



**Estandarización de una PCR en tiempo real para evaluar la expresión de genes
implicados en la diferenciación de células estromales mesenquimales infectadas
con *Histoplasma capsulatum***

Tatiana Tamayo González

Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogos y Bioanalistas otorgado por la
Universidad de Antioquia

Asesores

Ángel González

Carolina Rodríguez Echeverri

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia

2022

Estandarización de una PCR en tiempo real para evaluar la expresión de genes implicados en la diferenciación de células estromales mesenquimales infectadas con *Histoplasma capsulatum*

Tatiana Tamayo González¹, Carolina Rodríguez Echeverri², Ángel González^{1,*}

¹Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; ²Estudiante de pregrado en Microbiología y Bioanálisis, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Palabras clave: células madre mesenquimales, *Histoplasma capsulatum*, adipogénesis, osteogénesis, diferenciación celular, PCR en tiempo real

Resumen

Las células estromales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) son cada vez más utilizadas en la terapia regenerativa por su potencial de diferenciación a diferentes linajes celulares. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR en tiempo real para determinar si la infección, *in vitro*, con levaduras de *Histoplasma capsulatum* afecta el proceso de diferenciación de las MSCs, a través de la evaluación de la expresión de

genes asociado con la diferenciación a adipocitos (genes que codifican para adiponectina y lipoproteinlipasa) y osteocitos (genes que codifican para la proteína factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) y osteocalcina). Las MSCs fueron cultivadas en medios de cultivo especiales que contenían cocteles de moléculas que inducen la diferenciación hacia linaje adipogénico y osteogénico, e incubadas a tres tiempos diferentes (0, 2 y 4 semanas), para luego ser infectadas con levaduras de *Histoplasma capsulatum* e incubadas nuevamente por 24 horas, para después realizar una extracción del RNA por el método fenol cloroformo y, finalmente realizar una PCR en tiempo real (qPCR). Para la qPCR se utilizaron cinco pares de primers, uno para cada gen a evaluar y otro para el gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo o normalizador. Al analizar los datos arrojados por la PCR se pudo observar que la expresión relativa de genes asociados al proceso de adipogénesis disminuyó significativamente cuando las MSCs se infectaron con las levaduras del hongo, por el contrario, los genes asociados al proceso de osteogénesis aumentaron su expresión cuando estas fueron infectadas. Los anteriores resultados permiten concluir que *H. capsulatum* afecta el proceso de diferenciación de las células estromales mesenquimales hacia los linajes adipogénicos y osteogénicos. Mas estudios son necesarios para evaluar las implicaciones de estos hallazgos.

Introducción

La histoplasmosis es una micosis sistémica y endémica de gran importancia a nivel mundial, que afecta tanto individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos, y en el caso de pacientes con infección avanzada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)/sida, se comporta como infección oportunista y se asocia como marcador de estado sida. Esta infección se ha visto incrementada, el número de casos, en todos los continentes¹.

H. capsulatum es un hongo dimórfico térmico que a temperaturas inferiores a 35 °C crece como hongo filamentoso, mientras que en los tejidos del hospedero y en medios de cultivo enriquecidos a una temperatura de 37 °C crece en su forma levaduriforme². Dentro de las especies causantes de histoplasmosis se han descrito 4 especies pertenecientes al Complejo *H. capsulatum*: *Histoplasma capsulatum sensu stricto*, *H. mississippiense*, *H. ohiense* e *Histoplasma suramericanum*³. *Histoplasma* se encuentra principalmente en suelos ricos en nitrógeno y fosfatos asociado al guano de murciélago y las excretas de aves². La infección por *H. capsulatum* se da por la inhalación de microconidios y fragmentos de hifas, que una vez dentro del hospedero se transforman a su forma levaduriforme².

En América del Norte, las áreas de mayor endemidad se encuentran dentro de los valles de los ríos Mississippi y Ohio, en los Estados Unidos. En las áreas que rodean estos ríos se considera que la incidencia de esta infección es de 6,1 por cada 100000 habitantes. En América Latina se encuentran países altamente endémicos, los cuales incluyen Brasil, Guyana Francesa, Argentina, Colombia, Venezuela, Guatemala y Panamá; en Brasil se han realizado estudios seroepidemiológicos que han demostrado que hasta el 90% de la

población ha estado expuesta a *H. capsulatum*. En América del sur, con la epidemia del sida, se incrementó el número de casos de la forma diseminada de la enfermedad⁴.

