



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS-IZTACALA

"LOCALIZACION CELULAR DEL COMPLEJO
POLISACARIDO-PROTEINA PURIFICADO DEL
HONGO PATOGENO *Histoplasma capsulatum*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

MOHAMED ALI PEREYRA MORALES

LOS REYES IZTACALA TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267395



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicada

Con mucho cariño a mis padres

E. Teodora Morales C.

E. Enrique Pereyra C.

a quienes debo este momento: (y muchos otros)

A mis hermanos:

Marbella

y

Edmundo

**con quienes he vivido muchas cosas y de quienes he aprendido otro
tanto.**

A mis Tíos:

N. Isabel Morales y familia.

Esteban Morales y familia.

Emelia Pereyra y familia.

Francisca Pereyra y familia.

Esther Pereyra †

A la familia Flores Fragozo

A Leonardo Delgadillo y José Manuel Díaz

Agradecimientos

A la Doctora **Lucía Taylor** por la confianza depositada en mí para la realización de el presente trabajo.

A **Concepción Agundis Mata**, porque me enseñó que del trabajo rutinario sale lo novedoso, por su tiempo, paciencia y amistad gracias.

A **Eugenia Flores** por todo el tipo de apoyo que recibí de tí, por tu paciencia y el tiempo dedicado y por ser antes que todo una gran amiga.

A **Rocío Reyes, Esperanza Duarte, Gabriela Rodríguez, Javier Flores, Ángeles Martínez, Gabriela Peña** por su paciencia, su cariño, sus enseñanzas pero principalmente por su amistad.

A **Hortensia Navarro, Miguel Ángel Ayala, Amelia Pérez** por sus enseñanzas y por su amistad.

A mis amigos **Resalia González y Aniceto Gámez** por la ayuda brindada en todo este tiempo.

A **Leticia A. Espinosa, Rocío Sánchez, Miguel A. Sánchez, Gabriel Yañez, Juan Carlos Tovar, J. Guillermo Rodríguez**, por los momentos inolvidables que hemos tenido, por permitirme ser parte del equipo y por lo que falta.

Los países necesitan ingenieros que construyan carreteras, médicos que curen enfermedades, abogados que apliquen las leyes, agricultores que siembren los campos, trabajadores que hagan producir las fábricas. Pero para tener todo eso necesitan, primero, tener maestros: gente que enseñe a los ingenieros a construir, a los médicos a curar, a los abogados a legislar, a los agricultores a sembrar, a los trabajadores a producir y, a todos ellos, a ser maestros de los demás y de sí mismos. Porque el que deja de aprender, deja de reproducirse.

H.A.C.

Un modesto homenaje a quienes han logrado encausar mi energía

Mis maestros

Por sus conocimientos, su tiempo, su paciencia, sus enseñanzas, sus regaños, sus consejos pero principalmente por su amistad

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología de Hongos
del Departamento de Microbiología y Parasitología,
de la Facultad de Medicina, UNAM.

Directora de tesis:

Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Agradecimientos

Mi agradecimiento para:

Concepción Agundis Mata

Marie Therese Nancy de Merchant

Edgar Zenteno Galindo

Por el apoyo brindado durante la realización de éste trabajo y por las enseñanzas recibidas durante todo éste tiempo.

Particularmente agradezco a Marie Therese Nancy de Merchant por el apoyo técnico para el procesamiento de las muestras por microscopia de fluorescencia y electrónica.

El pasante de Biología Mohamed Ali Pereyra agradece la beca de la Fundación UNAM,
durante el periodo de realización de la presente tesis.

