



**Estandarización de una PCR en tiempo real para los genes SID4, ZRC1 y HC100
de *Histoplasma capsulatum***

Christian Santiago Serra Patiño

Trabajo de investigación presentado para optar al título de Microbiólogo y Bioanalista

Asesor

Ángel González Marín, Doctor (PhD) en Ciencias

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia
2022

Grupo de Investigación Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Director: Ricardo Velasco Vélez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Resumen

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico que se caracteriza por ser geofílico-saprófito, y puede encontrarse en diversos ambientes gracias a su fácil adaptación, aunque generalmente se encuentra en espacios cerrados con una humedad relativamente alta o en lugares donde se puedan encontrar normalmente excretas de aves y guano de murciélagos. Este hongo es el agente causal de la enfermedad conocida como histoplasmosis, la cual se da por la inhalación de microconidias o fragmentos de micelio del hongo. A lo largo de los años se han podido describir diferentes mecanismos y factores de virulencia que le permiten al hongo generar enfermedad, pero a pesar de los avances obtenidos, aún hay mecanismos que no han sido totalmente descritos como es el caso de algunos genes relacionados con la captación de micronutrientes como SID4 y ZRC1, asociados con la obtención de hierro y zinc, respectivamente, y genes que parecen tener una importancia en la supervivencia y replicación del hongo como es el caso del gen HC100 que codifica para una proteína de 100 kDa.

El objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de PCR en tiempo real para determinar la presencia de estos tres genes en la cepa HC1980 de *Histoplasma capsulatum*.

Resultados: Se diseñaron primers con un buen nivel de rendimiento y se realizó la estandarización de la PCR en tiempo real para los genes SID4, ZRC1 y HC100. No se evidenciaron dímeros de primers ni contaminación en la técnica; además, se pudo observar amplificación ya que la fluorescencia se detectó a las temperaturas y concentraciones evaluadas.

Conclusiones: Se estandarizó exitosamente una PCR en tiempo real para la detección de los genes SID4, ZRC1 y HC100 de *Histoplasma capsulatum*, la cual servirá para futuros ensayos que permitan medir la expresión de los genes en ausencia de micronutrientes o en cultivo con macrófagos y, en un futuro, poder determinar la función exacta de cada uno de ellos.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, PCR, PCR en tiempo real, SID4, ZRC1, HC100kDa

1. Introducción

La histoplasmosis es una micosis sistémica y endémica causada por el hongo dimórfico térmico *Histoplasma capsulatum* (1,2). Este microorganismo se caracteriza por estar presente en suelos a temperatura ambiente en su forma micelial, y en el hospedero en forma de levadura a 37°C (3,4). Esta enfermedad es cosmopolita, pero es principalmente endémica de las zonas de Ohio y Mississippi en EE. UU, y la mayor parte de Sur América, siendo los países más afectados Colombia, Brasil y Argentina (5,6), en donde se puede encontrar en suelos contaminados con guano de murciélago o excretas de ave que, debido a su alto contenido de nitrógeno, favorecen el crecimiento del hongo (7), por lo que las personas mayormente expuestas son constructores, personal del sector avícola y personas que se dediquen a la exploración de cuevas y bosques en donde es más frecuente encontrar este tipo de material biológico (8).

La vía de infección de *H. capsulatum* es la respiratoria; y se da cuando el hospedero inhala las partículas infectantes como las microconidias o fragmentos del micelio presentes en el ambiente. Estos fragmentos viajan hasta los alveolos donde se induce el cambio a la forma de levadura, el cual se da principalmente por el aumento de temperatura (3). Una vez en el pulmón, las levaduras deben evitar varios mecanismos de respuesta inmune como las barreras mecánicas, citotoxicidad y respuesta enzimática por las células de la respuesta inmune para poder replicarse dentro del hospedero asegurando su supervivencia (9).

Esta enfermedad tiene una amplia serie de manifestaciones clínicas, relacionadas con el tamaño del inóculo y al estado del sistema inmune del hospedero. En la mayoría de los casos, las personas expuestas y que no presentan algún tipo de inmunocompromiso ni comorbilidad, permanecen asintomáticas o presentan síntomas parecidos al resfriado común, siendo estos autolimitados y muchas veces sin la posibilidad de llegar a un diagnóstico preciso (5,10). Por otra parte, en personas inmunocompetentes expuestos a una importante carga fúngica tienen un mayor riesgo de presentar cuadros clínicos más graves entre las que se pueden incluir la histoplasmosis pulmonar aguda, en la cual se presentan síntomas parecidos a neumonía como tos seca, fiebre, dolor torácico y en

radiografías de tórax se pueden observar infiltrados pulmonares difusos; la histoplasmosis pulmonar crónica, se presenta mayormente en pacientes con defectos pulmonares estructurales como personas fumadoras o con EPOC (7), y se pueden presentar síntomas como tos, disnea, pérdida de peso y fibrosis pulmonar. Finalmente, la forma más crítica de la enfermedad es la histoplasmosis diseminada, la cual ocurre principalmente en pacientes con algún tipo de inmunocompromiso y se caracteriza por presentar los síntomas anteriormente descritos, y además se puede presentar diseminación en hígado, bazo, medula ósea, lesiones en piel y mucosas e incluso puede provocar la muerte (10).

