

2 Ej. No. 99



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE
ANTIGENOS EXTRAIDOS DE HONGOS
PRODUCTORES DE MICOSIS PROFUNDAS**

TESIS

**que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a :**

JOSE LUIS ROSAS DOMINGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PÁGS.
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	6
OBJETIVO DEL TRABAJO.	7
MATERIAL Y METODOS.	8
1. HONGOS.	8
2. MEDIOS DE CULTIVO.	8
3. CONDICIONES DE CULTIVO.	9
4. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO CRUDO.	9
5. AISLAMIENTO DEL COMPLEJO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA (CPP).	10
6. OBTENCIÓN DEL COMPLEJO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DESPROTEINIZADO (CPP-D).	10
- DIGESTIÓN CON PRONASA.	10
- TRATAMIENTO DE SEVAG.	11
7. MÉTODOS QUÍMICOS.	11
8. MÉTODOS ANALÍTICOS.	12
A) CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.	12
B) CROMATOGRAFÍA DE GASES.	13
C) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.	13
9. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.	16
RESULTADOS.	17
OBTENCIÓN DEL COMPLEJO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DESPROTEINIZADO (CPP-S).	17
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CPP-D.	17
ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA FRACCIÓN POLISACARÍDICA DE LOS CPP-D's.	18
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA FRACCIÓN POLISACARÍDICA DE LOS CPP-D's.	18

	PÁGS.
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.	19
ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DE LOS CPP-D's.	19
DISCUSION Y CONCLUSIONES.	21
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.	25
BIBLIOGRAFIA.	26

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Las micosis profundas causadas por hongos dimórficos están caracterizadas por la formación de lesiones granulomatosas. Se adquieren por la inhalación de esporas que producen un cuadro primario pulmonar a partir del cual pueden diseminarse a diferentes tejidos del cuerpo dependiendo de la afinidad específica de cada uno de los hongos (7). Entre ellas tenemos la histoplasmosis producida por *Histoplasma capsulatum*. Este hongo dimórfico tiene la característica de ser un parásito intracelular preferencial del sistema retículo endotelial donde se encuentra en forma de levaduras ovoides de 2-4 μ de diámetro (53). En su fase de vida libre micelilar, se encuentra en forma de macroconidias equinuladas, en un habitat muy particular, como por ejemplo el suelo con guano de murciélago, excretas de aves, etc., caracterizado por un alto contenido de nitrógeno y fósforo, que se encuentra en cuevas inexploradas, minas abandonadas, graneros y silos. Según estudios recientes, las áreas endémicas más importantes en México se encuentran en los estados de Querétaro, Hidalgo, Guerrero y con focos menores en Chiapas, Yucatán y Puebla (66).

Entre las otras micosis profundas, la blastomicosis norteamericana es producida por *Blastomyces dermatitidis*, también un hongo dimórfico. Las aleuriosporas ovoides de 2 a 10 μ de diámetro de la fase micelilar son los elementos infectantes que al penetrar en el huésped se transforman en levaduras de 8 a 15 μ de diámetro con un característico septo ancho de gemación simple. El habitat preciso de este hongo es desconocido, a pesar de que,

Denton y DiSalvo (12) aislaron el organismo de una muestra de suelo cerca de Augusta, Georgia, EE.UU. Sin embargo, bajo las mismas condiciones y en el mismo lugar no se ha podido aislar nuevamente. En México esta infección es bastante rara, con un solo caso reportado en la literatura (44) siendo, sin embargo, bastante frecuente en el vecino país del Norte.

La coccidioidomicosis, es asimismo otra micosis profunda del tracto respiratorio. Su agente etiológico *Coccidioides immitis*, en su fase micelial infectante de artrosporas, está asociado a un medio ambiente semiárido. Al penetrar por las vías respiratorias al huésped, se transforma en células esféricas con pared celular gruesa, que al madurar, se llenan de endosporas. Estas células son conocidas como esférulas (40-80 μ de diámetro). Es probablemente el más virulento de los hongos patógenos. Este hongo se aísla con frecuencia del suelo de las zonas endémicas. El suelo generalmente favorable tiene un alto contenido de material orgánico carbonizado y una alta concentración de sales, particularmente de CaSO_4 y boratos. Las áreas endémicas más importantes de esta enfermedad incluyen el suroeste de los Estados Unidos (Valle de San Joaquín) y el Norte de México (Sonora, Coahuila, Baja California, Chihuahua y Nuevo León), con focos menores en Centro y Sudamérica (53).

La paracoccidioidomicosis es otra enfermedad granulomatosa que produce una infección primaria pulmonar característica, a menudo asintomática, diseminándose a mucosas principalmente. Esta enfermedad se produce por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. La forma micelial infectante de este hongo es muy similar a las aleuriosporas sencillas de 2 a 10 μ de -

diámetro de *B. dermatitidis* que al penetrar al huésped toma la forma de levaduras multigemantes (timón de barco), típica de *P. brasiliensis*. Hasta ahora el habitat saprofitico y las asociaciones ecológicas del hongo no están completamente claras. Sin embargo, estudios recientes de pruebas cutáneas en grandes poblaciones y el aislamiento del organismo del suelo han comenzado a clarificar la ecología y la epidemiología de la enfermedad (53). Los casos de la enfermedad generalmente provienen de lugares con clima templado, de zonas boscosas y húmedas. Geográficamente la infección está restringida a las áreas del continente Sudamericano, incluyendo México y Centroamérica.

Debido a la alta incidencia de histoplasmosis y coccidioidomicosis en México, teniendo en cuenta la frecuencia de casos nuevos y conociendo además, la gravedad de estas enfermedades pulmonares, sobre todo en condiciones de mala nutrición en clases socioeconómicas bajas, así como en estados inmunosupresivos del huésped, es de fundamental importancia el diagnóstico preciso y temprano de estas enfermedades. En vista de la dificultad y largo tiempo requerido para el diagnóstico micológico, es necesaria la ayuda del diagnóstico serológico de estas micosis profundas. Para ello, se requiere de antígenos específicos, con buen grado de reactividad, y de fácil obtención que puedan ser utilizados en todos los laboratorios de serodiagnóstico fúngico.

La composición química de la pared celular de estos hongos dimórficos muestran ciertas similitudes y diferencias entre ellos, en particular entre sus fases micelial y levaduriforme. Tenemos, por ejemplo, que la pared ce-

lular de *H. capsulatum* en su fase levaduriforme está compuesta en su mayor parte por hexosas, N-acetil glucosamina, aminoácidos y β glucanas (50) y - en su fase micelilar por los mismos componentes sólo que en diferentes concentraciones (16). Para *B. dermatitidis*, Domer (17) encuentra esencialmente α glucanas en la fase levaduriforme, además de hexosas y N-acetil glucosamina, del mismo modo que en *Histoplasma* los componentes de ambas fases difieren fundamentalmente en cuanto a sus concentraciones. En *P. brasiliensis*, también se encuentran los mismos componentes de hexosas, aminoazúcares, aminoácidos y lípidos (35, 55, 56), siguiendo el mismo patrón que las cepas anteriores o sea variando la concentración de los componentes dependiendo de la fase en que se encuentre el hongo. Kanetsuna *et al* (35) encuentran - asimismo una diferencia entre las dos fases de *P. brasiliensis* o sea que la fase levaduriforme de este hongo, presenta α glucanas principalmente y en la fase micelilar, β glucanas, de modo similar al encontrado en *B. dermatitidis*.

A diferencia de estos tres hongos encontramos que en *C. immitis* además de las hexosas presentes en las cepas anteriores, presenta una diferencia - cualitativa por la presencia de un azúcar raro en hongos, la 3-O-metil manosa detectado tanto en la pared celular de las artrosporas (7%) y micelio -- (3.5%) como en la pared de las esférulas (8%) (68, 69).

Por lo anteriormente expuesto, se observa que la pared celular de estos hongos presentan tanto similitudes como diferencias, sobre todo en cuanto a concentraciones de componentes, y quizá de estructura (rearreglo espacial) destacándose en *C. immitis* la presencia de un azúcar diferente de los

otros. Esto nos sugiere que estas mismas diferencias y similitudes podemos encontrarlas en los antígenos obtenidos en el laboratorio.

Por otro lado, Kashkin (38), en 1978, realizó un estudio inmunológico comparativo de diferentes antígenos de hongos causantes de micosis profundas, encontrando que independientemente de los métodos de obtención de los antígenos, todos los preparados antigénicos contenían proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. El contenido relativo de estos componentes variaba, dependiendo del método de preparación del antígeno y de la especie del hongo. De ahí, que no haya encontrado características inmunológicas particulares.