ÍNDICE

Índice	2
Índice de cuadros y figuras	4
Resumen	6
Introducción	7
Justificación	15
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
Hipótesis	19
Materiales y métodos	20
Microorganismos	20
Animales	20
Antígenos	20
Obtención del complejo polisacárido-proteína (CPP)	21
Obtención del CPPD-Histo	21
Obtención de fracciones enriquecidas de IgG específicas anti-CPPD-Histo	22
Protocolo de inmunización	22
Obtención de fracciones enriquecidas de IgG	23
Acoplamiento de CPPD-Histo a Sefarosa	23
Purificación de IgG's anti-CPPD-Histo	24
Obtención de formas fúngicas	24
Separación de macroconidios e hifas	24
Separación de levaduras en diferentes fases de crecimiento	25
Determinación de la inmunolocalización celular del CPPD-Histo	25
Por microscopía de fluorescencia	25
Por microscopía electrónica	26
Resultados	28
Antígenos	28

Fracciones enriquecidas de IgG específicas anti-CPPD-Histo	28
Formas fúngicas	29
Inmunolocalización celular del CPPD-Histo	34
Microscopía de fluorescencia	34
Microscopía electrónica	35
Discusión y conclusiones	54
Bibliografía	61

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1: Determinaciones químicas de los antígenos obtenidos	28
CUADRO 2: Actividad inmune de las IgG's obtenidas por cromatografía	30
CUADRO 3: Separación de muestras de micelio de <i>H. capsulatum</i> por sonicación	31
FIGURA 1: Morfología de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	8
FIGURA 2: Morfología de la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	9
FIGURA 3: Diagrama general de trabajo	16
FIGURA 4: Actividad inmune de los antígenos de la cepa EH-53 en IDG	29
FIGURA 5: Fracción con fragmentos de hifa de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i> separada por Percoll	31
FIGURA 6: Fracción enriquecida de macroconidios de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i> separada por Percoll	32
FIGURA 7: Fracción del sedimento de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i> separada por Percoll	32
FIGURA 8: Curva de crecimiento de levaduras de <i>H. capsulatum</i>	33

FIGURA 9: Inmunolocalización por fluorescencia del CPPD-Histo en la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	34
FIGURA 10: Inmunolocalización por fluorescencia del CPPD-Histo en la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	35
FIGURA 11: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en hifas de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	37
FIGURA 12: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en macroconidios de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	39
FIGURA 13: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en la zona de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de macroconidios de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	42
FIGURA 14: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en las zonas delgadas de la capa externa de la pared celular de macroconidios de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	45
FIGURA 15: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en microconidios de la fase micelial de <i>H. capsulatum</i>	48
FIGURA 16: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en la fase levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	50
FIGURA 17: Macroconidios con unidades de crecimiento o de "germinación"	53

RESUMEN

La histoplasmosis es una micosis sistémica causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Produce un cuadro pulmonar primario que comparte similitudes nosológicas con otras micosis profundas como la blastomicosis, la coccidioidomicosis y la paracoccidioidomicosis, así como con enfermedades de etiologías no fúngicas como la nocardiosis y la tuberculosis. El antígeno más utilizado en la serología de la histoplasmosis es la histoplasmina, sin embargo, nuestro laboratorio cuenta con un antígeno parcialmente purificado, complejo polisacárido-proteína desproteínizado del hongo *Histoplasma capsulatum* (CPPD-Histo), el cual es útil para discriminar en métodos inmunodiagnósticos de alta sensibilidad, la histoplasmosis de diversas micosis pulmonares y otras enfermedades respiratorias. En este trabajo se planteó caracterizar la ubicación preferencial del antígeno CPPD-Histo, en las fases micelial y levaduriforme del hongo, así como su localización celular en sus diferentes formas y unidades estructurales. El estudio se desarrolló mediante inmunolocalización con marcaje de isotiocianato de fluoresceína y de oro coloidal para microscopías de fluorescencia y electrónica, usando anticuerpos primarios CPPD-Histo específicos. La localización en microscopía de fluorescencia, ubicó al antígeno en pared celular de hifas y levaduras. La localización en microscopía electrónica, mostró mayor concentración del CPPD-Histo en las zonas de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de las proyecciones digitiformes de macroconidios, poco marcaje en pared celular de hifas, y una distribución dispersa de la marca en las levaduras, cosechadas en fase logarítmica de crecimiento. Los resultados obtenidos permitieron ubicar la localización preferencial del antígeno estudiado en las diferentes formas y estructuras fúngicas.

