patrones moleculares de los aislamientos de pacientes con los de murciélagos, resultando en una homología de 91 a 100% (Canteros, Hiachini et al. 2005). Esto permitió agrupar y comparar cepas con las mismas características genéticas, con la subsecuente conclusión de su posible origen.

De acuerdo a los estudios realizados por Kasuga y colaboradores, actualmente las variedades taxonómicas están distribuidas en ocho clados, de los cuales siete son considerados especies filogenéticas, con base en el polimorfismo de las secuencias parciales de 4 genes (Kasuga, Taylor et al. 1999).

A pesar de que Honduras es considerado un país donde *H. capsulatum* circula a niveles endémicos, existen muy pocos datos sobre la histoplasmosis humana en el país. Asimismo, se carece de estudios destinados a definir la distribución geográfica, los reservorios naturales y las características genéticas de las cepas que circulan en el país.

En vista de la reemergencia de la tuberculosis, el advenimiento del VIH/SIDA en Honduras, la globalización, la facilidad y rapidez de la movilidad de poblaciones humanas, el aumento del eco-turismo, los cambios climáticos y desbalances en los ecosistemas que favorecen la emergencia de enfermedades infecciosas, es de suma importancia caracterizar los patógenos endémicos de Honduras para generar conocimientos que tengan aplicabilidad tanto desde el punto de vista clínico humano como desde el punto de vista micológico y biológico.

## 2. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

La presente tesis pretende hacer un aporte al conocimiento de la diversidad genética de *H. capsulatum* en Honduras.

El objetivo general del estudio es hacer una caracterización genética de diversos aislamientos de *H. capsulatum* originarios de Honduras.

Para efectos de la caracterización genética, se realizaron estudios que responden a los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la diversidad genética de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes con histoplasmosis.
2. Analizar las relaciones filogenéticas de los aislados de Honduras respecto a los obtenidos en otros países.

## CAPITULO 2:

### 1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

El hongo *Histoplasma capsulatum* es habitante natural del suelo, endémico del continente americano y clasificado como un hongo verdaderamente patógeno ya que puede causar enfermedad en individuos inmunocompetentes así como en personas inmunosuprimidas. Esta patogenicidad del hongo está estrechamente ligada a su termodimorfismo, el cual permite al hongo desarrollar estadios de hongo filamentoso en la vida saprofitica y estadios unicelulares o levaduras, en su forma parasitaria (Lopez 2006).

#### 2.1. *Biología y Fisiología de Histoplasma capsulatum*

##### 2.1.1. Clasificación Taxonómica

Actualmente, la ubicación taxonómica de *H. capsulatum* es la siguiente (Guarro, GeneJ et al. 1999; Untereiner, Scott et al. 2004; Cruz, Opazo et al. 2006).

<b>Dominio</b>	<b>Eukarya (Eukaryota)</b>
<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Euascomycetes
<b>Orden</b>	Onygenales
<b>Familia</b>	Ajellomycetaceae
<b>Género</b>	<i>Histoplasma (Ajellomyces)</i>
<b>Especie</b>	<i>capsulatum (capsulatus)</i>

El género *Histoplasma* tiene forma perfecta, la cual es adquirida por cualquier hongo que puede reproducirse tanto asexual como sexualmente. La reproducción sexual en el caso de *Histoplasma* se produce por conjugación de esporas de diferentes polaridades (positivas y negativas), que se atraen para formar esporas sexuales y que en el caso de *H. capsulatum* forman ascosporas contenidas en ascas. Esta forma teleomorfa o perfecta de *Histoplasma* se conoce como *Ajellomyces capsulatus* (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993).

Se han descrito tres variedades de *Histoplasma capsulatum*:

- *Histoplasma capsulatum* variedad *capsulatum*
- *Histoplasma capsulatum* variedad *duboisii*
- *Histoplasma capsulatum* variedad *farciminosum*

Cada una de estas variedades está relacionada con la región geográfica donde se ha aislado y con la forma clínica que produce. La variedad *capsulatum* se ha aislado en América y generalmente produce la forma clínica pulmonar, la variedad *duboisii* se ha aislado en África presentando principalmente formas diseminadas en piel y mucosas. La variedad *farciminosum* que es endémica en Asia, Europa y África y produce la Linfangitis Epizoótica de los caballos (Rippon 1988).

Para propósitos de esta tesis, el nombre *Histoplasma capsulatum* denota *H. capsulatum* variedad *capsulatum*.

### 2.1.2. Dimorfismo de *Histoplasma capsulatum*

*H. capsulatum* es un hongo termodimórfico, ya que presenta diferentes morfologías a diferentes temperaturas. A temperatura de aproximadamente 25°C el hongo adopta una forma filamentosa y a 37°C se convierte en organismos unicelulares, llamados levaduras (Klein and Tebbets 2007) y son las formas parasitaria en el huésped vertebrado (Woods 2002). Debido a que la temperatura es determinante para el cambio de morfología, también se usa el término termodimorfismo para evidenciar o describir dicha características. El dimorfismo es una característica propia de algunos hongos que tienen relación con la invasión y proliferación en tejidos. Por regla general, la forma filamentosa es saprofitica y la forma levaduriforme es patogénica. Existen seis géneros de hongos patógenos relacionados con el dimorfismo, estos son: *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* y *Penicillium marneffeii* (Rippon 1988).

Este conocimiento es útil al hacer el diagnóstico clínico laboratorial de la histoplasmosis pues el diagnóstico definitivo debe hacerse demostrando el termodimorfismo.

#### ***Morfología a 25°C***

Cuando se cultiva a temperaturas de 25°C *H. capsulatum* crece en colonias vellosas, algodonosas, blancuzcas que semanas después se vuelven pardas. El reverso de las colonias tiene un pigmento color pardo claro. Microscópicamente, el hongo se observa como micelio filamentoso, ramificado, tabicado y hialino. La característica más importante es la presencia de esporas redondas, de 9 a 14 µm de diámetro, de pared

gruesa con proyecciones digitiformes y llamadas comúnmente macroconidios tuberculados o espiculados (Figura 1). También pueden presentarse microconidios hialinos, lobosos u ovoides que miden de 2-4 x 2.5-6  $\mu\text{m}$ , los cuales pueden ser sésiles o pedunculados (Cruz, Opazo et al. 2006).



**Figura 1.** Cultivo de *H. capsulatum* donde se observa micelio hialino con macroconidios tuberculados. Cuadro inserto: forma levaduriforme. Tomado de (Cruz 2006).

La presencia de estas esporas y en especial las de los macroconidios tuberculados en cultivos de muestras clínicas hace sospechar fuertemente el diagnóstico de *H. capsulatum*. Sin embargo, aun presentándose los macroconidios característicos, debe demostrarse el dimorfismo propio de este género, ya que existen otros hongos que presentan este tipo de esporas. *Blastomyces dermatitides* y *Renispora flavissima* presentan el mismo tipo de microconidios y en algunas especies de *Sepedonium* y *Chrysosporium* se observan macroconidios tuberculados (Cruz, Opazo et al. 2006).

### ***Morfología a 37°C***

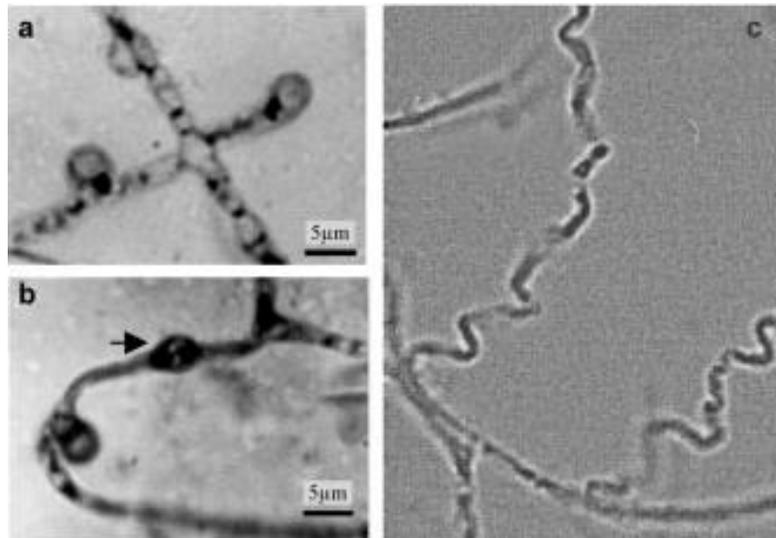
Cuando *H. capsulatum* se incuba a 37°C crecen colonias cremosas, pastosas, plegadas, que al observarse en preparaciones microscópicas aparecen como pequeñas levaduras de 2-5 µm, de una sola yema (Fischer, Mocelin et al. 2009). A esta temperatura, tanto en preparaciones histológicas como en el cultivo, *H. capsulatum* presenta similitud morfológica con algunas especies de levaduras que tienen similar tamaño, por ejemplo *Candida glabrata*, *Pneumocystis jirovecii* y *Cryptococcus neoformans*, así como también con *Penicillium marneffeii*, descubierto como hongo dimórfico desde hace algunos años (Cruz, Opazo et al. 2006).

### **2.1.3. Variabilidad fenotípica celular y colonial**

Existe variedad en las características de la colonia de *H. capsulatum* a temperatura de 25°C. En ocasiones, a esta temperatura, se desarrolla una colonia algodonosa, blanquecina, y en otras ocasiones crecen colonias pulverulentas de color canela. Es recomendable evaluar una colonia siguiendo su tiempo de incubación, pues un mismo aislamiento puede variar su morfología en poco tiempo, así una colonia algodonosa puede tornarse pulverulenta después de unas dos ó tres semanas de incubación.

Además de estas variaciones, se han reportado hallazgos de colonias rugosas a 25°C - 28°C, que muestran una morfología atípica de *H. capsulatum* (Zuiani, Rivas et al. 2006). En estas cepas, llamadas aberrantes, también se presenta una morfología celular poco

característica con macroconidios lisos en vez de tuberculados, sin las proyecciones digitiformes típicas del hongo (Figura 2). Asimismo, las hifas también cambian de su forma normal a una forma engrosada, y flexuosa que algunos autores han relacionado con la deficiencia del gen Ms8 necesario para la formación normal de la hifa (Tian and Shearer 2001; Zuiani, Rivas et al. 2006).



**Figura 2.** Morfología celular de cepas aberrantes de *H. capsulatum*: (a) hifas hialinas ligeramente engrosadas, septadas, con clamidoconidios solitarios terminales; (b) Clamidoconidio intercalar ;(c) Hifas hialinas flexuosas. Coloración de lactofenol azul de algodón, 400 aumentos. Tomado de Zuiani, Rivas et al. 2006.

## 2.2. Variabilidad genética

Estudios sobre la epidemiología molecular de *H. capsulatum* han revelado que el hongo presenta una variedad genética importante. La epidemiología molecular de *H. capsulatum* se basa en la tipificación de cepas por métodos genéticos utilizando diversas técnicas como RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción),

Polimorfismo del DNA amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) o mediante amplificación específica del ADN seguida de restricción (PCR-RFLP) (Hernandez 2008).

Los primeros trabajos en relación a la clasificación de *H. capsulatum* por métodos moleculares fueron hechos por Vincent et. al (Vincent, Goewert et al. 1986), quien realizó un experimento basado en el análisis de ADN mitocondrial, utilizando enzimas de restricción cuyos fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados por la técnica de Southern blot para investigar si existían diferencias en 24 cepas de *H. capsulatum*, la mayoría de las cuales fueron aisladas en Norte América, 4 de ellas en Centroamérica (no se especifica el país) y 2 de Colombia. Además se incluyeron en el estudio 2 cepas de la variedad *duboisii*. Los resultados mostraron 3 patrones diferentes relacionados más que todo con la procedencia geográfica de las cepas. La cepa Down, sensible a la temperatura fue llamada Clase 1, a todas las demás cepas aisladas en Norte América y a las de la variedad *duboisii* se les clasificó como de Clase 2, y a las cepas de Centro y Sur América se les agrupó en la Clase 3. Tres años después, Spitzer y colaboradores, basados en el análisis de ADN mitocondrial y ribosomal, agregaron una clase más a la clasificación de Vincent, al diferenciar un aislado de suelos de Florida y obtener un patrón diferente de los ya conocidos en cepas de Norte, Centro y Sur América (Spitzer, Lasker et al. 1989).

En 1990, Spitzer realizó otro estudio donde determinó que aislados obtenidos de pacientes con SIDA mostraron un patrón polimórfico de ADNm muy similar al del ADN

de la cepa Down, mientras que aislados de pacientes no asociados a SIDA mostraron un patrón similar al ADN de la clase 2 (Spitzer, Keath et al. 1990).

En 1992, Keath y colaboradores incluyeron a la clasificación ya existente, las clases 5 y 6 al estudiar un brote en Estados Unidos en una población donde la histoplasmosis no era endémica. En este estudio se utilizó el gen *yps3* y las técnicas de Southern blot y RFLP.

Uno de los primeros métodos utilizados en Latinoamérica para tipificar *Histoplasma* fue RFLP (Reyes-Montes, Taylor et al. 2000), con el cual se identificaron 10 perfiles diferentes en aislados de *Histoplasma* en México. Otro método posteriormente utilizado por el mismo grupo de investigadores fue el de RAPD-PCR (Polimorfismo del DNA amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa, PCR), en el cual se utilizan oligonucleótidos arbitrarios para obtener productos de amplificación que son separados en un gel de agarosa. Cada conjunto de fragmentos representa un perfil polimórfico para cada aislamiento de *Histoplasma* que permite identificar cada cepa trazando su huella genética. Este método permitió determinar diferencias que no fueron detectadas por RFLP (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000). En estos estudios, Taylor y colaboradores demostraron perfiles diferentes entre aislamientos de *Histoplasma* procedentes de murciélagos y otros procedentes de muestras de pacientes. Sin embargo, un aislado de un paciente produjo una secuencia idéntica a las secuencias de aislados de murciélagos, lo que apoya fuertemente la relación entre la fuente de infección y el desarrollo de la enfermedad (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000).

Anteriormente, en Norteamérica, Kersulyte y colaboradores habían utilizado el método RAPD-PCR para demostrar diversidad genética en aislados provenientes de muestras clínicas procedentes de Kansas e Indiana. En este estudio se utilizaron diferentes juegos de cebadores para optimizar el método (Kersulyte, Woods et al. 1992). Similares estudios fueron desarrollados por Carter y colaboradores, en aislados de Indianápolis, Estados Unidos, para analizar las diferencias genéticas entre los aislados de una misma región. El método utilizado fue también el de RAPD-PCR y se utilizaron 11 marcadores de regiones no conservadas con el fin de detectar mayor variabilidad genética. Otro objetivo de este estudio fue correlacionar si las sub-poblaciones del hongo se relacionan con la severidad de la enfermedad. Como resultado se encontraron diversas poblaciones dentro de los aislamientos, pero no se demostró asociación entre la severidad de la enfermedad con un determinado perfil genético (Carter, Burt et al. 1996). Los mismos estudios fueron realizados en Tailandia donde los autores encontraron diferencia de perfiles en 13 aislados de *H. capsulatum* de pacientes en su mayoría con SIDA (Poonwan, Imai et al. 1998).

Otro aporte importante en estudios realizados en regiones no conservadas de *H. capsulatum*, fue hecho por Jiang y colaboradores, este estudio incluyó la región intergénica ITS (Jiang, Bartlett et al. 2000). Esta región ha sido ampliamente utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos de gran variedad de microorganismos. Kasuga menciona los estudios de White y Berbee, quienes realizaron estudios previos con las regiones ITS en otros microorganismos (Kasuga, Taylor et al. 1999). Se sabe que la región ITS es una región moderadamente variable del genoma de los seres vivos, por lo

que se utiliza también para determinar variabilidad genética en microorganismos. Jiang demostró que esta región presentaba diferencias en 24 cepas de *H. capsulatum*, lo que le permitió clasificar en diferentes tipos los aislados de una misma localidad (Jiang, Bartlett et al. 2000).

Los hallazgos de Carter, Poonwan y Jiang, demostraron la ventaja de utilizar cebadores arbitrarios para detectar mayor variabilidad genética. En 1999, Kasuga y colaboradores realizaron un estudio filogenético con 46 aislamientos provenientes de diferentes países que incluían las diferentes variedades conocidas por su origen geográfico (*capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum*). Las cepas de Norteamérica estuvieron representadas por aislados del sureste de Estados Unidos, las de Centroamérica por dos aislados de Panamá, las de Sur América por aislados de Colombia y Argentina. Algunas cepas de la variedad *farciminosum* aisladas de caballos representaban las cepas de Asia y aislados de humanos de la variedad *duboisii* eran provenientes de África.

En el estudio de Kasuga y colaboradores utilizaron la amplificación por PCR de cuatro diferentes *loci* del genoma de *H. capsulatum* y posterior secuenciación de los amplicones. Los genes escogidos en el estudio de Kasuga codificaban para proteínas presentes en las tres variedades de *Histoplasma*, estos genes fueron: (a) *arf* (gen que codifica para la proteína del factor de ribosilación del ADP, involucrada en el tráfico de transporte vesicular intracelular en eucariotas. Este gen se ha estudiado en *Candida albicans*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*) (Lodge, Johnson et al. 1994); (b) *tub*; los genes *tub1* y *tub2* son genes que codifican para las tubulinas, las cuales son el mayor constituyente

proteínico de los microtúbulos, que a su vez forman los centriolos, organelos involucrados en la división celular. Específicamente, los genes de las tubulinas fueron clonados por Harris y colaboradores de una cepa virulenta de *H. capsulatum* con el fin de caracterizar dichos genes (Harris, Keath et al. 1989); (c) *anti-H* (gen que codifica para el antígeno H presente en *Histoplasma*). Este antígeno junto con el antígeno M son detectados en una prueba de inmunodifusión, en la cual se forman bandas de precipitación al hacer reaccionar antígeno extraído de *H. capsulatum* con suero de pacientes con histoplasmosis. El antígeno H es una glicoproteína y se cree que tiene un papel importante en la respuesta inmune mediada por células (Deepe and Durose 1995); y (d) el gen *ole*, que codifica para la enzima delta 9 desaturasa, muy importante en la regulación de la fluidez de la membrana de células animales y de microorganismos (Gargano, Di Lallo et al. 1995).

Kasuga encontró una divergencia para los genes *arf*, *tub1*, *ole* y *Anti-H* de un 3%-7% de sustitución de nucleótidos, esto dio origen a la agrupación de 6 clases filogenéticamente distintas de *Histoplasma capsulatum* (Kasuga, Taylor et al. 1999) que incluyen las siguientes clases: clase 1 Norte América *Histoplasma capsulatum* (NAm Hcc1); clase 2 Norte América *Histoplasma capsulatum* (NAm Hcc2); Clase 3 Centroamérica (representada por Panamá); Clase 4 Sur América grupo A (SAm Hcc grupo A); Clase 5 Sur América grupo B (SAm Hcc grupo B) y la Clase 6 *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. La variedad *farciminosum* fue agrupada en la clase Sur América grupo A.

Años después, Kasuga realizó un estudio más extenso al analizar la relación filogenética de 137 aislados representando las tres variedades de *H. capsulatum* provenientes de los 6 continentes. En este estudio, las secuencias parciales de los cuatro genes conservados *ole*, *arf*, *Hanti* y *tub* fueron analizadas utilizando los algoritmos de Máxima Parsimonia (MP) y Neighbor Joining (NJ). Los árboles filogenéticos revelaron 8 grupos formados por: NAm1, NAm2, LAm A, LAm B, Eurasia, África, Australia y Holanda, aunque por los momentos la clase de Eurasia fue incluida en LAm A. El grupo con mayor diversidad genética fue el LAm A y en este se incluyeron aislamientos de México, Guatemala, Colombia, Brasil, Panamá y la clase de Eurasia. Los aislados de India, China, Tailandia e Inglaterra formaron un grupo monofilético muy homogéneo, sin embargo fueron agrupados en la clase LAm A. La clase LAm B se formó principalmente por aislados provenientes de Argentina y 4 aislados de Medellín, Colombia. De modo que aislados de Colombia forman parte de las 2 clases de Latinoamérica.

Como dato interesante, los aislados de la variedad *Farcimosum*, no se agruparon en una sola clase, sino que se observó que de 13 aislamientos, uno fue localizado en la clase de África, 4 en NAm 2 y 11 en Eurasia. Por esto se cree que la variedad farciminososa es una forma de histoplasmosis que ocurre en equinos pero puede ser causada por cualquier clase de *Histoplasma*. En el cuadro 1, se detallan los estudios sobre clasificación y variabilidad genética de *H. capsulatum* encontrada en la revisión de la literatura en los últimos años.

**Cuadro 1.** Resumen de la variedad genética en *Histoplasma capsulatum* encontrada en estudios realizados entre 1981 y 2008.

<b>Tipo de huésped</b>	<b>Variedad genética</b>	<b>País</b>	<b>Técnica utilizada</b>	<b>Referencia</b>
Reservorio (suelos)	Variación en los patrones enzimáticos de 8 enzimas. Análisis fenotípico	USA, Kentucky, Michigan, Missouri	Isoenzimas	(Gaur, Lichtwardt et al. 1981)
Aislados de humanos y animales	Agrupación clase 1, 2 y 3	USA	Enzimas de restricción Southern blot	(Vincent, Goewert et al. 1986)
Inmunocomprometidos SIDA (brote)	Clase 5 y 6: 5a Panamá, 5b NY, 5c PR, 5d CA	USA Zonas no endémicas	RFLP ADN genómico Gen ysp3	(Keath, Kobayashi et al. 1992)
Aislados clínicos de pacientes con y sin SIDA	Cada aislamiento tiene un genotipo multilocus único. Perfiles similares independientes de Síndrome	Indiana USA	AP-PCR, Variante de RAPD-PCR. Se utilizan varios oligonucleótidos, Secuenciación	(Carter, Burt et al. 1996)
Aislamientos clínicos	Mayor diversidad con nueva técnica	USA	RAPD-PCR (polimorfismo del ADN amplificado al azar)	(Kersulyte, Woods et al. 1992) (Woods, Kersulyte et al. 1993)
Pacientes con SIDA Aislamientos clínicos	10 perfiles diferentes	México	RFLP	(Salas-Rios, Montes et al. 1998)
	Perfiles diferentes en regiones geográficas diferentes	Aislamientos de Tailandia y USA	RAPD-PCR	(Poonwan, Imai et al. 1998)
Aislados de Murciélagos	2 perfiles diferentes que diferenciaban procedencia	México	RAPD-PCR	(Chávez Tapia 1998)
Pacientes Mexicanos con SIDA Pacientes de Guatemala, Colombia, USA, Reservorios	Perfil similar en aislados de pacientes con SIDA	México	RAPD-PCR	(Reyes-Montes, Bobadilla-Del Valle et al. 1999)

<b>Tipo de huésped</b>	<b>Variedad genética</b>	<b>País</b>	<b>Técnica utilizada</b>	<b>Referencia</b>
Aislados clínicos	6 clases: Norteamérica 1, Norteamérica 2, Panamá, Suramérica A, Suramérica B, Hc var. duboissi	USA	Secuenciación	(Kasuga, Taylor et al. 1999)
Murciélagos	11 perfiles idénticos y 2 diferentes	México	RAPD-PCR Modificado con 2 oligonucleótidos	(Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000)
Aislados de pacientes	10 diferentes patrones: A1, A2, A3, B-H	USA	Variaciones en las secuencias nucleotídicas de la regiones espaciadoras internas transcritas ITS1-ITS2 y del gen 5.8 S ARNr	(Jiang, Bartlett et al. 2000)
92 aislados de 25 ciudades de 6 continentes	7 especies filogenéticas: Norteamérica 1, Norteamérica 2, Latinoamérica A, Latinoamérica B, África, Australia, Holanda-Indonesia	USA	Secuenciación de 4 genes específicos: <i>arf</i> , <i>H-anti</i> , <i>ole</i> y <i>tub 1</i> amplificados por PCR	(Kasuga, White et al. 2003)
Murciélagos Infectados	3 Grupos diferentes A,B y C	México	RAPD-PCR	(Taylor, Chavez-Tapia et al. 2005)
Aislados de pacientes con SIDA	LAm Hcc A. Todos los aislamiento corresponden a la clase 6 que proviene de Latinoamérica Grupo A	Panamá	Amplificación del Gen YPS3. RFLP	(Gutierrez, Canton et al. 2005)

### 2.3. Ecología de *Histoplasma capsulatum*

*H. capsulatum* habita en suelos húmedos, en áreas boscosas, en zonas tropicales o subtropicales, a temperaturas de 18°C a 28°C. Como habitante del suelo, debe competir con abundante y variada microbiota y subsistir en difíciles condiciones (Woods 2002). *H. capsulatum* crece mejor en suelos húmedos, de pH ligeramente ácido, ricos en sustancias orgánicas, especialmente aquellos contaminados con guano de aves o murciélagos que contienen abundante Nitrógeno. La relación de la presencia de *H. capsulatum* con heces de murciélagos y aves está ampliamente documentada (Cardona and Aguilar-Paz 1970; Flor, Estivills et al. 2003; Canteros, Hiachini et al. 2005; Kauffman 2007).