Esta misma composición polisacáridica de los antígenos de hongos dimórficos es descrita por otros autores como Markowitz (43), que en *H. capsulatum* aísla fracciones de mezclas de polisacáridos con actividad serológica. Asimismo Bradley (1974) (3) encuentra que los antígenos H y M de este mismo hongo, los cuales están constituidos fundamentalmente de proteína presentan un mínimo componente polisacáridico que contiene principalmente galactosa, glucosa, manosa y hexosaminas, con la manosa como azúcar predominante. En otro estudio sobre *H. capsulatum* (63) fue aislado un complejo polisacárido-proteína con muy buena especificidad en inmunodifusión en gel, observando que por la acción de la enzima β -glucosidasa hubo pérdida de actividad en la inmunodifusión, en tanto que con calor y una enzima proteolítica, pronasa, no se alteró la actividad del antígeno, sugiriendo que la especificidad de éste reside en la fracción polisacárida.

En *B. dermatitidis*, Cox (9) obtiene un antígeno polisacárido-proteína de la pared celular en donde el azúcar está representado por galactosa, manosa y glucosa.

Por último, podemos citar a Azuma *et al* (1) quienes aislan galactomananas, serológicamente activas, de *H. capsulatum*, *H. duboisii*, *P. brasiliensis* y *B. dermatitidis*. Sin embargo, al ensayarlos en distintas pruebas inmunológicas, comprueban que son antígenos comunes de todos estos hongos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los resultados de los distintos trabajos sobre los antígenos mencionados nos llevan a distintas consideraciones: a) Que la especificidad inmune en los hongos citados no parece estar dada ni por la molécula polisacárido representada por algunos tipos de galactomananas, ni por la molécula proteínica aislada (1); b) Podría ser que el reconocimiento inmune se estableciera más finamente hacia la intimidad de complejos moleculares con una parte polisacáridica y otra proteínica, tan frecuentes en los hongos (54, 63, 64, - 51), ya que no existe gran variabilidad en cuanto a componentes identificados. A nuestro ver la interacción polisacárido-proteína está sujeta a variaciones en su arreglo espacial según cada hongo y cada fase y serían estas variaciones las que podrían proveer la máxima especificidad de cada microorganismo. Hasta que se puedan comprobar los planteamientos anteriores, el camino a seguir, sería encontrar un método que mostrase la existencia o no de algún componente particular de cada hongo, a nivel del reconocimiento inmunológico.

Debido a las dificultades de aislamiento y caracterización de sustancias antigénicas de hongos, se plantea la necesidad de evidenciar la existencia de los componentes particulares para cada una de estas cuatro especies fúngicas, a través de un estudio de la caracterización bioquímica de complejos polisacárido-proteína (CPP) extraídos de cada uno de ellos (51, - 63, 64).

Esta caracterización bioquímica se ha enfocado inicialmente a la fracción polisacáridica de la molécula del antígeno ya que se ha demostrado en diversos trabajos que la composición química de la pared celular de estos hongos está compuesta por un alto porcentaje de carbohidratos (16, 17, 22, 35, 47, 68, 69) lo que derivaría también a tener una gran cantidad en el antígeno extraído, ya que el CPP estudiado es obtenido de un filtrado miceliar del hongo, donde estarían disueltos probablemente los principales componentes de la pared fúngica. Posteriormente se analizaría la fracción proteica de la molécula.

La caracterización bioquímica de los CPP-D's nos podría indicar las semejanzas y diferencias que existen en la fracción polisacárida del complejo así como de la fracción proteica y nos ayudaría a establecer una mejor diferenciación e identificación de los antígenos de cada uno de los hongos productores de micosis profundas.

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

1. Aislar y caracterizar sustancias antigénicas de *H. capsulatum*, -- *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis* y *C. immitis* con el propósito de hacer diagnóstico diferencial entre ellos.
2. Establecer diferencias y semejanzas en cuanto a la composición bioquímica de los antígenos de hongos que desarrollan reactividad cruzada y que dificultan un diagnóstico preciso.
3. Evidenciar la presencia de componentes específicos para cada uno de los hongos estudiados.

MATERIAL Y METODOS

1) HONGOS.

Los hongos utilizados para la obtención de antígenos fueron *Histoplasma capsulatum*, cepas 5026, 5005 y 5027, *Blastomyces dermatitidis*, cepas - - 5504 y 5501, *Coccidioides immitis*, cepas 49 y 5221 y *Paracoccidioides brasiliensis* cepa Aurelio. Estas cepas proceden del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) y provienen de casos humanos de histoplasmosis, blastomycosis, coccidioidomycosis y paracoccidioidomycosis.

2) MEDIOS DE CULTIVO.

Se utilizaron diferentes medios de cultivo, tanto para el mantenimiento de las cepas de hongos como para la producción de antígenos. Entre ellos están:

a) Medio de Sabouraud (BIOXON) con antibióticos. Utilizado para el -- mantenimiento de las cepas.

- Dextrosa	20 g
- Peptona de caseína y carne	10 g
- Cicloheximida	50 mg
- Cloranfenicol	500 mg
- Agar	15 g
- Agua c.s.p.	1 litro

b) Medio Smith. Utilizado para el cultivo de los hongos y la posterior obtención de antígenos.

- Citrato férrico (anhidro)	0.30 g
- Fosfato dibásico de potasio	1.31 g

- Citrato de sodio (anhidro) 0.90 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado 1.50 g
- Dextrosa (anhidra) 10.0 g
- Glicerina 25.0 ml
- Asparagina 14.0 g
- Cloruro de amonio (anhidro) 7.0 g
- Agua destilada c.s.p. 1 litro
- Ajustar pH a 7.2-7.4

3) *CONDICIONES DE CULTIVO.*

Se procedió a la siembra del hongo en medio de Smith y se incubó de -- 3-6 meses a temperatura ambiente para desarrollar la fase micelial del hongo. Después del tiempo descrito de incubación se mataron las cepas con una solución de formaldehído al 10% durante 1 semana. Antes del procesamiento para la obtención del antígeno se hizo una prueba de viabilidad de los microorganismos.

4) *OBTENCION DEL ANTIGENO CRUDO.*

Después de muertas la cepas, se separó la masa micelial por medio de filtración en papel Whatman Nº 3 adaptado a un filtro de Buchner. El filtrado fué esterilizado por filtración con Millipore. Luego fué dializado 24 hr contra agua destilada cambiando el agua varias veces al día. Se procedió a su concentración (10 veces al volumen inicial) y se almacenó en -- congelación. Estos antígenos son llamados antígenos crudos (histoplasm--na, blastomicina, coccidioidina y paracoccidioidina).

5) AISLAMIENTO DEL COMPLEJO POLISACARIDO-PROTEINA (CPP).

A partir del filtrado de los cultivos anteriormente descritos, los CPP's de los hongos estudiados fueron obtenidos utilizando la técnica de Kirby (39), adaptada por Bonilla y Soto (2) modificada por Taylor y Bojalil (63) de la siguiente manera: Por cada 10 g de filtrado se añadieron 15 ml de fe nol líquido. Se incubaron a 56°C por una hora agitando repetidas veces. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 500 g durante 15 minutos. La fase acuosa se separó cuidadosamente y se mezcló con 3 volúmenes de alcohol etílico al 95%. Esta mezcla se dejó a 4°C toda la noche. El precipitado formado se separó por centrifugación a 500 g por 15 minutos.

El precipitado obtenido se disolvió en agua destilada y se le agregó nuevamente etanol al 95%. Esto se repitió tres veces. Por último, el precipitado disuelto en agua se mantuvo en congelación para su posterior desproteínización.

6) OBTENCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO-PROTEINA DESPROTEINIZADO (CPP-D). (Fig. 1).

Se procedió a tratamientos de desproteínización de los CPP's, con pronasa (23, 64) y Sevag (59) para la obtención de los complejos polisacáridos-proteína desproteínizados (CPP-D's). En primer lugar se utilizó la digestión con pronasa y en seguida se procedió con el tratamiento de Sevag para eliminar asimismo cualquier residuo de pronasa que hubiere quedado.