En general, las infecciones por *H. capsulatum* cursan de manera asintomática, pero del 5 al 10% de los infectados presentan sintomatología variable que depende tres factores importantes, que son: i) el número de conidios inhalados, ii) la virulencia de la cepa infectante y iii) el estado inmunológico del hospedero. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la histoplasmosis pulmonar aguda, la forma pulmonar crónica y la histoplasmosis progresiva diseminada. También pueden presentarse otras formas menos frecuentes como la histoplasmosis cutánea primaria y el histoplasmomoma⁵. La forma pulmonar aguda es indistinguible de un resfriado común y se considera de curso benigno cuando afecta a individuos inmunocompetentes; la forma pulmonar crónica es más común en varones adultos que están entre la tercera y cuarta década de la vida, y que habitan áreas endémicas². La forma diseminada progresiva se presenta inicialmente como una infección pulmonar aguda que se disemina rápidamente a varios órganos, principalmente a hígado, bazo, el tracto gastrointestinal y la médula ósea; la propagación a estos sitios ocurre entre el 33 al 66 % de los casos, y en su mayoría la muerte ocurre debido a fallo respiratorio, hemorragia digestiva, coagulación intravascular diseminada o sepsis bacteriana⁶. Es propia de personas inmunocomprometidas y sujetos en los extremos de la vida; pero las formas más graves de la enfermedad se dan en personas con patologías inmunosupresoras de base como el VIH en fase sida⁶. Los resultados de laboratorio pueden incluir anemia (90 %), leucopenia y trombocitopenia (80 %) como signos de deterioro de la función de la médula ósea⁶

La pancitopenia es una manifestación importante en pacientes con histoplasmosis diseminada, lo cual conduce en algunos casos a coagulopatía, lo que conlleva a una alta mortalidad, lo que sugiere que *H. capsulatum* causa alteraciones en la médula ósea y su producción celular.

En médula ósea podemos encontrar dos poblaciones celulares importantes, las células madre hematopoyéticas, que son células multipotentes, encargadas de la renovación de las células sanguíneas y del sistema inmune, y las células estromales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés), que son células multipotentes que participan en la reparación y la regeneración de tejidos, tienen la capacidad de diferenciarse a osteocitos, adipocitos y condrocitos, y otros tejidos; además, *in vitro*, se adhieren al plástico y fenotípicamente expresan marcadores de membrana como CD29, CD73, CD90 y CD105, mientras que son negativas para marcadores como CD14, CD34 y CD45⁷.

Las MSCs, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune, a través de la secreción de factores tróficos y pueden migrar selectivamente a áreas del cuerpo que se encuentran lesionadas para regenerar los tejidos y órganos dañados mediante diferentes procesos o funciones que incluyen la angiogénesis, la secreción de metaloproteinasas, matriz extracelular y la diferenciación celular, sus principales fuentes de obtención son la médula ósea, el tejido adiposo, la placenta, y el cordón umbilical⁸.

Algunos estudios han demostrado que las MSC son permisivas para la infección por algunos microorganismos como el citomegalovirus (CMV), el cual altera la función de las MSC de médula ósea, al cambiar la expresión de moléculas en su superficie celular; el CMV modifica el patrón de interacción entre las MSC y células hematopoyéticas, y además afecta el proceso de diferenciación de MSC a linajes adipogénicos y

osteogénicos⁹; otros estudios demostraron que bacterias como *Escherichia coli*, inducen la proliferación y la diferenciación osteogénica, pero reducen la diferenciación adipogénica de estas MSCs¹⁰.

Estudios *in vitro* han permitido demostrar el proceso secuencial de la adipogénesis y la osteogénesis; es así como la diferenciación adipogénica progresa en forma secuencial desde células madre indiferenciadas mesodérmicas, adipoblastos, preadipocitos y finalmente adipocitos maduros. Durante este proceso se han reportado moléculas inductoras de linaje adipogénico, como la Insulina, Isobutilmetilxantina, Indometacina y Dexametasona, las cuales tienen la capacidad de aumentar la expresión de genes asociados al linaje adipocítico¹¹. Por su lado, la diferenciación hacia el linaje osteogénico también se puede inducir con un coctel de moléculas que incluye dexametasona¹², ácido ascórbico¹³ y B-glicerolfosfato¹⁴.

En el presente estudio, se estandarizó una PCR en tiempo real para determinar la expresión de genes asociados con la diferenciación a linaje adipogénico y osteogénico de MSCs infectados o no con *Histoplasma capsulatum*. Se observó que la infección con este hongo patógeno afectó la diferenciación de estas MSCs a adipocitos y osteocitos.