INTRODUCCIÓN

La micosis profunda conocida como histoplasmosis es señalada como una enfermedad de gran prevalencia en diferentes zonas geográficas del mundo, pero en particular, su mayor trascendencia radica en el continente americano (González-Ochoa, 1969; Rippon, 1988). En México, es considerada como una enfermedad ocupacional (Artículo 513, Ley Federal del Trabajo, 1970) ya que diferentes trabajadores rurales como mineros, peones, limpiadores de minas, campesinos recolectores de guano y profesionistas especializados como espeleólogos, geólogos, biólogos, antropólogos, arqueólogos entre otros, adquieren la infección en el desempeño de sus labores (González-Ochoa, 1969; Velasco-Castrejón, 1994; Taylor *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1997; González-Zepeda, *et al.* 1998).

El agente etiológico de la histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* es un hongo dimórfico que crece en la naturaleza en fase micelial, la cual presenta dos tipos de conidios: los macroconidios de 8-14 μm y los microconidios de 2-6 μm de diámetro. Por lo general, los microconidios y pequeños fragmentos de hifas son la forma infectante que al penetrar por vía respiratoria, producen la infección en hospederos susceptibles (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992). El hongo crece abundantemente en suelos ricos en nitrógeno y fósforo, proporcionados por el guano de murciélagos o excretas de aves (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992). *Histoplasma capsulatum* presenta principalmente dos tipos de morfología colonial, las colonias albinas llamadas A y las colonias de color pardo llamadas B, sin embargo no se conoce una correlación sobre la patogenicidad de ambos tipos coloniales (Daniels *et al.*, 1968; Kwon-Chung & Bennett, 1992). Las colonias A son blancas, vellosas, toscas con micelio extenso y algunas veces limitadas, al continuar su desarrollo mantienen las mismas características, mientras que las B son planas y presentan un color inicialmente pardo claro y posteriormente pardo-oscuro y tienden a presentar un aspecto pulverulento. Las colonias B cambian sus características macroscópicas con el tiempo, asumiendo una morfología colonial semejante a las

albinas, debido a que las colonias, A y B, proceden de parentales que manifiestan ambos tipos coloniales y que, las colonias A tienden a sobreponerse a las B (Daniels *et al.*, 1968; Rippon, 1988). La estructura celular de *H. capsulatum* es la de una célula eucariótica (Garrison *et al.*, 1970); microscópicamente se observa en los dos tipos de colonias, abundante micelio con hifas delgadas, septadas e hialinas. De las hifas nacen directamente o a través de pequeños conidióforos, los microconidios piriformes o redondos y los macroconidios que en su forma típica son de doble membrana, espiculados formando proyecciones con la apariencia de dedos (digitiformes) (Daniels *et al.*, 1968; Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992) (Figura 1). La pared celular de las formas fúngicas de la fase micelial está compuesta de glucanas, predominando las tipo β , quitina, proteínas y lípidos (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992).