Digestión de pronasa. La digestión de los CPP's con pronasa se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: Solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, 37°C, pH 7.5 durante una semana. La proteína se trató con la enzima en una proporción de 100:0.5 ó 100:1. La digestión se realizó en pre-

sencia de CaCl_2 0.05 M, MgSO_4 0.03 M y dos gotas de tolueno para evitar la contaminación. Se incluyó en el proceso un control de albúmina bovina incubada bajo las mismas condiciones con pronasa; además se incluyó un blanco que contenía todos los componentes usados menos el sustrato. La enzima se añadió diariamente a los sustratos agregando cada día la mitad de la cantidad usada el día anterior. Los aminoácidos liberados durante la digestión se determinaron al inicio y al final del tratamiento enzimático - - - - - por medio de la prueba de la ninhidrina (34) usando lisina como testigo.

Método de Sevag (59). El reactivo de Sevag está compuesto de butanol Q.P. 1 parte y cloroformo Q.P. 9 partes. El material utilizado debe estar cuidadosamente lavado con mezcla crómica. Se mezclaron partes iguales del reactivo de Sevag y de la muestra por desproteínizar (CPP). Se separó en frío la fase cloroformo-butanol de la fase acuosa por medio de un embudo de separación. La extracción se repitió de 5 a 10 veces, teniendo la precaución de lavar 2 ó 3 veces con agua, las fases cloroformo-butanol. Las fases acuosas recuperadas se dializaron contra agua destilada durante 24 hr cambiando el agua 4 ó 5 veces. El CPP-D obtenido se liofilizó y se conservó a 4°C.

7) METODOS QUIMICOS UTILIZADOS.

A todos los CPP-D's obtenidos se les determinaron las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Las proteínas por el método de Lowry (42), los carbohidratos por el método del fenol-sulfúrico (18) y los ácidos nucleicos por los métodos de la p-nitrofenil-hidrazina para ADN (67) y del orcinol para el ARN (67).

8) *MÉTODOS ANALÍTICOS.*

Previo al análisis de los componentes de la fracción polisacáridica de los CCP-D's, se procedió a la hidrólisis de la muestra con HCl 8 N durante 4 hr a 100°C. Los hidrolizados fueron neutralizados en desecador con lentejas de KOH al vacío. Las muestras nunca excedieron de 5 mg/ml.

a) *Cromatografía en capa fina (49, 62).*

Los hidrolizados de los CPP-D's fueron sometidos a una cromatografía en capa fina bidimensional en cromatofolios de 10 x 10 cm (Merck). Se utilizó como solvente 1:

- Buffer de fosfatos pH 5.0, 0.1 M, (10 vol)
- Acetona (50 vol)
- Butanol (40 vol)

y como solvente 2:

- Acetato de etilo (12 vol)
- Acido acético (3 vol)
- Metanol (3 vol)
- Agua (2 vol)

Para revelar las placas se utilizó el ftalato de anilina en aerosol (Merck). Luego de la aplicación de la muestra en la placa (25 µl conteniendo entre 25 y 100 µg de azúcar) se dejó correr en el solvente 1 hasta un centímetro antes del borde final de la placa. Se sacó de la cámara y se puso a secar en la estufa por diez minutos. Se repitió el proceso dos veces más. Se giró la placa 90° para introducirla en el solvente 2, y se dejó correr de idéntica manera que con el solvente 1. Al mismo tiempo que las muestras se corrieron testigos de una solución de glucosa, galactosa y manosa (20 mg/100 ml de alcohol isopropílico). Hecho lo anterior se procedió

a revelar las placas rociándolas uniformemente con el revelador. Luego se secaron en la estufa a 85°C por 20 minutos.

b) *Cromatografía de gases* (21, 32, 41).

Para la cromatografía de gases, se utilizó una muestra de CPP-D conteniendo de 100-150 μ g de azúcares totales más 50 μ g de m-inositol. Se liofilizó. Luego se hidrolizó 24 hr a 80°C con metanol y HCl, secando bajo nitrógeno. Se introdujeron 150 μ l de CH_2Cl_2 más 150 μ l de trifluoruro acético anhidro. Se procedió a calentar dos veces por 5 minutos a 150°C en un baño de arena, enfriando con agua entre cada calentamiento. Debe asegurarse --- que siempre haya líquido cuando esté a 150°C. Se enfrió en el congelador y la muestra se inyectó en la columna de silicón OV 210 al 5%. La temperatura se llevó de 110°C a 230°C aumentando 2°C por minuto. El gas de arrastre usado fue el N_2 con un flujo de 7.5 ml N_2 /minuto. El análisis se realizó por medio de un Cromatógrafo de Gases PERKIN ELMER Mod. SIGMA 3B 1117V - 60H2.

c) *Electroforesis en geles de poliacrilamida* (8, 45, 52).

Para poder observar la pureza de los CPP-D's se procedió a la electroforesis en geles de poliacrilamida. Para la polimerización de los geles de acrilamida se utilizaron las soluciones siguientes:

Solución A (Buffer).

- HCl 1N 48 ml
- Tris base (Merck) 36.6 g
- TEMED (N,N,N',N', tetrametiletildiamina, Merck) 0.23 ml
- H_2O c.s.p. 100 ml
- pH= 8.9

Solución B (Acrilamida).

- Acrilamida 20 g
- Bis-acrilamida 0.525 g
- H₂O c.s.p. 100 ml

Solución C (Catalizador). Se prepara a la hora de usar.

- Persulfato de amonio 0.14 g
- H₂O c.s.p. 100 ml

Solución 1.

- Solución A..... 10 ml
- Solución B..... 20 ml
- Agua..... 10 ml

Buffer de glicina.

- Tris (base)..... 6 g
- Glicina..... 28 g
- Agua c.s.p..... 500 ml
- pH= 8.3. En el momento de uso se diluyó 1:2. Se almacenó en el refrigerador.

Se desarrolló una cinética de corrimiento con diferentes concentraciones de acrilamida (5, 6, 6.5, 7 y 15%), escogiéndose la del 6.5% con la que se obtuvo la mejor resolución de las muestras. Al mismo tiempo que las - - muestras, se usaron un suero y albúmina sérica bovina como controles. Para el corrimiento se mezcló un volumen de solución 1 con un volumen de solución C y se distribuyeron en tubos de 10 cm de largo por 4 cm de diámetro, llenándolas hasta 1 cm del borde superior del tubo. Luego se le agregó 0.1 ml de agua en la parte superior del gel y se dejó polimerisar por 1 hr hasta la gelificación. Ya gelificados los tubos, se montaron en el aparato para electroforesis y se dejaron correr sin la muestra con un buffer de glicina

na a 2 mA por tubo durante 20 minutos. Se aplicó entonces la muestra con una cantidad de 10 a 50 μ g de proteína en un volumen de 0.1 ml, o sea, 0.09 ml de una solución de 5 mg/ml de los CPP-D's con 0.01 ml de glicerina para volverla más densa. Se corrió 5 min a un mA por tubo eliminando la muestra restante y siguiendo la electroforesis por 180 min a 2 mA por tubo con un voltaje total de 80-100 V. Por último, después de la electroforesis, los tubos se tiñeron con negro de amido Schwarz para proteína y con la técnica de ácido peryódico de Schiff (PAS) para carbohidratos. Como el control de corrimiento se utilizó un gel con una muestra de albúmina con colorante de amido black.

Técnica de coloración con Amido Schwarz.

Solución del colorante:

- Amido black (1 g en ácido acético al 7%) c.s.p. 100 ml

Solución para decolorar:

- Acido acético al 7%.

Los geles extraídos de los tubos de electroforesis se introdujeron en la solución del colorante durante 30 min y posteriormente decolorados con varias lavadas del ácido acético al 7%.

Técnica de coloración con ácido peryódico de Schiff (PAS) para carbohidratos.

Soluciones:

1. Acido tricloroacético al 12.5%.
2. Acido peryódico (1 g en ácido acético al 3%) c.s.p. 100 ml.
3. Nitrato de plata 0.1 N.
4. Reactivo de Schiff.
5. Metabisulfito de sodio al 0.5%.

Los geles extraídos de los tubos de electroforesis se introdujeron en la solución de ácido tricloroacético al 12.5% durante 30 min. Posteriormente se lavaron ligeramente con agua destilada. Luego se sumergieron en la solución de ácido peryódico al 1% durante 50 minutos y lavados posteriormente en agua destilada para eliminar los iones de iodato, comprobándolo con la solución de nitrato de plata al 0.1 N, al no dar precipitado pardo. Habiendo eliminado el iodato se sumergieron en el reactivo de Schiff durante 50 minutos y se lavaron con la solución fresca de metabisulfito de sodio al 0.5% tres veces por 10 min. Por último se lavaron en agua destilada con frecuentes cambios hasta remover el exceso de colorante. Se conservaron en ácido acético al 3%.