Materiales y métodos

Aislamiento, purificación y cultivo de MSCs

Las células estromales mesenquimales (MSCs) se obtuvieron de médula ósea a partir de fémur y tibia de ratones C57BL/6 de 8 - 12 semanas de edad, mediante lavados con PBS con antibióticos (penicilina –estreptomicina al 1%) utilizando una jeringa con aguja de

calibre 21G. Las células se transfirieron a platos de cultivo de 96 pozos con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bajo en glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales y 100 U/ml Penicilina– 100 µg/ml Estreptomicina, y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ con cambio de medio cada 3-4 días hasta alcanzar una densidad celular del 90 %, las células no adherentes fueron removidas y las adherentes cultivadas por siete días, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente por Rodríguez y colaboradores¹⁵.

Para la purificación de las MSCs se realizó el desprendimiento celular con Tripsina 1X, tomando una alícuota para recuento celular y utilizando un estuche comercial para su purificación [(Cellular Lineage Cell Depletion Kit mouse (Miltenyi Biotec)] que contenía diferentes anticuerpos monoclonales específicos a saber: anti-CD45, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-CD5, anti-Gr1 (Ly-6/C), y anti-Ter-119, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la viabilidad celular por tinción con azul de tripano.

Levaduras de *Histoplasma capsulatum*

En el presente estudio se utilizó la cepa de *H. capsulatum* 1980 (CIB 1980), la cual fue cultivada en medio líquido de Infusión Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en inglés brain-heart infusion) suplementado con 10% de glucosa, 0,1% de L-cistina y 100 U/ml de penicilina – 100 g/ml de estreptomicina e incubada a 37 °C en agitación por 24 horas. Las levaduras se diluyeron con PBS en una dilución de 1:10, de esta se tomaron 10 µl y 990

µl de Janus Green para estimar su viabilidad y posteriormente ser contadas en hemocitómetro y ajustadas al número y volumen deseado.

Infección de las MSCs

Las MSCs previamente cultivadas fueron infectadas con levaduras de *H. capsulatum* a un múltiplo de infección (MOI) de 5 (5 levaduras del hongo por 1 MSC) e incubadas por 24 horas.

Diferenciación osteogénica y adipogénica

Para la inducción de la diferenciación a adipocitos y osteocitos, las células purificadas fueron cultivadas en platos de 96 pozos con 100 µl de medio de diferenciación específico para cada linaje; para adipogénesis, se realizó mediante cultivo en medio inductor consistente en DMEM alto en glucosa 4,5g/L, 1 µM Dexametasona, 0,5 mM Indometacina, 10 µg/ml Insulina, 100 mM 3- isobutil-1-metilxantina y 10% SFB; y para osteogénesis DMEM con 0,1 µM dexametasona, 50 µM ácido ascórbico y 10 mM β-glicerolfosfato. Se realizó cambio de medio cada tres o cuatro días, por un periodo de cuatro semanas.

Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo a partir de cultivos en diferentes tiempos, la monocapa celular se lisó usando 200uL de trizol y se realizaron lavados con 200uL de cloroformo. Además,

las muestras se procesaron utilizando un tratamiento con ADNasa I (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). El cDNA se sintetizó a partir de 500 ng de ARN con un kit comercial de síntesis de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa ((FIREScript® RT cDNA synthesis KIT de SOLIS BIODYNE), según las instrucciones del fabricante.

Estandarización de la PCR en tiempo real y determinación de la expresión de genes asociados a la diferenciación celular.

Se determinó la expresión de genes asociados a la diferenciación a osteocitos y adipocitos. Los genes evaluados fueron: de expresión temprana, Runx2 y LPL; y genes de expresión tardía, Osteocalcina y Adiponectina. Se realizó la estandarización de la PCR en tiempo real, utilizando 4 pares de cebadores que previamente fueron verificados a tres temperaturas y tres concentraciones diferentes mediante PCR convencional, así se determinaron las condiciones de corrida para la PCR en tiempo real.

Secuencias de los cebadores utilizados

GEN	FORWARD	REVERSE
Osteocalcina	GTATGGCTTGAAGACCGC CT	CATCCATACTTGCAGGGCAG A
RUNX2	AAGGTTGTAGCCCTCGGA GA	CCGGCCCACAAATCTCAGAT
Lipoproteinlipasa	TCGCCTTTCTCCTGATGA CG	CCAATGTTGCATCCTGGCTG
Adiponectina	TGACGACACCAAAGGGC TC	TCCAACCTGCACAAGTTCC
GADPDH	CCTTCATTGACCTTCACTA CATGGTCTA	TGGAAGATGGTGATGGCCTT TCCATTG

Se realizó una PCR convencional para determinar las condiciones óptimas de alineación de los cebadores. Se llevó a cabo usando 3 temperaturas de alineamiento diferentes 59 °C, 60 °C y 61 °C y usando también tres concentraciones diferentes de cebadores (0,1, 0,2 y 0,3 µM). Las bandas se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % (2h-60V), y posteriormente fueron teñidas con bromuro de etidio.

