

## Artículo original

# Dosis mínima infectante de la fase micelial de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, en ratones Balb/c

Joel Torres\*, Hilda Romero

Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido 14 de febrero de 2011; aceptado 30 de noviembre de 2011

**Resumen:** El objetivo fue determinar la dosis mínima infectante (DMI) de *Histoplasma capsulatum* mediante inoculación de la fase micelial en ratones Balb/c, con el propósito de aportar alternativas útiles para el futuro uso de inóculos fúngicos que faciliten la reproducción de la enfermedad. Se prepararon inóculos de 50, 75 y 94% de transmitancia (T) provenientes de la mezcla de suspensiones estandarizadas de cinco aislamientos del hongo y a cada inóculo se le determinaron las unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL). Se inyectaron, intraperitonealmente, 100  $\mu$ L de cada inóculo a tres grupos de 10 ratones, identificados como G2, G3 y G4, respectivamente. Se incluyó otro grupo como control sano (G1) y se observaron durante 15 días. La enfermedad se comprobó mediante la observación de los ratones, estudios histopatológicos y micológicos. La DMI fue de 50% T ( $7,5 \times 10^4$  UFC/mL), seleccionada en función de la presencia de hepatoesplenomegalia, nódulos en hígado y/o bazo y el porcentaje de recuperación del hongo en los subcultivos. Los resultados demostraron la reproducción de la enfermedad, con ausencia de muertes en el transcurso de 15 días de observación.

**Palabras clave:** *Histoplasma capsulatum*, histoplasmosis, dosis mínima infectante, infección experimental.

## Minimal infective dose of the mycelium phase of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Balb/c mice

**Abstract:** The objective was to determine the *Histoplasma capsulatum* minimal infective dose (MID) by the inoculation of the mycelium phase in Balb/c mice, with the purpose of contributing useful alternatives for the future application of fungal inoculums which facilitate the reproduction of the disease. Several inoculums with 50, 75 and 94% transmittance (T) were prepared with a mixture of standardized suspensions from five isolations of the fungus, determining colony forming units/ml (CFU/mL) for each inoculum. Three groups of 10 mice each, identified as G2, G3 and G4, were injected intraperitoneally with 100  $\mu$ l of each inoculum. Another group (G1) was included as healthy control. All mice were observed during 15 days. The disease was determined by observation of the animals, and by histopathological and mycological examinations. The MID was 50% T ( $17.5 \times 10^4$  CFU/mL) selected on basis of the presence of hepatosplenomegaly, nodules in liver and/or spleen, and the percentage of recovery of fungi from subcultures. The results showed the reproduction of the disease in absence of deaths during the 15-day observation period.

**Keywords:** *Histoplasma capsulatum*, histoplasmosis, minimal infective dose, experimental infection.

\* Correspondencia:  
E-mail: joeltorr@yahoo.es

### Introducción

La histoplasmosis americana es una enfermedad granulomatosa sistémica considerada como la micosis respiratoria más frecuente del mundo, y en Venezuela ocupa el primer lugar. Es causada por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, (*H.capsulatum*), hongo dimorfo, cosmopolita. Su hábitat se encuentra en suelos con pH ácido y alto contenido de nitrógeno, el cual está relacionado con la presencia de excretas de pájaros y murciélagos, la

temperatura entre 22-29 °C y la humedad relativa de 67 a 87% o más con precipitación anual aproximada de 1.000 mm, factores esenciales para su crecimiento y desarrollo en el ambiente [1-7].

La fase levaduriforme (parasitaria) se desarrolla en el interior de las células del sistema macrofágico mononuclear y en cultivos incubados a 37 °C, caracterizándose por el desarrollo de levaduras ovales y gemantes de 2 a 4  $\mu$ m de diámetro [5]. La fase micelial (saprófita) se encuentra en la tierra o en cultivos obtenidos de muestras de suelo o de

pacientes, incubados a temperaturas inferiores a 35 °C y presentan un micelio aéreo, algodonoso, blanco o parduzco con producción de macroconidias erizadas o tuberculadas, ovals o piriformes, de naturaleza polisacárida de 10 a 25 µm de diámetro y microconidias de tipo aleuria, piriformes, con pared fina, lisa o ligeramente rugosa de 2 a 5 µm de diámetro [1,4,7,8]. Este hongo pertenece al grupo 3 de riesgo biológico, por lo que su manipulación debe realizarse en laboratorios de seguridad tipo 3 y tomando en cuenta las medidas de bioseguridad recomendadas para tal fin [9-11].