9) METODOS INMUNOLOGICOS.

Se utilizó la inmunodifusión en gel de Ouchterlony (48) para determinar la actividad inmunológica de los antígenos. Esta se desarrolló empleando una mezcla de agarosa al 1.5% en veronal 0.039M pH 8.4 usando azida de sodio al 0.01% como preservador. Los pozos tenían un diámetro de 5 mm por 3 mm de distancia entre ellos.

RESULTADOS

OBTENCION DEL COMPLEJO POLISACARIDO-PROTEINA DESPROTEINIZADO (CPP-D).

Con el fin de desproteínizar el CPP para tratar de eliminar posibles fracciones proteicas, los CPP's obtenidos se sometieron a la acción enzimática con pronasa y a un tratamiento con Sevag (cloroformo-butanol). A pesar de los tratamientos enérgicos de desproteínización, los CPP-D' siguen conteniendo porcentajes variables de protefna (1.3-9.3%) en los diferentes hongos estudiados como podemos observar en la Fig. 2.

COMPOSICION QUIMICA DE LOS CPP-D.

El porcentaje de carbohidratos donde se obtuvo mayor variación fué -- con los CPP-D's de *C. immitis*, ya que en la cepa 5221 se obtuvo 86.2% mientras que en la otra cepa 47 estudiada se obtuvo apenas un 33.2%, lo que está de acuerdo con los porcentajes de carbohidratos de las cepas de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* utilizadas (Fig. 2). Esta variación no se observó con los CPP-D's de *H. capsulatum* donde los porcentajes de carbohidratos variaron nada más de 29.2 a 35.4% entre las tres cepas analizadas.

La concentración de protefnas en los CPP-D's varió de 1.3 a 9.3% (Fig. 2), a pesar de los métodos de desproteínización realizados, como se dijo anteriormente. La relación de carbohidratos a protefnas (CHO/PROT) varió desde 3.8 en la cepa 5026 de *H. capsulatum* hasta 14.8 en la cepa Aurelio de -- *P. brasiliensis*. Las relaciones CHO/PROT más elevadas se presentaron en -- las cepas de *C. immitis* y *P. brasiliensis*, y las relaciones CHO/PROT más homogéneas se presentaron en la cepas de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*.

Se encuentran trazas de ácidos nucleicos (Fig. 2) posiblemente porque el método de extracción utilizado por glicoproteínas (39), también extrae ácidos nucleicos.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA FRACCIÓN POLISACARÍDICA DE LOS CPP-D's.

Al realizar el análisis cualitativo de los componentes de la fracción polisacáridica por cromatografía en capa fina, encontramos como puede verse en la Tabla 1, que en todos los hongos estudiados aparecieron como monómeros estructurales de los CPP-D's: glucosa, manosa y galactosa. Además se encontraron en las cepas de *H. capsulatum* y *C. immitis* otras manchas que pudieran corresponder a hexosaminas.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA FRACCIÓN POLISACARÍDICA DE LOS CPP-D's.

Por otro lado se realizó también el análisis cuantitativo de esta misma fracción polisacáridica usando la cromatografía de gases. Se encontró -- (Fig. 3) glucosa como azúcar más abundante en *C. immitis* y *B. dermatitidis* siendo la manosa predominante en *H. capsulatum*. El porcentaje de este azúcar varió de 43.2 en *H. capsulatum* a 52.7% en *B. dermatitidis*. El porcentaje de manosa encontrado en las tres cepas varió de 37.1 para *B. dermatitidis* a 54.0 en *H. capsulatum* donde resultó mayor que la glucosa. Por último se detectó un bajo porcentaje de galactosa, de 2.8 en *H. capsulatum* a 13.6 en *C. immitis*. Debido a que no se obtuvo suficiente crecimiento del hongo *P. brasiliensis*, la cantidad de CPP-D obtenido fue mínima, lo que ocasionó que al realizar la cromatografía de gases, no hubiera suficiente mate

rial para el análisis y sólo se pudo detectar como componente principal un azúcar de 5 carbonos (¿Pentosa?) además de los otros tres azúcares presentes en mucho menor porcentaje. Se necesitará una mayor cantidad de CPP-D para poder repetir esta cromatografía y verificar estos resultados con *P. brasiliensis*.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Para poder observar la pureza de los CPP-D's se procedió a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Antes de realizar este análisis con antígenos, se procedió a experimentar el mejor porcentaje de acrilamida, habiendo investigado con 5, 6, 6.5, 7 y 15%, y obtenido la mejor resolución de bandas con el 6.5%.

Se encontraron 3 bandas para el CPP-D de *H. capsulatum*, dos para *B. dermatitidis* y una para *C. immitis* (Fig. 4). Este análisis nos demuestra que el tratamiento de desproteínización sí elimina bastante proteína, puesto que sólo aparecen 1 a 2 bandas en cada CPP-D.

ANALISIS INMUNOLOGICO DE LOS CPP-D's.

Para poder visualizar el comportamiento inmune de los CPP-D's aislados, se realizó una inmunodifusión en gel según Ouchterlony (48) utilizando un suero humano histoplasmoso. Como se puede observar en la Fig. 5, existe un mayor número de bandas entre los antígenos crudos y el suero histoplasmoso, que entre los CPP-D's y el suero. Sin embargo, podemos observar reacción cruzada entre todos los antígenos crudos y el suero, incluyendo la pa-

racoccidioidina. Los CPP-D's presentan un menor número de bandas al reaccionar con este suero y el CPP-D de *P. brasiliensis* no presenta ninguna.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los antígenos CPP-D's analizados en este estudio, obtenidos por extracción con fenol seguido de precipitación con alcohol y posterior desproteinización, están probablemente constituidos por algunos de los componentes químicos presentes en la pared celular de los hongos estudiados, como se puede observar por la composición de los CPP-D's (glucosa, manosa y galactosa en su fracción polisacáridica). Por medio de autólisis, probablemente, estas moléculas se disolverían en el medio de cultivo y por lo tanto aparecerían en nuestros antígenos extraídos.

El análisis de los antígenos ha puesto en evidencia que las relaciones CHO/PROT más homogéneas se presentaron en las cepas de *H. capsulatum* y *B. dermatitidis* que son los hongos que mayor cruce inmune presentan, probablemente por su mayor similitud en cuanto a la composición química de su pared celular. La gran diferencia entre los porcentajes de carbohidratos en los CPP-D's de *C. immitis* (Fig. 2), a pesar de haber utilizado las mismas condiciones de cultivo y de extracción de antígeno, puede ser debido a la variación antigénica que existe entre diferentes cepas, como ya fue descrito por otros autores (19, 57, 58).

Esta diferencia encontrada con *C. immitis* puede también ser explicada por la diferente composición química de su pared, ya que este hongo presenta un azúcar, la 3-O-metil manosa, que no se encuentra en los otros tres hongos estudiados (1, 17, 3, 54).

La similitud en composición química de la fracción polisacáridica (ma-

nosa, glucosa y galactosa) encontrada en los CPP-D's, pudiera explicar de - cierto modo, las reacciones cruzadas que manifiestan entre si estos hongos, al realizar pruebas serológicas. La composición química de los CPP-D's ana- lizados está de acuerdo con otros estudios realizados en antígenos de es- tos hongos, como por ejemplo el trabajo de Azuma *et al* (1) donde también en- cuentran en su precipitado etanólico, galactosa, manosa, glucosa además de proteínas. Sin embargo, estos autores al purificar este precipitado, con- servan especialmente una galactomanana, eliminándose así la glucosa del com- puesto. A pesar de la desproteinización con pronasa y Sevag, de nuestros - antígenos, estos todavía contenían una fracción proteica unida a la frac- - ción polisacáridica que no fué posible eliminar. Esto nos sugiere una posi- ble importancia de la unión polisacárido-proteína que podría considerarse como la parte más importante del complejo pudiendo ser quizá la responsable del carácter antigénico de los CPP-D's obtenidos.