A través de los años se han podido estudiar diferentes mecanismos y factores de virulencia mediante los cuales *H. capsulatum* puede evadir la inmunidad generada por células de la respuesta inmune del hospedero, entre los cuales se destacan, además del dimorfismo térmico, mecanismos en los cuales, a través de la expresión de genes reguladores, el hongo puede promover la síntesis de sideróforos, transportadores y quelantes de hierro y zinc, entre los cuales se encuentra un gen involucrado en la captación de hierro conocido como SID4, el cual se ha descrito como una CoA-ligasa ácida que interviene en el metabolismo del hidroxamato, y el cual codifica para una proteína de 589 aminoácidos (11), y un gen involucrado en la captación de zinc, conocido como ZRC1, el cual interviene en el almacenamiento de zinc en vacuolas en condiciones de alta disponibilidad y está reportado como una secuencia que cuenta con 2597 pares de bases.(12,13). La expresión de estos genes ayuda a que el hongo no se vea afectado por los mecanismos de defensa usados por el sistema inmune para controlar la infección. De igual manera, entre los factores de virulencia que se han descrito en *H. capsulatum* se puede mencionar un gen que codifica para una proteína de 100kDa, la cual se ha descrito que se expresa cinco veces más después de una hora de contacto entre la levadura y los macrófagos del hospedero (14). De esta proteína no se tiene una función exacta, pero se tiene la hipótesis de que pertenece a un grupo de proteínas conocido como proteínas p100 y de la cual se demostró su importancia en *Plasmodium falciparum* (15), donde se describió, mediante el silenciamiento en el gen que codifica para esta proteínas, una importante disminución en la viabilidad del parásito, por esto se cree que esta proteína está relacionada con procesos de supervivencia y replicación, además de

que este gen se usa en el ámbito clínico para la detección molecular de histoplasmosis en cualquiera de sus formas clínicas.

Se han realizado diversos estudios sobre la interacción entre los macrófagos e *H. capsulatum* los cuales han logrado demostrar que, una vez el hongo ingresa a la célula comienza su replicación y disseminación; sin embargo, en respuesta a la infección los macrófagos exhiben diferentes mecanismos inmunitarios para hacer frente, entre las cuales destacan la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (12), reclutamiento de otras células del sistema inmune y un mecanismo muy importante en el que los macrófagos crean un entorno deficiente de micronutrientes con el fin de limitar la patogenicidad, no solo en *H. capsulatum* sino también de otros microorganismos intracelulares, este proceso se conoce como inmunidad nutricional (16). En el caso de *H. capsulatum* se suprime la captación de hierro y zinc, los cuales se conoce que están implicados en la patogénesis del hongo ya que son importantes cofactores en muchos procesos enzimáticos, aunque su función exacta en el hongo aún no es muy clara y se necesitan más estudios (11,13).

Aunque se conocen muchos de los mecanismos que utiliza *H. capsulatum* para evadir y generar enfermedad en el ser humano, aún hay muchos genes que, aunque se han descrito, no se sabe su función exacta tanto en los procesos de virulencia como en la evasión del sistema inmune. El objetivo de esta investigación es poder estandarizar un protocolo de PCR en tiempo real para los genes SID4, ZRC1 y HC100 con el fin de poder avanzar en el entendimiento de los factores de virulencia de este hongo y, para posteriormente, determinar la expresión de estos genes en condiciones experimentales en ausencia y presencia de micronutrientes.

En el caso de *Histoplasma capsulatum*, no se ha descrito la función de estos genes. Por tanto la estandarización de una PCR convencional y una PCR en tiempo real es de vital importancia ya que son técnicas rápidas, sencillas, específicas y sensibles las cuales permiten determinar la presencia mediante amplificación usando primers diseñados de manera in silico de estos genes asociados a la captación de hierro, zinc y supervivencia intracelular del hongo. Adicionalmente, se estandarizaron las dos técnicas debido a que la PCR convencional, además de ser una técnica sumamente económica que permite realizar pruebas de ensayo y error con muy buenos resultados, también permite evaluar

la concordancia de los resultados obtenidos mediante una técnica como la PCR en tiempo real con el objetivo de tener unas condiciones estándar para la amplificación de los genes ya que no existe información de técnicas similares en SID4 y ZRC1 y en especial del gen HC100 el cual si tiene una estandarización la cual se usa para diagnóstico molecular de histoplasmosis mediante una PCR anidada pero no existe información concluyente sobre el papel que parece jugar en la patogénesis de esta micosis (1).