La qPCR se realizó utilizando el Máxima SYBR Kit Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) según las instrucciones del fabricante y usando como gen normalizador el GAPDH.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando el software Prisma GraphPad Software (versión 7.0). En todos los casos se consideró un valor significativo con un valor de $P < 0,05$. Se comparó la expresión de cada gen durante los diferentes periodos de tiempo evaluados.

Resultados

Estandarización de la PCR en tiempo real

Se estandarizó un protocolo de PCR en tiempo real utilizando el kit qPCR SOLIS BYODINE y el agente intercalante el SYBRGreen con el sistema CFX96 real-Time System de BIORAD. Las condiciones de estandarización fueron la siguientes: temperatura de inicio de 95°C por 12 minutos, temperatura de desnaturalización 95°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C por 30 segundos, temperatura de extensión 72°C por 30 segundos y una temperatura de elongación final de 70°C. Se utilizó el gen GAPDH como el gen normalizador, se cuantificaron los genes LPL (Fig. 1) y adiponectina (Fig. 2) utilizando el cDNA obtenido de las células sometidas a diferenciación adipogénica, y los genes osteocalcina (Fig. 3) y Runx2 (Fig. 4) con el cDNA extraído de las células sometidas a medio de diferenciación osteogénico.

En todos los casos se logró la detección y amplificación de los genes, pudiendo observarse la disminución de los genes adipogénicos en la semana cuatro y el aumento

de la expresión de los genes osteogénicos en esta misma semana, demostrando así que *H. capsulatum* afecta la diferenciación adipogénica y osteogénica de las MCS

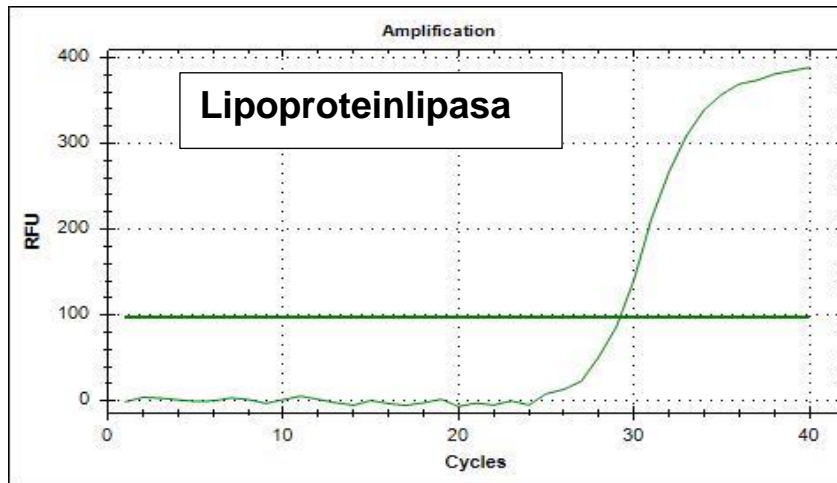


Figura 1. Resultado de la PCR en tiempo real para la detección y amplificación del gen lipoproteinlipasa. Se observa amplificación del gen en el ciclo 29.

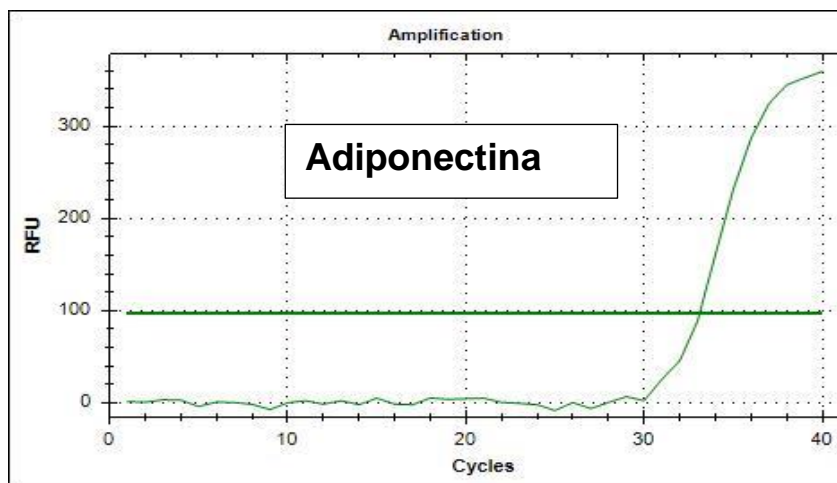


Figura 2. Resultado de la PCR en tiempo real para la detección y amplificación del gen adiponectina. Se observa amplificación del gen en el ciclo 33.