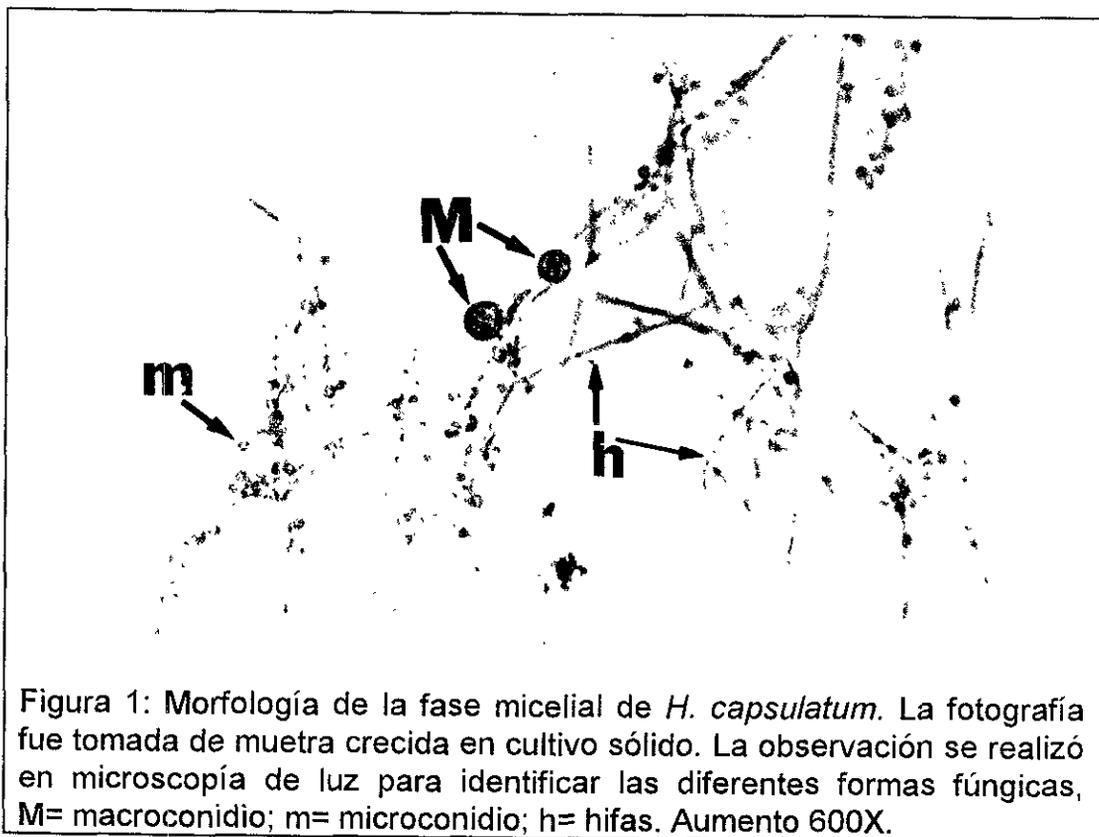


Figura 1: Morfología de la fase micelial de *H. capsulatum*. La fotografía fue tomada de muestra crecida en cultivo sólido. La observación se realizó en microscopía de luz para identificar las diferentes formas fúngicas, M= macroconidio; m= microconidio; h= hifas. Aumento 600X.

El hongo se desarrolla en fase levaduriforme intracelularmente (forma parasitaria), o en cultivos enriquecidos con cisteína a 37°C (Figura 2); las levaduras son redondas u ovals (2-4 μm de diámetro) y representan la forma virulenta del hongo (Rippon, 1988; Maresca & Kobayashi, 1989). La pared celular de las levaduras está compuesta de glucanas, predominando las tipo α , además de los constituyentes de la pared señalados en la fase micelial (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992). Por lo general, las levaduras, tienen predilección por las células del sistema fagocítico mononuclear, aunque parasitan algunas veces fagocitos no profesionales. Las levaduras son uninucleadas y se reproducen por gemación (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992). El tiempo de generación de las levaduras, en células de hámster y de ratón ha sido constante (de 10 a 11 h) bajo una gran variedad de condiciones experimentales (Howard, 1964; 1965; 1967), mientras que los tiempos generalmente reportados *in vitro*, son de 6-8 horas (Berliner, 1973).