El hongo sobrevive en lugares húmedos por largos períodos de tiempo en sitios donde regularmente pernoctan aves. Asimismo, las cuevas naturales, minas subterráneas, edificios viejos, áticos de iglesias o casas abandonadas proporcionan un refugio para los murciélagos, quienes al igual que las aves depositan sus heces en el suelo y estas excretas funcionan como fertilizante para el crecimiento del hongo (Lenhart, Schafer et al. 2004). Los murciélagos tienen un papel importante en la dispersión mecánica del hongo ya que con sus alas y patas acarrear las esporas del hongo y las transportan a regiones geográficas distantes. Algunas especies de murciélagos tienen hábitos migratorios por cuestiones climáticas o de alimentación, pero otras especies son muy adaptables, incluso a las grandes ciudades donde puede alojarse en los techos de las viviendas (Canteros, Hiachini et al. 2005).

También se ha demostrado que los murciélagos pueden ser infectados por *H. capsulatum*, padecer enfermedad y eliminar esporas por las heces. Diversos estudios proveen evidencia de que 25 especies de murciélagos son portadores de *Histoplasma* (Lenhart 1994; Canteros, Hiachini et al. 2005). Los estudios de aislamientos de órganos en murciélagos realizados por Taylor y colaboradores en 1999, en diferentes especies de murciélagos capturados en México, proveen evidencia de que los murciélagos padecen la enfermedad, ya que al observar preparaciones de tejidos examinadas por tinciones de Gomori encontraron reacción inflamatoria mínima. El hallazgo más importante de dicho estudio fue la presencia de levaduras sugestivas de *H. capsulatum* en macrófagos pulmonares lo que indica que probablemente los murciélagos sufran la enfermedad (Taylor, Chavez-Tapia et al. 1999). Por el contrario, debido a su alta temperatura corporal (42°C), se cree que las aves no pueden ser portadoras biológicas de *H. capsulatum* (Lenhart 1994).

## **2.4. Epidemiología de *Histoplasma capsulatum***

### **2.4.1. Epidemiología global**

*H. capsulatum* se ha descrito en más de sesenta países donde predominan los climas tropicales húmedos (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993; Chang, Taira et al. 2007). Las tres variedades que se conocen del género *Histoplasma* están relacionadas con regiones geográficas específicas. Se habla entonces de histoplasmosis americana, histoplasmosis africana y la linfangitis epizoótica de caballos en Asia,

producidas por las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum* respectivamente. En África, casi todos los casos de histoplasmosis por la variedad *duboisii* se han observado en la región de Senegal, Nigeria, Zaire, Camerún, Angola y Guinea, que es una zona de baja altitud y clima tropical húmedo (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993).

En Europa, los casos de histoplasmosis son poco frecuentes. Se han reportado casos importados de individuos que visitan países endémicos y son diagnosticados al realizar la historia clínica del paciente (Flor, Estivills et al. 2003; Vázquez, Velasco et al. 2005). En Alemania, las micosis invasivas causan 40% de mortalidad en los pacientes de terapia intensiva y afectan un 23% de los pacientes que reciben trasplante (Hernandez 2008).

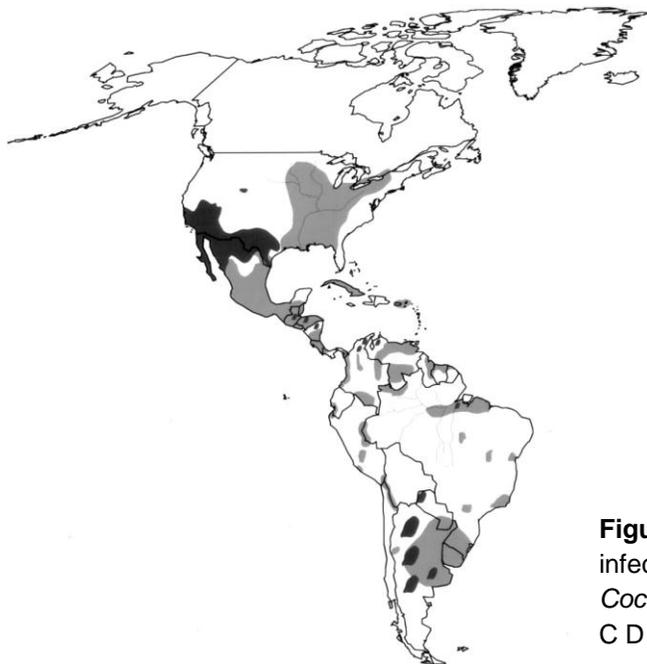
Debido a que el presente trabajo de investigación tiene lugar en Honduras, Centro América, la subsiguiente discusión de la epidemiología se concentra en el Continente Americano.

#### **2.4.2. Epidemiología en el Continente Americano**

La variedad *capsulatum*, la más común de las variedades de *Histoplasma* en América, se ha descrito desde Canadá hasta Argentina. En América del Sur, las zonas endémicas más importantes son la cuenca del Rio de la Plata en Argentina y regiones de la Serra do Mar en Brasil (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993). Aunque en Brasil la histoplasmosis es endémica en todo el país, muchos casos se reportan en la zona sudeste, muchos brotes han ocurrido específicamente en el estado de Rio de Janeiro (Aide 2009). En Argentina, la histoplasmosis ocupa el tercer lugar en frecuencia anual después de infecciones por levaduras y *Cryptococcus*. Más aun, la forma diseminada de

histoplasmosis es además un marcador de SIDA ya que dicha asociación en Argentina oscila entre 5.3 y 6% (Negroni, Robles et al. 1994; Zuiani, Rivas et al. 2006).

En Norte América, las zonas endémicas mejor conocidas son los valles de Ohio y valles del río Mississippi en Estados Unidos (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2005). Otros Estados con zonas endémicas son Kentucky, Tennessee e Indiana. Este último, se destaca por el brote ocurrido en el 2001 en una escuela donde el 77% de la población estudiantil mostró evidencia serológica de haber estado en contacto con el hongo y de estos, el 68% desarrollaron síntomas de histoplasmosis pulmonar (Chamany, Mirza et al. 2004). La figura 3 muestra la distribución geográfica de infecciones por *H. capsulatum* y *Coccidioides immitis* en el continente Americano sujeto a limitaciones de observación y reporte de infecciones.



**Figura 3.** Distribución geográfica de infecciones por *H. capsulatum* (gris) y *Coccidioides immitis* (negro). Fuente: Ericsson C D y colaboradores. CID 2002:35:1088–95

### 2.4.3. Epidemiología en Honduras

En Honduras no se han realizado estudios sistematizados para estimar la prevalencia de las infecciones producidas por *H. capsulatum* ni tampoco hay un estimado de la incidencia de la enfermedad a nivel nacional. En una revisión de casos clínicos hecha por dos investigadores hondureños (Cardona and Aguilar-Paz 1970), se menciona que el primer diagnóstico de histoplasmosis en un paciente hondureño fue en 1926; caso que fue diagnosticado en Panamá (Duron 1966; Cardona and Aguilar-Paz 1970). Posteriormente, se reportaron el primer y segundo caso hondureños en los años 1966 y 1968, respectivamente.

El primer caso fue diagnosticado en un paciente masculino originario de Santa Bárbara y residente en San Pedro Sula por el patólogo Raúl Durón, al investigar una muestra de un nódulo de pulmón teñida por la coloración de Grocott-Gomori. El segundo caso trataba de histoplasmosis de la mucosa oral en un joven de 24 años originario de El Progreso, Yoro (Duron 1966; Duron and Castro 1968).

La misma revisión de 1970 informa de varios diagnósticos no publicados hasta esa fecha y además documenta dos casos más, demostrando que la histoplasmosis es un problema de salud que merece atención en el país (Cardona and Aguilar-Paz 1970). Además de estudios clínicos, el auge de la investigación en histoplasmosis en los años 60 (que coincidió con la intensificación de la lucha contra la tuberculosis) conllevó a varios estudios epidemiológicos basados en pruebas de hipersensibilidad retardada

(intradermoreacción) utilizando la reactividad a la histoplasmina como indicador de exposición. Un estudio llevado a cabo en 1962 en Talanga y otras localidades de Francisco Morazán reportó 49% de reactividad a la histoplasmina (Duron 1966; Cardona and Aguilar-Paz 1970). Posteriormente, Alvarado en 1965, reportó una frecuencia de reactividad de 38.8% en un estudio de casi 75,000 personas estudiadas entre 1962 y 1965 (Alvarado 1965). Aunque se desconocen los valores predictivos de la prueba utilizada en dicho estudio, es importante resaltar que este es el estudio más significativo sobre la histoplasmosis en el país.

En 1973 un estudio epidemio-ecológico para determinar el índice de histoplasmosis mediante la prueba de reacción cutánea a la Histoplasmina en algunas poblaciones de Honduras fue realizado por el microbiólogo Franklin Castañeda. Las poblaciones estudiadas fueron: La Avispa (departamento de Olancho), Teupasenti (departamento de El Paraíso) y Villa Nueva (departamento de Cortés). Los porcentajes de positividad fueron de 31.5% en La Avispa; 18.7% en Teupasenti; 11.4% en el área urbana de Villa Nueva y 17.7% para el área rural de la misma localidad. Se determinó la frecuencia de positividad en relación al sexo la cual fue de 25.9% para hombres y 14.7% en mujeres. El aspecto ecológico de este estudio lo proporcionó la búsqueda de *Histoplasma capsulatum* en muestras de tierra de cuevas localizadas en sitios cercanos a las poblaciones de La Avispa y Villa Nueva. En ninguna de las muestras recolectadas en la cueva de Las Ventanas de Villa Nueva se aisló *H. capsulatum* y solamente fueron obtenidos 2 aislamientos de un total de 22 cultivos de muestras en la cueva de La Avispa (Castañeda 1973).

Desafortunadamente, el estudio científico de la histoplasmosis declinó dramáticamente en la década de los 70 y después de ella, no se conoce ninguna otra publicación sobre la histoplasmosis en Honduras. El cuadro No. 2 muestra los datos proporcionados por la jefe del laboratorio de micología del Hospital Escuela, en Tegucigalpa en relación a la cantidad de aislamientos de *H. capsulatum* que se han detectado desde el año 2004 hasta el 2010.

**Cuadro 2:** Aislamientos de *H. capsulatum* en el período comprendido del año 2004 al 2010 en el Hospital Escuela- Tegucigalpa

<b>Año</b>	<b>No. de aislados de <i>Histoplasma capsulatum</i></b>
<b>2004</b>	26
<b>2005</b>	13
<b>2006</b>	20
<b>2007</b>	7
<b>2008</b>	12
<b>2009</b>	7
<b>2010</b>	5

En el período comprendido de Diciembre de 2010 a Julio del 2011, tiempo en el cual se realizó el presente estudio, se presentaron 18 casos de histoplasmosis en los Hospitales prospectados. Se desconocen datos clínicos de la mayoría de los pacientes, como la presencia de co-morbilidades como VIH/SIDA. No existe la posibilidad de solicitar al

Hospital Escuela datos retrospectivos sobre la frecuencia de casos de histoplasmosis utilizando los códigos de clasificación internacional ICD 10, debido a que la Histoplasmosis no es una enfermedad de notificación obligatoria en Honduras.

## **2.5. *Histoplasmosis***

### **2.5.1. Breve reseña histórica**

La Histoplasmosis fue descrita como entidad clínica por primera vez en la zona del Canal de Panamá en 1906 por el patólogo Samuel Darling, quien descubrió en un frotis de material de autopsias, estructuras que él consideró un protozoo muy cercano a *Leishmania* ya que observó elementos intracelulares de un tamaño similar a los cuerpos de Leishman-Donnovan. Sin embargo, dos características de sus hallazgos no coincidían con *Leishmania*: la presencia de un halo alrededor del organismo y la falta de quinoplasto (Maniscalchi and Espinoza 2006; Kauffman 2007). A estas estructuras Darling les llamó *Histoplasma capsulatum* debido a su apariencia de histiocitos, y a la aparente cápsula dada por la refringencia alrededor de las levaduras que semejaba una cápsula (Woods 2002).

Posteriormente se descubrió que dichas estructuras eran un hongo y que en realidad no tiene cápsula. No fue sino hasta 1934 cuando De Monbreun cultivó *Histoplasma* por vez primera en Estados Unidos. De Mombreun comprobó que el microorganismo era dimórfico y que crecía en forma filamentosa cuando se incubaba a 25-28°C y como levadura a 37°C. Posteriormente, en 1949 Emmons lo aisló de tierra de madrigueras de

ratas y fue el primero en evidenciar la relación del hongo con cuevas habitadas por murciélagos (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993; Canteros, Hiachini et al. 2005).

Como se mencionó anteriormente, el primer caso de Histoplasmosis reportado en Honduras fue realizado en la década de los 60 por el patólogo Raúl Durón, al investigar una muestra de un nódulo de pulmón que fue teñido por coloración de Grocott-Gomori en un paciente masculino originario de Santa Bárbara y residente en San Pedro Sula (Duron 1966). Posteriormente y hasta 1970, hubo varias publicaciones en la Revista Médica Hondureña documentando casos clínicos y reportando estudios epidemiológicos utilizando la histoplasmina (Duron 1966; Cardona and Aguilar-Paz 1970). La revisión de literatura realizada en esta tesis no reveló más datos publicados, nacional o internacionalmente, sobre la histoplasmosis en Honduras.

### **2.5.2. Presentaciones clínicas**

La infección humana por *H. capsulatum* es comúnmente producida por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Como se mencionó anteriormente, la histoplasmosis se adquiere al inhalar esporas (microconidios) suspendidas en el aire de ambientes contaminados como gallineros, edificios abandonados y cuevas, o también por aerosoles que se forman al remover polvo en demolición de viejos edificios (Kauffman 2007; Pfaller and Diekema 2010). Algunas actividades, como el trabajo de reparación de casas abandonadas y edificios viejos, el trabajo de jardinería, de exploración de cuevas, de antropología y de los granjeros, representa un factor de riesgo para adquirir la

infección por *H. capsulatum*. La exposición a sitios donde abunda el guano de murciélagos como las cuevas o ambientes donde pernoctan muchas aves también son factores de riesgo (Lenhart, Schafer et al. 2004).

Es muy probable que exista una asociación entre la ocupación y la endemidad (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000). Existen dos factores importantes para que una persona que ha entrado en contacto con el hongo presente la enfermedad, uno es la intensidad de la exposición y otro es el estado inmunológico de la persona expuesta. En personas inmunocompetentes, una pequeña cantidad de esporas puede solo producir malestares pasajeros similares a una gripe, o ser totalmente asintomática. Sin embargo, grandes cantidades de esporas pueden conducir a una infección pulmonar severa que puede ser mortal (Aide 2009). La gran mayoría de personas que inhalan el hongo no llegan a presentar la enfermedad. Es aceptado que solamente entre el 1% y el 5% de los infectados presentan manifestaciones clínicas (Kauffman 2007; Pfaller and Diekema 2010). Dichas infecciones asintomáticas, que como está indicado anteriormente, comprenden más del 95% de los casos, generalmente se revelan por pruebas inmunológicas como la histoplasmina. Estudios radiológicos revelan que un tercio de los casos asintomáticos muestran años después focos de calcificación en pulmones (Torres-Rodriguez, Ribas-Forcadell et al. 1999).

Una vez que los microconidios son inhalados llegan a los alveolos donde son fagocitados por macrófagos alveolares dentro de los cuales se convierten a la forma parasítica levaduriforme, para multiplicarse activamente. Esta multiplicación puede ser contenida

de inmediato sin dejar huella inmunológica, o proseguir silenciosamente sin causar síntomas clínicos identificables (infección asintomática o sub-clínica) pero evocando una respuesta inmune que puede ser detectada posteriormente. La multiplicación puede también resultar en daño a los tejidos con la consecuente inflamación y resultando en neumonía focal. A este nivel, la infección puede ser contenida, curar espontáneamente y las lesiones tisulares puede ser calcificadas o por el contrario, progresar a formas clínicas de severidad variable como se destaca a continuación (Aide 2009).

### **2.5.3. Histoplasmosis pulmonar aguda**

La histoplasmosis pulmonar aguda ocurre generalmente en niños que por primera vez entran en contacto con el hongo, y en pacientes con inmunodeficiencias severas como linfomas, leucemias o SIDA. También puede ocurrir histoplasmosis pulmonar aguda cuando una persona se ha expuesto a grandes cantidades de esporas. Los síntomas clínicos incluyen fiebre, malestar general, mialgias, dolor de cabeza, debilidad y tos seca (Pfaller and Diekema 2010). En un 5% de pacientes se presentan manifestaciones reumatológicas y puede presentarse un eritema nodoso que se cree es una respuesta de hipersensibilidad al hongo (Kauffman 2007).

### **2.5.4. Histoplasmosis pulmonar crónica**

Un pequeño porcentaje de infectados puede progresar a la histoplasmosis pulmonar crónica, también llamada histoplasmosis de reinfección o crónica cavitaria

(Pfaller and Diekema 2010). Esta forma es clínicamente igual a una tuberculosis avanzada y parece tener especial predilección por personas mayores. El espesamiento de las paredes en el vértice del pulmón con subsecuente necrosis y aumento de fibrosis consecuentes de la infección, resulta en la formación de cavidades que van aumentando en tamaño hasta consumir un lóbulo entero. Los síntomas presentes en esta forma pulmonar crónica son tos, expectoración mucopurulenta, hemoptisis, disnea de esfuerzo, fiebre vespertina, astenia, anorexia y pérdida de peso (Aide 2009) En raras ocasiones ocurren complicaciones de la enfermedad pulmonar crónica por ejemplo el granuloma mediastinal, que consiste en una masa de nódulos agrandados en el mediastino, y la fibrosis mediastinal, en la cual una fibrosis excesiva envuelve las estructuras del mediastino, la cual es una complicación letal.

### **2.5.5. Histoplasmosis diseminada**

La diseminación de *H. capsulatum* se lleva a cabo por la vía hematogena y a través del sistema retículo endotelial en los macrófagos parasitados y ocurre cuando existe una depresión previa del sistema inmune del huésped (Tian and Shearer 2001; Kauffman 2007).

Normalmente la respuesta inmune a la infección es mediada por células. Los linfocitos T al interactuar con el antígeno de *Histoplasma*, activan macrófagos para eliminar al hongo, el huésped puede controlar la infección, pero los pacientes inmunosuprimidos son incapaces de desarrollar una respuesta inmune mediada por células (Kauffman 2007). Individuos que tienen riesgo de desarrollar histoplasmosis diseminada son pacientes con

SIDA, leucemia, trasplantados e infantes debido a que en estos, el sistema inmune no ha madurado y también presentan riesgo las personas constantemente expuestas al hongo por vivir en zonas endémicas (Fischer, Mocelin et al. 2009).

Los síntomas en la histoplasmosis diseminada incluyen fiebre, malestar general, anorexia y pérdida de peso. Al examen físico se observa linfadenopatía y hepatoesplenomegalia, palidez y petequias. Los exámenes de laboratorio muestran pancitopenia, velocidad de eritrosedimentación (VES) aumentada, proteína C reactiva positiva, deshidrogenasa láctica (DLH) y fosfatasa alcalina elevadas. Ninguno de estos síntomas ni los hallazgos de laboratorio son específicos de histoplasmosis, pero no deberá darse otro diagnóstico hasta que no se haya excluido totalmente histoplasmosis.

La forma diseminada se puede presentar como aguda o crónica. En la diseminada aguda se puede observar sepsis, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, estrés respiratorio y falla renal. Esta forma clínica se observa sobre todo en niños con SIDA. También suelen haber manifestaciones gastrointestinales y lesiones granulomatosas en mucosas (lengua, laringe, faringe, paladar) que pueden ser un índice de diseminación. No todos los órganos suelen ser afectados en la diseminación, parece ser que el hongo tiene predilección por el sistema óseo, renal y la piel.

La forma diseminada crónica se ha observado en América del Sur, en personas mayores y con predominio en sexo masculino, los factores de riesgo y manifestaciones clínicas son semejantes a las que se presentan en la forma aguda, pero son menos severas (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993). Algunas manifestaciones poco frecuentes de

la histoplasmosis diseminada son la endocarditis, infección vascular e Infección del sistema nervioso central.

## **2.6. Inmunopatogénesis**

Como se explicó anteriormente, cuando los conidios o fragmentos de micelio de *Histoplasma* son inhalados se pueden producir 3 resultados: una infección inaparente benigna auto limitada, una infección pulmonar o una infección diseminada. El desarrollo de cualquiera de estas condiciones estará fuertemente influenciada por el sistema inmune del paciente y por el inóculo de esporas.

Básicamente, el mecanismo de patogenicidad de los hongos es su habilidad para adaptarse al medio tisular y a la temperatura, además de su capacidad para resistir la actividad lítica de las defensas del hospedero (Maniscalchi and Espinoza 2006). Estas características son propias de *Histoplasma*, ya que es un hongo termodimórfico que al ser inhalado convierte su fase saprofitica a la fase levaduriforme.

El hecho de que *Histoplasma* presente dos tipos de morfología implica que en cada forma expresa genes específicos de fase. La conversión de la fase filamentosa a la de levadura ocurre en los pulmones donde la temperatura corporal funciona como un disparador para la expresión de los genes específicos de esta fase. Uno de los genes más estudiados en *H. capsulatum* es el gen *yps3* (*yeast phase specific*), el cual ya se ha caracterizado. El gen *yps3* se considera importante para identificar cepas patógenas, ya que su expresión variable ha sido observada en cepas de *H. capsulatum* que difieren en termotolerancia y

virulencia (Salas-Rios, Montes et al. 1998). La presencia de una proteína denominada p30M que, al contrario de *YPS-3* se produce en la fase micelial y no en la levaduriforme, ha conducido a la suposición de que p30M actuaría como represor de la expresión de *yps-3* en la fase micelial, mientras que su ausencia permitiría la expresión de *yps-3* en levaduras (Abidi, Roh et al. 1998).

El tiempo de conversión de forma del hongo es corto, y aunque *Histoplasma* es un patógeno intracelular también se le puede encontrar en el medio extracelular. Es posible que la conversión a levadura ocurra al entrar la conidia a los macrófagos pulmonares o que este cambio ocurra primero y la levadura sea fagocitada (Lopez 2006). Aunque en este proceso entran en juego todos los fagocitos profesionales, *Histoplasma* se encuentra de inicio predominantemente dentro de macrófagos alveolares. Los macrófagos le proporcionan un ambiente protector tanto para su crecimiento como para su replicación ya que las proteínas surfactantes del pulmón SP-A y SP-D pueden matar directamente las esporas o levaduras (Holbrook and Rappleye 2008). Para que *Histoplasma* penetre a los macrófagos, se expresa una proteína de pared celular, una adhesina llamada HSP60, responsable de la unión de las células de *Histoplasma* a los macrófagos (Newman, Gootee et al. 1994; Lopez 2006).