2. Materiales y métodos

Diseño de los primers para los genes SID4, ZRC1 y HC100

Se diseñaron un par de primers para cada gen usando las secuencias disponibles en el NCBI: ZRC1 (HCBG_00193), SID4 (ACC64456) y HC100 (AJ005963.1), con estas secuencias se realizó un alineamiento en el programa MEGAX para encontrar regiones conservadas de las cepas HC1980, NAm1, G217B, H143, G186AR y H88 poniendo especial importancia en el alineamiento para el gen HC100 de todas las secuencias y de SID4 y ZRC1 de G186AR (Panamá), siendo este una cepa muy parecida a HC1980. Para la selección de las regiones que se iban a usar se debe tener en cuenta que en todas las secuencias se usaron los exones ya que, en el caso de HC100 solo se tiene acceso a regiones codificantes del gen y en el caso de ZRC1 y SID4 se siguió con el mismo parámetro aunque si se cuenta con las secuencias completas. Con las secuencias se llevó a cabo una selección de posibles primers usando el programa Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) y con ellas se evaluaron las características de longitud, contenido GC, temperatura de melting, secuencias terminales, homodímeros, heterodímeros y formación de estructuras secundarias usando el programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Los primers que se usaron para los experimentos fueron los siguientes: Hcp100 Forward: (CGGAAGGATGGGTCAAAGT), HC100 Reverse (TTTTCAAGTTCCCGCAGTTT), ZRC1 Forward (TCCGAAAACCCCGATGCAAC), Zrc2 Reverse (CCAATGAGACGAAGCGTTCAA), Sid4 Forward (CTCTCTGGAGGCTGCAACAA) y SID4 Reverse (GCCCAAGGTCATCTCCCAA).

Estandarización de la PCR convencional

Para la PCR convencional se usó el termociclador C1000 de Bio Rad y el kit comercial de DNA polimerasa y buffer (TP1000 ExcelTaq) con el fin de estandarizar las condiciones óptimas de amplificación tanto en temperatura como en concentración de primers, para lograr estandarizar la PCR convencional y comprobar que haya concordancia de los resultados usando las mismas condiciones en una PCR en tiempo real.

El perfil térmico que se usó para los ensayos fue el siguiente: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 35 ciclos a determinada temperatura estandarizada durante 30 segundos, 35 ciclos a 72°C durante 50 segundos, luego se programó un ciclo a 72°C durante 5 minutos para asegurar que todos los productos de la amplificación fueran lo más homogéneos posibles.

Durante la estandarización de la PCR convencional se realizaron ensayos evaluando las diferentes temperaturas: 56°C, 57°C, 58°C, 59°C y 60°C; y concentraciones de primers: 0,1uM, 0,2uM y 0,4uM. Para la revelación de la PCR se realizó una electroforesis probando las siguientes condiciones: se usó un gel de agarosa con concentraciones de 1,5% y 2% en el que se depositaron las muestras tanto positivas como negativas para cada gen; este gel se sometió a una corriente eléctrica de 60V y 80V durante 2 horas y se usó como colorante fluorescente el reactivo bromuro de etidio. Para observar los resultados se usó el equipo (Bio Rad Gel Doc XR+). Los ensayos se realizaron varias veces para probar la repetibilidad de la estandarización y así obtener resultados representativos.

Para la reacción usada en cada PCR convencional se usaron los siguientes volúmenes y concentraciones para 15uL de reacción: 1uL (150ng) de DNA molde, 0,2 uL (0,1mM) de primer forward y reverse, 1,5uL de buffer de reacción, 1,2uL de dNTPs (2,5mM de cada nucleótido), 0,1uL de Taq Buffer y 10,8uL de agua grado molecular.

Estandarización de la PCR en tiempo real

Para la PCR en tiempo real se usó el termociclador (Bio Rad CFX96) y el kit comercial (HOT FIREPol Evagreen Supermix Solis Biodyne), y se usaron las condiciones previamente estandarizadas en la PCR convencional; siendo estas las siguientes: 95°C durante 12 minutos, 35 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 35 ciclos a 59°C durante 25 segundos, 35 ciclos a 72°C durante 25 segundos. Para poder realizar un análisis sobre si los productos de que las amplificaciones correspondían a los genes que se estaban evaluando y que si estos si perteneces a *H. capsulatum* se realizó una comparación de los tres genes evaluados con las condiciones estandarizadas con un gen normalizador el cual es constitutivo para el hongo conocido como TEF3, el cual es un gen encargado de la subunidad ribosómica y factores de elongación de la traducción (14). Nuevamente se

realizaron varias repeticiones de los ensayos para obtener resultados representativos y por cada PCR en tiempo real las muestras positivas se montaron por duplicado.

Extracción DNA

Para la extracción de DNA se usó la cepa de *H. capsulatum* 1980 al igual que el kit Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit de Miobio, en el cual las muestras fueron tratadas con soluciones MD1-MD5, centrifugación y decantación a diferentes tiempos y velocidades según las recomendaciones del fabricante.