Al analizar inmunológicamente los CPP-D's se encontró que a pesar de - observar reacciones cruzadas entre ellos, el cruce inmune era menor que con los antígenos crudos histoplasmina, blastomicina, coccidioidina y paraco- ccidioidina. Se observó asimismo, que el CPP-D de *P. brasiliensis* no demos- tró cruce con el suero histoplasmoso. Para poder hacer un análisis inmune- más concluyente, se necesitaría, sin embargo, realizar este tipo de pruebas con otros sueros histoplasmosos, con sueros blastomicosos, coccidioidomico- sos y paracoccidioidomicosos.

En trabajos previos (63, 51), estos CPP-D's fueron analizados inmunoló- gicamente en las pruebas de fijación de complemento, hemaglutinación e inmu-

nodifusión en gel encontrándose también un mayor cruce con los antígenos --
crudos que con los complejos desproteinizados y el menor cruce dado por el
CPP-D de *P. brasiliensis*.

La presencia de las galactomananas de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* y
B. dermatitidis aisladas por Azuma *et al* (1) son las responsables según los
autores del cruce inmune entre estas cepas. Los autores además sugieren, -
por los resultados obtenidos en cuanto a estructuras químicas de sus com- -
puestos y análisis inmunológicos, que el residuo terminal no reductor gala_c
tofuranósido juega un papel importante como un fuerte determinante inmunoló
gico, lo que explicaría los altos grados de cruce encontrados.

Queda todavía mucho que aclarar de estas moléculas antigénicas tan im-
portantes para el diagnóstico y pronóstico de las micosis profundas, y este
trabajo sólo consideró la parte polisacárida de estos antígenos. Falta, --
sin embargo, el análisis de la parte proteica, que a pesar de estar en me--
nos cantidad, también es importante.

Las similitudes encontradas en estos complejos desproteinizados, como
lo son la presencia de carbohidratos, proteínas y ácido nucleicos, así co-
mo particularmente la presencia de glucosa, manosa y galactosa en la frac-
ción polisacárida de la molécula, concuerda con la estructura química de
la pared celular de estos hongos. Por otro lado, las diferencias encontra-
das, en cuanto a la concentración de sus componentes y por la presencia de
una fracción polisacárida compuesta probablemente por un azúcar diferente
a la glucosa, manosa o galactosa en *P. brasiliensis*, el cual podría ser res-
ponsable del menor cruce inmune, nos llevan a considerar que deben prose- -
guirse los estudios para aclarar la estructura química fina de estos antige

nos.

Sin embargo, una gran dificultad que se presenta para estandarizar los antígenos fúngicos es la gran diversidad de los métodos usados para su extracción, así como los métodos analíticos e inmunológicos que se usan para aislar, caracterizar o identificar antígenos comunes o diferentes en las distintas células y especies de hongos, (1, 3, 9, 43, 46, 47, 51, 31, 38, 40, 65). Para eliminar las variaciones antigénicas presentes en diferentes cepas, como ha sido demostrado en diferentes trabajos (19, 57, 58) se recomienda el uso de cepas autóctonas de cada región, para además llegar a tener una mayor reproducibilidad en los resultados.

El método de aislamiento del antígeno utilizado en este estudio, procura ser sencillo y de fácil manipulación para que pueda ser adaptado en diferentes laboratorios que se dediquen al serodiagnóstico de las micosis, además de ser una de las técnicas más utilizadas para la obtención de antígenos polisacáridos.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- FIG. 1 Esquema de aislamiento del complejo polisacárido-proteína desproteinizado (CPP-D).
- FIG. 2 Porcentaje de carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos presentes en los complejos polisacárido-proteína desproteinizados (CPP-D's) de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* y *P. brasiliensis*.
- FIG. 3. Porcentajes de monosacáridos presentes en la fracción de carbohidratos del complejo polisacárido-proteína desproteinizado (CPP-D) de -- *H. capsulatum* (Cepa 5026), *B. dermatitidis* (Cepa 5504) y *C. immitis* (Cepa 5221) por cromatografía de gases.
- FIG. 4 Electroforesis en geles de poliacrilamida de los complejos polisacárido-proteína desproteinizados (CPP-D's) de *H. capsulatum* (CPP-D Histo), *B. dermatitidis* (CPP-D Blasto) y *C. immitis* (CPP-D Cocci).
- FIG. 5 Inmunodifusión en gel de antígenos crudos y CPP-D's contra un suero histoplasmoso (SH).
- TABLA 1 Análisis cualitativo de los azúcares presentes en los CPP-D's de los hongos estudiados por cromatografía en capa fina.

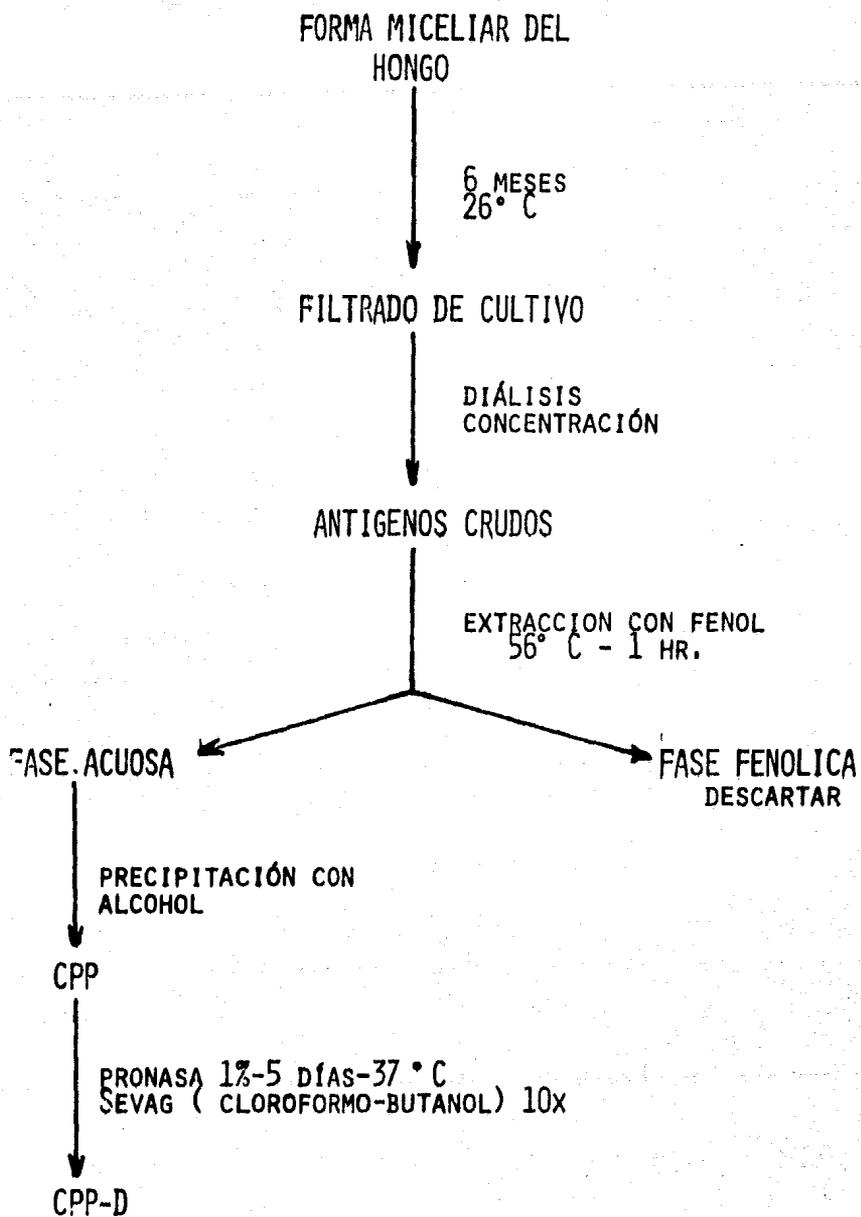


FIG. 1. ESQUEMA DE AISLAMIENTO DEL COMPLEJO POLISACARIDO-PROTEINA DESPROTEINIZADO (CPP-D).