La infección natural se produce cuando el individuo inhala las microconidias (fase infectante), las cuales se alojan dentro del espacio alveolar, donde brotan, para luego ser fagocitadas por los neutrófilos y macrófagos por vía de los receptores CD11/CD18, ocurriendo la mayor parte de la conversión a la fase levaduriforme en el interior de estas células [4,12,13].

En la mayoría de las investigaciones se ha utilizado la fase levaduriforme de *H. capsulatum* con el propósito de estudiar el desarrollo de la histoplasmosis, su histopatología, la respuesta inmunitaria y la susceptibilidad a los antifúngicos y, aunque la inoculación experimental se puede realizar con cualquiera de las dos fases, son escasos los estudios reportados en los que la fase micelial del hongo se haya empleado, así como la determinación de la dosis mínima infectante (DMI) [7,14-16]. Mantener la fase levaduriforme de este hongo para realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* es engorroso, ya que se requiere de nutrientes y condiciones especiales, que no se encuentran disponibles en muchos laboratorios de bajos recursos y, por otra parte, el tiempo requerido para lograr la conversión es relativamente largo (3-4 semanas) [1]. Disponer de inóculos fúngicos estandarizados es un requisito fundamental para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de la investigación así como para establecer proyecciones y comparaciones con situaciones reales. Es por ello que en el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la dosis mínima infectante de la fase micelial de *Histoplasma capsulatum*, con el propósito de aportar alternativas útiles para su aplicación sistemática en futuros ensayos *in vivo*.

## Materiales y métodos

**Aislamientos:** Se utilizaron 5 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, identificadas siguiendo la metodología convencional, según las características macro y microscópicas de los cultivos y se mantuvieron en agar Mycosel™, a temperatura ambiente (TA) hasta el momento del ensayo [1].

**Inóculos fúngicos:** De cada aislamiento se prepararon suspensiones fúngicas estandarizadas, según la metodología descrita previamente [17,18]: un trozo del cultivo fúngico se transfirió a una fiola que contenía 30 mL del medio caldo Sabouraud dextrosa y se incubó a TA durante tres días con agitación a 80 rpm. Luego se realizaron dos subcultivos con intervalos de tres días, en las condiciones

ya descritas. El último subcultivo se homogeneizó al quinto día, correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento, con un homogeneizador de tejidos IKA-WERK y se diluyó lo suficiente, con solución salina fisiológica estéril, hasta obtener turbiedades equivalentes a 50, 75 y 94% de transmitancia (T), usando un Spectronic 20. Cada inóculo (de 50, 75 y 94% T) estuvo constituido por la mezcla de las suspensiones fúngicas estandarizadas correspondientes a cada aislamiento. A estos inóculos se les determinaron las unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL), por duplicado, según la técnica de agotamiento por estría [19]. Para controlar la pureza, una alícuota de cada inóculo se cultivó en agar Sabouraud dextrosa (ASD) en tubos y se incubó a TA durante 30 días.

**Inoculación experimental:** Se emplearon 40 ratones Balb/c machos, adultos, de 27,5 g de peso promedio, mantenidos en el bioterio del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la UCV, con agua y comida *ad libitum* y cumpliendo con las normas internacionales de las buenas prácticas de laboratorio y del cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por la Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) y las normas de bioética del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología [20,21]. Los ratones fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno e identificados como G1 (control sano), G2, G3 y G4. La inoculación experimental se llevó a cabo por vía intraperitoneal, inoculando 100 µL de las suspensiones estandarizadas de 50, 75 y 94% T a los G2, G3 y G4, respectivamente. Se realizaron observaciones interdiarias para registrar el peso corporal, el aspecto físico y la aparición de lesiones durante 15 días. La instalación de la enfermedad se evaluó mediante la observación de los ratones y los estudios histopatológico y micológico [14].

**Estudio histopatológico y micológico:** Todos los animales fueron anestesiados con éter etílico y sacrificados 15 días posteriores a la inoculación del hongo. Durante la necropsia, se observaron los órganos internos en búsqueda de microabscesos; se extrajeron el hígado y el bazo, y se tomó una porción de cada uno de ellos para fijarlos en formaldehído y realizar cortes histológicos, los cuales se colorearon con Grocott y hematoxilina-eosina (HE), con el fin de registrar el patrón histopatológico de las lesiones. La porción restante, se cortó en trozos pequeños, se sembró (por duplicado) en tubos con agar Mycosel™ y se incubaron a TA durante 30 días [14].