3. Resultados

Diseño de primers

Se obtuvieron primers que cumplieron con las condiciones esperadas y siguiendo diferentes protocolos de diseño de primers. En el caso de HC100 se procuró que, al momento de realizar el alineamiento, se priorizaran que las secuencias de todos los genes se encontraran conservadas, por otra parte para los genes SID4 y ZRC1 se dio prioridad a que los primers estuviesen conservados en la cepa G186AR ya que es una cepa geográficamente similar a HC1980 la cual es la cepa que se usó en la estandarización.

Tabla 1

Gen	Primer	NCBI	Características
ZRC1	Zrc1 Forward (TCCGAAAACCCCGATG CAAC), Zrc1 Reverse (CCAATGAGACGAAGCG TTCAA)	HCBG_00193	Longitud: 20-21pb %GC: 52% Tm: 59-57°C
SID4	Sid4 Forward (CTCTCTGGAGGCTGCA ACAA) Sid4 Reverse (GCCCAAGGTCATCTCC CAAA)	ACC64456	Longitud: 20pb %GC: 55% Tm: 58-57°C
HC100	Hc100 Forward: (CGGAAGGATGGGTCAA AGT) Hc100 Reverse (TTTTCAAGTTCCCGCA GTTT)	AJ005963.1	Longitud: 19-20pb %GC: 53-40% Tm: 56°C

Tabla 1. Primers diseñados para los genes ZRC1, SID4 y HC100, se puede observar el código de acceso para cada secuencia en la base de datos del NCBI y las características para cada par de primers.

PCR convencional

El diseño de los primers para los genes SID4, ZRC1 y HC100 de la cepa de *H. capsulatum* 1980 demostraron ser óptimos para la amplificación en un ensayo de PCR convencional.

Todos los controles positivos amplificaron adecuadamente en un rango entre 100 y 150 pares de bases, lo cual corresponde al tamaño esperado del amplicón (Fig. 1). En cuanto a los controles negativos no se evidenció amplificación alguna demostrando que no hubo contaminación de ningún tipo durante el proceso y los primers estaban debidamente diseñados ya que no se presentaron dímeros de primers durante la amplificación. Durante esta etapa de la estandarización se evaluaron diversas temperaturas y concentraciones de primers, en las cuales se obtuvieron diferentes resultados. (Fig. 2,3,4).

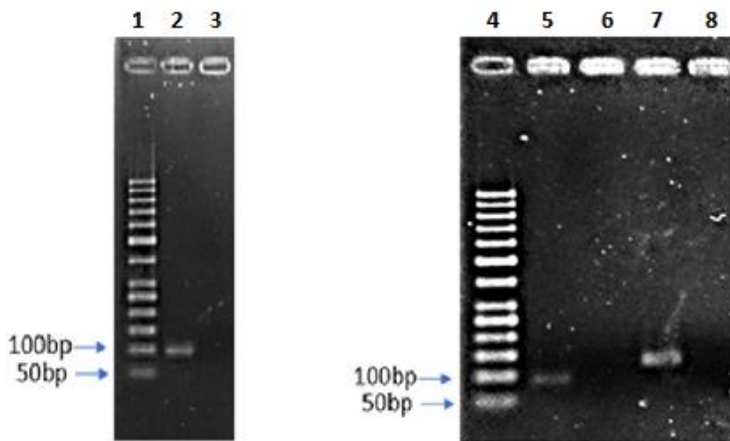


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la amplificación de los genes que codifican para SID4, ZRC1 y HC100. 1, Marcador de peso molecular; 2, Gen HC100 positivo; 3, Gen HC100 control negativo; 4, Marcador de peso molecular 5, Gen SID4 positivo; 6, Gen SID4 control negativo; 7, Gen ZRC1 positivo; y 8, Gen ZRC1 control negativo. Experimento final realizado a una temperatura de **59°C** con una concentración de primers de **0,1uM**.

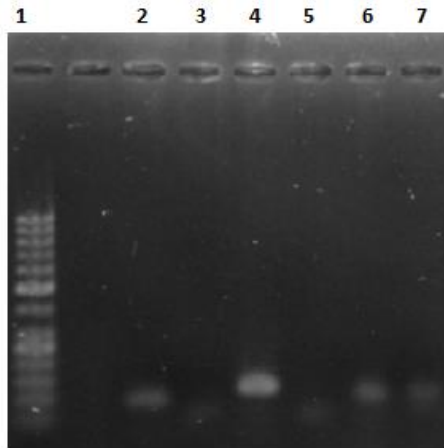


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la amplificación de los genes que codifican para SID4, ZRC1 y HC100. 1, Marcador de peso molecular; 2, Gen HC100 positivo; 3, Gen HC100 control negativo; 4, Gen SID4 positivo; 5, Gen SID4 control negativo; 6, Gen ZRC1 positivo; y 7, Gen ZRC1 control negativo. Experimento realizado a una temperatura de **57°C** con una concentración de primers de 0,4uM. Se observa amplificación en los controles negativos. Este es un resultado representativo para las diferentes temperaturas evaluadas.