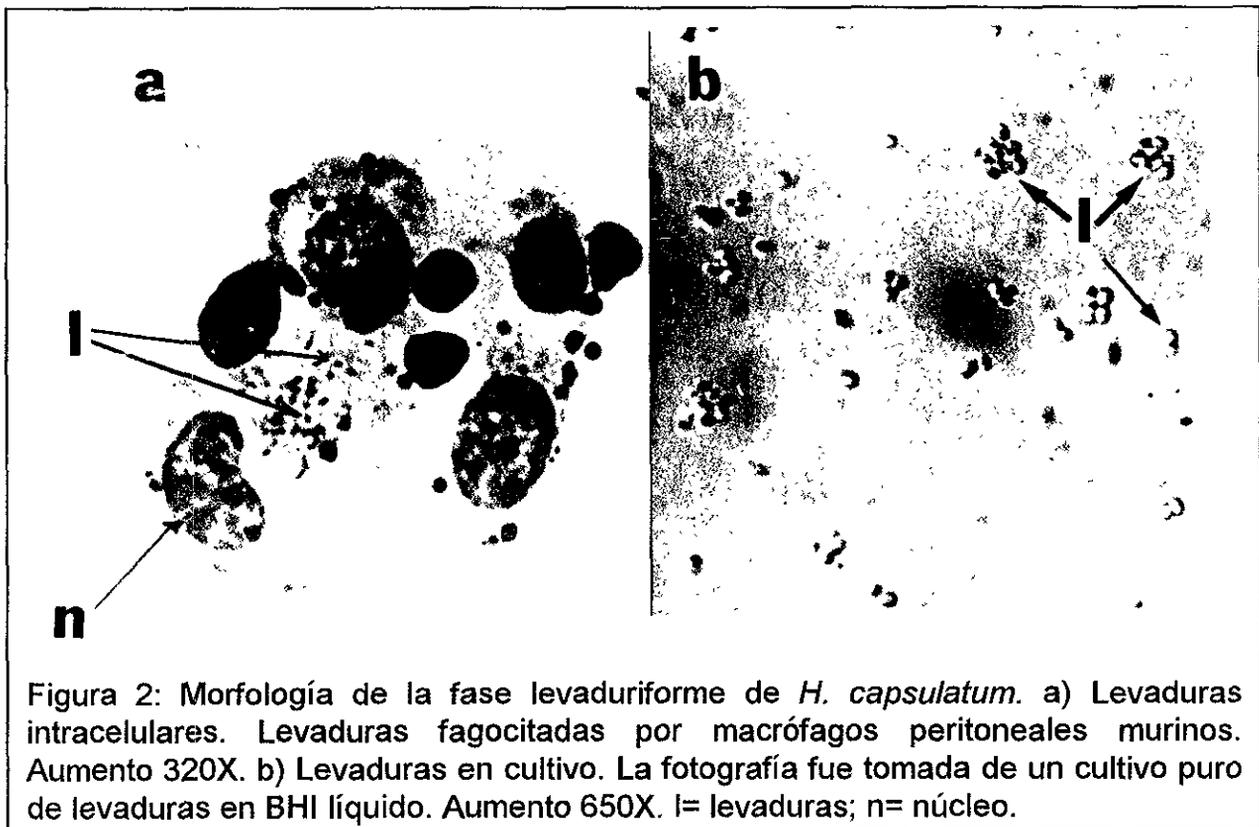


Figura 2: Morfología de la fase levaduriforme de *H. capsulatum*. a) Levaduras intracelulares. Levaduras fagocitadas por macrófagos peritoneales murinos. Aumento 320X. b) Levaduras en cultivo. La fotografía fue tomada de un cultivo puro de levaduras en BHI líquido. Aumento 650X. l= levaduras; n= núcleo.

La histoplasmosis es una micosis sistémica que tiene la característica de inducir una inflamación crónica que se manifiesta por una reacción granulomatosa típica. Produce un cuadro pulmonar primario, a partir del cual puede diseminarse a diferentes tejidos u órganos (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett 1992). *Histoplasma capsulatum* puede producir diversos cuadros clínicos que comparten similitudes nosológicas con otras micosis profundas como blastomycosis, coccidioidomycosis y paracoccidioidomycosis, así como con enfermedades de etiologías no fúngicas como la nocardiosis y la tuberculosis; lo que en un momento dado, puede confundir el diagnóstico clínico (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett 1992).