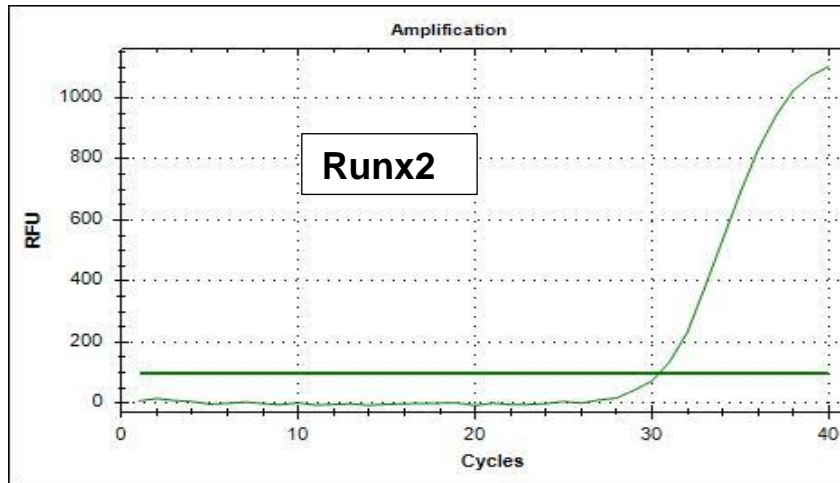


Figura 3. Resultado de la PCR en tiempo real para la detección y amplificación del gen Runx2. Se observa amplificación del gen en el ciclo 31.

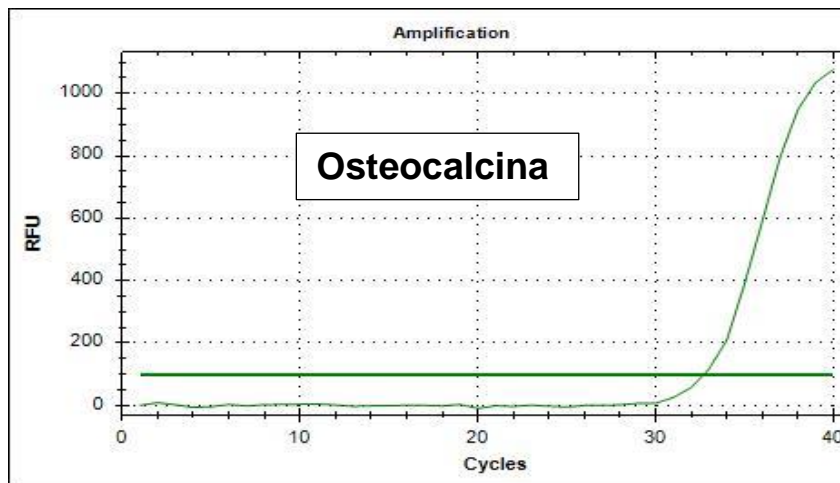


Figura 4. Resultado de la PCR en tiempo real para la detección y amplificación del gen osteocalcina. Se observa amplificación del gen en el ciclo 33.

Efecto de la infección de las MSC con H. capsulatum en la diferenciación adipogénica

Una vez estandarizada la PCR en tiempo real para determinar la expresión de los genes que participan en la expresión de proteínas asociadas con la diferenciación adipogénica, se observó que tanto el gen de expresión temprana (LPL) como el gen de expresión tardía (Adiponectina) se expresaron significativamente a partir de la segunda semana de cultivo (Figs. 5 y 6). Interesantemente, la infección de las MSCs con las levaduras del *H. capsulatum* disminuyó significativamente la expresión de los dos genes tanto en la segunda como en la cuarta semana post-infección (Figs. 5 y 6).