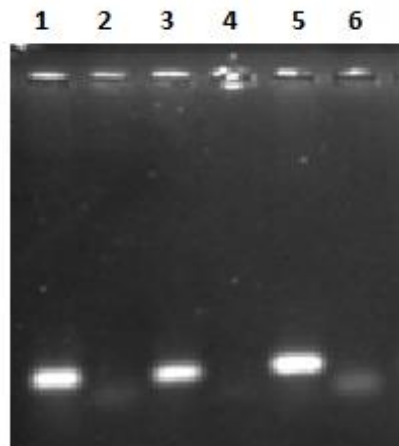


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% para la amplificación de los genes que codifican para SID4, ZRC1 y HC100. 1, Gen Hc100 positivo; 2, Gen HC100 control negativo; 3, Gen SID4 positivo; 4, Gen SID4 control negativo; 5, Gen ZRC1 positivo; y 6, Gen ZRC1 control negativo. Experimento realizado a una temperatura de **59°C** con una concentración de primers de **0,2uM**. Se observa amplificación en los controles negativos. Este es un resultado representativo para las diferentes concentraciones de primers evaluadas.

PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real para los tres genes se observaron resultados consecuentes a los obtenidos en la PCR convencional, nuevamente el control negativo de ninguno de los genes presentó amplificación, demostrando que los primers fueron debidamente diseñados. Además, se observó en los tres resultados que el agente intercalante Evagreen fue ideal para este ensayo ya que la fluorescencia en los tres genes se empezó a detectar alrededor de los 20 ciclos en todos los casos (Fig. 4).