**Determinación de la Dosis Mínima Infectante (DMI):** La DMI se seleccionó en función de las observaciones macroscópicas de los órganos (presencia de abscesos y hepatoesplenomegalia), los datos histopatológicos (tinción de Grocott y HE) y el estudio micológico (mayor porcentaje de recuperación del hongo en los subcultivos de los órganos de cada ratón, en agar Mycosel™).

**Análisis estadístico:** Para calcular la significancia estadística

ca entre el registro de los pesos antes y después de la inoculación, se utilizó la prueba de U-Mann-Whitney para datos no paramétricos con un nivel de significación de 0,05. Para conocer la diferencia estadística, entre el porcentaje de recuperación del hongo en los subcultivos de cada uno de los órganos provenientes de los ratones controles, y los ratones inoculados con las diferentes suspensiones fúngicas, se utilizaron la prueba de chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher con un nivel de significancia de 0,05, usando el paquete estadístico SPSS 11 bajo ambiente Windows.

## Resultados

La observación interdiaria de los animales durante los 15 días del ensayo, reveló alteraciones físicas de los ratones a partir del sexto día de inoculación. Los ratones del G2 presentaron abdomen híperextendido y tanto en éstos como en los del G3 se observó una ligera caída y opacidad del pelo y disminución de la actividad corporal; el G4 se mostró sin cambios evidentes, al igual que el control sano (G1). No hubo cambios significativos en el peso promedio de los grupos estudiados ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, no se registraron muertes durante el desarrollo de este protocolo (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación física de los grupos experimentales.

Grupo experimental	Peso promedio (g)	Aspecto y actividad corporal
G1	20,8	Apariencia normal.
G2	22,2	Pelaje ligeramente opaco y disminuido. Actividad motora disminuida, abdomen híperextendido, en comparación con control sano.
G3	23,6	Pelaje ligeramente opaco y disminuido. Actividad motora disminuida, en comparación al control sano.
G4	25,2	Sin cambios evidentes.

La observación macroscópica de los órganos evidenció hepatoesplenomegalia (HEM) moderada con presencia de microabscesos hepáticos en el G2; los G3 y G4 desarrollaron HEM leve con oscurecimiento del hígado y del bazo y ausencia de lesiones. En el G1 no se observaron alteraciones de los órganos. Con la coloración de HE, en todos los grupos, a excepción del G1, se evidenció en el hígado, degeneración grasa marcada, infiltrado linfoplasmocitario y respuesta gigantomocelular, además de necrosis con patrón zonal periácinar. En el bazo se observó hiperplasia de células endoteliales, depleción linfoide folicular central y mielopoyesis extramedular. La aparición de las lesiones fue proporcional al tamaño del inóculo (Figura 1). La coloración de Grocott fue positiva en hígado y bazo para los G2, G3 y G4, revelando la presencia de levaduras intracelulares, pequeñas, ovaladas, unigemantes en algunos casos. El grupo control sano (G1) permaneció sin alteraciones histológicas