Con frecuencia no se logra el diagnóstico micológico y por lo regular éste aporta resultados en un tiempo prolongado, por tal motivo se suele recurrir a los procedimientos de inmunodiagnóstico, que a pesar de presentar limitaciones como reacciones cruzadas con otras especies de hongos causantes de cuadros clínicos semejantes (Wheat *et al.*, 1983; Wheat *et al.*, 1986a), son una herramienta alternativa para el diagnóstico rápido de las micosis.

Las pruebas serológicas usuales en el inmunodiagnóstico de la enfermedad, como la precipitación en tubo capilar (PTC), la inmunodifusión en gel (IDG), la reacción de fijación de complemento (RFC), y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) tanto para la búsqueda de anticuerpos como de antígenos circulantes, son relativamente rápidas, con buena especificidad y sensibilidad, siendo la ELISA la más sensible de todas (Becerril *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1993). No obstante, hay que considerar que en serología, a medida que se incrementa la sensibilidad de las pruebas, con frecuencia se pierde especificidad inmunológica, razón por la cual en las pruebas de mayor sensibilidad se deben utilizar antígenos más puros, muy específicos y con buena reactividad (Becerril *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1993; Toriello *et al.*, 1997).

Por reacción de precipitación, Heiner (1958) logró evidenciar dos antígenos específicos de *H. capsulatum* denominados H y M, que son los mejores indicadores

para el inmunodiagnóstico de la histoplasmosis. Son considerados como antígenos de referencia, por las típicas bandas que producen en pruebas de doble inmunodifusión en gel (Heiner, 1958); y han sido identificados en distintas muestras biológicas como suero y orina de casos severos de histoplasmosis diseminada (Wheat *et al.*, 1986b). Se han realizado varios intentos para obtener anticuerpos monoclonales contra ellos, y a la fecha, sólo existen monoclonales para el antígeno M (Reiss *et al.*, 1986; Hamilton *et al.*, 1990b). Biguet *et al.* (1967) y Hamilton *et al.* (1990a) presentan evidencias de que el antígeno M tiene actividad de catalasa, lo que podría ser un componente de reactividad cruzada con otros hongos dimórficos que tengan catalasas similares.

El antígeno H ha sido clonado recientemente por Deepe & Durose (1995) y su clonación ha hecho posible la producción de altas cantidades de éste antígeno para diversos usos.

A partir de fase micelial o levaduriforme de *H. capsulatum* así como de diferentes componentes de la histoplasmina, antígeno separado del filtrado crudo del hongo crecido en medio sintético, se han tratado de obtener antígenos purificados o fracciones antigénicas que sean suficientemente reactivas y específicas para ser utilizadas en inmunodiagnóstico o como herramienta experimental (Biguet *et al.*, 1967; Azuma *et al.*, 1974; Taylor & Bojalil, 1977; Taylor *et al.*, 1980; Reyes-Montes *et al.*, 1982; Toriello *et al.*, 1982; Wheat *et al.*, 1986a; Toriello *et al.*, 1991; Toriello *et al.*, 1993). Taylor & Bojalil (1977) lograron aislar un complejo polisacárido-proteína (CPP) de la histoplasmina, el cual mostró inicialmente buena especificidad en inmunodifusión en gel. Se han realizado varios trabajos con este complejo y su desproteínización por pronasa y por el método de Sevag condujo a la obtención del antígeno denominado CPPD-Histo (Taylor *et al.*, 1980) que aumenta la especificidad del inmunodiagnóstico de la histoplasmosis en pruebas de alta sensibilidad (Taylor *et al.*, 1980; Reyes-Montes *et al.*, 1982; Toriello *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1993; Toriello *et al.*, 1997).