Efecto de la infección de las MSC con H. capsulatum en la diferenciación osteogénica

Los resultados permitieron observar que el gen de expresión temprana (RUNX) se expresó significativamente a partir de la segunda semana de cultivo, con un pico de expresión a la cuarta semana, mientras que el gen de expresión tardía (Osteocalcina) se expresó significativamente en la cuarta semana de cultivo (Figs. 7 y 8). Contrario a lo observado con los resultados de expresión de los genes asociados con el proceso adipogénico, la infección de las MSCs con el hongo indujo un aumento en la expresión de estos genes a partir del primer día post-infección (Figs. 7 y 8).

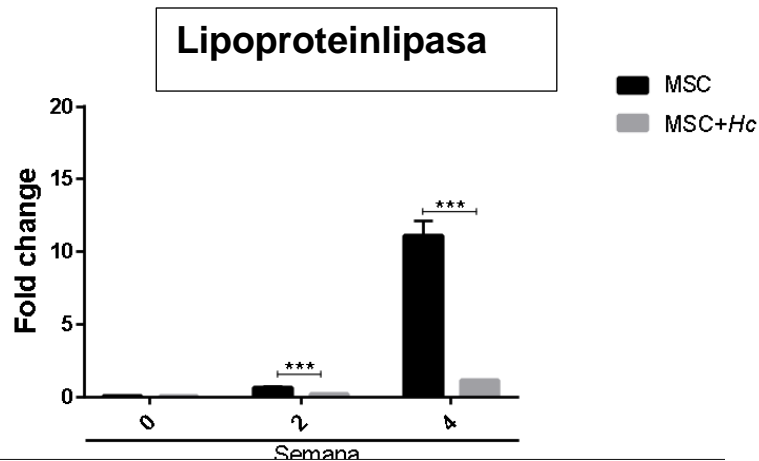


Figura 5. Expresión relativa del gen lipoproteinlipasa (LPL) en MSC sin infectar y en MSC infectadas con *H. capsulatum*. Las MSC fueron cultivadas por cuatro semanas bajo condiciones de diferenciación adipogénica, se determinó la expresión del respectivo gen durante la semana cero, dos y cuatro. Se observa como *H. capsulatum* inhibe la expresión de LPL. $P < 0,05$

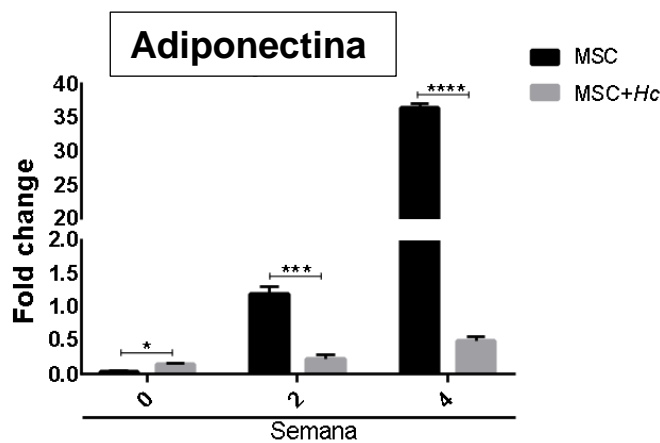


Figura 6. Expresión relativa del gen adiponectina en MSC sin infectar y en MSC infectadas con *H. capsulatum*. Las MSC fueron cultivadas durante cuatro semanas bajo condiciones de diferenciación adipogénica, se midió la expresión del respectivo gen durante la semana cero, dos y cuatro. Se observa como *H. capsulatum* inhibe la expresión de LPL. $P < 0,05$

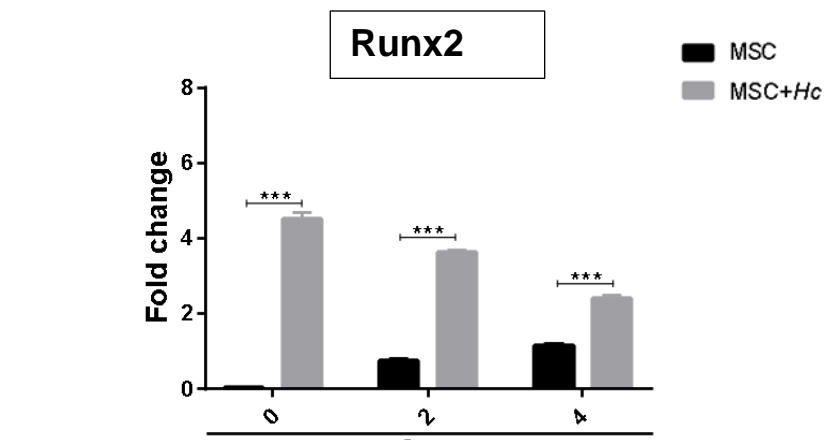


Figura 7. Expresión relativa del gen Runx2 en MSC sin infectar y en MSC infectadas con *H. capsulatum*. Las MSC fueron cultivadas durante cuatro semanas bajo condiciones de diferenciación osteogénica, se midió la expresión del respectivo gen durante la semana cero, dos y cuatro. Se observa como *H. capsulatum* estimula la expresión de Runx2. $P < 0,005$