Un mecanismo por el cual las esporas o levaduras entran a macrófagos es por la vía clásica. En este mecanismo de vía clásica el hongo se une a inmunoglobulinas y componentes del complemento sufriendo opsonización y fagocitosis. Otro mecanismo que ha sido propuesto para la entrada de esporas o levaduras a macrófagos es la unión a

receptores de superficie de la familia de la  $\beta$  integrinas, estas son la  $\alpha_1/\beta_2$  (CD11a/CD18),  $\alpha_M/\beta_2$  (CD11b/CD18) y  $\alpha_x/\beta_2$  (CD11c/CD18). Estas integrinas se expresan en fagocitos profesionales, especialmente en macrófagos (Lopez 2006).

Cuando los receptores de superficie macrófagos entran en contacto con levaduras o microconidios, estos activan e inducen a las células a que extiendan proyecciones o pseudópodos que rodean al agente extraño y se fusionen en los extremos dando lugar a la formación de un fagosoma, al que se le unen los lisosomas para formar un fagolisosoma. Los lisosomas tienen varios mecanismos microbicidas, como su bajo pH (aproximadamente 4) el cual es dañino para el patógeno. Este pH ácido favorece también la activación de hidrolasas, lipasas, nucleasas, proteasas, etc. Otro mecanismo microbicida es el llamado estallido respiratorio. El estallido respiratorio implica el aumento en la captación de oxígeno durante la endocitosis. El oxígeno, al ser utilizado, produce productos intermediarios que destruyen a los microorganismos (Regueiro, Lopez et al. 2002). Estos productos intermediarios tienen su origen al activarse un complejo de enzimas en la membrana del fagocito y del fagolisosoma denominado NADPH oxidasa, la cual reduce el oxígeno molecular a superóxido  $O_2^-$ , el cual puede a su vez ser reducido a  $-OH$ . Al mismo tiempo el oxígeno molecular puede convertirse a  $H_2O_2$  por acción de la peróxido-dismutasa. Tanto el radical  $-OH$  como el  $H_2O_2$  son microbicidas (Regueiro, Lopez et al. 2002).

Los neutrófilos juegan un papel importante en la defensa contra *Histoplasma* por acción de los gránulos azurófilos (Newman, Gootee et al. 2000) los cuales no son más que

defensinas y citoquinas. Entre las citoquinas de mayor importancia que actúan contra el hongo tenemos a la interleucina 12 (IL12), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Aunque los neutrófilos son importantes en la defensa contra agentes infecciosos, es importante recordar que estas células son de vida corta, no así los macrófagos, que también producen citoquinas, por tanto son los vectores ideales para microorganismos de crecimiento lento como *Histoplasma*.

Otra respuesta del sistema inmune a la infección por *Histoplasma* es la inmunidad mediada por células. El resultado de esta respuesta es la formación del granuloma, un tipo de hipersensibilidad retardada que ocurre debido a la incapacidad de los macrófagos para destruir los patógenos, lo que provoca una acumulación de células fagocíticas. El granuloma está formado por macrófagos infectados y linfocitos T. Esto ocurre en el caso de la histoplasmosis, especialmente cuando la respuesta inmune es eficiente. Para el huésped, el beneficio de que se forme el granuloma es el resultante aislamiento de la infección, ya que controla el crecimiento del patógeno, protege al tejido sano que le rodea y previene la diseminación sistémica. Al mismo tiempo, el patógeno tiene cierta ventaja y es que crea un microambiente en donde a veces puede permanecer latente por años (Heninger, Hogan et al. 2006).

*H. capsulatum* posee además mecanismos para evadir el sistema inmune, Una vez que las levaduras de *Histoplasma* son reconocidas por receptores de las células del sistema inmune y son fagocitadas, estas se mantienen unidas a la membrana (se mantienen en el

fagosoma) y no se liberan al citoplasma, posteriormente el fagosoma se une a lisosomas para formar el fagolisosoma, sin embargo, se ha demostrado que el hongo puede ser capaz de evadir la unión fago-lisosoma (Eissenberg, West et al. 1991). El éxito de este hongo como patógeno, radica en la habilidad que tiene para evitar su destrucción por los componentes lisosomales, ya que el ambiente ácido de los fagolisosomas no es favorable al hongo. Se cree entonces que si el hongo permanece viable en el fagosoma o en el fagolisosoma es porque de alguna manera modifica el pH del ambiente, probablemente por secreción de agentes alcalinizantes (Eissenberg, Goldman et al. 1993).

Otro mecanismo que se ha estudiado en este hongo es la resistencia al oxígeno e intermediarios nitrogenados, productos del estallido respiratorio que ocurre cuando se forma el fagolisosoma. El fagolisosoma tiene un pH muy ácido y además contiene enzimas hidrolíticas que solo se activan a pH ácido, esta acidez del fagolisosoma lo hace un blanco fácil de los metabolitos tóxicos del oxígeno. Los parásitos intracelulares como *Histoplasma*, evaden este mecanismo de defensa escapando de la vacuola al citoplasma. Aunque no se conoce el mecanismo exacto de supervivencia intracelular de *H. capsulatum*, la respuesta inmunitaria contra el parásito ha sido relacionada con la liberación de óxido nítrico y su captación de hierro. La falta de adquisición de hierro por el parásito tiene un efecto negativo en su supervivencia (Lopez 2006; Maniscalchi and Espinoza 2006). Dado que *H. capsulatum* necesita del hierro para su metabolismo, se sugiere que la restricción o captura del hierro intracelular puede ser una de las bases del efecto anti-*Histoplasma* del macrófago murino (Fukazawa, Cassone et al. 1994).

Como cualquier patógeno, *H. capsulatum* ha desarrollado tres estrategias para combatir su limitado acceso a este nutriente. Se piensa que el hongo combate la limitación de hierro por medio de la liberación del Fe que está unido a transferrina. En este mecanismo *H. capsulatum* provoca la acidificación por el descenso del pH liberando así el hierro. Sin embargo, es posible que como se mencionó anteriormente, el hongo module a su conveniencia la acidez pues condiciones acídicas extremas provocarían la muerte del mismo (Lopez 2006). Se ha establecido *in vitro* que la producción de sideróforos, pequeños compuestos quelantes extracelulares de hierro, pueden abastecer este nutriente a *H. capsulatum*. Un tercer mecanismo identificado *in vitro* ha sido la reducción enzimática y/o no-enzimática de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . La transferrina al igual que los sideróforos de *Histoplasma* se unen específicamente a  $\text{Fe}^{+3}$ , por tanto la reducción de este elemento en estos compuestos lo hace disponible al hongo (Lopez 2006).

## **2.7. Diagnóstico de Laboratorio de la histoplasmosis**

El diagnóstico de laboratorio tradicional para la histoplasmosis se ha realizado a través de métodos directos e indirectos. Los métodos directos tradicionales incluyen el cultivo y examen microscópico directo del material de las lesiones y los indirectos incluyen la serología (por medio de la detección de anticuerpos) así como las pruebas de hipersensibilidad retardada. Además de los métodos tradicionales, hoy en día existen métodos que utilizan la biología molecular, los cuales están ganando popularidad.

Los métodos directos requieren mucha experiencia del personal que los maneja. El aislamiento a partir de muestras clínicas puede tardar aproximadamente un mes de incubación, lo que representa una desventaja para el diagnóstico de la enfermedad en comparación con las técnicas serológicas o moleculares como la PCR que se utiliza cada vez con mayor frecuencia (Munoz, Gomez et al. 2010; Simon, Veron et al. 2010). Sin embargo, a pesar del tiempo prolongado que requieren, los métodos directos tradicionales continúan siendo las pruebas de referencia para el diagnóstico de la histoplasmosis pues son más accesibles en muchos países donde la histoplasmosis es endémica.

Los métodos indirectos, por otra parte, aunque son más rápidos, tienen serias limitaciones. Por ejemplo, en casos de co-morbilidad con inmunodepresión, la validez de los resultados serológicos es cuestionable debido a la anergia o falta de respuesta inmune en este tipo de pacientes (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993). Todas estas pruebas se describen a continuación.

### **2.7.1. Cultivo en medios artificiales**

El material patológico se siembra en medios de cultivo como Sabouraud y Mycosel y se incuba a dos temperaturas (25°C y 37°C) y se revisa periódicamente hasta observar crecimiento. No se debe descartar un cultivo sino hasta después de un mes de incubación. El examen directo de muestras patológicas consiste en teñir un frotis de la muestra con colorante de Giemsa para identificar las levaduras intracelulares características de *Histoplasma*. (Fischer, Mocelin et al. 2009).

### 2.7.2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se utilizan como ayuda diagnóstica de la histoplasmosis, pero tienen la desventaja de que su especificidad y sensibilidad es variable. En zonas endémicas, donde la probabilidad de encontrar anticuerpos en la población es alta, se debe demostrar seroconversión, esto es, la elevación del título de anticuerpos en la segunda muestra en comparación con el título de la muestra inicial.

Las técnicas serológicas más utilizadas como ayuda diagnóstica en la histoplasmosis son la Fijación de Complemento y la Inmunodifusión en Agar, ambos con una sensibilidad aproximada de 80% (Fischer, Mocelin et al. 2009) y son altamente específicas (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993).

La prueba de Inmunodifusión en Agar presenta dos problemas básicos. El primero es la reacción cruzada que existe con otras infecciones micóticas como Coccidioidomicosis, Blastomicosis, Paracoccidioidomicosis e incluso con infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*; y el segundo es que en pacientes inmunocomprometidos esta prueba no es útil porque la respuesta de anticuerpos es muy pobre (Kauffman 2007; Fischer, Mocelin et al. 2009).

En la Fijación de Complemento se necesita comprobar la elevación en 4 veces, el título de anticuerpos en muestras pareadas tomadas con varias semanas de diferencia. La determinación de anticuerpos en una sola muestra no es recomendada, aunque un título  $\leq$  1:32 puede ser sugestivo. El hallazgo de títulos bajos en esta prueba indica solamente

que el paciente ha estado en contacto con el hongo, (Kauffman 2007). La prueba de inmunodifusión detecta presencia de anticuerpos por medio de bandas de precipitación. Su desventaja es que estas aparecen positivas de 4 a 6 semanas después de la infección. Un beneficio de esta prueba es que puede distinguir infecciones agudas de crónicas: la banda M, que es la más frecuente, está presente en infecciones agudas, y la banda H está presente en infecciones crónicas (Fischer, Mocelin et al. 2009).

### **2.7.3. Pruebas de hipersensibilidad retardada (Histoplasmina)**

La histoplasmina es un antígeno metabólico del hongo que se obtiene por cultivo de *Histoplasma* en caldo de Sabouraud (Torres-Rodriguez, Ribas-Forcadell et al. 2000). La principal utilidad de esta prueba es determinar la endemidad de la infección en una región geográfica, así como para estimar la prevalencia de infección asintomática en un área determinada.

En áreas endémicas la histoplasmina no tiene utilidad diagnóstica, pues un buen porcentaje de la población vive expuesta al hongo, lo cual genera una respuesta inmune en dicha población. Sin embargo, la histoplasmina podría ser de ayuda diagnóstica en zonas no endémicas, aunque el diagnóstico definitivo debe integrar otras pruebas de laboratorio como la serología o el cultivo junto con la clínica. También es importante resaltar que la histoplasmina presenta reacción cruzada con otros hongos causantes de micosis sistémicas como *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Paracoccidioides*, por tanto no es una prueba específica (Kauffman 2007).

#### 2.7.4. Diagnóstico utilizando técnicas moleculares

En vista de las desventajas de tiempo y baja sensibilidad y especificidad que tienen la mayoría de los métodos tradicionales para el diagnóstico de histoplasmosis, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar las herramientas de diagnóstico laboratorial (Munoz, Gomez et al. 2010; Simon, Veron et al. 2010). La necesidad de mejores y más rápidos métodos diagnósticos se ha enfatizado en las últimas décadas, ya que las infecciones por hongos, endémicos y oportunistas han aumentado notablemente, sobre todo en personas inmunocomprometidas (Torres-Rodriguez, Palacio-Hernandez et al. 1993; Hernandez 2008).

Estudios realizados en México en el año 2008, informan que del total de pacientes atendidos en un laboratorio de micología, 22% fueron micosis oportunistas. En Alemania, las micosis invasivas causan 40% de mortalidad en los pacientes de terapia intensiva y afectan un 23% de los pacientes que reciben trasplante (Hernandez 2008). Por estas razones, es necesario indagar e introducir nuevas herramientas en función de que el paciente tenga un diagnóstico rápido, seguro y eficaz una vez instalada una infección micótica. Los hongos que más han recibido atención en relación a la implementación de técnicas moleculares son los dimórficos, productores de micosis sistémicas, estos tienen un tiempo de incubación bastante largo y en caso de aislarse se debe demostrar su dimorfismo, lo que hace aun más lenta su identificación (Hernandez 2008). Levaduras como *Cryptococcus* y *Candida*, al igual que algunos hongos del phylum Zygomycota como *Mucor*, *Rhizopus* y *Absidia*, también han merecido especial atención ya que son

frecuente causa de morbilidad y mortalidad y con frecuencia se aíslan de muestras clínicas.

La técnica molecular más utilizada para la identificación de la mayoría de hongos y en especial para *Histoplasma* es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, desarrollada por Kary Mullis en 1983 (Hernandez 2008). En la última década los investigadores se han dado a la tarea de perfeccionar esta técnica con diferentes modalidades, así se han desarrollado técnicas de PCR anidado, PCR en tiempo real y PCR con blancos que confieren mayor especificidad a las pruebas (Bialek, Ernst et al. 2002; Colella, Sofía et al. 2007; Toranzo, Tiraboschi et al. 2009; Simon, Veron et al. 2010). La técnica de PCR permite amplificar genes específicos de especie y aún mejor, aquellos que codifican para proteínas específicas de especie.

## ***2.8. Necesidades de investigación en Honduras***

Considerando la ausencia de datos hondureños en cuanto a la prevalencia, incidencia y epidemiología de la histoplasmosis humana, así como la falta de estudios biológicos sobre el agente causal, especialmente orientadas a determinar sus reservorios y aspectos filogenéticos, a continuación se sugieren algunos temas prioritarios:

- a) Estudios retrospectivos que permitan conocer la prevalencia de histoplasmosis en diferentes zonas del país, con lo que se podrá tener datos estadísticos de referencia.
- b) Estudios prospectivos clínicos para determinar la asociación de la histoplasmosis con el SIDA y otras condiciones inmunodepresoras.

- c) Estudios de prevalencia de histoplasmosis humana para determinar las zonas geográficas de mayor transmisión y los factores de riesgo asociados a la misma.
- d) Estudios laboratoriales para determinar las características fenotípicas de los aislamientos clínicos de *H. capsulatum* en los laboratorios del país.
- e) Desarrollo y determinación de la factibilidad de nuevas técnicas moleculares de laboratorio que permitan diagnósticos más rápidos.
- f) Estudios eco-epidemiológicos para determinar la importancia de los reservorios silvestres.
- g) Estudios para determinar los genotipos circulantes en Honduras.
- h) Estudios para determinar la asociación entre el fenotipo de la colonia y los genotipos de diferentes aislamientos de *H. capsulatum*.

## CAPITULO 3:

### 1. METODOLOGÍA

#### *1.1. Recapitulación de los objetivos de investigación*

La presente tesis pretende hacer un aporte al conocimiento de la diversidad genética de *H. capsulatum* en Honduras.

**El objetivo general** del estudio es hacer una caracterización genética de diversos aislamientos de *H. capsulatum* originarios de Honduras.

Para esto, se realizaron dos estudios simultáneos complementarios que responden a los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar la diversidad genética de aislados de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes con histoplasmosis.
2. Analizar las relaciones filogenéticas de los aislados de Honduras respecto a los obtenidos en otros países.

#### *1.2. Diseño del Estudio*

El trabajo de investigación corresponde a un estudio descriptivo transversal realizado en el período comprendido entre Septiembre del 2010 a Septiembre del 2011.

### ***1.3. Obtención de aislados***

Para la obtención de aislados de muestras clínicas se solicitó la colaboración de los laboratorios clínicos de dos hospitales de Tegucigalpa, el Hospital Cardiopulmonar y el Hospital Escuela. Estos laboratorios fueron seleccionados por estar situados en hospitales de tercer nivel y contar con servicios de análisis clínicos donde se realizan aislamientos micológicos. Además, a estos hospitales son remitidos pacientes con enfermedades infecciosas de otras ciudades ya que cuentan con médicos especialistas infectólogos y neumólogos.

El jefe de cada laboratorio clínico fue contactado y se solicitó la colaboración de su laboratorio para brindar aviso oportuno sobre cualquier aislamiento sospechoso o ya identificado como *H. capsulatum*. A la vez, y de ser pertinente, se ofreció colaborar con el laboratorio mediante el fortalecimiento de la sección de micología, ya sea en aspectos metodológicos de aislamiento, o facilitando capacitaciones en principios de bioseguridad.

Una vez recibido el aviso de un aislamiento, se procedió la recolección inmediata del cultivo. El cultivo fue entregado en tubo de ensayo sellado y transportado al laboratorio Teasdale Corti de la UNAH con las medidas de bioseguridad apropiadas. Se solicitó al encargado del laboratorio la información anonimizada sobre el origen de la muestra, de manera que el investigador no pudiera asociar la identidad del paciente con la muestra, la información recolectada incluyó sexo, edad del paciente, sitio de procedencia de la muestra y positividad por VIH/SIDA (si la información estaba incluida).

#### ***1.4. Metodología de Laboratorio***

Los cultivos de *Histoplasma* fueron realizados en los laboratorios clínicos asegurando el seguimiento de técnicas adecuadas para maximizar el aislamiento. La técnica estandarizada se describe a continuación:

- a) Siembra de las muestras por duplicado en los medios de Mycosel y Sabouraud (Zuiani, Rivas et al. 2006).
- b) Incubación simultánea por duplicado a 25°C y 37°C hasta la observación de crecimiento de colonias macroscópicas, que generalmente ocurre entre 2 y 3 semanas de incubación.
- c) Montaje de preparaciones del cultivo en azul de lactofenol (Cruz, Opazo et al. 2006) para la búsqueda de estructuras características del hongo (microconidios y macroconidios tuberculados).
- d) Demostración de dimorfismo (forma filamentosa en cultivos a 25°C y forma levaduriforme a 37°C).

#### ***1.5. Transporte de aislamientos al laboratorio de Micología***

Los cultivos se trasladaron a los laboratorios de Microbiología en la UNAH, en triple empaque, bajo condiciones de bioseguridad estandarizadas especificadas en el apéndice C del Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomédicos (Richmond, McKinney et al. 2009). Los aislados se mantuvieron en el cepario de

Micología para no alterar las condiciones de temperatura a 25°C y se mantuvo un registro actualizado de cada aislado obtenido.

### ***1.6. Aspectos de Bioseguridad***

Los procedimientos operativos estándares (POE) para la recolección y manejo de muestras fueron escritos y archivados para posterior utilización de cualquier investigador que se involucre en estudios con este microorganismo. Los cultivos viables se trabajaron utilizando principios de Bioseguridad Nivel 2. Todo el trabajo fue realizado en cámara de bioseguridad (Clase II tipo A2). Se utilizó equipo de protección personal para dicho nivel (guantes y gabacha), como se recomienda en la sección IV y la sección VIII-B del Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomédicos (Richmond, McKinney et al. 2009). Además, se maximizaron precauciones al utilizar mascarilla N95, según las recomendaciones de la Agencia de Institutos Nacionales de Salud (NIH) y la agencia de Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Dado que *H. capsulatum* es un microorganismo transmisible por inhalación de aerosoles, en muchos países se trabaja en laboratorios de bioseguridad tipo III. Sin embargo la quinta edición del NIH y CDC en la sección VIII-B Agentes Fúngicos, en la sección de *Histoplasma*, se permite que el procesamiento de muestras clínicas, la identificación de aislamientos y estudios de tejidos puedan ser ahora estudiados en laboratorios de bioseguridad tipo II, siempre que estos tengan las facilidades para el manejo y procesamiento de especímenes infecciosos y que estos incluyan entre su equipo la cabina de bioseguridad clase II y el uso de mascarilla N95 (Richmond, McKinney et al. 2009).

Los procedimientos operativos estándares para la recolección y manejo de muestras fueron escritos y archivados para la posterior utilización de investigadores que pudieran involucrarse en estudios con *H. capsulatum*.

### ***1.7. Extracción de ADN***

Una vez que los contenedores con los aislados llegaron al laboratorio de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, procedentes del laboratorio de Micología, se ubicaron en un sitio establecido para su mantenimiento por un breve período de tiempo (1 hora), tiempo requerido para preparar el material necesario para luego realizar la extracción de ADN. Previamente a la extracción de ADN, los aislados fueron sumergidos en nitrógeno líquido para favorecer el rompimiento de la pared celular del hongo (Reyes-Montes, Bobadilla-Del Valle et al. 1999).

Para la extracción de ADN se colocaron los aislados dentro de la cabina de bioseguridad con los materiales necesarios: morteros con pistilo previamente esterilizados y numerados de acuerdo al aislado, asas micológicas y nitrógeno líquido. Para enfriar cada mortero se agregó una pequeña cantidad de nitrógeno líquido y posteriormente se colocó todo el crecimiento del aislado, se agregó más nitrógeno líquido y rápidamente se trituró con la ayuda del pistilo hasta formar un material pulverizado. Este material fue agregado a un micro tubo de 1,5 ml conteniendo buffer ATL incluido en kit de extracción y posteriormente fue procesado de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando el Kit comercial QIAGEN, según el protocolo “*Purification of total DNA from insects*

using the DNeasy® Blood & tissue Kit". Después de la extracción, el ADN fue cuantificado mediante tecnología Nanodrop (Nanodrop Technologies, Oxfordshire, UK) y evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con la adición de bromuro de etidio. El ADN fue rotulado y conservado a -20°C para posterior análisis molecular.

Una vez realizada la extracción, los restos de aislados fueron esterilizados en autoclave y posteriormente eliminados.

### 1.8. Genotipificación de los aislamientos de *H. capsulatum*

Para investigar los genotipos de *Histoplasma capsulatum* aislados se analizaron secuencias de 7 regiones del genoma del hongo por amplificación y secuenciación.

El primer tipo de secuencias analizadas fueron las secuencias parciales de los siguientes genes codificantes: (A) *arf* (Lodge, Johnson et al. 1994); (B) *H-anti* (Deepe and Durose 1995); (C) *ole* (Gargano, Di Lallo et al. 1995) y (D) *tub1* (Harris, Keath et al. 1989). Se realizaron amplificaciones de cada uno de estos genes por la técnica de PCR y para ello se utilizaron los siguientes cebadores:

<b><i>Gen amplificado</i></b>	<b>Nombre del cebador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b><i>arf:</i></b>	arf1	AGAATATGGGGCAAAAAGGA
	arf2	CGCAATTCATCTTCGTTGAG
<b><i>H-anti:</i></b>	Hanti3	CGCAGTCACCTCCATACTATC
	Hanti4	CGGCCGACATTAACCC
<b><i>ole:</i></b>	ole3	TTTAAACGAAGCCCCCACGG
	ole4	CACCACCTCCAACAGCAGCA
<b><i>tub1</i></b>	<i>tub1</i>	GGTGGCCAAATCGAAACTC
	tub2	GGCAGCTTTCGTTTCCTCAGT

Las reacciones y el programa del termociclador que se utilizaron se describen a continuación (Kasuga, Taylor et al. 1999; Taylor, Chavez-Tapia et al. 2005):

<b>Master Mix</b>	<b>1x (µL)</b>
<b>2XTaq MMix 2x</b>	25
<b>Cebador 1</b>	2.25
<b>Cebador 2</b>	2.25
<b>Agua</b>	18.5
<b>ADN</b>	2.0

#### **Programa de amplificación**

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>94°C</b>	2 min
<b>32 ciclos:</b>	
<b>94°C</b>	15 s
<b>* “Touchdown”</b>	
<b>72°C</b>	1 min
<b>1 ciclo:</b>	
<b>72°C</b>	5 min
<b>4°C</b>	∞

\* Touchdown

65° C

65°C– 0.7°C/ciclo

(x 12 ciclos)

56°C

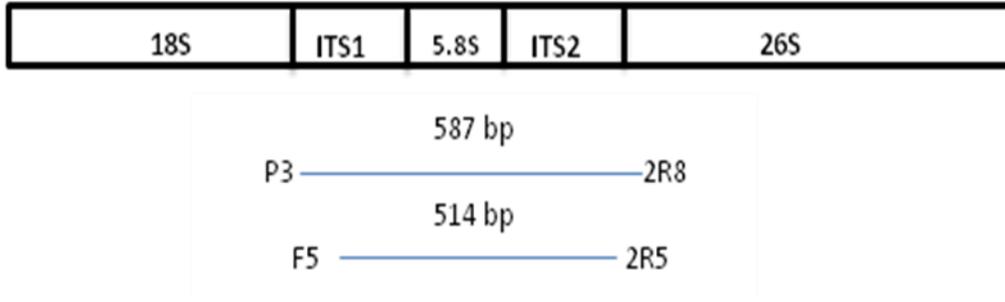
20 ciclos

4°C

∞

Nota: \* La temperatura en estos 12 ciclos disminuye 0.7°C en cada ciclo.