Además del CPPD-Histo también se ha obtenido con buena especificidad, complejos similares para otros hongos productores de micosis profundas, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis* (Toriello *et al.*, 1982; Toriello *et al.*, 1991; Toriello *et al.*, 1993).

El análisis químico tanto de los antígenos crudos como de los purificados (CPPD) de las especies fúngicas arriba referidas, ha comprobado que en los diferentes lotes de extracción, prevalece una mayor concentración de carbohidratos con respecto a las proteínas. La cromatografía en capa fina mostró que los CPPD's, extraídos de los cuatro hongos productores de micosis profundas, poseen en su composición química fundamentalmente glucosa, manosa y galactosa, además de trazas de hexosaminas en los CPPD-Histo y CPPD-Cocci. La concentración de monosacáridos determinada por cromatografía en gas-líquido mostró mayores porcentajes de manosa y glucosa que de galactosa, en los CPPD's estudiados (Toriello *et al.*, 1982).

El tratamiento con α y β -glucosidasa del CPPD-Histo mostró que el componente antigénico importante para la reacción con el anticuerpo específico es posiblemente una β -glucana, ya que la actividad inmune de este antígeno se perdía únicamente con la acción de la β -glucosidasa (Taylor & Bojalil, 1977). Este comportamiento de pérdida de la actividad inmunológica, al eliminar componentes mono o polisacáridos, ha sido demostrado por otros autores, en particular, Cole *et al.* (1991) mostraron que la oxidación por periodato del carbohidrato de dos fracciones glicoproteicas de 110 y 120 kDa de *C. immitis*, llevó a la pérdida de la habilidad de producir reacción de precipitación con los anticuerpos homólogos.

En vista de que se ha adjudicado a la galactosa o a los residuos terminales galacto-manosil presentes en las fracciones antigénicas de *H. capsulatum*, como las moléculas responsables de los cruces inmunes con algunos hongos productores de micosis (Azuma *et al.*, 1974; Ishizaki *et al.*, 1981), se procedió al tratamiento del antígeno crudo y del CPPD-Histo con α y β -galactosidasas. Se observó por

cromatografía en capa fina, la liberación de galactosa libre sólo cuando se utilizó el tratamiento con β -galactosidasa, lo que indicaba que los antígenos contenían residuos terminales de β -galactosil. En vista de que este tratamiento no modificó la reactividad cruzada con los otros hongos estudiados (*C. immitis*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*) se sugiere que la unidad de cruce en el antígeno CPPD-Histo no es debida a los residuos terminales no reductores de β -galactosa liberados por la acción de la enzima (Jiménez-Montiel *et al.*, 1988).

Diferentes componentes específicos y compartidos, de los antígenos fúngicos de *C. immitis*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*, fueron evidenciados al ser revelados con suero hiperinmune anti-*H. capsulatum* en un análisis inmunolectroforético de la histoplasmina y del CPPD-Histo en doble dimensión y tandem (Toriello *et al.*, 1993). La histoplasmina mostró 14 arcos de precipitación en inmunolectroforésis en doble dimensión, y el análisis en tandem con los CPPD's de todos los hongos productores de micosis profundas, reveló para el CPPD-Histo dos arcos específicos, denominados 1 y 3. La histoplasmina presentó varias fracciones de cruce inmune cuando fue comparada en tandem con los CPPD's heterólogos (Toriello *et al.*, 1993).

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de los antígenos crudos y purificados de hongos productores de micosis profundas mostraron la presencia de distintas fracciones en las respectivas histoplasminas, coccidioidinas y paracoccidioidinas, además de sus CPPD-Histo, CPPD-Cocci y CPPD-Para, presentando los antígenos crudos de 6 a 13 bandas y los purificados de 6 a 8 bandas (Reyes-Montes, 1993; Reyes-Montes, com. pers.).