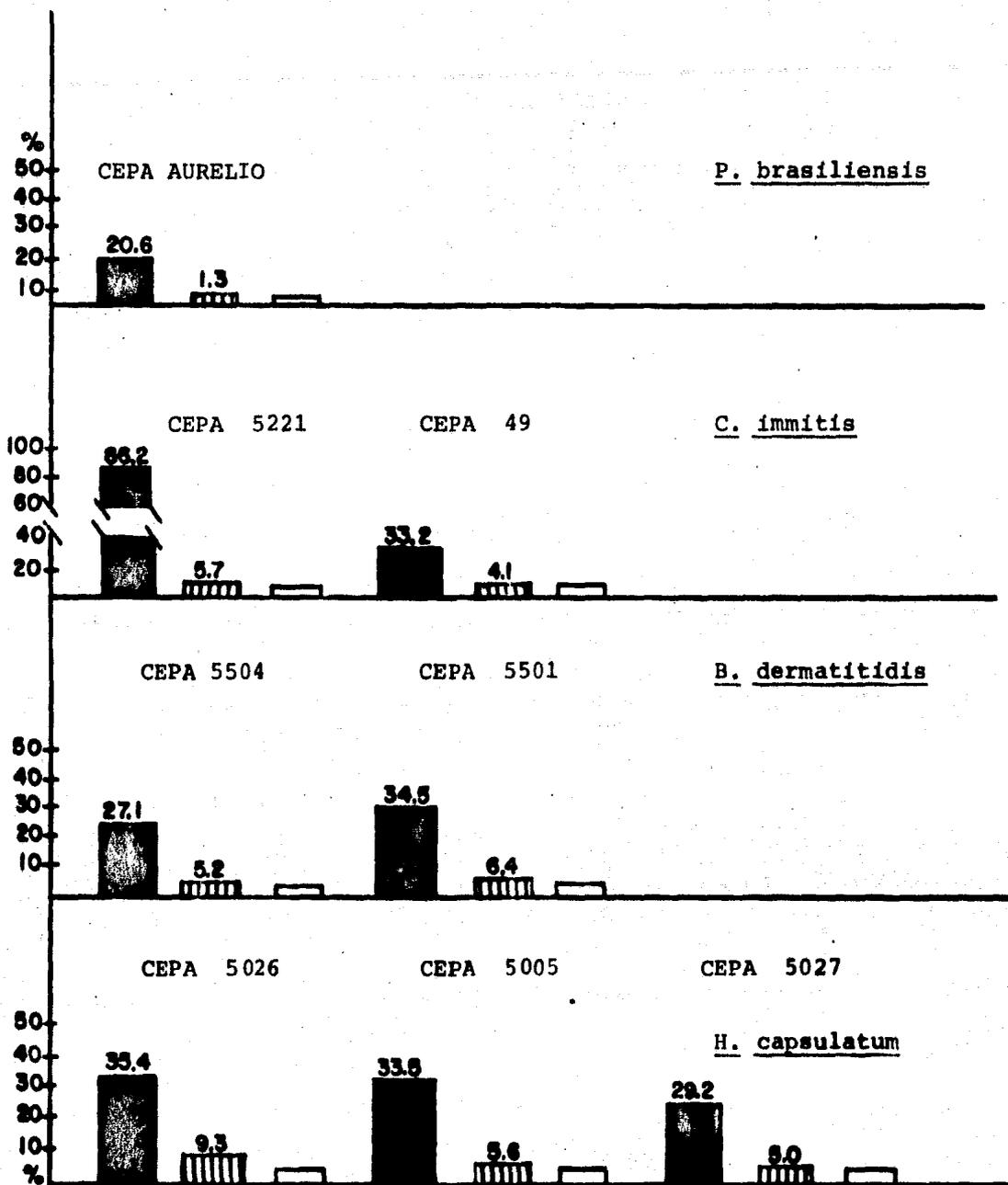


FIG. 2.-PORCENTAJE DE CARBOHIDRATOS, PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS - PRESENTES EN LOS COMPLEJOS POLISACARIDOS-PROTEINA DESPROTEINIZADOS (CPP-D's) DE *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*, y *P. brasiliensis*.

■ CARBOHIDRATOS ▨ PROTEINAS □ ACIDOS NUCLEICOS

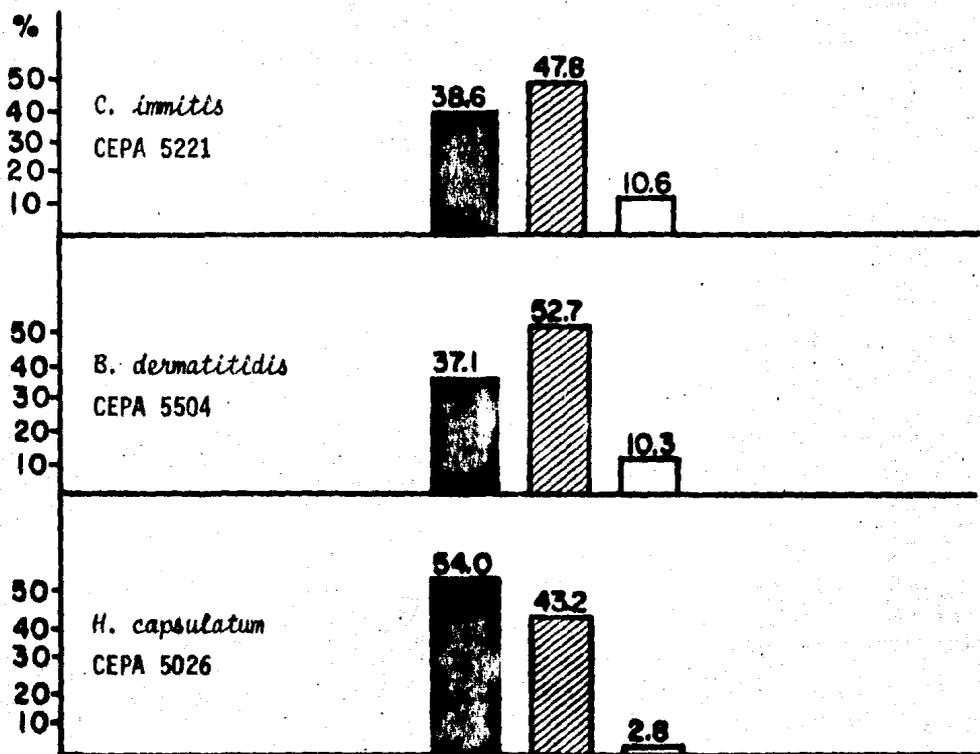


FIG. 3.- PORCENTAJES DE MONOSACARIDOS PRESENTES EN LA FRACCION DE CARBOHIDRATOS DEL COMPLEJO POLISACARIDO PROTEINA DESPROTEINIZADOS (CPP-D) DE *H. capsulatum* (CEPA 5026), *B. dermatitidis* (CEPA 5504) y *C. immitis* (CEPA 5221) POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