Otra secuencia analizada fue la que codifica por la subunidad pequeña ribosomal 5.8S rRNA y sus regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Figura 4) (Jiang, Bartlett et al. 2000).



**Figura 4.** Esquema de las regiones ITS de *H. capsulatum* amplificadas por la técnica de PCR anidado (Jian et al., 2000). Se indica la posición en donde hibridan los cebadores con la diana y el tamaño de los productos de amplificación para ambas PCR.

La amplificación de estos genes se realizó con la técnica de PCR utilizando solamente una ronda de amplificación con los cebadores P3 y 2R8, en lugar del PCR anidado utilizado por Jian. Las secuencias de los cebadores y el programa de PCR fueron las siguientes:

P3: 5'-CGGAAGGATCATTACCACGCCG-3'

2R8: 5'-CACGGGTATCCCTACCTGATC-3'

Master Mix	1x (µL)
2XTaq MMix 2x	25
Cebador P3	2
Cebador 2R8	2
Agua	19
ADN	2

### Programa de amplificación

Temperatura	Tiempo
94 °C	10 min
<b>40 ciclos:</b>	
94 °C	1 min
47 °C	2 min
72 °C	2 min
<b>1 ciclo:</b>	
72°C	10 min
4°C	∞

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Un tercer grupo de cebadores se utilizaron para marcadores no génicos que han sido diseñados para amplificar directamente secuencias polimórficas específicas de *H. capsulatum* (Carter, Burt et al. 1996; Carter, Burt et al. 1997).

Las parejas de cebadores se describen a continuación:

Nombre de cebadores	Secuencia de cebadores 5'-3'
604U	CGTAATTGTTTCTGCCTCTCC
604L	CTGTTCTCGGTGTAATATTCC
642U	CGATTGTTATTAAACTCGGTGGG
642L	CTCGACAATGAGAGTTAGAATGG

Las reacciones y programas de PCR se describen a continuación:

Master Mix	1x (µL)
2XTaq MMix 2x	25
Cebador U	2
Cebador L	2
Agua	19
ADN	2

### Programa de amplificación

Temperatura	Tiempo
95°C	5 min
<b>35 ciclos:</b>	
95°C	30 s
55°C	30 s
72°C	30 s
<b>1 ciclo:</b>	
72°C	10 min
4°C	∞

### *1.9. Análisis de Datos*

Los productos amplificados de los genes investigados fueron enviados directamente sin purificar a las instalaciones de la Compañía MacroGen (<http://www.macrogen.com>) en Estados Unidos para su secuenciación. Las secuencias posteriormente fueron analizadas mediante los programas Chromas Pro (Technelysium) y MEGA5 (Tamura K 2011). Las secuencias obtenidas fueron sometidas a análisis filogenético utilizando los algoritmos del vecino más cercano o Neighbor Joining (NJ) y el método del Grupo Par sin peso con promedio aritmético o *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

El algoritmo de vecino más cercano, NJ (por sus siglas en inglés) se aplica comúnmente a la elaboración de árboles de distancia, sin importar el criterio de optimización. El árbol completamente estructurado se descompone en un árbol “estrella”, las secuencias más parecidas (más cercanas) son unidas, insertándose en el resto del árbol, esto lo hace sucesivamente hasta que todas las secuencias que son más parecidas se juntan.

El algoritmo UPGMA (por sus siglas en inglés), es un agrupamiento filético que ensambla las ramas del árbol basándose en el criterio de mayor similitud entre pares y promedio de pares unidos. Se utilizaron estos dos algoritmos con el fin de generar árboles con un Bootstrap de 500 réplicas.

El ADN de los genes *arf*, *H-anti*, *ole* y *tub1*, así como las secuencias espaciadoras ITS del gen ribosomal y las de regiones variables de los genes 604U y 642U fueron comparados con aquellas secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta comparación se realizó mediante la herramienta BLAST para demostrar las semejanzas entre las secuencias nucleotídicas de los aislamientos del presente trabajo de investigación con respecto a las secuencias de la base de datos.

Los números de identificación del GenBank de las secuencias de la base de datos que fueron utilizadas para cada gen se listan a continuación:

<b>ITS</b>	<b>ole</b>	<b>arf</b>	<b>Hanti</b>	<b>tub</b>	<b>604</b>	<b>642</b>
AF322377	AF495593	AF495591	AF495592	AF495602	U40067	U39630
AF322378	AF495601	AF495595	AF495600	AF495606	U40220	U39631
AF322380	AF495609	AF495603	AF495604	AF495610	XM001539266	
AF322382	AF495613	AF495619	AF495624	AF495622	XM002621576	
AF322383	AF495617	AF495640	AF495628	AF495626		
AF322385	AF495629	AF495644	AF495636	AF495642		
AF458085	AF495645	GU320835	AF495639	AF495650		
AF458086	AF495649	GU320837	AF495643	GU321038		
DQ239895	GU320994	GU320841	AF495652	GU321041		
DQ239896	GU320996	GU320844	GU320889	GU321050		

---

DQ467835	GU321003	GU320852	GU320896	GU321056
AB055235	GU321030	GU320859	GU320900	GU321067
AB055246	GU321032	GU320864	GU320902	GU321070
AB055249	GU321033	GU320869	GU320907	GU321080
AB071824	GU321034	AY013310	GU320927	GU321087
AB071835	FJ435629	AY013311	GU320929	AY013312
AB071839	FJ435630	EU096461	GU320934	AY013313
AB071842	FJ435631		U203466217B	
AB211529	FJ435632		XM001543097	
EU048555	FJ435633			
EU048556	FJ435635			
	X85962			
	X85963			
	XM002629365			

## **CAPITULO 4:**

### **1. RESULTADOS**

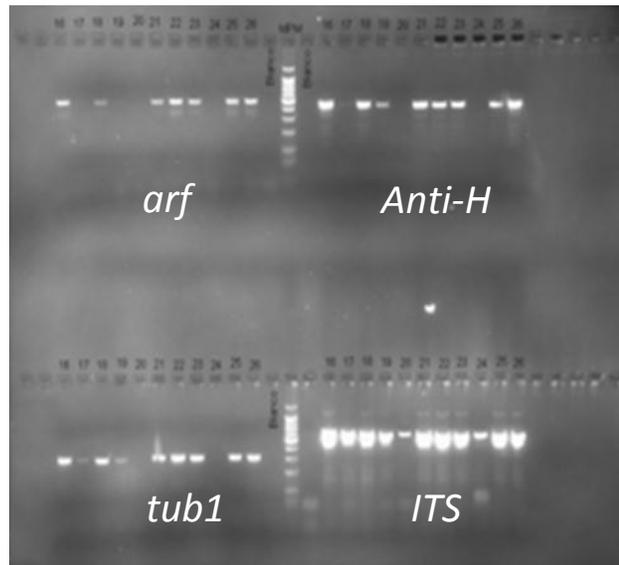
Un total de 26 aislados provenientes de pacientes con histoplasmosis fueron obtenidos para el presente estudio. Trece de ellos fueron obtenidos del laboratorio del Hospital Escuela; de estos 8 formaban previamente parte del cepario de Micología de la Escuela de Microbiología de la UNAH. Estos aislados fueron obtenidos del Hospital Escuela entre los años 2007 y 2008. Los otros 5 aislados procedentes del Hospital Escuela fueron obtenidos de aislamientos realizados en el período de Diciembre del 2010 a Julio del 2011. Los restantes 13 aislados fueron proporcionados por el laboratorio del Hospital Cardiopulmonar de Tegucigalpa en este mismo período. Los datos obtenidos en relación a los aislados utilizados en el estudio se detallan en el cuadro 3.

Los datos demográficos de la totalidad de aislados indican un mayor número de pacientes varones. Las edades de los pacientes en este estudio oscilaron entre 4 y 66 años, observándose una mayor frecuencia de histoplasmosis en las edades entre los 30 y 40 años. No se obtuvieron datos en relación al estado inmunológico de los pacientes del Hospital Escuela contrariamente a los aislados del Hospital Cardiopulmonar que en su totalidad provenían de pacientes con VIH-SIDA.

**Cuadro 3:** Lista de aislados utilizados en este estudio. Clave: HE = Proveedor Hospital Escuela; HC= Proveedor Hospital Cardiopulmonar; CM= Cepario Micología-UNAH. S/I: Sin información.

<b>Aislado</b>	<b>Procedencia del aislado</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Enfermedad Base</b>
CM-Hn1	Sangre	F	52	S/I
CM-Hn2	Sangre	M	34	S/I
CM-Hn3	Sangre	F	16	SIDA
CM-Hn4	Sangre	F	27	S/I
CM-Hn5	Sangre	F	37	S/I
CM-Hn6	Sangre	F	4	Desnutrición
CM-Hn7	Sangre	M	35	S/I
CM-Hn8	LCR	M	24	S/I
HE-Hn9	LCR	F	16	S/I
HE-Hn10	Sangre	M	49	S/I
HE-Hn11	Sangre	F	36	S/I
HE-Hn12	Sangre	F	24	S/I
HC-Hn13	Biopsia	F	S/I	SIDA
HC-Hn14	Ganglio	M	63	SIDA
HC-Hn15	Medula ósea	M	36	SIDA
HC-Hn 16	Sangre	M	32	SIDA
HC-Hn17	Ganglio	M	30	SIDA
HC-Hn18	Heces	M	60	SIDA
HC-Hn19	Ganglio	M	66	SIDA
HC-Hn20	S/I	S/I	S/I	S/I
HC-Hn21	Sangre	M	41	SIDA
HC-Hn22	Orina	M	S/I	SIDA
HC-Hn23	Biopsia	M	S/I	SIDA
HC-Hn24	LCR	M	48	SIDA
HC-Hn25	LCR	M	S/I	SIDA
HE-Hn26	Sangre	M	32	SIDA

A cada aislado de *H. capsulatum* se le extrajo ADN y posteriormente cada extracción fue amplificada por la técnica de PCR con los diferentes juegos de cebadores descritos en el capítulo de metodología. La región ITS fue exitosamente amplificada en todos los 26 aislados que conformaron el estudio. Sin embargo, los genes *ole*, *arf*, *tub*, *Hanti* y 604, no produjeron bandas de amplificación para los aislados Hn20 y Hn24 (figura 5). Las amplificaciones realizadas produjeron bandas con los tamaños esperados de acuerdo a la literatura. Los genes *ole*, *arf*, *Hanti* y *tub* produjeron bandas de 550, 600, 500 y 310 pb respectivamente. La región ITS produjo una banda de 510 pb y las secuencias 604 y 642 produjeron bandas de 200 pb.



**Figura 5:** Amplificación de genes *arf*, *Hanti*, *tub1* y región ITS por la técnica de PCR

Las posiciones variables para cada gen se informan en el Cuadro 4. Se informa también el número de pares de bases que fueron obtenidas en cada gen después de su limpieza.

**Cuadro No. 4:** Número de posiciones variables en los 7 genes estudiados

<b>Gen</b>	<b>Número de posiciones variables</b>	<b>Pares de bases obtenidas</b>
<b>Ole</b>	21	361
<b>Anti-H</b>	27	361
<b>Arf</b>	23	433
<b>Tub</b>	25	217
<b>604U</b>	12	127
<b>642U</b>	10	127
<b>Región ITS</b>	25	505

Las secuencias obtenidas fueron enviadas a la base de datos de GenBank y los siguientes números de acceso fueron asignados. Esta información está disponible para la comunidad científica a partir del mes de marzo 2012.

<b>ITS</b>	<b>Ole</b>	<b>Arf</b>	<b>Hanti</b>	<b>tub</b>
ITS 1 JQ218335	ole 1 JQ218399	arf 2 JQ218421	Hanti 1 JQ218360	Tub 1 JQ218379
ITS 2 JQ218336	ole 2 JQ218400	arf 3 JQ218422	Hanti 2 JQ218361	Tub 4 JQ218380
ITS 3 JQ218337	ole 3 JQ218401	arf 4 JQ218423	Hanti 3 JQ218362	Tub 7 JQ218381
ITS 4 JQ218338	ole 4 JQ218402	arf 5 JQ218424	Hanti 4 JQ218363	Tub10 JQ218382
ITS 5 JQ218339	ole 5 JQ218403	arf 7 JQ218425	Hanti 5 JQ218364	Tub15 JQ218383
ITS 6 JQ218340	ole 6 JQ218404	arf 8 JQ218426	Hanti 8 JQ218365	Tub21 JQ218384
ITS 7 JQ218341	ole 7 JQ218405	arf 9 JQ218427	Hanti 9 JQ218366	Tub25 JQ218385
ITS 8 JQ218342	ole 8 JQ218406	arf 10 JQ218428	Hanti10 JQ218367	Tub 2 JQ218386
ITS 9 JQ218343	ole 9 JQ218407	arf 11 JQ218429	Hanti11 JQ218368	Tub 5 JQ218387
ITS10 JQ218344	ole 10 JQ218408	arf 12 JQ218430	Hanti12 JQ218369	Tub 8 JQ218388
ITS11 JQ218345	ole 11 JQ218409	arf 13 JQ218431	Hanti13 JQ218370	Tub12 JQ218389
ITS12 JQ218346	ole 12 JQ218410	arf 14 JQ218432	Hanti14 JQ218371	Tub16 JQ218390
ITS13 JQ218347	ole 13 JQ218411	arf 15 JQ218433	Hanti15 JQ218372	Tub22 JQ218391
ITS14 JQ218348	ole 14 JQ218412	arf 22 JQ218434	Hanti16 JQ218373	Tub26 JQ218392
ITS15 JQ218349	ole 15 JQ218413	arf 25 JQ218435	Hanti18 JQ218374	Tub 3 JQ218393
ITS16 JQ218350	ole 16 JQ218414	arf 26 JQ218436	Hanti22 JQ218375	Tub 6 JQ218394
ITS 17 JQ218351	ole 18 JQ218415		Hanti 23	Tub 9 JQ218395
ITS 18 JQ218352	ole 19 JQ218416		JQ218376	Tub13 JQ218396
ITS 19 JQ218353	ole 21 JQ218417		Hanti 25	Tub18 JQ218397
ITS 21 JQ218354	ole 23 JQ218418		JQ218377	Tub23 JQ218398
ITS 22 JQ218355	ole 25 JQ218419		Hanti 26	
ITS 23 JQ218356	ole 26 JQ218420		JQ218378	
ITS 24 JQ218357				
ITS 25 JQ218358				
ITS 26 JQ218359				

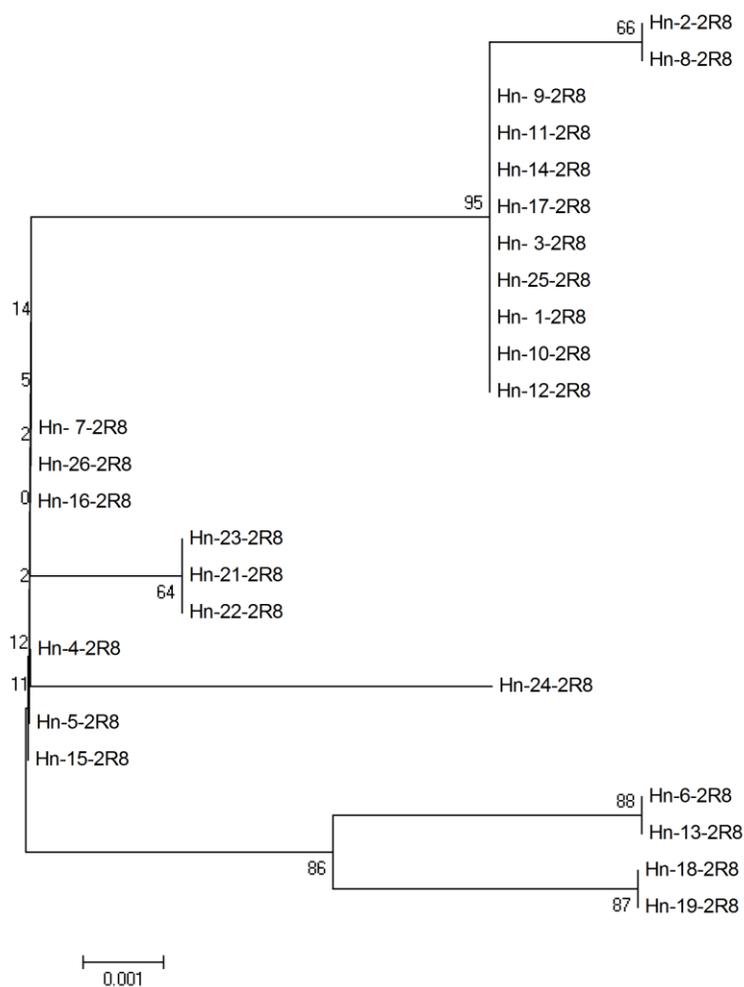
Las secuencias obtenidas de los siete *loci* fueron comparadas con secuencias homólogas existentes en la base de datos del Gen Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para aislados de *H. capsulatum* de otras regiones del mundo. Esta comparación demostró que las

secuencias de los aislados de Honduras correspondían en su totalidad a secuencias de *Histoplasma capsulatum* y no fueron el producto de una amplificación inespecífica.

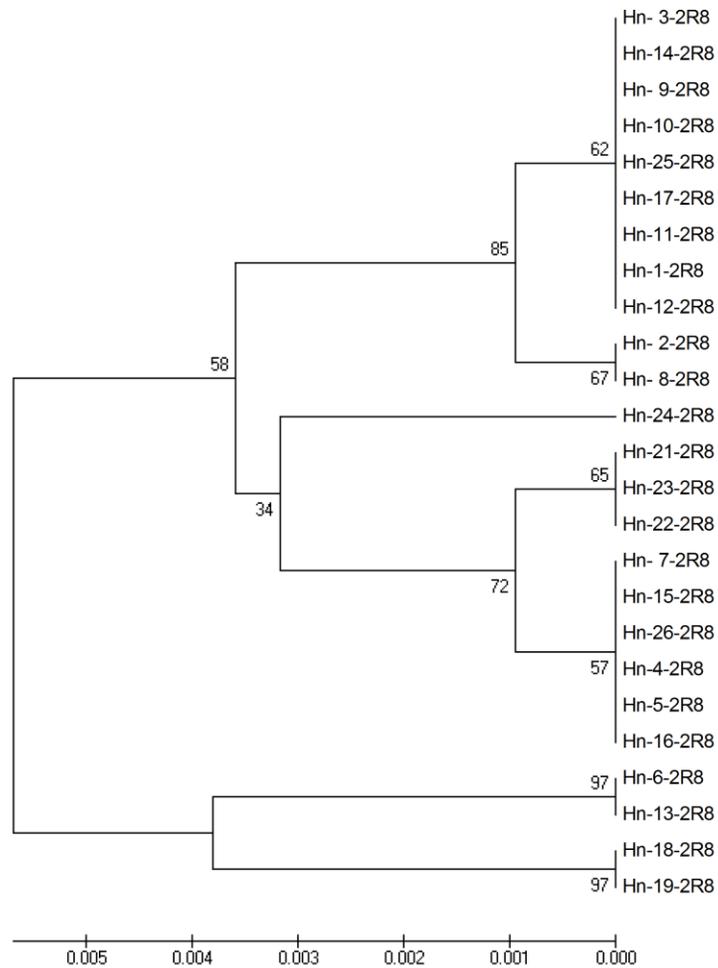
Para investigar la variabilidad genética dentro de los aislados de Honduras se utilizó el programa MEGA5 haciendo uso de los algoritmos *Neighbor Joining* (NJ) y UPGMA.

Al someter a análisis filogenético, tanto las secuencias obtenidas de regiones conservadas como de regiones variables, dieron como resultado entre 7 y 13 “clusters” en los aislados del estudio. Los árboles filogenéticos de los aislados de Honduras pueden observarse en las figuras 6 a 19.

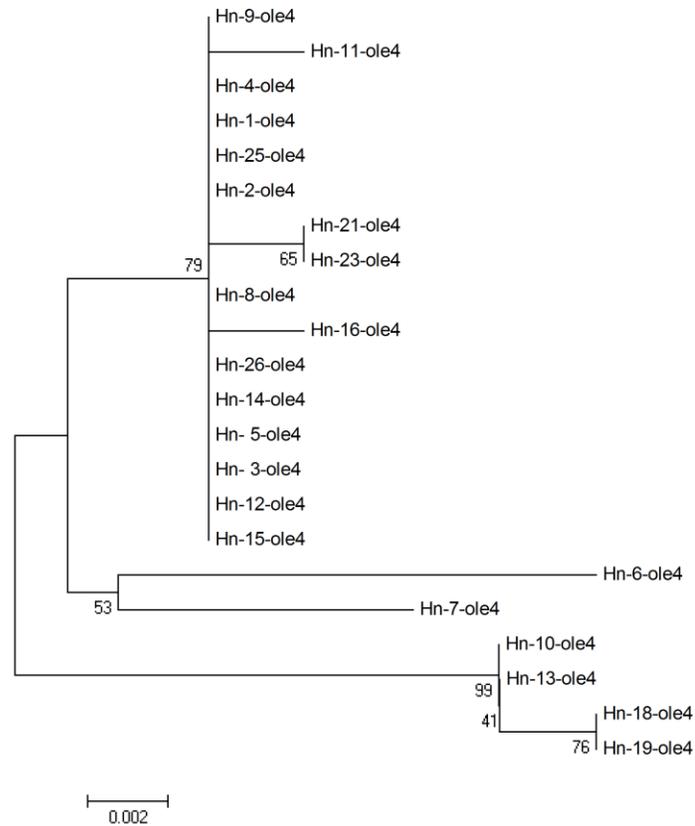
Al comparar las secuencias de los aislados de Honduras con secuencias depositadas en las bases de datos por investigadores de diferentes países del mundo, se observa que las secuencias hondureñas se encuentran más cercanamente relacionadas con las secuencias de Brasil y México. En la mayoría de los algoritmos las secuencias de Norte América, Europa, África y Asia se agrupan más lejanamente formando ramas separadas. Los árboles obtenidos por el análisis conjunto de secuencias de aislados de Honduras y de otros países se observan en las figuras 20- 29.