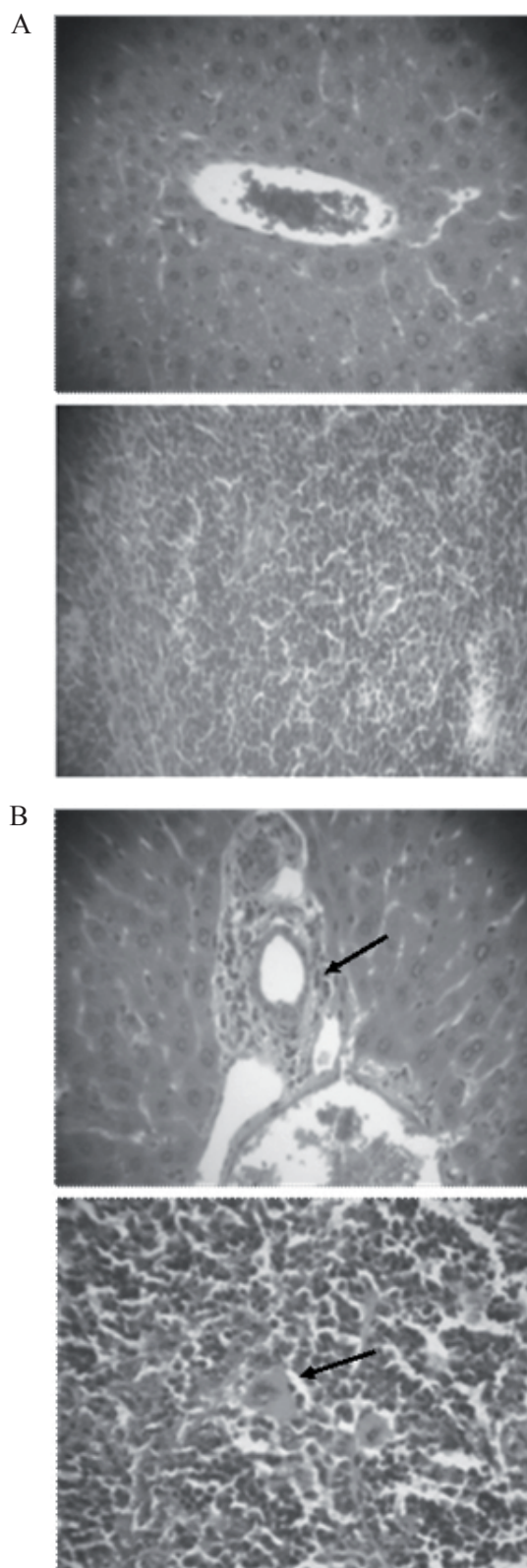


Figura 1. Coloración de HE, mostrando infiltrado linfoplasmocitario y respuesta gigantomocelular, con necrosis de patrón zonal periácinar, en hígado (arriba) y bazo (abajo). Panel A: control sano. Panel B: G2.

evidentes.

De los subcultivos en agar Mycosel™, se aisló *H. capsulatum* en un 30 y 20% de ambos órganos del G3 y



G4; en el G2, la recuperación del hongo fue de 70% en hígado y 100% en bazo, como se observa en la figura 2. Los subcultivos del hígado y bazo de los controles sanos fueron negativos hasta seis semanas después de la siembra en agar Mycosel™. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de recuperación del hongo en los medios de cultivo, en el hígado y bazo en todos los grupos ( $p < 0,05$ ). La prueba exacta de Fisher evidenció que los G3 y G4 se comportaron igual que el G1 ( $p > 0,05$ ), mientras que el G2 mostró diferencia en el porcentaje de recuperación del hongo en ambos órganos, al compararlo con el G1 ( $p < 0,05$ ).

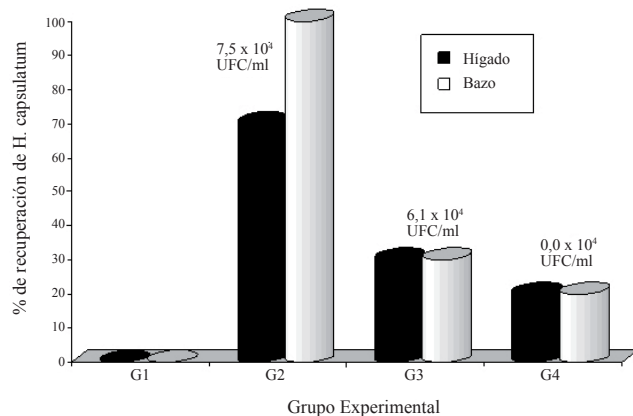


Figura 2. Recuperación de *H. capsulatum*, en agar Mycosel™, según grupo experimental. Control G1: 0% T; G2: 50% T; G3: 75% T; G4: 94% T.

## Discusión

La inoculación experimental es una práctica realizada desde la antigüedad con la finalidad de reproducir el desarrollo natural de las enfermedades, su etiopatología y los mecanismos naturales o artificiales que contribuyen a su reversión [22-25]. En el caso de las micosis, la histoplasmosis experimental es un recurso utilizado con el fin de investigar diversos aspectos, como la respuesta a los antifúngicos y estudios inmunológicos, entre otros. Para ello se han empleado protocolos que incluyen diferentes modelos de animales, vías de inoculación, tamaño del inóculo y en el que la constante ha sido el uso de la fase levaduriforme de *H. capsulatum*, siendo esta la forma parasitaria y con la cual se obtiene una mayor aproximación a las presentadas en el ser humano [22,23,26-32]. No obstante, la utilización de la fase filamentosa para realizar estudios *in vivo*, no debe ser descartada, puesto que es conocido que ambas fases pueden ser usadas indistintamente [7].