■ MANOSA ▨ GLUCOSA □ GALACTOSA

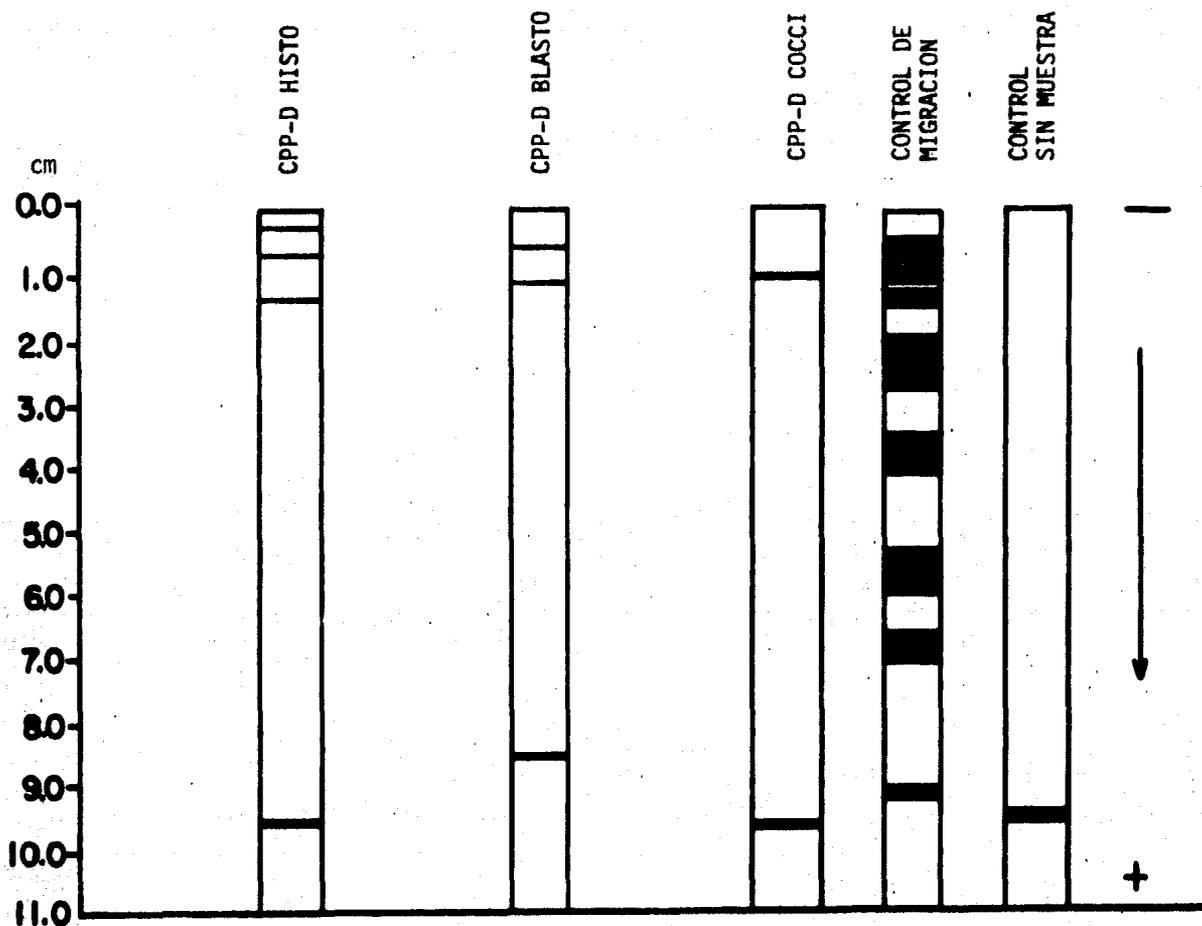


FIG. 4.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LOS COMPLEJOS POLISACARIDO PROTEINA DESPROTEINIZADOS (CPP-D's) DE *H. capsulatum* (CPP-D HISTO), *B. dermatitidis* (CPP-D BLASTO) y *C. immitis* (CPP-D COCCI).

Se utilizó un suero humano normal como control de migración y un control sin muestra.

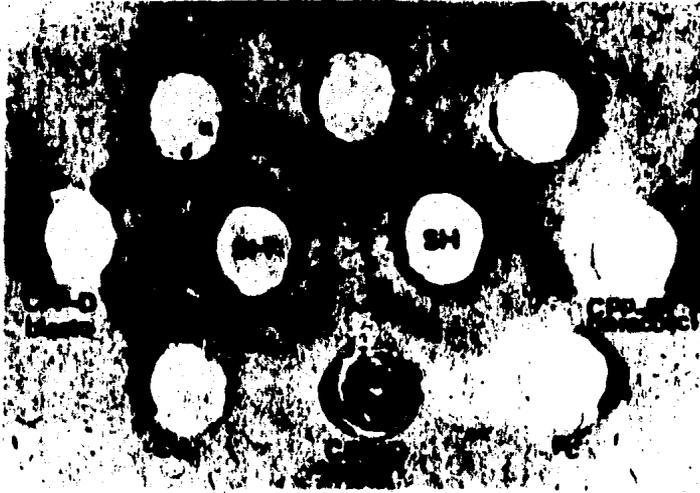


Fig. 5. INMUNODIFUSION EN GEL DE ANTIGENOS CRUDOS Y CPP-D's
CONTRA UN SUERO HISTOPLASMOSO (SH).

Bm = blastomicina
CPP-D histo = CPP-D *H. capsulatum*
Hp = histoplasmina
CPP-D paracocci = CPP-D *P. brasiliensis*
Pc = paracoccidioidina
CPP-D cocci = CPP-D *C. immitis*
Cd = coccidioidina
CPP-D blasto = CPP-D *B. dermatitidis*

TABLA 1. ANALISIS CUALITATIVO DE LOS AZUCARES PRESENTES EN LOS CPP-D₅ DE LOS HONGOS ESTUDIADOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

<i>H. capsulatum:</i>	Glucosa, Galactosa, Manosa, Hexosamina
<i>B. dermatitidis:</i>	Glucosa, Galactosa, Manosa
<i>C. immitis:</i>	Glucosa, Galactosa, Manosa, Hexosamina
<i>P. brasiliensis:</i>	Glucosa, Galactosa, Manosa

HIDROLISIS HCl-8 4 HRS 100°C

BIBLIOGRAFIA

1. Azuma, I., Kanetsuna, F., Tanaka, Y., Yamamura, Y. & Carbonell, L.M. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: - 111-126, 1974.
2. Bonilla Soto, O., Rose, N.R. & Alberman, C.E. Allergic molds. *J. - - Allerg.* 32: 246, 1961.
3. Bradley, G., Pine, L., Reeves, M.W. & Moss, C.W. Purification, composition and serological characterization of Histoplasmin -H and M antigens. *Infect. Immun.* 9: 870-880, 1974.
4. Campbell, C.C. Problems associated with antigenic analysis of *Histoplasma capsulatum* and the other mycotic agents. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 92: 113-118, 1965.
5. Campo-Aasen, I., Cabral, N.A. & Yarzabal, L. Subcellular localization of antigen E/2 of *Paracoccidioides brasiliensis* an immunoenzymatic - - electron microscopy study. *Sabouraudia.* 18: 167-171, 1980.
6. Chaparas, S.D. *et al.* Correlation of human skin reactivity with lymphocyte transformation induced by mycobacterial antigens and histoplasmin. *Amer. Rev. Res. Dis.* 101: 67-73, 1970.
7. Connant, N.F. & Smith, D.T. *Micologia*. W.B. Saunders Company 3a. Ed. Edit. Interamericana Philadelphia. 1971.
8. Connaught, J. Starch Gel Electrophoresis. Medical Research Laboratories. University of Toronto, Toronto Canada. 1964.
9. Cox, R.A. & Larsh, H.W. Yeast and mycelial-phase antigens of *Blastomyces dermatitidis*: Comparison using disc gel electrophoresis. *Infect. Immun.* 10: 48-53, 1974.

10. Cox, R.A. Cross reactivity between antigens of *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* in lymphocyte - - transformation assays. *Infec. Immun.* 25: 932-938, 1979.
11. Davis, T.E., Domer, J.E. & Yu-Teh Li. Cell wall studies of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* using autologous and heterologous enzymes. *Infec. Immun.* 15: 978-987, 1977.
12. Denton, J.F. & DiSalvo, A.F. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* -- from natural sites at Augusta, Georgia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: -- 716-722, 1964.
13. Dexter, H.H. Further studies on the inhibition of *Histoplasma capsulatum*, within macrophages from immunized animals. *Infec. Immun.* 8: 557-581, 1973.
14. Dickerson, Q.H. & Busey, J.F. Chromatographic separation of h and m antigens from *Histoplasma*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 654-658, -- 1968.
15. DiSalvo, A.F., Sekhon, A.S., Land, G.A. & Fleming, W.H. Evaluation of the exoantigen test for identification of *Histoplasma* species and - - *Coccidioides immitis* cultures. *J. Clin. Microb.* 11: 238-241, 1980.
16. Domer, J.E., Hamilton, J.G. & Harkin, J.C. Comparative study of the - cell walls of the yeastlike and mycelial phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 94: 466-474, 1967.
17. Domer, J.E. Monosaccharide and chitin contents of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 107: - - 870-877, 1971.
18. Dubois, M., Giles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature.* 168: 167, 1951.
19. Ehrhard, H.B. & Pine, L. Factors influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: Effect of physical factors and composition of medium. *Appl. Microbiol.* 23: 250-261, 1972.