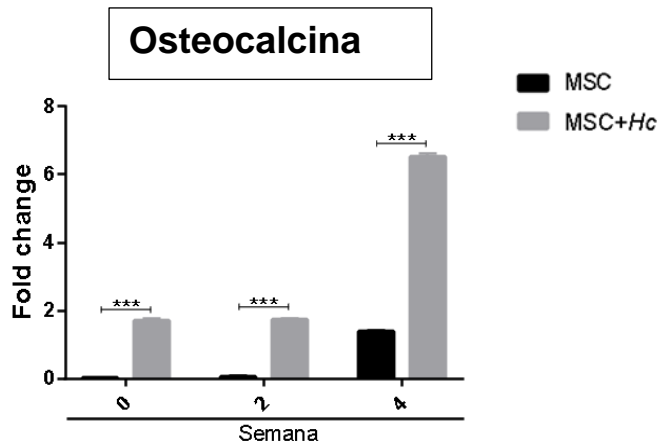


Figura 8. Expresión relativa del gen osteocalcina en MSC sin infectar y en MSC infectadas con *H. capsulatum*. Las MSC fueron cultivadas durante cuatro semanas bajo condiciones de diferenciación osteogénica, se midió la expresión del respectivo gen durante la semana cero, dos y cuatro. Se observa como *H. capsulatum* estimula la expresión de osteocalcina. $P < 0,05$

Discusión

Las MSCs son cada vez más utilizadas en la medicina regenerativa por su capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares como el adipogénico y el osteogénico. Sin embargo, se ha descrito que estas células pueden ser el blanco de diferentes microorganismos. En el presente estudio se determinó si las levaduras de *H. capsulatum* afectaban la diferenciación de las MSCs, obtenidas de medula ósea de ratón, a los linajes adipogénico y osteogénico.

Se estandarizó una PCR en tiempo real para determinar la expresión relativa de dos genes implicados en la adipogénesis (LPL y adiponectina) y dos genes relacionados con la osteogénesis (Runx2 y osteocalcina).

Los resultados permitieron determinar que la infección de las MSCs, con *H. capsulatum*, inhibió la diferenciación hacia el linaje adipogénico; por el contrario, la infección con este hongo patógeno promueve la diferenciación osteogénica, como fuera sugerido al observar un aumento significativo en la expresión de los genes asociados con este linaje.

En el caso de un aumento en la expresión de los genes relacionados con la osteogénesis, inducida por la infección con levaduras de *H. capsulatum*, sugiere que este proceso podría estar asociado con el metabolismo de este hongo patógeno el cual requiere el calcio para su metabolismo, dado que este participa en muchos procesos que incluyen la regulación de la homeóstasis del hierro, participa en la adaptación al pH, el metabolismo de la glucosa, la morfogénesis y el crecimiento en fase micelial: aunque en fase levadura los requerimientos de calcio son menores que en la fase micelial¹⁶. Runx2 es el factor de transcripción específico para osteogénesis y el determinante para la diferenciación de las células mesenquimales hacia el linaje osteoblástico y es el factor de transcripción más abundante en los osteoblastos maduros¹⁷, la expresión de osteocalcina está regulada por factores de transcripción homodominio como Runx2¹⁸, por lo tanto, al incrementarse la expresión de este gen se espera que la osteocalcina también lo haga.

En estudios previos se ha reportado que bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* también afectan la diferenciación de las MSC de médula ósea, las cuales, al igual que *H. capsulatum*, estimulan la diferenciación osteogénica e inhiben la diferenciación adipogénica, lo cual en este caso se encuentra

mediado por los ligandos tipo Toll (TLR)¹⁹. Algunos estudios reportan resultados contradictorios con respecto a la diferenciación de las MSC y la activación de los TLR, en cuanto a los componentes bacterianos se ha encontrado que la exposición a lipopolisacárido (LPS) proveniente de *E. coli* y ácido lipoteicoico (LTA) de *S. pyogenes* de forma prolongada regulan de forma positiva la diferenciación osteogénica²⁰. Por otro lado, al inhibir la adipogénesis, las MSC pierden gran parte de su potencial terapéutico, ya que los adipocitos son necesarios para el almacenamiento de ácidos grasos.