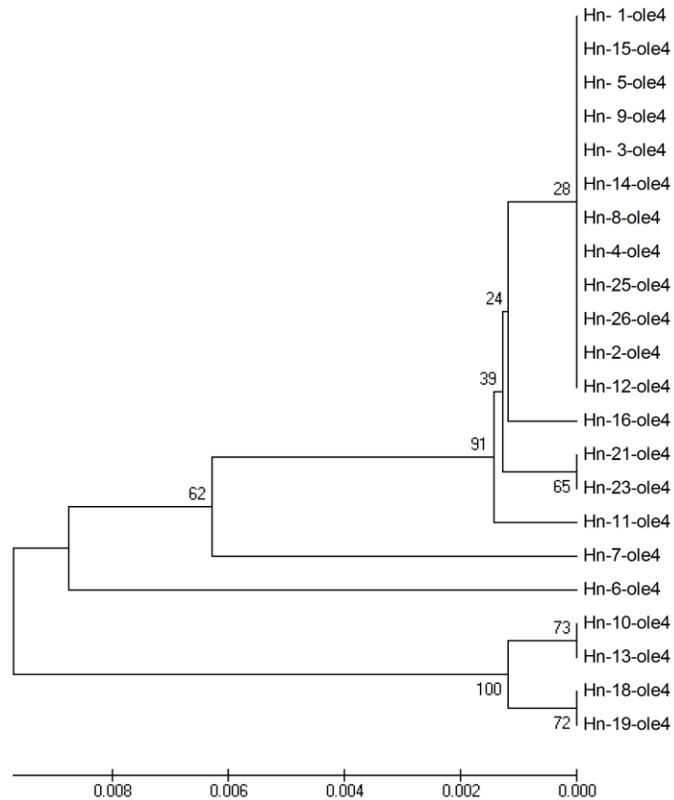
**Figura 6.** Relación evolutiva de 25 Taxones (Región ITS). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.02659624. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los taxones asociados se agruparon en la prueba *bootstrap* (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Kimura 1980) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+No codificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 530 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



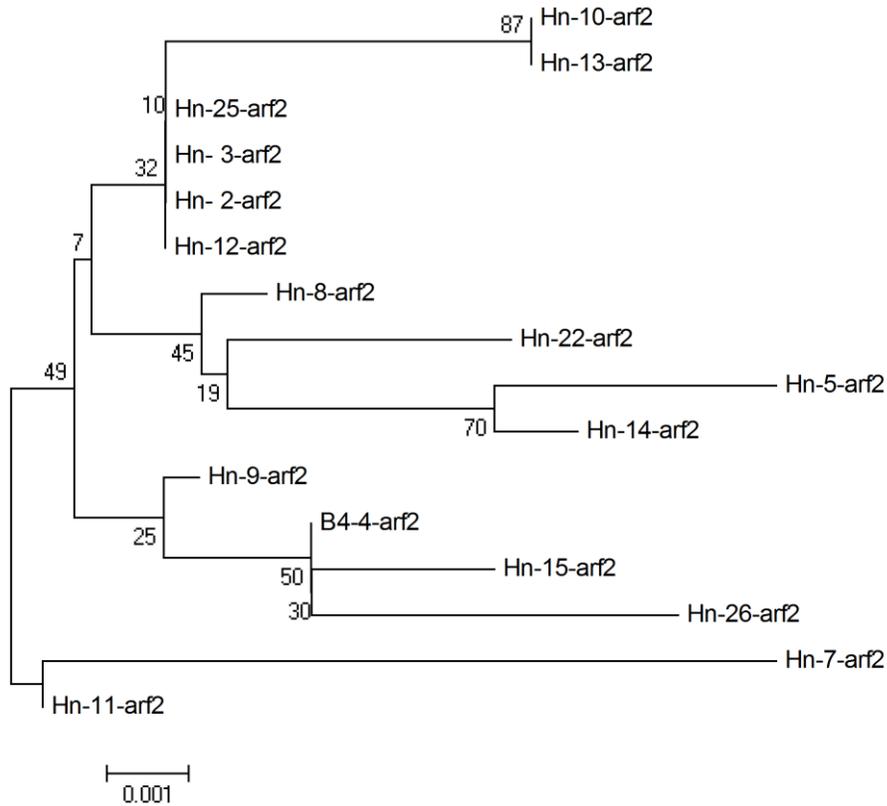
**Figura 7.** Relación evolutiva de 25 Taxones (Región ITS). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.02382316. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Kimura 1980) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 530 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K 2011).



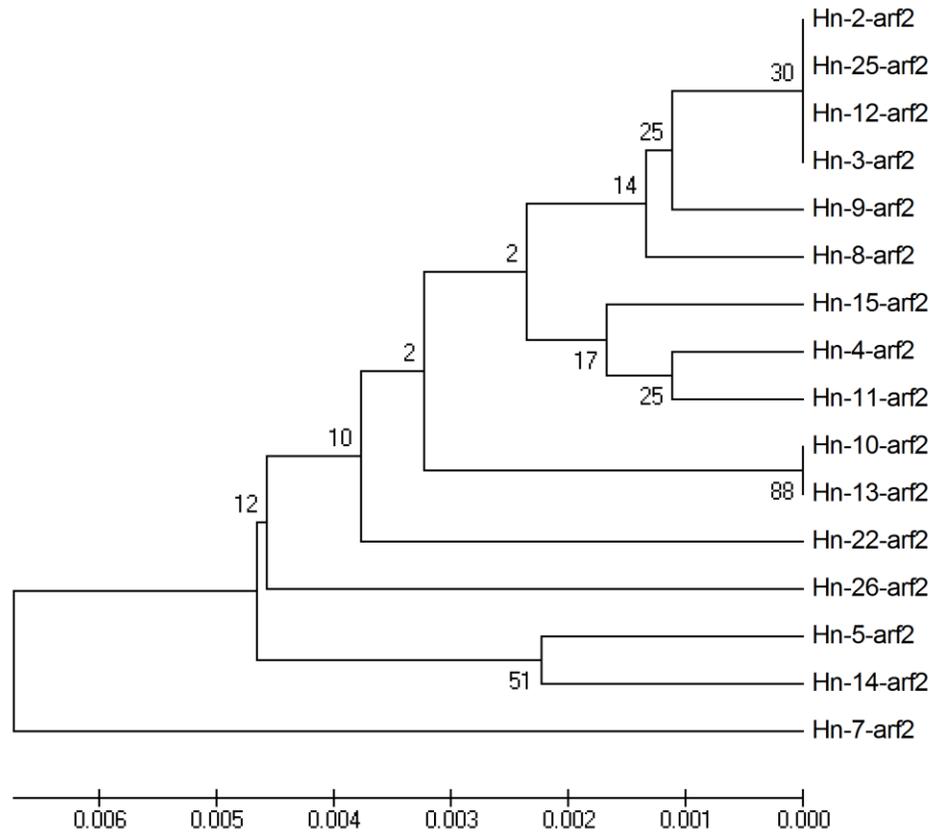
**Figura 8.** Relación evolutiva de 22 Taxones (Gen Ole). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.04679494. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Kunogi, Tamura et al. 2009) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 423 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K 2011).



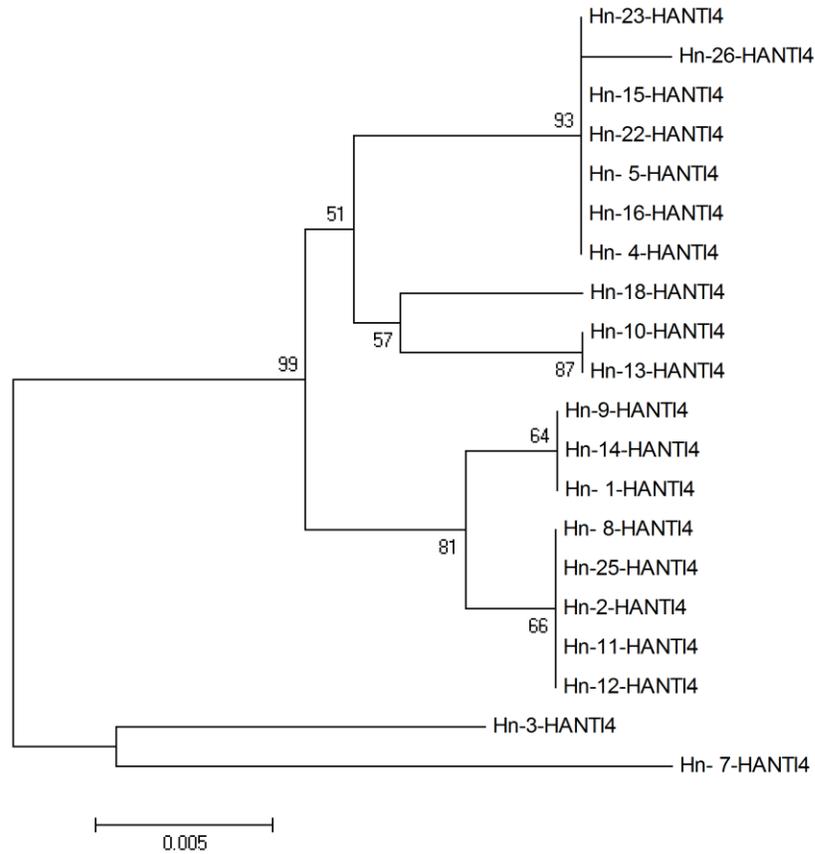
**Figura 9.** Relación evolutiva de 22 Taxones (Gen Ole). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.03950101. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 423 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



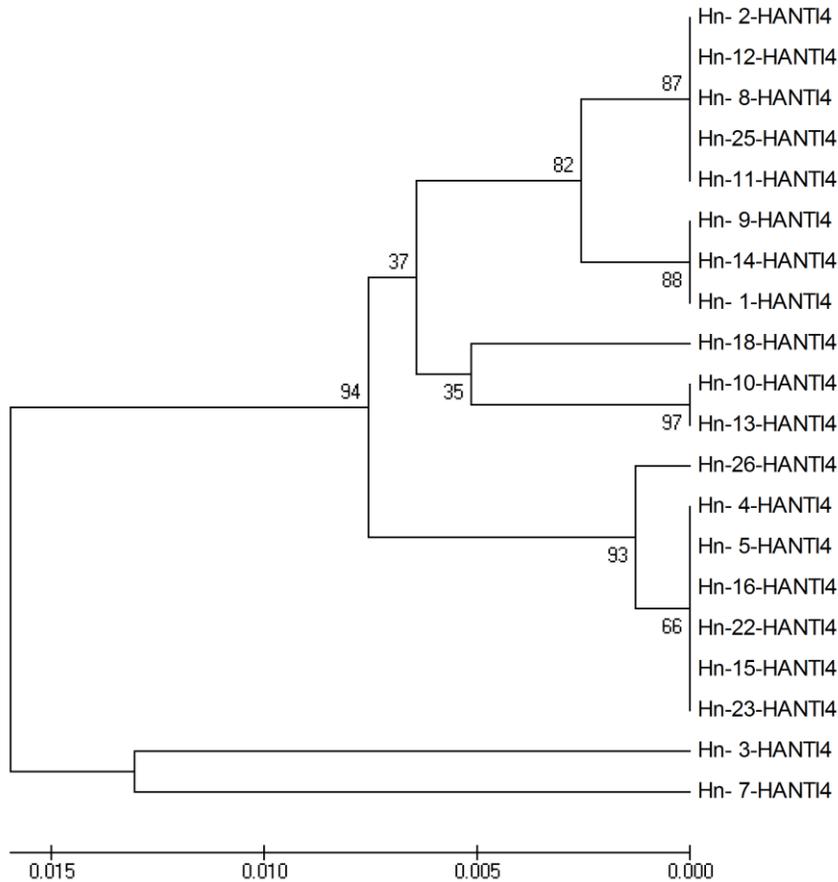
**Figura 10.** Relación evolutiva de 16 Taxones (Gen Arf). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.03931582. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 450 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



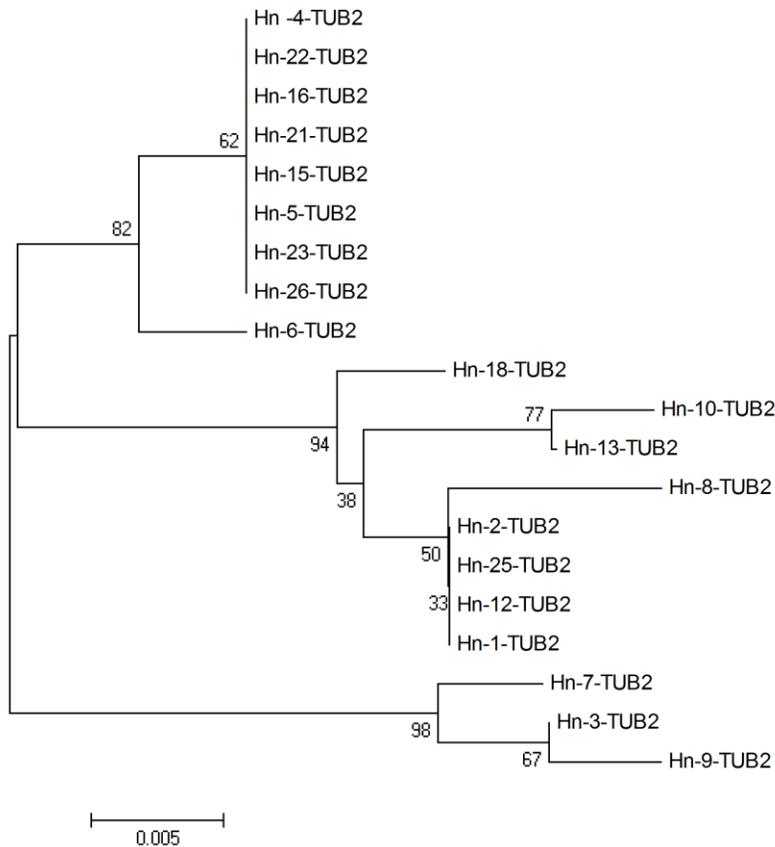
**Figura 11.** Relación evolutiva de 16 Taxones (Gen Arf). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.03948900. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 450 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



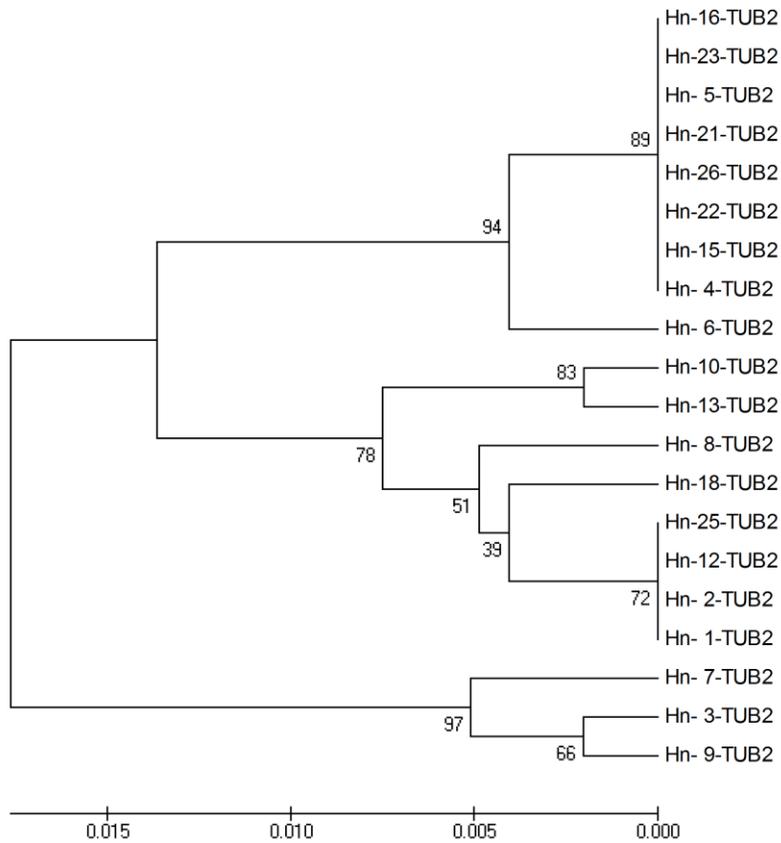
**Figura 12.** Relación evolutiva de 20 Taxones (Gen Hanti). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama =0.06876917. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 394 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



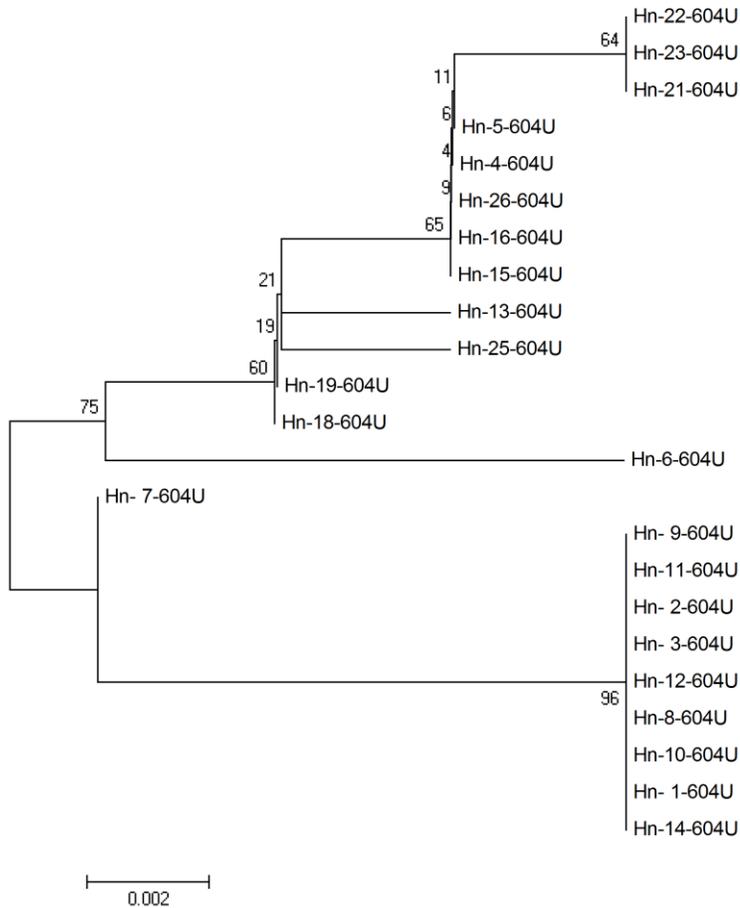
**Figura 13.** Relación evolutiva de 20 Taxones (Gen Hanti). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.06790106. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 394 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



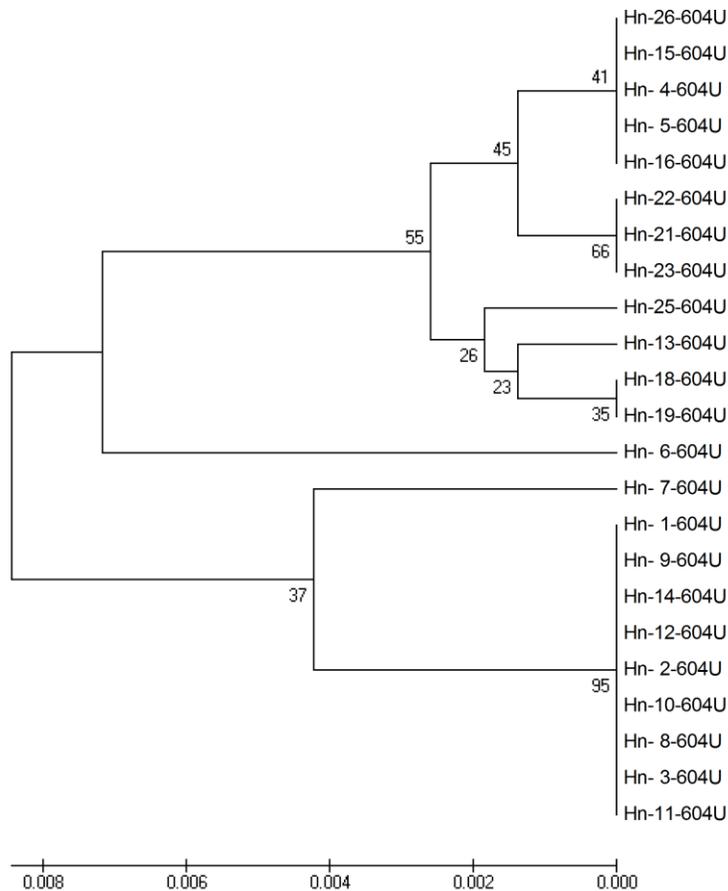
**Figura 14.** Relación evolutiva de 20 Taxones (Gen tub). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.08088198. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985) . El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de substituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+No codificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 248 posiciones en el grupo final de datos.



**Figura 15.** Relación evolutiva de 20 Taxones (Gen tub). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.07852196. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 248 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).

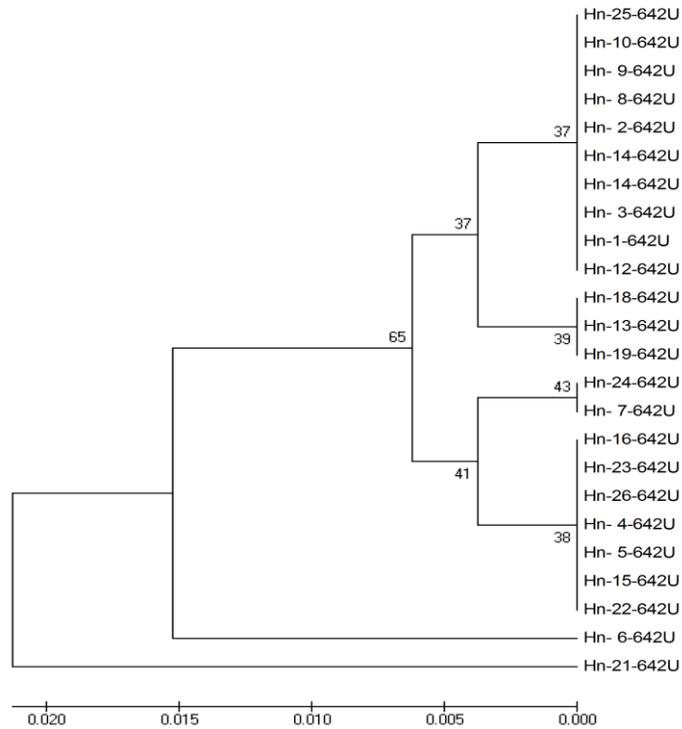


**Figura 16.** Relación evolutiva de 23 Taxones (Gen 604U). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.03373646. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de substituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 180 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).

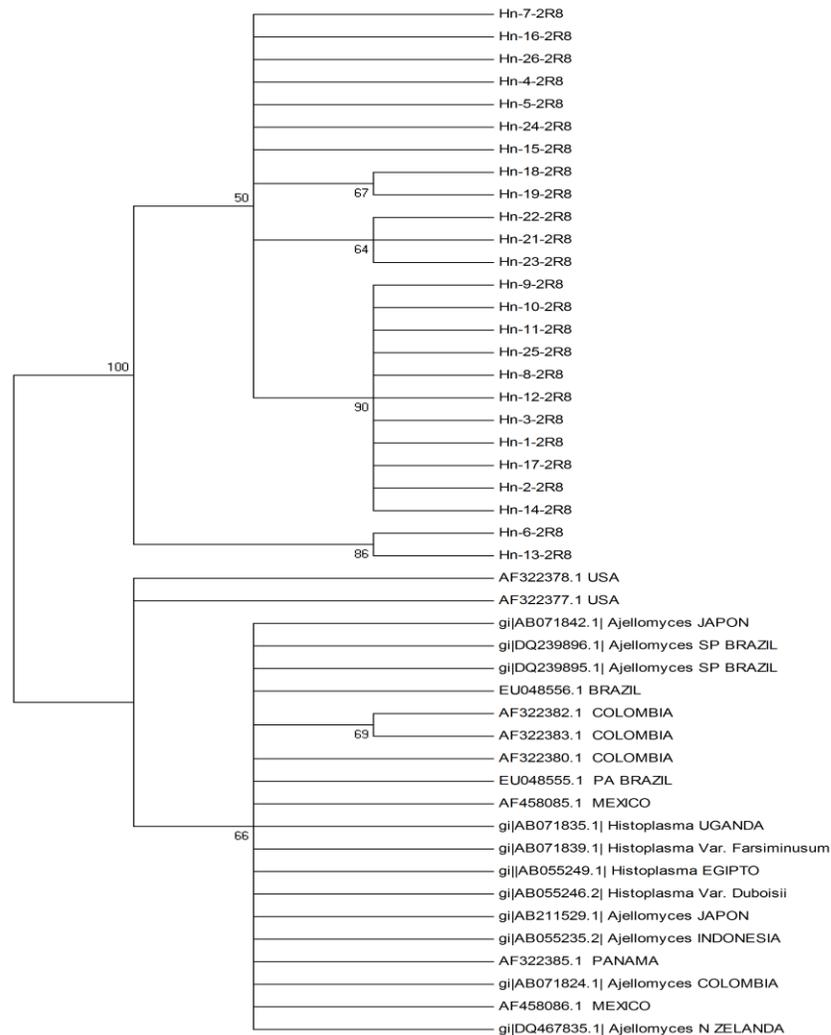


**Figura 17.** Relación evolutiva de 23 Taxones (Gen 604U). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.03544820. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 180 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).