20. Emmons, CH. W., Binford, CH. H. & Utz, J.P. Medical micology. Lea & Febiger 2a. Ed. Philadelphia. 1970.
21. Ettre, L.S. & McFadden, W.H. Ancillary techniques of gas chromatography, Wiley-Interscience, New York. 1969.
22. Flores Carreón, A., Gómez Villalva, A. and San Blas, G. (1-3) gluca nase and dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. Antonie Van Leeu wenhook. 45: 265-274, 1979.
23. Gerety, R.F., Ferraresi, R.W. and Raffael, S. Polysaccharide in dela yed hypersensitivity. I. Pneumococcae polysaccharide as inducer and -- elicitor of delayed reactivity in guinea pigs. J. Exp. Med. 131: 189-193, 1970.
24. González-Ochoa, A. & Felix, D. Geographic distribution of cutaneous - reactivity to histoplasmin in Mexico. Rev. Invest. Salud Públ. (Méx.). 31: 74, 1971.
25. Green, J.H., Harrell, W.K., Johnson, J.E. & Benson, R. Isolation of - antigen from *Blastomyces dermatitidis* that is specific for the diagno- sis of blastomycosis. Current Microbiol. 4: 293-296, 1980.
26. Greene, C.H., Delalla, L.S. & Tompkins, V.N. Separation of specific - antigens of *Histoplasma capsulatum* by ion-exchange chromatography. -- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 140-141, 1960.
27. Hassid, W.Z., Baker, E.E. and McCready, R.M. An immunologically active polysaccharide produced by *Coccidioides immitis* Rixford and Gilchrist. J. Biol. Chem. 149: 303-311, 1943.
28. Heiner, D.C. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics. 22: 616-620, 1958.
29. Hirsch, E.F. & D. D'Andrea. The specific substance of *Coccidioides -- immitis*. J. Infec. Dis. 40: 634-637, 1927.

30. Huppert, M., Spratt, N.S., Vucovich, K.R., Sun, S.H. & Rice, E.H. Antigenic analysis of coccidioidin and spherulin determined by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infec. Immun.* 20: 541-551, 1978.
31. Huppert, M., Adler, J.P., Rice, E.H. & Sun, S.H. Common antigens among systemic disease fungi analysed by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infec. Immun.* 23: 479-485, 1979.
32. Jones, R.A. An introduction to gas-liquid chromatography. Academic -- Press, New York. 1970.
33. Kabat, E.A. Experimental Immunochemistry. Charles, C., Thomas, Publ. Springfield, 2a. Ed. pp. 530-561. 1961.
34. Kabat, E.A. Experimental Immunochemistry. Charles, C., Thomas, Publ. Springfield, 2a. Ed. pp. 559. 1961.
35. Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Azuma, I. & Yamamura, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 110: 208-218, 1972.
36. Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Gil, F. & Azuma, I. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial -- forms of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: 1-13, 1974.
37. Kanetsuna, F. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 19: 275-286, 1981.
38. Kashkin, K.P., Drozdov, A.I. & Ponomarenko, V.A. Comparative immunochemical studies of different antigens of deep mycosis pathogens. - - *Ann. Immunol.* 129: 287-300, 1978.
39. Kirby, K.S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J. Biochem.* 64: 405, 1956.
40. Lancaster, M.V. & Sprouse, R.F. Isolation of a purified skin test antigen from *Blastomyces dermatitidis* yeast-phase cell wall. *Infec. Immun.* 14: 623-625, 1976.

41. Littlewood, A.B. Gas chromatography: Principles, techniques and applications. 2a. Ed. Academic Press, New York. 1970.
42. Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Tarr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurements with the folin-reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
43. Markowitz, H. Polysaccharide antigens from *Histoplasma capsulatum*. -- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115: 697-700, 1964.
44. Martínez Baez, M.A., Reyes, M.A. y González Ochoa, A. Blastomycosis - norteamericana en México. Rev. Inst. Salub. Enfer. Trop. (Méx.). 14: - 225, 1954.
45. Morris, C.J.O.R. & Morris, P. Separation methods in Biochemistry. Pitman Ltd., London. 1964.
46. Negróni, R., Costa, E., De Marfa, R.I., Golfera, H. & Arechavala, A. - Estudio de dos antígenos de la fase levaduriforme del *Histoplasma capsulatum* para pruebas cutáneas. Sabouraudia. 17: 155-161, 1979.
47. Odds, F.C., Kaufman, L., McLaughlin, D., Callaway, C. & Blumer, O. -- Effect of chitinase complex on the antigenicity and chemistry of yeast form cell walls and other fractions of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. Sabouraudia. 12: 138-149, 1971.
48. Ouchterlony, O. Difusion in gel methods for immunological analysis. -- Prog. Allergy. 6: 30, 1962.
49. Randerath, K. Cromatografía de capa fina. Bilbao, Urmo. 1969.
50. Reiss, E. Serial enzymatic hydrolysis of cell walls of two serotypes of yeast-form *Histoplasma capsulatum* with α -(1-3) glucanase, β -(1-3) glucanase, pronase and chitinase. Infec. Immun. 16: 181-188, 1977.
51. Reyes Montes, M.R., Martínez, A., Toriello, C. & Taylor, M.L. Antigens from *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi. Mycopathologia. 78: 17-23, 1982.

52. Richards, E.G. & Gratzner, W.B. In: J. Smith (Ed.) Chromatographic and Electrophoretic Techniques (Heinemann) Vol. 2. 1967.
53. Rippon, J.W. Medical Mycology. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto. 1974.
54. Salvin, S.B. & Smith, R.F. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*: III. Isolation properties and activity of a protein-carbohydrate complex. J. Infec. Dis. 105: 45-73, 1959.
55. San Blas, G., San Blas, F. & Serrano, L.E. Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strains - IVIC Pb9. Infec. Immun. 15: 343-346, 1977.
56. San Blas, G. & Vernet, D. Induction of the synthesis of cell wall (1-3) glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal. Calf. Serum. Infec. Immun. 15: 879-902,
57. Schubert, J.H., Ajello, L., Stanford, S. & Grant, V.Q. Variation in complement fixation antigen production by different strains of *Histoplasma capsulatum* grown on two media. J. Lab. Clin. Med. 41: 91-97, 1953.
58. Schubert, J.H. & Ajello, L. Variation in complement fixation antigenicity of different yeast phase strain of *Histoplasma capsulatum*. J. Lab. Clin. Med. 50: 304, 1957.
59. Sevag, M.G. Eine neue physikalische. Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch. Wirksamer Substanzen. Isolierung von Kohlenhydraten aus Hühnereweiss and Pneumococccen. Biochem. A. 273: 419-429, 1934.
60. Smith, C.E., Whiting, E.G., Baker, E.E., Rosenberger, H.G., Beard, R.R. & Saito, M.T. The use of coccidioidin. Am. Rev. Tuberc. 57: 330-360, 1948.
61. Sprouse, R.F. Purification of histoplasmin purified derivative. Amer. Rev. Resp. Dis. 100: 685-690, 1969.
62. Sthal, E. Thin Layer Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, - - - Heidelberg. 1969.

63. Taylor, M.L. y Bojalil, L.F. Inmunología de la histoplasmosis: Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de *Histoplasma capsulatum*. Arch. Invest. Med. (Méx.). 8: 91-102, 1977.
64. Taylor, M.L., Reyes Montes, M.R., Lachica, A., Eslava Campos, C., Olvera, J. & Maxwell, R. Immunology of histoplasmosis: humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. Mycopathologia. 71: -- 159-166, 1980.
65. Torres, J.M., Da Luz, S., López Lemes, M.H., Guisantes, J., Josef, M., Nieto, A., Coch, J. & Yarzabal, L.A. Evaluación de la reactividad de un antígeno purificado de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a sueros de paracoccidioidomicosis e histoplasmosis. Ann. Parasitol. (Paris). 50: 507-513, 1975.
66. Velasco, C.O. Quelques aspects de histoplasmosis en République Mexicaine. Medicine Tropicale. 41: 681-683, 1981.
67. Webb, J.M. & Levy, H.B. New developments in the chemical determination of nucleic acids. Meth. Biochem. Anal. 6: 1, 1968.
68. Wheat, R. & Sheer, E. Cell walls of *Coccidioides immitis* neutral - - sugars of aqueous alkaline extracts polymers. Infec. Immun. 15: 340-341, 1977.
69. Wheat, R.W., Tritschler, C., Conant, N.J. & Lowe, E.P. Comparison of *Coccidioides immitis* arthrospore, mycelium, and spherule cell walls, and influence of growth medium on mycelial cell wall composition. - - Infec. Immun. 17: 91-97, 1977.
70. Yarzabal, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana, revelados por inmunoelectroforesis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, Brasil. 13: 320-327, 1971.
71. Yarzabal, L.A., Biguet, J., Vaucelle, T., Andrieu, S., Torres, J.M. & Luz, S. Análisis inmunológico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia. 11: 80-88, 1973.

72. Yarzábal, L.A., Andrieu, S., Bout, D. & Naquira, F. Isolation of a -- specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble ex- - tracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*. 14: 275-280, -- 1976.
73. Yarzábal, L.A., Bout, D., Naquira, F., Fruit, J. & Andrieu, S. Identi fication and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabourau-- dia*. 15: 79-85, 1977.