Figura 4A. ZRC1

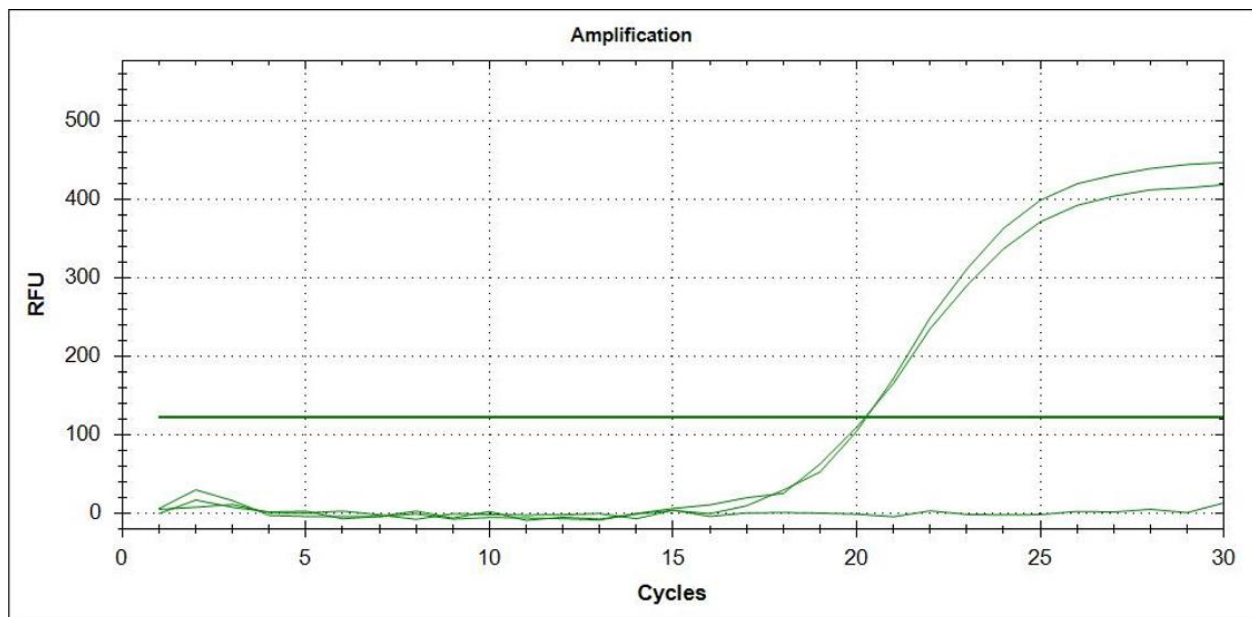


Figura 4B. SID4

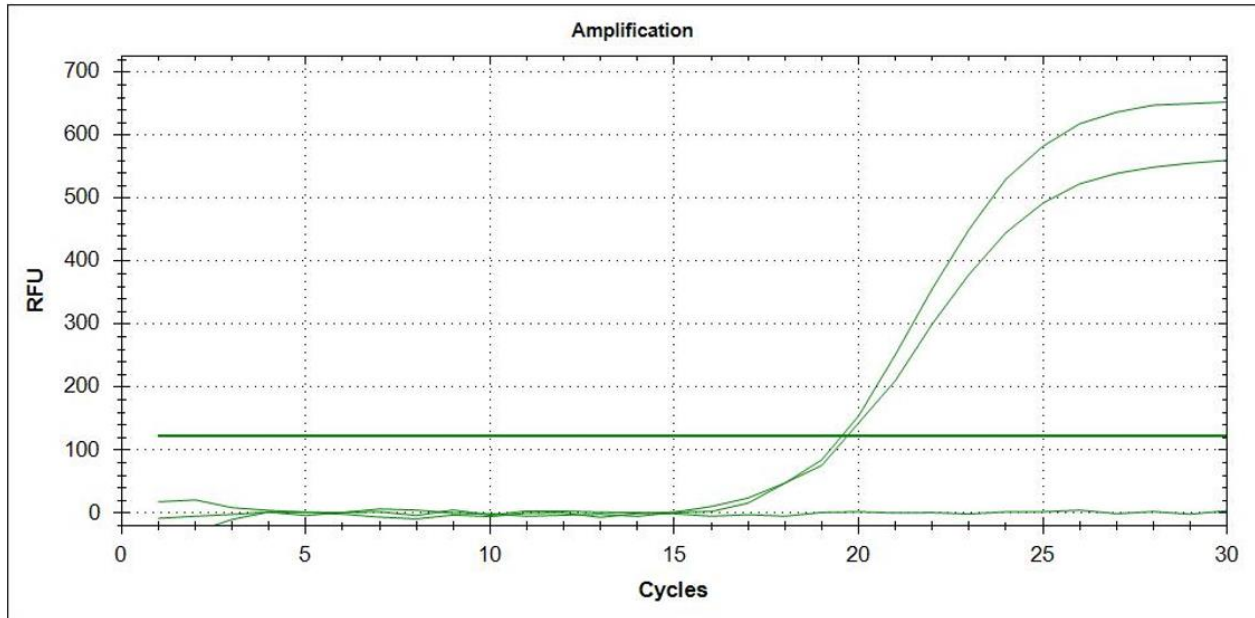


Figura 4C. HC100

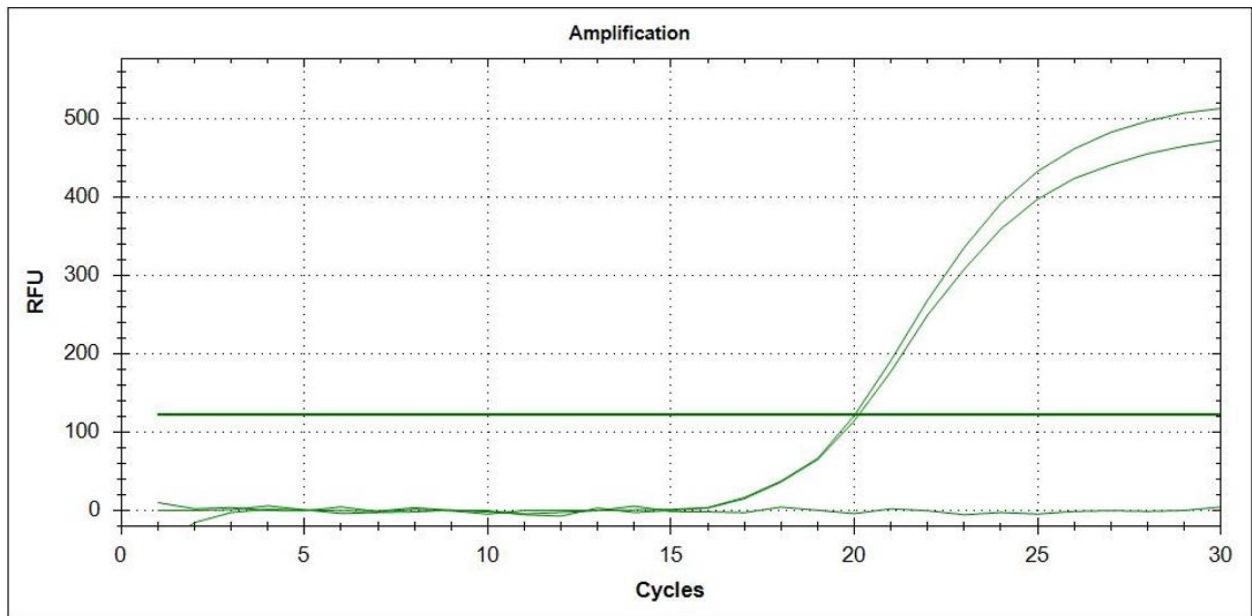


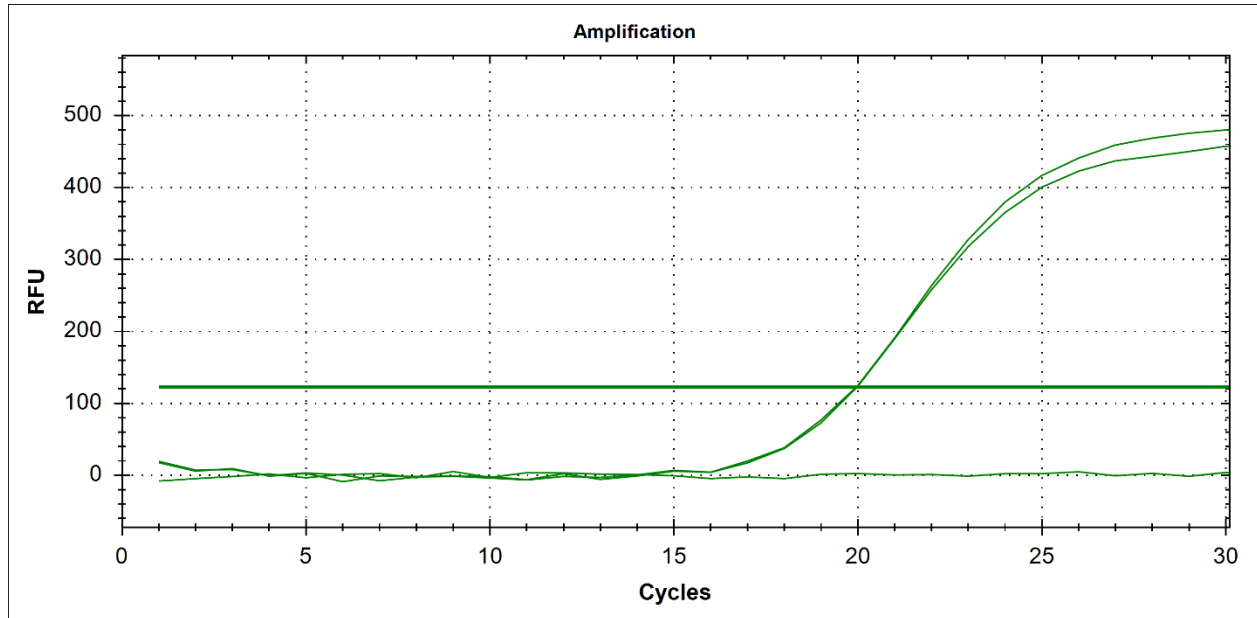
Figura 4D TEF3

Figura 4. Resultados de la PCR en tiempo real. (A) Muestras positivas para el gen *Zrc1* en las que se observa amplificación de las muestras en el ciclo 20 y su respectivo control negativo. (B) Muestras positivas para el gen *Sid4* en las que se observa amplificación de las muestras en el ciclo 20 y su respectivo control negativo. (C) Muestras positivas para el gen *Hc100* en las que se observa amplificación de las muestras en el ciclo 20 y su respectivo control negativo. (D) Muestras positivas para el gen normalizador *TEF3* en las que se observa amplificación en el ciclo 20 y su respectivo control negativo. Todas las muestras se montaron por duplicado.

4. Discusión

En la actualidad se ha reportado una gran cantidad de información sobre los mecanismos que utiliza *H. capsulatum* para infectar y sobrevivir dentro de las células del hospedero, pero se desconocen los procesos que hacen a este hongo dimórfico una amenaza para la salud humana en zonas endémicas (18).

El objetivo de este proyecto fue estandarizar dos técnicas que permitieran brindar un primer paso para lograr entender en detalle el proceso de evasión de la inmunidad nutricional que tiene el hongo una vez está dentro de los macrófagos del hospedero ya que tanto los genes ZRC1 y SID4 están involucrados en el proceso de la captación de micronutrientes vitales para la replicación y supervivencia del hongo como son el hierro y el zinc (19).

Los resultados obtenidos permitieron estandarizar y establecer la información del umbral de detección (Cycle Threshold - CT) en el momento de la amplificación de la PCR en tiempo real, lo que permite definir que los primers y las condiciones estandarizadas si permiten la amplificación del DNA que corresponde a los tres genes evaluados en comparación de un gen constitutivo como lo es TEF3. Adicionalmente, y en el caso de la amplificación del gen que codifica para la proteína HC100, esta estandarización podría utilizarse, en un futuro, para el diagnóstico molecular de la histoplasmosis ya que se presenta una alternativa a la PCR ya estandarizada para histoplasmosis debido a que los primers solo presentan una similitud del 29,2% y el 52,8% para los primers forward y reverse respectivamente según lo reportado en la literatura, lo que indica que detecta otra región del gen evaluado, además de que se utilizó una cepa como HC1980 la cual es diferente a la cepa estandarizada para el diagnóstico de histoplasmosis (20). En este caso, podrían utilizarse muestras de pacientes con diagnóstico de la micosis, y de esta manera implementar dicha prueba molecular para el diagnóstico por el laboratorio usando esta estandarización como base.