Conclusiones

Los resultados indican que *H. capsulatum* tiene la capacidad de alterar la diferenciación de las MSC de medula ósea de ratón hacia los linajes adipogénico y osteogénico in vitro, observándose que se inhibe la diferenciación adipogénica y se estimula la osteogénica. Más estudios son necesarios para determinar los mecanismos moleculares por medio del cual este hongo patógeno induce tales alteraciones, y su significado en la fisiopatología de la infección de estas células.

Agradecimientos

Ofrezco un especial agradecimiento al grupo MICROBA, en especial a la línea de inmunología, a la estudiante de doctorado Carolina Rodríguez Echeverry y al profesor Ángel González quienes me acompañaron y aportaron sus conocimientos durante todo el proceso que llevo la realización de este proyecto.

Declaración de conflictos de interés

No existen conflictos de interés

Referencias

1. Buitrago, M. J., Bernal-Martínez, L., Castelli, M. V., Rodríguez-Tudela, J. L. y Cuenca-Estrella, M. (2011). Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: A review of cases and diagnosis. *J. Travel Med*, 18(1), 26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2010.00477.x>
2. Fernández Andreu, Carlos M, Illnait Zaragoza, María T, Martínez Machín, Gerardo, Perurena Lancha, Mayda R, & Monroy Vaca, Ernesto. (2011). Una actualización acerca de histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop*, 63(3), 189-205. Recuperado en 23 de mayo de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300001&lng=es&tlng=es.
3. Sepúlveda VE, Márquez R, Turissini DA, Goldman WE, Matute DR. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. *mBio*. 2017; 8(6). doi:10.1128/mbio.01339-17

4. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir and Critl Care Med.* 2020;41(01):013-030. doi:10.1055/s-0039-1698429
5. Thompson, G. R., LaValle, C. E. y Everett, E. D. (2004). Unusual manifestations of histoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 50(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.020>
6. García Vega E, Fernandez Andreu CM, Rivero Figueroa D. Aspectos epidemiológicos, clínicos, microbiológicos y terapéuticos de la histoplasmosis. *Rev Cuba de Medicina Mil.* 2013;42(1):97.
7. Uccelli, A., Moretta, L. y Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
8. Miranda Rodriguez A, Galván Cabrera JA, De león Delgado J. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. *Rev. Cuba. de Hematol. Inmunol. y Hemoter.* 2015;31(1).
9. Smirnov SV, Harbacheuski R, Lewis-Antes A, Zhu H, Rameshwar P, Kotenko SV. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells as a target for cytomegalovirus infection: Implications for hematopoiesis, self-renewal and differentiation potential. *Virology.* 2007;360(1):6-16. doi:10.1016/j.virol.2006.09.017

10. Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, Peters K. Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2013;319(18):2883-2892. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.08.020

11. Alcalá - Hernández, C. F., De la Rosa, L. A., Wall- Medrano, A., López - Díaz, J. A. y Álvarez - Parrilla, E. (2015). Avances en terapia farmacológica y fitoquímica de la adipogénesis. *Nutr Hosp.* 32, 545–555. <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v32n2/10revision07.pdf>

12. Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 2003;90(1):13-22. doi:10.1002/jcb.10592

13. Xing W, Pourteymoor S, Mohan S. Ascorbic acid regulates osterix expression in osteoblasts by activation of prolyl hydroxylase and ubiquitination-mediated proteosomal degradation pathway. *Physiol Genomics.* 2011;43(12):749-757. doi:10.1152/physiolgenomics.00229.2010

14. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5):117. doi:10.1186/scrt328

15. Rodríguez-Echeverri C, Puerta-Arias JD, González Á. Paracoccidioides brasiliensis activates mesenchymal stem cells through TLR2, TLR4, and Dectin-1. *Med. Mycol.* 2020. doi:10.1093/mmy/myaa039
16. López, CE, Dimorfismo y patogenia de Histoplasma capsulatum. *Rev. Argent. Microbiol.* [Internet]. 2006;38(4):235-242. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016794012>
17. Marie, P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>
18. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:62-72.
19. Fiedler, T., Salamon, A., Adam, S., Herzmann, N., Taubenheim, J. y Peters, K. (2013). Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 319(18), 2883–2892. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.08.020>
20. Hyun Hwa Cho, Yong Chan Bae, Jin Sup Jung, M.D., Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells, *Stem Cells*, Volume 24, Issue 12, December 2006, Pages 2744–2752, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0189>