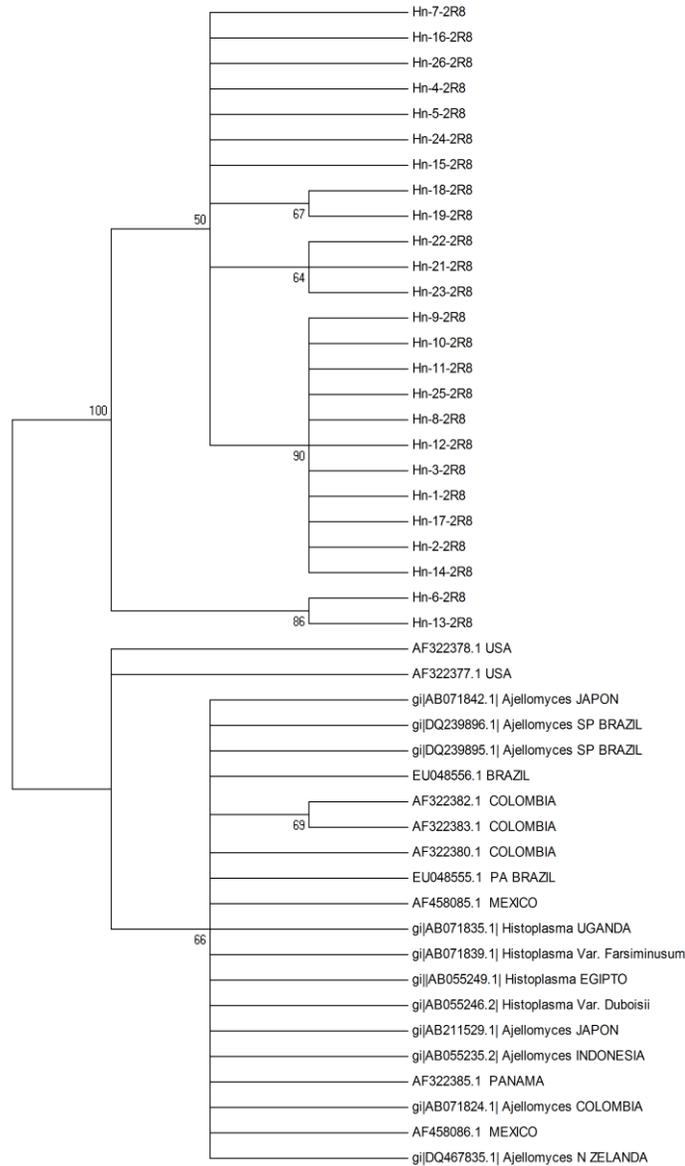




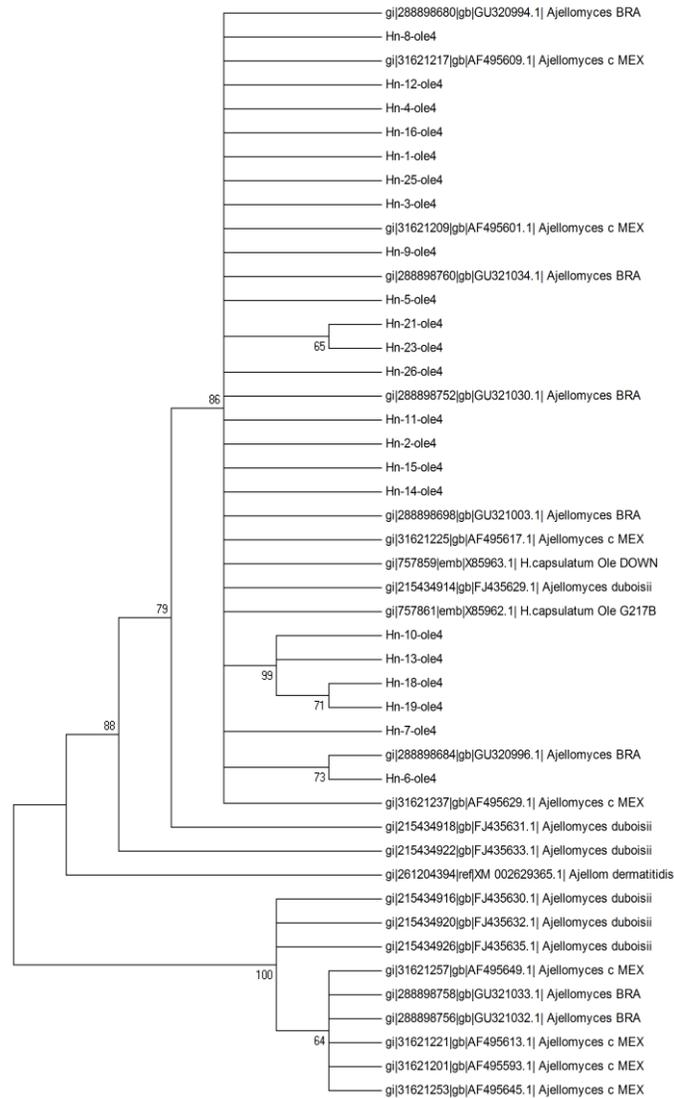
**Figura 19.** Relación evolutiva de 24 Taxones (Gen 642U). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano [1]. Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.07371628. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas [2]. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad [3] y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 135 posiciones en el grupo final de datos.



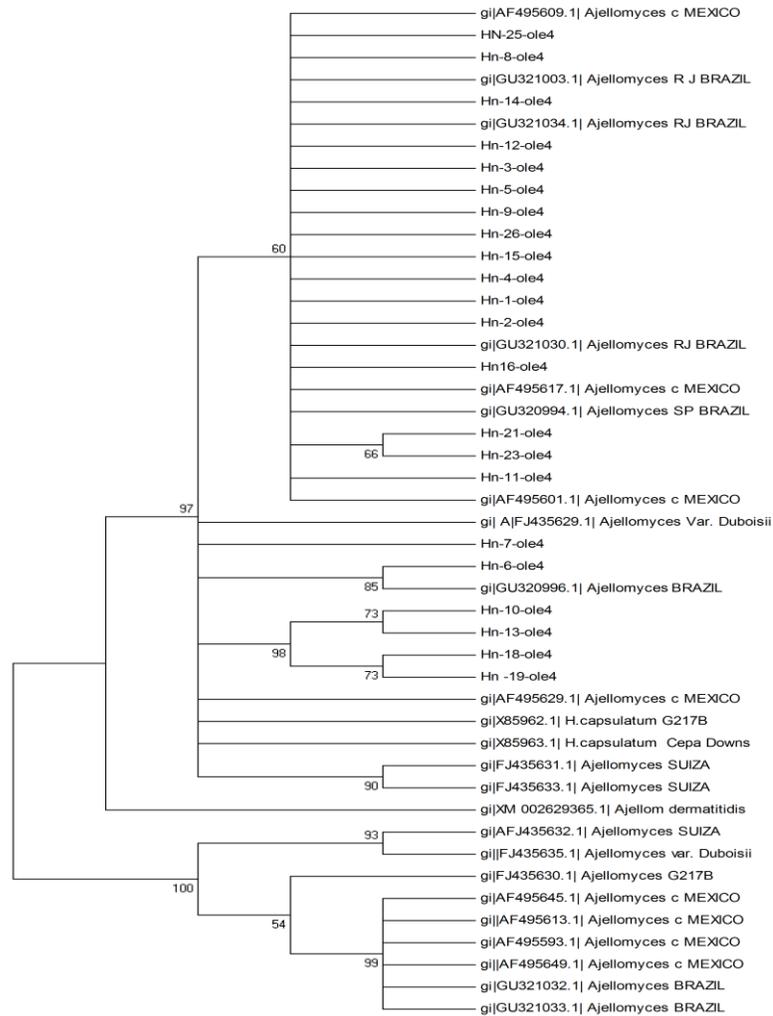
**Figura 20.** Relación evolutiva de 46 Taxones (Gen ITS). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 3.00988625. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los taxos asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 398 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



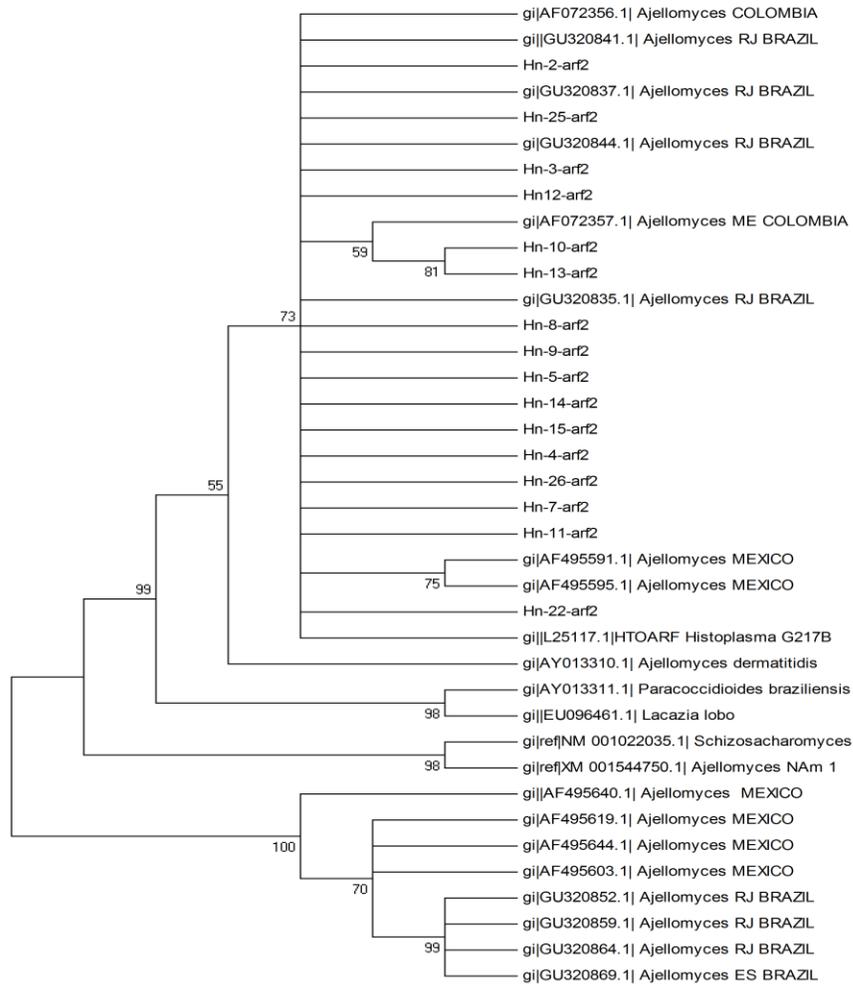
**Figura 21.** Relación evolutiva de 46 Taxones (Región ITS). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 3.02052655. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 398 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



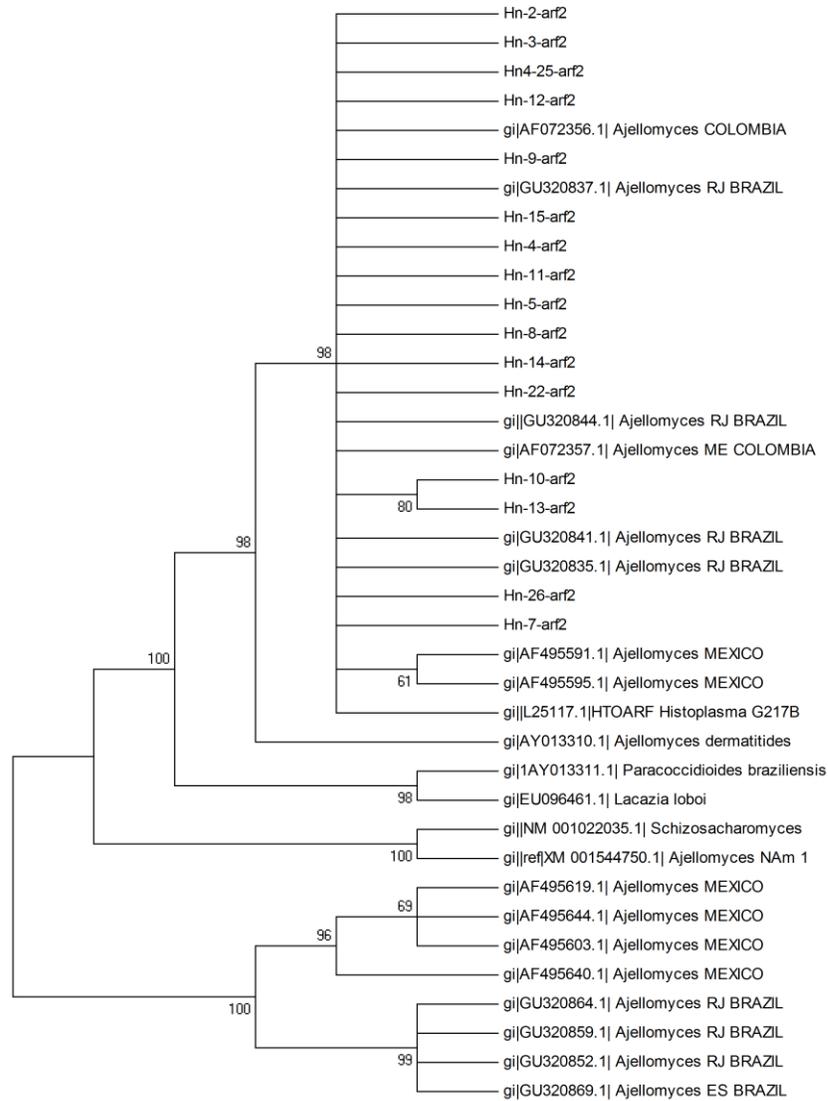
**Figura 22.** Relación evolutiva de 46 Taxones (Gen Ole). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 3.85436561. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de substituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 379 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



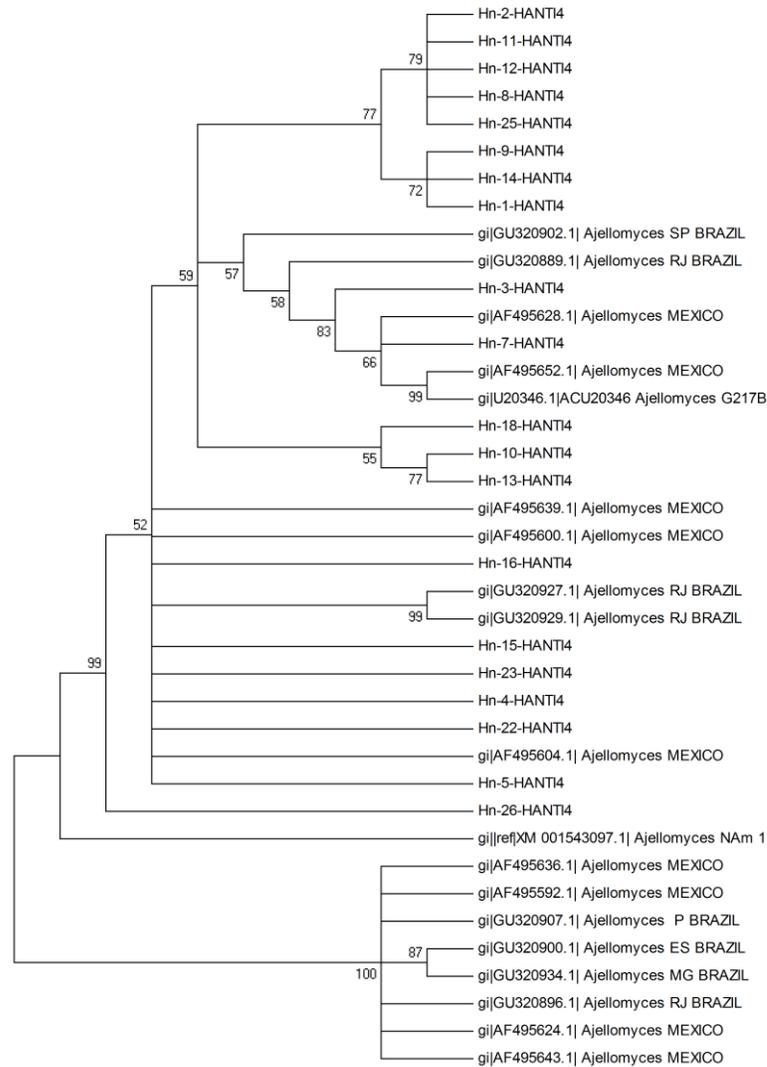
**Figura 23.** Relación evolutiva de 46 Taxones (Gen ole). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 3.02052655. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 379 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



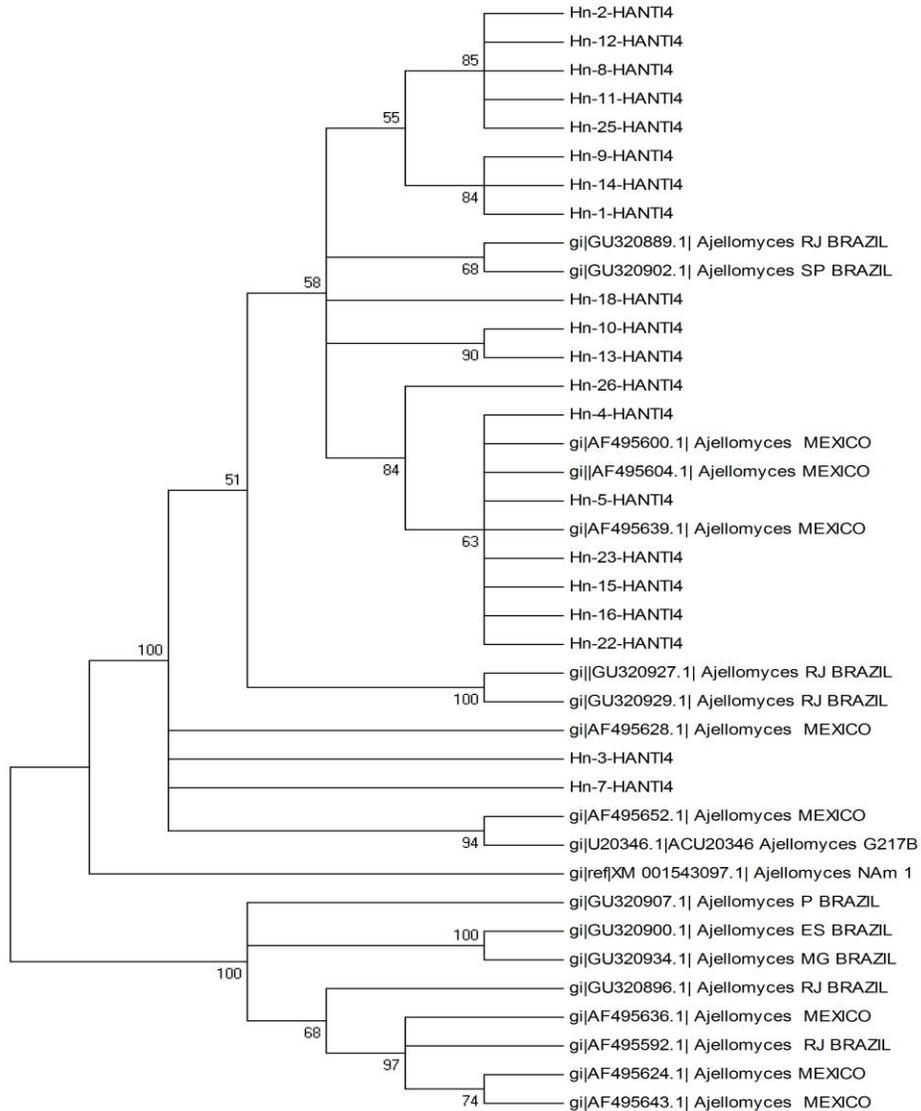
**Figura 24.** Relación evolutiva de 46 Taxones (Gen Arf). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Sneath 1973) . Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 2.28341546. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 379 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



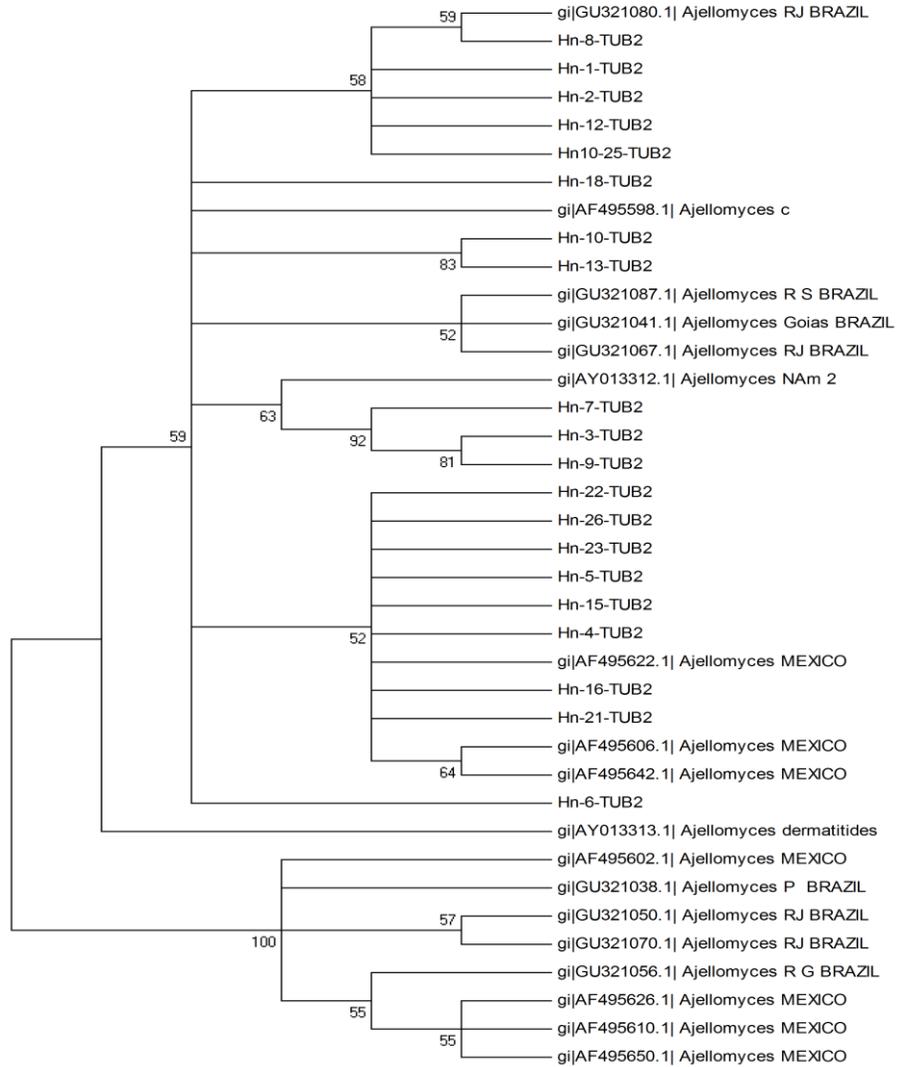
**Figura 25.** Relación evolutiva de 38 Taxones (Gen Arf). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 2.18816958. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 379 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