En este sentido, son escasas las publicaciones referentes a la preparación de inóculos usando la fase filamentosa de hongos dimórficos, relacionadas, en su mayoría, con la investigación de la respuesta a los antifúngicos; entre ellas se destacan, la realizada en 1994 con *Coccidioides immitis* en estudios *in vivo* e *in vitro* [14]; en el 2004 y 2011 con *H. capsulatum*, en ensayos *in vitro* empleando el método de macrodilución en caldo [18,33] y en el 2006 con este mismo hongo aplicando la técnica de difusión en discos y

pozos [15].

En el presente trabajo, cada uno de los cinco aislamientos se procesó en la fase logarítmica de crecimiento, similar a lo reportado anteriormente en ensayos de susceptibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* [15,18,33] y para obtener el inóculo fúngico, el procedimiento consistió en utilizar una mezcla de las suspensiones estandarizadas de estos aislamientos, con el propósito de reducir el riesgo de variaciones individuales en la virulencia de los aislados, coincidiendo con un reporte previo en estudios de susceptibilidad en ratones Balb/c, con cuatro cepas de *H. capsulatum*, solo que los autores emplearon la fase levaduriforme de este hongo [32].

Un hallazgo interesante de resaltar fue la ausencia de muertes durante el desarrollo del ensayo, lo cual concuerda con un trabajo preliminar, no publicado, en el que se siguió el mismo procedimiento usando otra cepa de ratones (NMRI-IVIC) y concentraciones del inóculo más elevadas [34]; este hecho quizás se deba a la morfología de crecimiento del hongo, la vía de inoculación, o que la virulencia fúngica se atenuó como consecuencia del procedimiento seguido para la obtención del inóculo. Observamos que la utilización de la fase filamentosa de *H. capsulatum* para ensayos *in vivo*, permite la manipulación de los animales de experimentación sin que se produzcan muertes antes de finalizar el ensayo, a diferencia de trabajar con la fase levaduriforme de este hongo.

En conclusión, los resultados obtenidos de la observación de los grupos experimentales, así como de los datos del estudio histopatológico, demostraron un predominio de evidencias de infección por *H. capsulatum* en el G2 (inóculo fúngico de 50% T), confirmado por el elevado porcentaje de recuperación del hongo en los subcultivos de hígado y bazo de este grupo (70 y 100% respectivamente); la DMI escogida fue de  $7,5 \times 10^4$  UFC/ml, correspondiente a 50% T (Tabla 2). Se recomienda la inclusión de este protocolo de manera sistemática para ensayos *in vivo* con *H. capsulatum* en fase micelial.

Tabla 2. Dosis mínima infectante. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) correspondientes a cada inóculo fúngico.

Grupo experimental	Inóculo (%T)	Volumen (μL)	UFC/ml
G2	50	100	$7,5 \times 10^4$
G3	75	100	$6,1 \times 10^4$
G4	94	100	$0,0 \times 10^4$

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su sincera gratitud a los doctores Apitz-Castro y Axel Santiago, al personal docente activo de la Cátedra de Micología, a las profesoras Yacelli Bustamante y Rosaria Ruggiero, de la Cátedra de Matemática y Estadística de la Escuela de Bioanálisis de la UCV y al Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, por su colaboración en la realización

de esta investigación. Trabajo financiado por el proyecto CDCH-UCV PI N° 0900-7119-2008.