En la literatura se tienen reportados varios genes involucrados para la captación de micronutrientes por parte de *H. capsulatum*, con base en esto se seleccionaron los genes SID4 y ZRC1 (11, 13, 21) y se buscó diseñar los primers con la información de secuencias

disponibles en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para los genes SID4 y ZRC1 se usó como referencia la cepa G186AR la cual es una cepa encontrada en Panamá (21) y que tiene la mayor similitud con la cepa HC1980 reportada en Colombia. Actualmente no existe evidencia literaria que demuestre la existencia de una estandarización de una PCR convencional o una PCR en tiempo real para estos dos genes, por lo cual tener esta estandarización es un buen avance en la información que se tiene sobre estos y en como funciona la inmunidad nutricional en casos de histoplasmosis. Para el diseño de los primers de HC100 se hizo una comparación de las secuencias reportadas de las cepas CIB1980, H88, G186AR, NAm1, G217B y H143 por lo que se puede concluir que los resultados obtenidos son representativos de todas las cepas o aislamientos de *H. capsulatum*, es decir, esta técnica de PCR en tiempo real, con los primers diseñados en este estudio, se pueden usar en cepas de diferentes regiones del mundo.

Con los resultados de la amplificación tanto de la PCR convencional como de la PCR en tiempo real se puede concluir que, tanto los primers como la estandarización están bien diseñados, pero se debe tener en cuenta que el estudio aún cuenta con limitaciones ya que no se realizaron pruebas adicionales de sensibilidad y especificidad in vitro, por lo cual se considera conveniente realizar experimentos con otros hongos dimórficos y experimentos que incluyan ausencia y presencia de micronutrientes además de estímulos mediante la infección de histoplasma en cultivos celulares.

Referencias

11. Muñoz CO, Cano LE, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*. 2010;14:145-158. doi:10.1016/s0123-9392(10)70132-6
2. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):207-227. doi:10.1016/j.idc.2015.10.009
3. Nguyen VQ, Sil A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(12):4880-4885. doi:10.1073/pnas.0710448105
4. Beyhan S, Sil A. Sensing the heat and the host: Virulence determinants of *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*. 2019;10(1):793-800. doi:10.1080/21505594.2019.1663596
5. Linder KA, Kauffman CA. Histoplasmosis: Epidemiology, diagnosis, and clinical manifestations. *Curr Fungal Infect Rep*. 2019;13(3):120-128. doi:10.1007/s12281-019-00341-x
6. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomedica*. 2011;31(3):301. doi:10.7705/biomedica.v31i3.597
7. Fernandez Andreu CM. Una actualización acerca de histoplasmosis. *Revista cubana de medicina*. Sep-Dic 2011;63(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300001
8. Cáceres DH, Gómez BL, Restrepo Á, Tobón ÁM. Histoplasmosis y sida: factores de riesgo clínicos y de laboratorio asociados al pronóstico de la enfermedad. *Infectio*. 2012; 16:44-50. doi:10.1016/s0123-9392(12)70026-7
9. Garfoot AL, Rappleye CA. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. *FEBS J*. 2016;283(4):619-633. doi:10.1111/febs.13389
10. González, Á (2018) Fundamentos de las micosis humanas. Colombia: Fondo Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas.
11. Hwang LH, Seth E, Gilmore SA, Sil A. SRE1 regulates iron-dependent and - independent pathways in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(1):16-25. doi:10.1128/EC.05274-11

- 12.** Mittal J, Ponce MG, Gendlina I, Nosanchuk JD. Histoplasma capsulatum: Mechanisms for pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2019;422:157-191. doi:10.1007/82_2018_114
- 13.** Dade J, DuBois JC, Pasula R, et al. HcZrt2, a zinc responsive gene, is indispensable for the survival of Histoplasma capsulatum in vivo. *Med Mycol.* 2016;54(8):865-875. doi:10.1093/mmy/myw045
- 14.** Edwards JA, Chen C, Kemski MM, Hu J, Mitchell TK, Rappleye CA. Histoplasma yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC Genomics.* 2013;14(1):695. doi:10.1186/1471-2164-14-695
- 15.** Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, et al. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by Histoplasma capsulatum during infection of murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(3):605-613. doi:10.1006/bbrc.1998.9894
- 16.** González-González AE, Taylor ML, Curiel-Quesada E. Aspectos relevantes del marcador molecular Hcp100 de Histoplasma capsulatum y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(3):115-119. doi:10.1016/j.riam.2011.09.001
- 17.** Hennigar SR, McClung JP. Nutritional immunity: Starving pathogens of trace minerals: Starving pathogens of trace minerals. *Am J Lifestyle Med.* 2016;10(3):170-173. doi:10.1177/1559827616629117
- 18.** Ray SC, Rappleye CA. Flying under the radar: Histoplasma capsulatum avoidance of innate immune recognition. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;89:91-98. doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.009
- 19.** Shen Q, Rappleye CA. Differentiation of the fungus Histoplasma capsulatum into a pathogen of phagocytes. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:1-7. doi:10.1016/j.mib.2017.10.003
- 20.** Bialek R, Feucht A, Aepinus C, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of Histoplasma capsulatum DNA in human tissue. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1644-1647. doi:10.1128/JCM.40.5.1644-1647.2002

21. Damasceno LS, Vite-Garín T, Ramírez JA, et al. Mixed infection by *Histoplasma capsulatum* isolates with different mating types in Brazilian AIDS-patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61. doi:10.1590/s1678-9946201961008