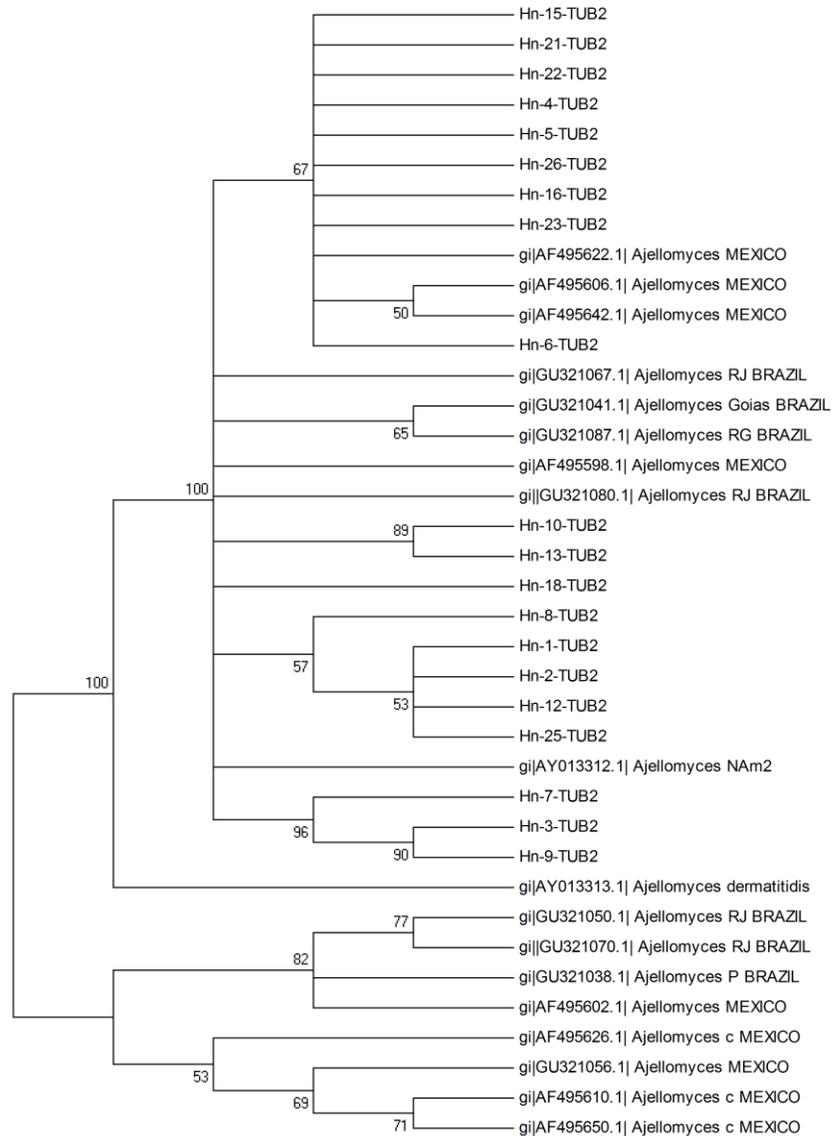
**Figura 26.** Relación evolutiva de 39 Taxones (Gen Hanti). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 2.08910100. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de substituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 351 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



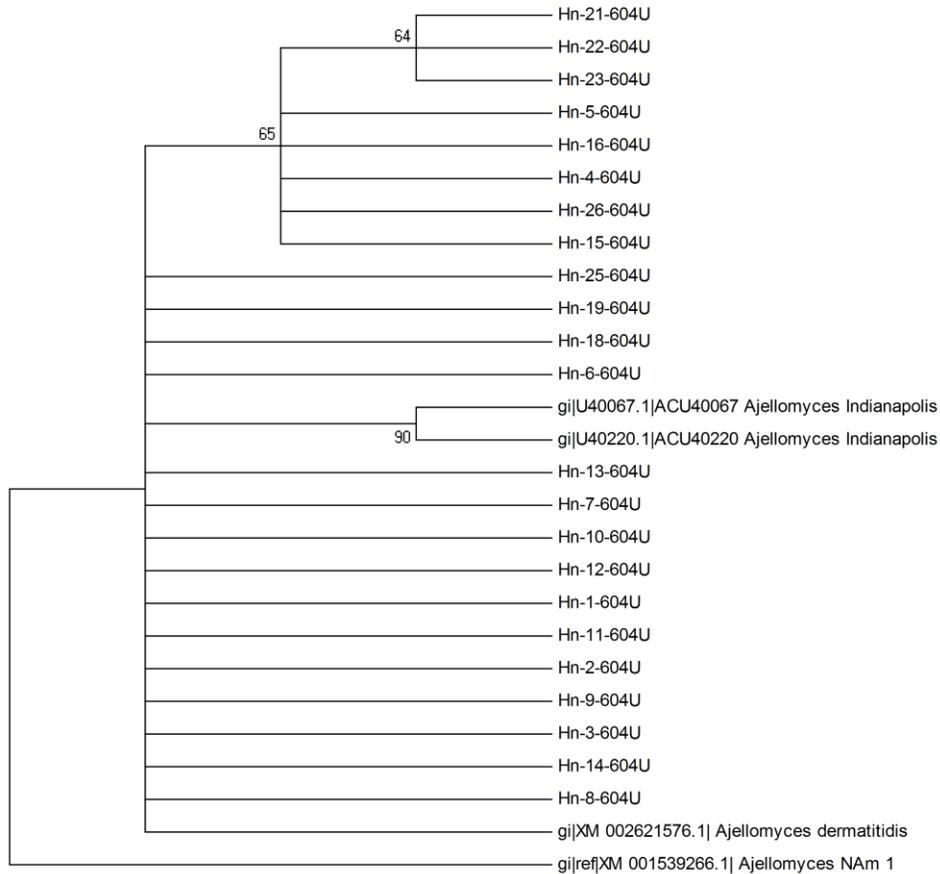
**Figura 27.** Relación evolutiva de 39 Taxones (Gen Hanti). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 1.97909157. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 351 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



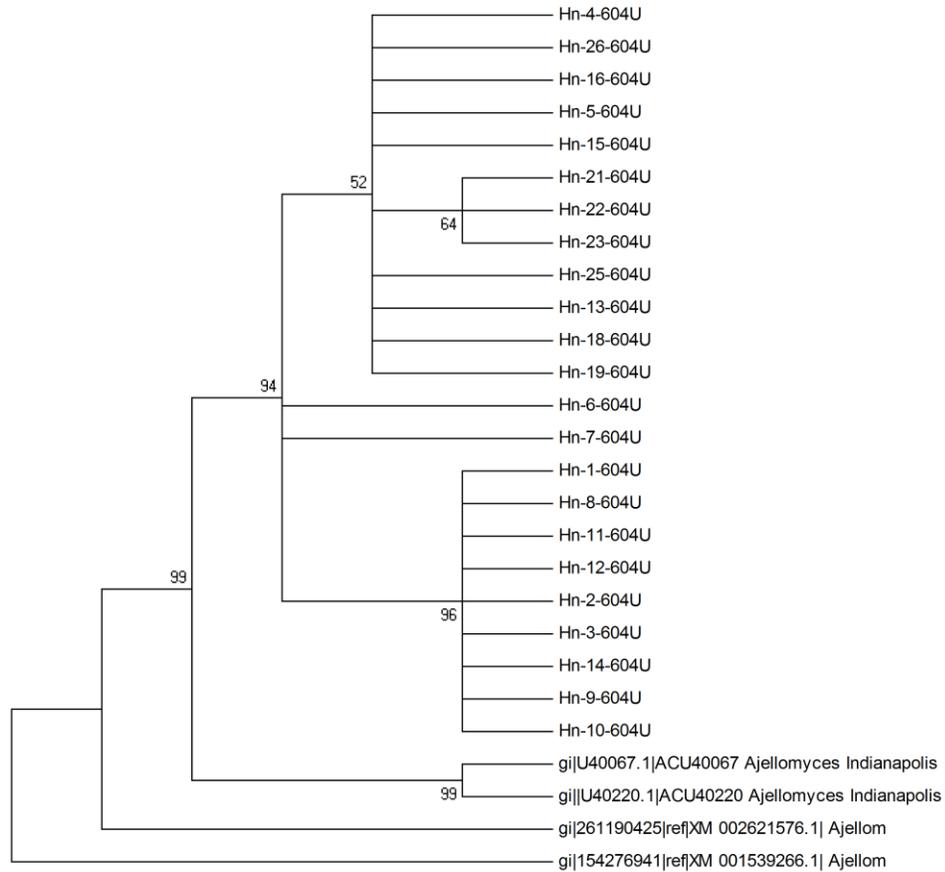
**Figura 28.** Relación evolutiva de 38 Taxones (Gen Tub). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987) . Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 1.61227442. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de substituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 185 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



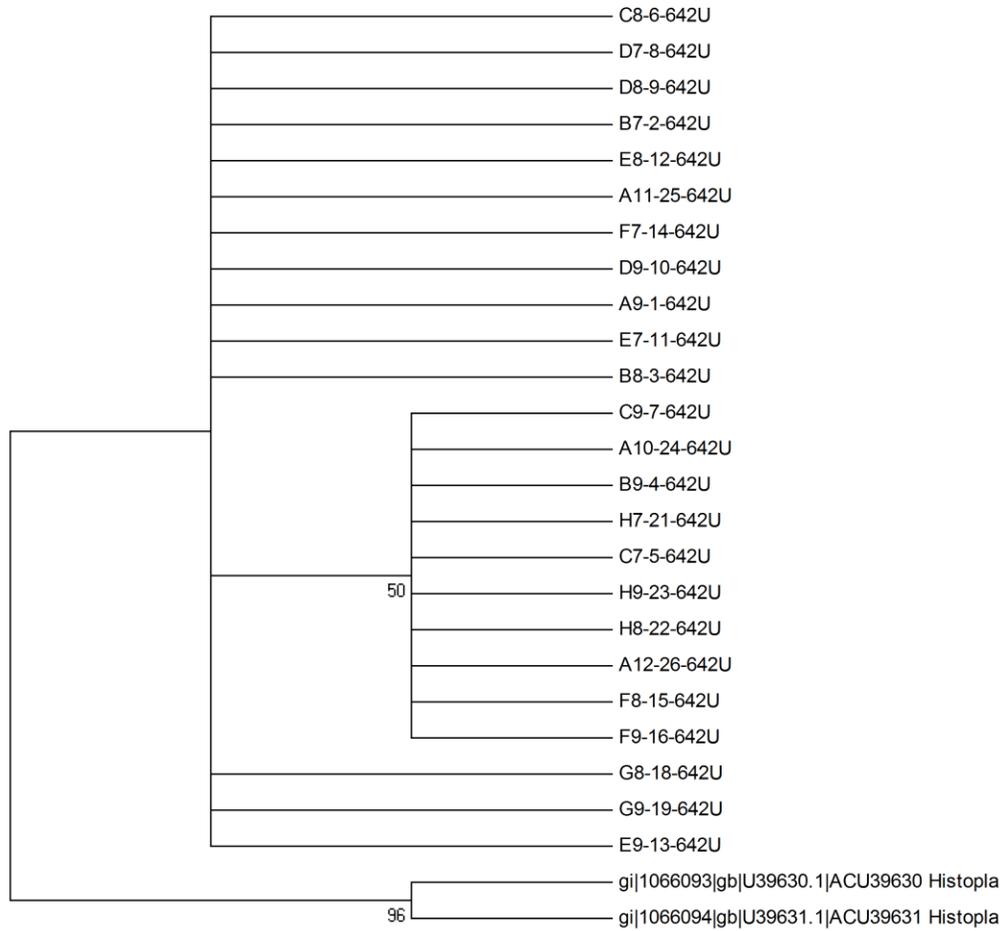
**Figura 29.** Relación evolutiva de 38 Taxones (Gen tub). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 1.44908775. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 185 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



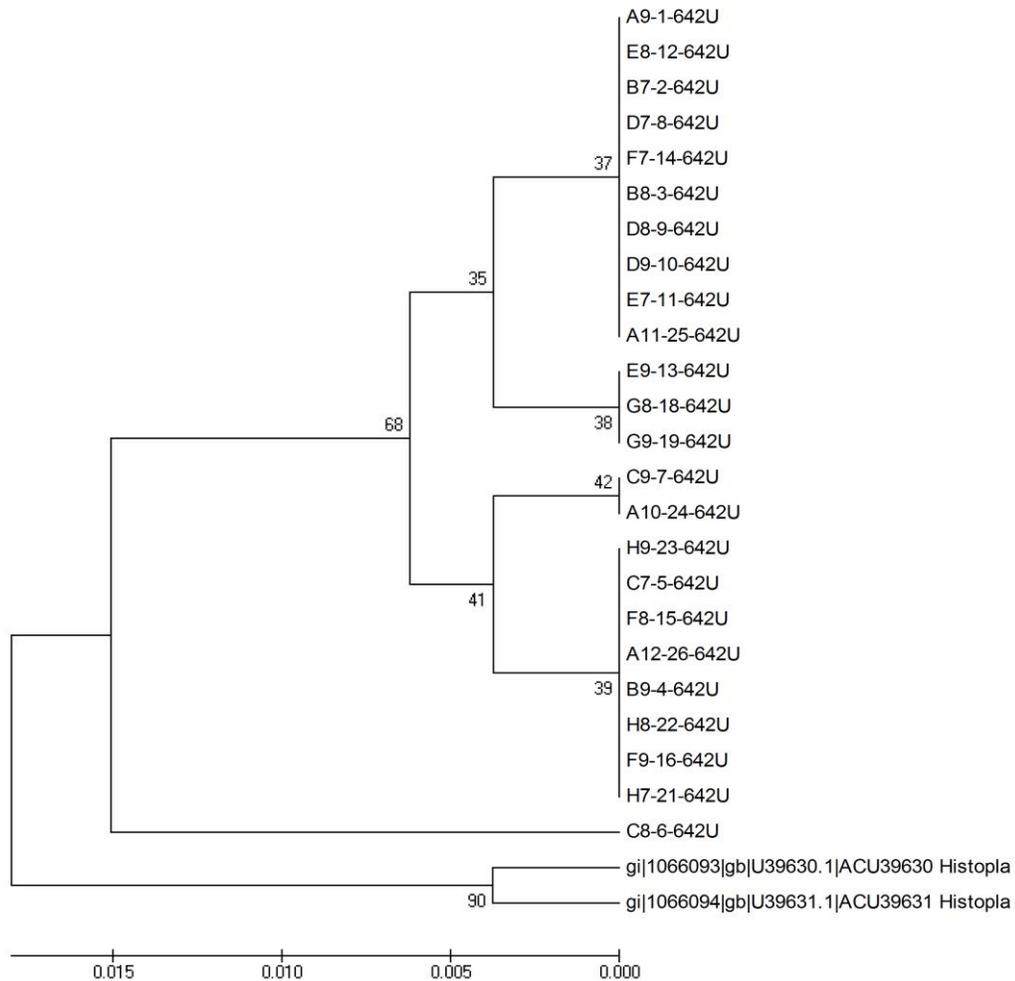
**Figura 30.** Relación evolutiva de 27 Taxones (locus 604U). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987) . Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 2.48817303. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 173 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



**Figura 31.** Relación evolutiva de 27 Taxones (locus 604U). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 1.98804544. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 173 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



**Figura 32.** Relación evolutiva de 26 Taxones (locus 642U). La historia evolutiva se dedujo usando el método de Vecino más cercano (Saitou and Nei 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama = 0.07275109. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales los Taxones asociadas se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol esta dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 135 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).



**Figura 33.** Relación evolutiva de 26 Taxones (locus 642U). La historia evolutiva se dedujo usando el método UPGMA (Sneath 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de la rama= 0.06847986. El porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales las Taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas en el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de Compuesto Máximo de Probabilidad (Tamura K. 2004) y están en las unidades del número de sustituciones bases por sitio. Las posiciones del codón incluidas fueron 1er+2do+3ro+Nocodificado. Todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes fueron eliminadas del grupo de datos (opción completa de cancelación). Hubo un total de 135 posiciones en el grupo final de datos (Tamura K. 2011).

## **CAPITULO 5:**

### **1. DISCUSIÓN**

Veintiséis aislados hondureños de *Histoplasma capsulatum* fueron incluidos en este estudio para investigar polimorfismos genéticos entre ellos y su relación filogenética con aislados de otros países de América y otros continentes. Este estudio representa un paso más hacia adelante en términos de investigación de la diversidad genética de esta especie, ya que es el primero realizado en el país y en Centroamérica con la finalidad de clasificar y determinar la variedad genética de los aislamientos locales de *H. capsulatum*.

Los aislados del hongo procedían de dos centros hospitalarios de Tegucigalpa, capital de Honduras. Estos centros fueron escogidos por ser estos donde se remiten pacientes de todo el país con cuadros respiratorios graves, además de manejar pacientes enfermos de VIH-SIDA, entidad clínica estrechamente relacionada con histoplasmosis. A pesar de que los cultivos utilizados fueron anonimizados, gracias a la información presente en la boleta de solicitud de exámenes laboratoriales, se pudo observar que todas las muestras provenían de sangre, biopsia de ganglios, líquido cefalorraquídeo, orina e incluso heces. Estos datos son importantes porque de ello se deduce que la forma clínica de histoplasmosis que predomina en los pacientes en este estudio es la histoplasmosis diseminada, lo cual concuerda con informes de algunos autores sobre la relación de la histoplasmosis diseminada con pacientes inmunosuprimidos (Cruz, Opazo et al. 2006; Kauffman 2007) (Chang, Taira et al. 2007) .

La variabilidad genética es el componente más básico de la biodiversidad. Esa variabilidad en los genomas de los organismos son las aquellas que se heredan y son propias de todos los organismos, en individuos de una población y entre poblaciones de una especie (Piñero 2008). La variabilidad genética en organismos vivientes se origina por las mutaciones. Las mutaciones son las responsables de toda la variación fenotípica que observable en la naturaleza, por ende están a la base de los procesos evolutivos. Por las mutaciones se han originado nuevos genes, lo que produce cambios en los organismos que son heredados a la progenie y que por selección natural se fijan o se desechan. Las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente o por resultado de exposición a agentes externos como la radiación o agentes químicos. Estas mutaciones pueden resultar del reemplazo, eliminación (delección) o inserción de una sola base, o bien de segmentos más grandes del genoma de un organismo, lo cual conduce a grandes cambios en el material genético.

Dentro de los hongos patógenos para el ser humano, en el que más se han realizado estudios de variabilidad genética es *H. capsulatum*, en el cual se han investigado polimorfismos cromosómicos, diversidad genética, relaciones de filogenia y filogeografía (Piñero 2008). En Latinoamérica también se han realizado algunos estudios dirigidos a investigar la variabilidad genética de *H. capsulatum*. Dichos estudios han demostrado variabilidad aun cuando se comparan aislados del ambiente en una misma región geográfica (Canteros, Hiachini et al. 2005). Los estudios de Romero y colaboradores,

dirigidos a investigar la variabilidad cromosómica de *H. capsulatum* sugieren que esta variabilidad sea debida en parte a re-arreglos del ADN que involucran fragmentos de los cromosomas que son traslocados, duplicados o eliminados por diferentes procesos (Romero-Martinez, Canteros et al. 2004).

El presente estudio filogenético realizado en 26 aislados de *H. capsulatum* a partir de pacientes cuya micosis fue adquirida en territorio hondureño, demostró que los aislados son genéticamente variables para los siete *loci* analizados. Los resultados demostraron que las secuencias de regiones conservadas en los genes *Ole*, *Hanti*, *tub* y la región ITS, produjeron de 8 a 13 “*clusters*” filogenéticos, con índices de *bootstrap* entre 62 y 99 en la mayoría de los “*clusters*”. Tales grupos se repetían con mucha similitud usando 2 diferentes algoritmos: *Neighbor Joining* y UPGMA. Esta reproducibilidad en la organización de los “*clusters*” de secuencias en árboles semejantes utilizando dos algoritmos diferentes valida los resultados en cuanto a la macro estructura de esos árboles.

En los arboles filogenéticos de genes conservados *ole*, *Hanti* y *tub* se observan varios “*clusters*” de grupos fuertemente relacionados. Uno de ellos lo conforman las secuencias Hn4, Hn5, Hn15, Hn16, Hn22, Hn23 y Hn26. Otro grupo compuesto por tres secuencias que aparecen siempre juntas en los mismos genes lo conforman las secuencias Hn2, Hn12 y Hn25, por lo que podríamos deducir que estas secuencias son filogenéticamente más cercanas. Además se observa otro grupo filogenéticamente muy cercano que incluye las

secuencias H10 y H13, estas secuencias se agrupan de manera semejante en los árboles generados por los cuatro genes *ole*, *arf*, *Hanti* y *tub*. La mayoría de estos “clusters” tiene un índice de *Bootstrap* mayor que 70, lo que sugiere una probabilidad mayor de 95% de haber encontrado la filogenia más parecida a la realidad (Baxevanis et al and 2006).

El árbol construido a partir de las secuencias del gen *arf* mediante el algoritmo UPGMA, revela mayor dispersión en el agrupamiento de los individuos. Con este algoritmo se observó que las mismas secuencias que en otros genes se encontraban agrupadas, por el gen *arf* no formaron grupos, sin embargo estas secuencias permanecían cercanas, lo que indica que estos individuos sí están filogenéticamente relacionados. Otra posible causa de esta dispersión pudo ser la imposibilidad técnica de obtener 10 de las secuencias para este gen, lo que pudo haber influido para producir un árbol donde las secuencias no se relacionaban de la misma manera que con otros genes en los que no hubo tanta pérdida de secuencias. Las secuencias Hn3 y Hn9 aparecen muy relacionadas en el 50% de los algoritmos y en caso de no aparecer en una misma rama, aparecen cercanas.

Se encuentran algunas secuencias que están siempre separadas del resto de los “clusters” sin conformar ningún grupo, estas son las secuencias Hn6, Hn7, Hn8 y Hn18. Podríamos decir que cada una de estas son diferentes y no tienen una relación tan cercana como aquella de los aislados que sí se encuentran repetidamente agrupados. Algunas secuencias como Hn9, Hn1 y Hn14 aparecen de diversas formas según el gen analizado. Estas están

irregularmente distribuidas y no aparecen en un solo grupo o separadas de manera definida.

En relación a la distribución filogenética de las regiones variables del genoma 604U y 642U (Carter, Burt et al. 1996), se observa una distribución de las secuencias diferente a la reflejada en los árboles que utilizan genes conservados, sin embargo el número de “clusters” conformados es similar (entre 7 y 11 grupos). Las regiones no codificantes 604 y 642 fueron utilizadas por Carter y colaboradores con el fin de detectar la identidad genética de individuos o grupos geográficos de *H. capsulatum*. Los autores utilizaron la técnica de PCR-RFLP para poner en evidencia sitios polimórficos dentro de los amplicones generados por cebadores específicos para el hongo. Como resultado de ello se obtuvieron bandas únicas polimórficas analizadas posteriormente por digestión con enzimas de restricción o en búsqueda de inserciones y/o deleciones (*indels*). Esta técnica fue aplicada a aislados de la región Norteamericana de Indianápolis, en las cuales se evidenció un solo alelo por *locus* para cada aislamiento. Los autores infieren la haploidía del hongo a partir de este resultado. El dato más relevante de este experimento fue que ninguno de los aislamientos analizados presentó el mismo genotipo general, incluso cuando los hongos hubiesen sido colectados durante el mismo año en la misma región geográfica. Un resultado semejante se puede derivar de nuestro estudio, que a pesar de haber utilizado secuenciación y no PCR-RFLP, refleja que ninguno de los aislamientos analizados muestra genotipo idéntico a otro. En consecuencia, este tipo de marcador podría ser tan útil para la caracterización genética de *Histoplasma* como la secuenciación de genes conservados, con la ventaja añadida de que la restricción de amplicones se

puede llevar a cabo en Honduras. La desventaja de dicha técnica es que es menos informativa que la secuenciación, ya que solamente pone de manifiesto polimorfismos en las dianas de las enzimas de restricción.

Otra observación interesante del trabajo de Carter y colaboradores (Carter, Burt et al. 1996) es la inexistente correlación entre las frecuencias alélicas de aislados de pacientes inmunocompetentes y aquellos de pacientes VIH-SIDA, lo que indica que la población de hongos no se subdivide respecto al estatus inmune del paciente de quien se aisló. Igualmente, se observó en nuestro estudio que no hay relación en cuanto a la agrupación de secuencias y la infección con VIH-SIDA en los pacientes infectados con el hongo. Con esta información no podríamos inferir que exista un genotipo(s) del hongo que esté vinculado particularmente a pacientes inmunosuprimidos, en parte porque no se cuenta con la información correspondiente a algunos pacientes y por otra porque las secuencias de los aislados provenientes de pacientes con VIH-SIDA se encuentran distribuidas aleatoriamente en varios “*clusters*”.

A pesar de que este tipo de marcador molecular (de secuencias no codificantes) fue incorporado a nuestro estudio con el objeto de detectar mayor diversidad genética que los genes conservados, los resultados no arrojaron diferencias significativas con los hallazgos entre estas regiones y los genes conservados analizados. En consecuencia la variabilidad genética detectada fue similar entre genes conservados y no conservados.