## Referencias

- Arenas R. Histoplasmosis. En: Arenas R, editor. Micología Médica. 2ª ed. México: Editorial Interamericana McGraw-Hill; 2003. p.163-71
- Grupos de Trabajo en Micología. Casuística de las micosis profundas 1984-2008. 24 años de historia. Bol Inform Las Micosis en Venezuela. 2009; 42: 10-3.
- Mayayo AE. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 1-9.
- Restrepo A. Histoplasmosis. En: Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M y Botero D, editores. Enfermedades Infecciosas. 6º ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p.316-26.
- Reviákina V, Panizo M, Dolande M, Selgrad S. Diagnóstico de las micosis sistémicas durante 5 años 2002-2006. Rev Soc Venez Microbiol. 2007; 27: 112-9.
- Sánchez AM. Histoplasmosis, la micosis del viajero. Enf Inf Microbiol. 2009; 3: 111-6.
- Casas RG. *Histoplasma capsulati*. En: Casas Rincón G, editor. Micología general. Caracas: Ediciones de la Universidad Central de Venezuela; 1989. p.167-73.
- Berliner MD. Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*, macro and micro-morphology of the mycelial phase. Sabouraudia 1968; 6: 111-8.
- Borrell N, Mesquida X, Alomar P. Normas de Bioseguridad. Rev Iberoam Micol. 2001; 17: 1-13.
- Lara VH, Ayala NN, Rodríguez PC. Laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4: Investigación de patógenos peligrosos. Rev Mex Patol Clin. 2007; 54: 177-86.
- Bonifaz A. Histoplasmosis. En: Bonifaz A, editor. Micología Médica Básica. 3ª ed. México, D.F.: McGraw Hill; 2010. p. 241-58.
- Porta A, Maresca B. Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. Med Mycol. 2000; 38: 399-406.
- Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. Agents of Histoplasmosis. En: Ajello L, Harry RJ, editors. Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections. Vol. 4. Medical Mycology. Londres: Arnold; 1998. p.373-93.
- Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoeno sobre *Coccidioides immitis*. Rev Iberoam Micol. 1994; 11: 99-104.
- Torres J, Romero H, Apitz-Castro R. Susceptibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en discos y pozos. Rev Soc Ven Microbiol. 2006; 26: 42-7.
- Conant NF, Smith DT, Baker RD, Callaway JL. Histoplasmosis. En: Conant NF, Smith DT, Baker RD, Callaway JL, editors. Manual of Clinical Mycology. 3ª ed. Neisa-México: W.B. Saunders Company; 1971. p.218-73.
- Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Microsporium canis*. J Mycol Med. 2000; 10: 152-5.
- Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. *In vitro* inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. J Mycol Med. 2004; 14: 181-4.
- Sacsquispe CR, Ventura EG. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud; 2001.
- Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad, 3ª Ed, 2008. p.33-5.
- The care and management of laboratory and other research animals. Robert Hubrecht and James Kirkwood, editors. 8th ed. Wiley-Blackwell; 2010.
- Kaplan W, Kaufman L, McClure HM. Pathogenesis and immunological aspects of experimental histoplasmosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Infect Immun. 1972; 5: 847-53.
- Deepe G Jr., Gibbons RS, Smulian AG. *Histoplasma capsulatum* manifests preferential invasion of phagocytic subpopulations in murine lungs. J Leuk Biol. 2008; 84: 669-78.
- Thomas L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Tabora CP. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. Med Mycol. 2008; 46: 113-8.
- Marcia L, Maluf F, Takahachi G, Terezinha I, Svidzinski E, Xander P, Apitz-castro R, Ciomar A, Bersani A. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2008; 25: 163-66.
- Finquelievich J, Elías MR, Iovannitti C, Negroni R. Blood culture as a parameter of treatment effectiveness in experimental histoplasmosis of the hamster. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995; 37: 99-102.
- Finquelievich JL, Iovannitti C, Landaburu F, Raffin G, Sanjuan N, Elías CM, Negroni R. Disminución de la actividad antifúngica del fluconazol asociada a ibuprofeno y piroxicam en la histoplasmosis experimental del hámster (*Mesocricetus auratus*). Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 40-3.
- Kobayashi GS, Travis SJ, Medoff DG. Comparison of fluconazole and amphotericin B in treating histoplasmosis in immunosuppressed mice. Antimicrob Agents Chemother. 1987; 2005-6.
- Wayne B, Randall S. Studies on experimental murine histoplasmosis: host protection and cellular immunity. Can J Microbiol. 1983; 29: 102-7.
- Durkin MM, Connally P, Karini K, Wheat E, Schnizlein-Vick C, Allen S, Alves K, Tewari R, Keath E. Pathogenic differences between North American and Latin American strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in experimentally infected mice. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4307-73.
- Clemons K, Stevens D. Efficacy of the triazole D0870 in a murine model of systemic histoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 778-80.
- Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Pérez-Torres A, Curiel-Quesada E, Vargas-Mendoza C, Martínez-Rivera MA. Combined therapy with amphotericin B and caspofungin in an experimental model of disseminated histoplasmosis. Rev Invest Clin. 2009; 61: 4-10.
- Torres J, Romero H. Actividad antifúngica *in vitro* de ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Iberoam Micol. 2011; 28: 139-42.
- Torres JL. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* del compuesto ajoene (E,Z-4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno-9-oxido) sobre *Histoplasma capsulatum*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, mayo de 2003.