Al comparar las secuencias de aislados de Honduras con las existentes en el banco de datos de GenBank provenientes de otros países, encontramos que las secuencias de los aislados de Honduras se ubican más cercanamente a secuencias del hongo de origen brasileño y mexicano. Esta observación fue más clara en los genes *Ole*, *Arf*, *Hanti* y *tub*, pues en el análisis de la región ITS se formó un grupo monofilético que agrupaba todos los aislados de Honduras en contraposición a un grupo que incluía las secuencias de los aislados de otros países. Para fines de clasificación, los resultados obtenidos en esta región intergénica no son congruentes con los obtenidos por Jiang y colaboradores (Jiang, Bartlett et al. 2000), quien utilizó esta región para tipificar aislados de *H. capsulatum* obteniendo no solo variabilidad genética, sino que también logró clasificar aislados de diferentes estados de Norte América al comparar aislados de Indiana y otros Estados con secuencias ya caracterizadas de Norte América como la cepa Down y la Norte América 2. Otros autores han utilizado la región ITS como blanco para análisis filogenéticos porque estas regiones generalmente muestran variación de secuencias intra-especies, sin embargo en los estudios de Henry y colaboradores tuvieron éxito para identificar especies de *Aspergillus* y otros contaminantes del ambiente, pero no para individualizar aislados de una misma especie (Henry, Iwen et al. 2000) .

Entre los primeros estudios de clasificación de *H. capsulatum* por métodos diferentes a los tradicionales, basados en morfología, se destaca el de Vincent (Vincent, Goewert et al. 1986), quien clasificó en 3 grupos a aislamientos que procedían de Norte América, África, Centro y Sur América. A pesar de no tener aislados representantes de Honduras en esa época, los aislados de Centro y Sur América se incluyeron en la clase 3. Vincent y

colaboradores utilizaron la comparación de fragmentos de ADN obtenidos por enzimas de restricción. Años después otro estudio que incluyó mayor número de aislados con otros sitios de procedencia permitió ampliar la clasificación anterior ya que surgieron 2 clases más. La técnica utilizada fue también RFLP usando el gen *yps3* (Keath, Kobayashi et al. 1992). En el estudio de Keath, las pocas secuencias representantes de Centroamérica pasaron a formar la clase 5, subclase 5d. Dado que el gen *yps3* no fue abordado en este trabajo no es posible proponer la inserción de las nuevas secuencias hondureñas dentro de esta clasificación.

Para ubicar los aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos en este estudio, hemos utilizado el estudio de filogeografía de Kasuga y colaboradores (Kasuga, White et al. 2003), en el cual se determinó la existencia de 7 clases de *H. capsulatum*, ya que metodológicamente es comparable al nuestro. Dentro de estas clases, el grupo mayor lo conformó la clase Latinoamérica A (LAm A) y otro más reducido formó la clase Latinoamérica B (LAm B). El primero, con gran diversidad filogenética, incluyó aislamientos de México, Guatemala, Panamá, Colombia y Brasil. La clase LAm B solamente agrupaba secuencias de aislados de Argentina y Medellín, Colombia. El hecho de que los aislados de Honduras se encuentren filogenéticamente más cercanos a secuencias de México y Brasil, sugiere fuertemente que las cepas de Honduras podrían ser ubicadas en la clase LAm A.

Con respecto a la metodología utilizada para determinar la variabilidad y la clasificación filogenética de *H. capsulatum* a nivel molecular se observa que durante las décadas 80s y 90s del siglo XX, se utilizó repetidamente la técnica de RFLP y análisis del ADN mediante la técnica de *Southern blot*. Estas técnicas dieron a conocer que existen diferencias en los tamaños de los fragmentos que se forman por cortes de enzimas de restricción en el genoma de un microorganismo. Esta técnica, sin embargo tiene la desventaja de ser poco sensible ya que no permite distinguir fácilmente aislamientos individuales y por otro lado el ADN extraído debe ser obtenido en grandes concentraciones y tener alto grado de pureza, de lo contrario las endonucleasas utilizadas pudieran funcionar ineficientemente (Taylor, Chavez-Tapia et al. 2000).

La técnica de polimorfismos del ADN amplificado al azar por PCR (RAPD-PCR), es otra técnica que ha sido muy utilizada (Kersulyte, Woods et al. 1992; Poonwan, Imai et al. 1998; Reyes-Montes, Bobadilla-Del Valle et al. 1999; Muniz, Pizzini et al. 2001) para analizar la diversidad genética de *Histoplasma*. RAPD ha demostrado alta capacidad de poner de manifiesto la diversidad genética del hongo y es de relativo fácil manejo para agrupar cepas del hongo. En esta técnica se amplifican por PCR blancos aleatorios inespecíficos y posteriormente se visualizan en una corrida electroforética en gel de agarosa. En el estudio de Karimi y colaboradores se agruparon 20 aislamientos del hongo en 18 tipos de acuerdo a su huella genética (Karimi, Wheat et al. 2002), demostrando la alta sensibilidad de la técnica para diferenciar entre genotipos. Kersulyte informa también de una técnica RAPD capaz de revelar diferencias individuales dentro de una misma clase de hongos agrupados por RFLP (Kersulyte, Woods et al. 1992). Por el contrario, el

estudio de Poonwan y colaboradores en Tailandia, reflejó que con ninguno de los cebadores de RAPD utilizados fueron capaces de establecer patrones claramente diferenciados entre los 13 individuos estudiados (Poonwan, Imai et al. 1998). Dado que nuestro estudio está basado en el análisis de secuencias de siete marcadores moleculares, y no en el uso de secuencias arbitrarias para la generación de huellas genéticas, nos es imposible comparar estos dos enfoques metodológicos; sin embargo podemos asegurar que el análisis de secuencias presenta la ventaja de evaluar con certeza y reproducibilidad determinadas posiciones dentro de genes significativos para la fisiología del microorganismo, en cambio RAPD se caracteriza por su baja reproducibilidad intra-laboratorial en los perfiles moleculares que genera y su robustez deja un margen de duda al momento de interpretar un gel. En consecuencia nos parece que la estrategia de secuenciación es más adecuada para los fines de evaluar la diversidad genética de este o de cualesquiera otros microorganismos.

Una limitante en este estudio corresponde a la falta de información epidemiológica sobre los pacientes de quienes fue aislado *H. capsulatum*. El corto tiempo de muestreo fue el factor principal para poder acceder al expediente de estos pacientes, ya que esto implicaba solicitar consentimiento informado y someter el estudio al comité de ética de los dos hospitales donde se nos proporcionaron los aislamientos. Datos importantes como la procedencia de los pacientes nos impide relacionar estadísticamente los grupos genéticos con la ubicación geográfica de los mismos. Estudios posteriores con mayor número de muestras y datos epidemiológicos podrían dilucidar esta incógnita.

La relación de los aislados de Honduras con dos países tan lejanos entre sí como lo son México y Brasil hace pensar que la amplia distribución de estas secuencias se deba principalmente a que esporas de *H. capsulatum* sean dispersadas por murciélagos migratorios que pueden recorrer distancias cercanas a los 2,000 Km, impulsados por factores de reproducción y disponibilidad de alimento. Un ejemplo de esta clase de murciélagos es la especie *Tadarida brasiliensis mexicana*, con una área de distribución desde el centro y sur de Estados Unidos hasta la parte sur de Brasil y norte de Argentina (Franco 2001). Podría ser que esta y otras especies migratorias sean responsables de la dispersión del hongo por casi toda América. Por esta razón sería interesante realizar estudios que pretendan aislar el hongo en cuestión a partir de los nichos ecológicos donde habitan los murciélagos para establecer la relación existente entre *Histoplasma capsulatum* y diversas especies de murciélagos, así como la distribución geográfica natural del hongo en Honduras.

## CAPITULO 6:

### 1. CONCLUSIONES

- 1.1. El presente trabajo de investigación demostró que en 26 aislados de *H. capsulatum* procedentes de Honduras existe variación genética detectable mediante secuenciación de genes y regiones conservadas. De acuerdo a lo revelado mediante dos algoritmos matemáticos los aislados hondureños se agrupan en 8 a 13 “*clusters*”.
- 1.2. Existen en estos aislados tres grupos estrechamente relacionados. Estos grupos están formados por los aislados: A) Hn10 y Hn13; (B) Hn4, Hn5, Hn15, Hn16, Hn22, Hn23, Hn26; y (C) Hn2, Hn12 y Hn25. La mayoría de ellos con *bootstrap* mayor de 60.
- 1.3. Los hallazgos de los árboles filogenéticos donde se relacionan las secuencias de los aislados de Honduras con las secuencias depositadas en el GenBank de diferentes países del mundo sugieren fuertemente que las cepas de Honduras se encuentran dentro de la clase LAm A (Latinoamérica A) de acuerdo a la clasificación hecha por Kasuga y colaboradores en el 2003.
- 1.4. Además de ser el primer reporte de diversidad genética de *H. capsulatum* en Honduras y Centroamérica, el presente estudio tiene como uno de sus aportes más importantes haber generado secuencias de los aislados

de Honduras quedando depositadas en el GenBank, las cuales podrán ser utilizadas como referencia para posteriores trabajos de investigación.

## **CAPITULO 7:**

### **1. RECOMENDACIONES**

- 1.1. Se recomienda continuar estudios dirigidos al aislamiento de *H. capsulatum* en murciélagos y su posterior genotipificación para establecer la relación que pueda existir entre estos y los aislados de humanos.
- 1.2. Se sugiere que la histoplasmosis sea una enfermedad de notificación obligatoria en Honduras, para que por la Secretaría de Salud se tenga acceso a información necesaria en estudios de investigación ya que actualmente no se tienen datos de morbilidad, mortalidad y prevalencia de histoplasmosis en el país.
- 1.3. Se recomienda continuar estudios de genotipificación en otros géneros de hongos que tengan impacto en salud pública para poder brindar aportes a la epidemiología molecular de infecciones micóticas.
- 1.4. Se recomienda realizar estudios epidemiológicos, dirigidos a investigar la procedencia de los pacientes infectados con *Histoplasma* para hacer la correlación geográfica pertinente y determinar los sitios probables de endemicidad del hongo.

## REFERENCIAS

- Abidi, F. E., H. Roh, et al. (1998). "Identification and characterization of a phase-specific, nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*." Infect Immun **66**(8): 3867-3873.
- Aide, M. A. (2009). "Chapter 4--histoplasmosis." J Bras Pneumol **35**(11): 1145-1151.
- Alvarado, R. (1965). "Resultado del Estudio Epidemiológico de la Histoplasmosis y Coccidioidomicosis realizados en la República de Honduras, C. A. 1962 -1965 " Revista Medica Hondureña.
- Baxevanis et al and (2006). Bioinformatics : a practical guide to the analysis of genes and proteins, Hoboken, N.J. : Wiley, 2006.
- Bialek, R., F. Ernst, et al. (2002). "Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections." Am J Clin Pathol **117**(4): 597-603.
- Canteros, C. E., R. H. Hiachini, et al. (2005). "Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*." Revista Argentina de Microbiologia **37**: 46-56.
- Cardona, V. and E. Aguilar-Paz (1970). "Histoplasmosis en Honduras." Revista Medica Hondureña **38**.
- Carter, D. A., A. Burt, et al. (1997). "A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*." Electrophoresis **18**(7): 1047-1053.
- Carter, D. A., A. Burt, et al. (1996). "Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure." J Clin Microbiol **34**(10): 2577-2584.
- Carter, D. A., J. W. Taylor, et al. (2001). "Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)(n) microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas." Fungal Genet Biol **34**(1): 37-48.
- Castañeda, F. (1973). Estudio Epidemio-ecologico de la Histoplasmosis en Honduras. Microbiologia. Tegucigalpa, Universidad Nacional Autonoma de Honduras. **Bs**: 50.

- Colella, M. T., M. Sofía, et al. (2007). "Identificación de *Histoplasma capsulatum* en muestras clínicas mediante la técnica de PCR en dos rondas." Kasmera **35**: 156-163.
- Cruz, R., H. Opazo, et al. (2006). "Reporte clínico: Histoplasmosis diseminada aloctona en un paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida." Boletín Micológico **21**: 77-84.
- Cruz, R., H. Opazo, et al. (2006). "Reporte clínico: Histoplasmosis diseminada aloctona en un paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida." Boletín Micológico **21**: 77-84.
- Chamany, S., S. A. Mirza, et al. (2004). "A Large Histoplasmosis Outbreak Among High School Students in Indiana, 2001." The Pediatric Infectious Disease Journal **23**: 909-914.
- Chang, M. R., C. L. Taira, et al. (2007). "STUDY OF 30 CASES OF HISTOPLASMOSIS OBSERVED IN MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **49**: 37-39.
- Chávez Tapia, C. B. V. Y., Rodrigo; Rodríguez Arellanes, Gabriela; Peña Sandoval, Gabriela R; Flores Estrada, José Javier; Reyes Montes, María del Rocío; Taylor, Maria Lucia (1998). "Bats as reservoirs and responsible of histoplasma capsulatum spreading in nature." Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias **11(3):187-91, jul.-sept. 1998.** (3): 187-191.
- Deepe, G. S., Jr. and G. G. Durose (1995). "Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*." Infect Immun **63(8)**: 3151-3157.
- Duron, R. (1966). "Primer caso de Histoplasmosis informado en Honduras." Revista Medica Hondureña **34**.
- Duron, R. A. and J. Castro (1968). "Histoplasmosis " Revista Medica Hondureña **36**.
- Eissenberg, L. G., W. E. Goldman, et al. (1993). "*Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes." J Exp Med **177(6)**: 1605-1611.
- Eissenberg, L. G., J. L. West, et al. (1991). "Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cells by *Histoplasma capsulatum*: selection of avirulent variants and their potential role in persistent histoplasmosis." Infect Immun **59(5)**: 1639-1646.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap." Evolution **39**: 783-791.

- Fischer, G. B., H. Mocelin, et al. (2009). "Histoplasmosis in children." Paediatr Respir Rev **10**(4): 172-177.
- Flor, A., D. Estivills, et al. (2003). "[Acute pulmonary histoplasmosis in a Spanish traveller to Nicaragua: an imported disease case]." Rev Iberoam Micol **20**(1): 24-28.
- Franco, M. L. (2001). Propuesta de un programa de educación ambiental formal para la conservación de murciélagos. Facultad de Ciencias. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Biología**: 105.
- Fukazawa, Y., A. Cassone, et al. (1994). "Mechanisms of cell-mediated immunity in fungal infection." J Med Vet Mycol **32 Suppl 1**: 123-131.
- Gargano, S., G. Di Lallo, et al. (1995). "A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene." Lipids **30**(10): 899-906.
- Gaur, P. K., R. W. Lichtwardt, et al. (1981). "Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*." Experimental Mycology **5**(1): 69-77.
- Guarro, J., GeneJ, et al. (1999). "Developments in fungal taxonomy." Clin Microbiol Rev **12**(3): 454-500.
- Gutierrez, M. E., A. Canton, et al. (2005). "Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases." Clin Infect Dis **40**(8): 1199-1202.
- Hajjeh, R. A. (1995). "Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus." Clin Infect Dis **21 Suppl 1**: S108-110.
- Harris, G. S., E. J. Keath, et al. (1989). "Characterization of alpha and beta tubulin genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*." J Gen Microbiol **135**(7): 1817-1832.
- Heninger, E., L. H. Hogan, et al. (2006). "Characterization of the *Histoplasma capsulatum* - induced granuloma." J Immunol **177**: 3303-3313.
- Henry, T., P. C. Iwen, et al. (2000). "Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2." J Clin Microbiol **38**(4): 1510-1515.
- Hernandez, F. (2008). "La Biología Molecular en el diagnostico micológico en México." Gac Med Mex **144**.
- Holbrook, E. D. and C. A. Rappleye (2008). "*Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch." Curr Opin Microbiol **11**(4): 318-324.

- Huber, F., M. Nacher, et al. (2008). "AIDS-related *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection: 25 years experience of French Guiana." *AIDS* **22**(9): 1047-1053.
- Jeong, H. W., J. W. Sohn, et al. (2007). "Disseminated histoplasmosis and tuberculosis in a patient with HIV infection." *Yonsei Med J* **48**(3): 531-534.
- Jiang, B., M. S. Bartlett, et al. (2000). "Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes." *J Clin Microbiol* **38**(1): 241-245.
- Karimi, K., L. J. Wheat, et al. (2002). "Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil." *J Infect Dis* **186**(11): 1655-1660.
- Kasuga, T., J. W. Taylor, et al. (1999). "Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling." *J Clin Microbiol* **37**(3): 653-663.
- Kasuga, T., T. J. White, et al. (2003). "Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*." *Mol Ecol* **12**(12): 3383-3401.
- Kauffman, C. A. (2007). "Histoplasmosis: a clinical and laboratory update." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 115-132.
- Keath, E. J., G. S. Kobayashi, et al. (1992). "Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene." *J Clin Microbiol* **30**(8): 2104-2107.
- Kersulyte, D., J. P. Woods, et al. (1992). "Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers." *J Bacteriol* **174**(22): 7075-7079.
- Kimura, M. (1980). "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Klein, B. S. and B. Tebbets (2007). "Dimorphism and virulence in fungi." *Curr Opin Microbiol* **10**(4): 314-319.
- Kunogi, M., A. Tamura, et al. (2009). "[Pulmonary histoplasmosis diagnosed by transbronchial lung biopsy]." *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* **47**(11): 1008-1014.

- Lenhart, S. W. (1994). "Recommendations for Protecting Workers From *Histoplasma capsulatum* Exposure During Bat Guano Removal from a Church's Attic." Applied Occupational and Environmental Hygiene **9**(4): 230-236.
- Lenhart, S. W., M. P. Schafer, et al. (2004). "Histoplasmosis Protecting Workers at Risk".
- Lodge, J. K., R. L. Johnson, et al. (1994). "Comparison of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferases from three pathogenic fungi: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Candida albicans*." J Biol Chem **269**(4): 2996-3009.
- Lopez, C. E. (2006). "[Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*]." Rev Argent Microbiol **38**(4): 235-242.
- Maniscalchi, M. and L. Espinoza (2006). "Mecanismos de evasión de *Histoplasma capsulatum* en los fagocitos." Rev. Soc. Ven. Microbiol. **26**(1): 6-13.
- Maubon, D., S. Simon, et al. (2007). "Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America." Diagn Microbiol Infect Dis **58**(4): 441-444.
- Muniz, M. D., E. S. T. P. Morais, et al. (2010). "Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*." Appl Environ Microbiol.
- Muniz, M. M., C. V. Pizzini, et al. (2001). "Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay." J Clin Microbiol **39**(12): 4487-4494.
- Munoz, C., B. L. Gomez, et al. (2010). "Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America." Clin Vaccine Immunol **17**(1): 62-67.
- Negrón, R., A. Robles, et al. (1994). "Histoplasmosis progresiva Estudio en un lapso de 10 años. ." Rev Argent Micología **17**: 14-21.
- Newman, S. L., L. Gootee, et al. (1994). "Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis." J Clin Invest **93**(4): 1422-1429.
- Newman, S. L., L. Gootee, et al. (2000). "Identification of constituents of human neutrophil azurophil granules that mediate fungistasis against *Histoplasma capsulatum*." Infect Immun **68**(10): 5668-5672.

Nygaard, K., A. Brantsaeter, et al. (2006). "[Histoplasmosis among travellers to Central America]." Tidsskr Nor Laegeforen **126**(21): 2838-2842.

Pfaller, M. and D. Diekema (2010). "Epidemiology of invasive mycosis in North America." Critical Review of Microbiology **36**.

Piñero, D. e. a. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Capital Natural de Mexico. CONABIO. Mexico, D.F. **I: Conocimiento actual de la biodiversidad:** 437-494.

Poonwan, N., T. Imai, et al. (1998). "Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method." J Clin Microbiol **36**(10): 3073-3076.

Regueiro, J. R., C. Lopez, et al. (2002). Inmunologia Biologia y patologia del sistema inmune. Madrid, Medica Panamericana.

Reyes-Montes, M. A., M. L. Taylor, et al. (2000). "Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: una revisión de los hallazgos." Revista Iberoamericana de Micología **17**: 121-126.

Reyes-Montes, M. R., M. Bobadilla-Del Valle, et al. (1999). "Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns." J Clin Microbiol **37**(5): 1404-1408.

Richmond, J. Y., R. W. McKinney, et al. (2009). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Washington, D.C., U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention.

Rippon, J. W. (1988). Medical mycology : the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia, Saunders.

Romero-Martinez, R., C. Canteros, et al. (2004). "[Intraspecific chromosomal variability in human pathogenic fungi, especially in *Histoplasma capsulatum*]." Rev Iberoam Micol **21**(4): 168-176.

Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-425.

Sakamoto, K., M. Kase, et al. (1999). "[Pulmonary histoplasmosis exhibiting solitary pulmonary nodule resected by thoracoscopic surgery: a case report and review of the Japanese literature]." Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi **37**(11): 909-914.

Salas-Rios, M. A., M. d. R. R. Montes, et al. (1998). "Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción." Rev Inst Nal Enf Resp Mex **11**.

Simon, S., V. Veron, et al. (2010). "Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction." Diagn Microbiol Infect Dis **66**(3): 268-273.

Sneath, P. H. A. a. S. R. R., Ed. (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco. , Freeman,

Spitzer, E., B. Lasker, et al. (1989). "Use of Mitochondrial and Ribosomal DNA Polymorphisms To Classify Clinical and Soil Isolates of *Histoplasma capsulatum*." INFECTION AND IMMUNITY **57**(5): 1409-1412.

Spitzer, E. D., E. J. Keath, et al. (1990). "Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome." J Infect Dis **162**(1): 258-261.

Tamura K, P. D., Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution (submitted).".

Tamura K., N. M., and Kumar S. (2004). "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method." Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). **101**: 11030-11035.

Tamura K., P. D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." Molecular Biology and Evolution (In Press).

Taylor, M. L., C. B. Chavez-Tapia, et al. (2000). "Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico." Fungal Genet Biol **30**(3): 207-212.

- Taylor, M. L., C. B. Chavez-Tapia, et al. (2005). "Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico." FEMS Immunol Med Microbiol **45**(3): 451-458.
- Taylor, M. L., C. B. Chavez-Tapia, et al. (1999). "Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters." Am J Trop Med Hyg **61**(6): 914-919.
- Tian, X. and G. Shearer, Jr. (2001). "Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*." Gene **275**(1): 107-114.
- Toranzo, A. I., I. N. Tiraboschi, et al. (2009). "[Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples]." Rev Argent Microbiol **41**(1): 20-26.
- Torres-Rodriguez, J. M., A. d. Palacio-Hernandez, et al. (1993). Micologia Medica.
- Torres-Rodriguez, J. M., E. Ribas-Forcadell, et al. (1999). "[Diagnostic value of intradermoreaction with histoplasmin in non-endemic areas of histoplasmosis]." Med Clin (Barc) **113**(1): 37-38.
- Torres-Rodriguez, J. M., E. Ribas-Forcadell, et al. (2000). "[Diagnostic usefulness of the intradermal test with histoplasmin in non-endemic areas of histoplasmosis]." Rev Iberoam Micol **17**(3): 97-101.
- Untereiner, W. A., J. A. Scott, et al. (2004). "The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales." The Mycological Society of America, Lawrence.
- Vázquez, E. G.-., M. Velasco, et al. (2005). "Infección por *Histoplasma capsulatum* en un grupo de cooperantes en Guatemala." Enferm Infecc Microbiol Clin **23**: 274-276.
- Vincent, R. D., R. Goewert, et al. (1986). "Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms." J Bacteriol **165**(3): 813-818.
- Woods, J. P. (2002). "*Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment." Fungal Genet Biol **35**(2): 81-97.
- Woods, J. P., D. Kersulyte, et al. (1993). "Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies." J Clin Microbiol **31**(2): 463-464.
- Zuiani, M. F., M. C. Rivas, et al. (2006). "[*Histoplasma capsulatum* with aberrant morphology isolated in Argentina]." Rev Argent Microbiol **38**(2): 79-83.

## ANEXOS