En la actualidad, los antígenos más usuales de *H. capsulatum* aún no han sido definidos en su localización celular, aunque Graybill *et al.* (1988), con el interés de ampliar el conocimiento sobre los antígenos de este hongo, localizaron la posición celular del antígeno H en pared celular y citoplasma del micelio, y en el núcleo de

levadura, por medio de anticuerpos policlonales, mientras que el empleo de anticuerpos monoclonales seleccionó sólo epítopes citoplasmáticos.

En la mayoría de los trabajos orientados hacia la purificación de fracciones antigénicas de hongos patógenos para el hombre, se han empleado técnicas bioquímicas y/o cromatográficas, las cuales presentan algunas limitaciones. Para mejorar la eficacia de las pruebas serológicas es necesario contar con técnicas que garanticen una rápida producción y además de la cantidad y calidad de los productos antigénicos, razón por la cual, es importante conocer las formas y estructuras fúngicas que contienen mayor cantidad de compuestos antigénicos, para favorecer su producción y mejorar el rendimiento en la obtención del antígeno buscado. La investigación de la ubicación de antígenos en las diferentes formas y estructuras celulares de los hongos se encuentra aún en fases iniciales. Aunque la información actual arroja datos en los modelos de *C. immitis* (Cole *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 1991; Galgiani *et al.*, 1992), *P. brasiliensis* (Straus *et al.*, 1996) y *H. capsulatum* (Patino *et al.*, 1986; Graybill *et al.*, 1988), ésta es aún insuficiente.

Es finalidad de este trabajo, localizar la presencia del complejo polisacárido-proteína desproteinizado de *H. capsulatum* (CPPD-Histo), a nivel de formas y estructuras celulares del hongo, así como la expresión en sus distintas fases dimórficas, además de ubicarlo en las diferentes etapas de su desarrollo.

JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, cuenta con un antígeno parcialmente purificado, complejo polisacárido-proteína desproteínizado de *H. capsulatum* (CPPD-Histo), el cual es útil para discriminar la histoplasmosis de diversas micosis pulmonares y otras enfermedades respiratorias, debido a que presenta bajos niveles de cruce inmune entre el grupo de hongos causantes de micosis sistémicas. Por estas razones este antígeno es una buena herramienta diagnóstica. En la literatura se han reportado antígenos puros del hongo, desafortunadamente la variación antigénica de cepas de *H. capsulatum* y la falta de uniformización en los métodos de producción de estos reactivos biológicos dificultan su uso generalizado, aunado al alto costo de su adquisición, por lo que es importante recurrir a nuestras propias herramientas, como producir nuestros antígenos a bajo costo y fundamentalmente a partir de cepas autóctonas, que garanticen una amplia gama antigénica que cubra las posibilidades de un buen diagnóstico. Las ventajas del uso de antígenos producidos con cepas aisladas en México han sido plenamente documentadas (Toriello *et al.*, 1991; Toriello *et al.*, 1997).

En este trabajo se planteó caracterizar la ubicación preferencial del antígeno CPPD-Histo, en las fases micelial y levaduriforme del hongo, su aparición en el ciclo de crecimiento (expresión temprana o tardía); así como su localización celular en las diferentes formas fúngicas (hifas, macroconidios, microconidios y levaduras) y estructuras celulares (pared celular y otras), por técnicas de microscopía, utilizando métodos de marcaje para microscopía electrónica y de fluorescencia. La información obtenida permitirá profundizar el conocimiento sobre la composición de las diferentes formas y estructuras fúngicas y obtener mayor cantidad de fracciones enriquecidas de CPPD-Histo al favorecer la aparición y crecimiento de las formas donde se encuentre en mayor abundancia, lo que facilitará el empleo de diferentes metodologías para su mejor purificación.

La secuencia de procedimientos para el desarrollo de este trabajo viene esquematizada en la figura 3.

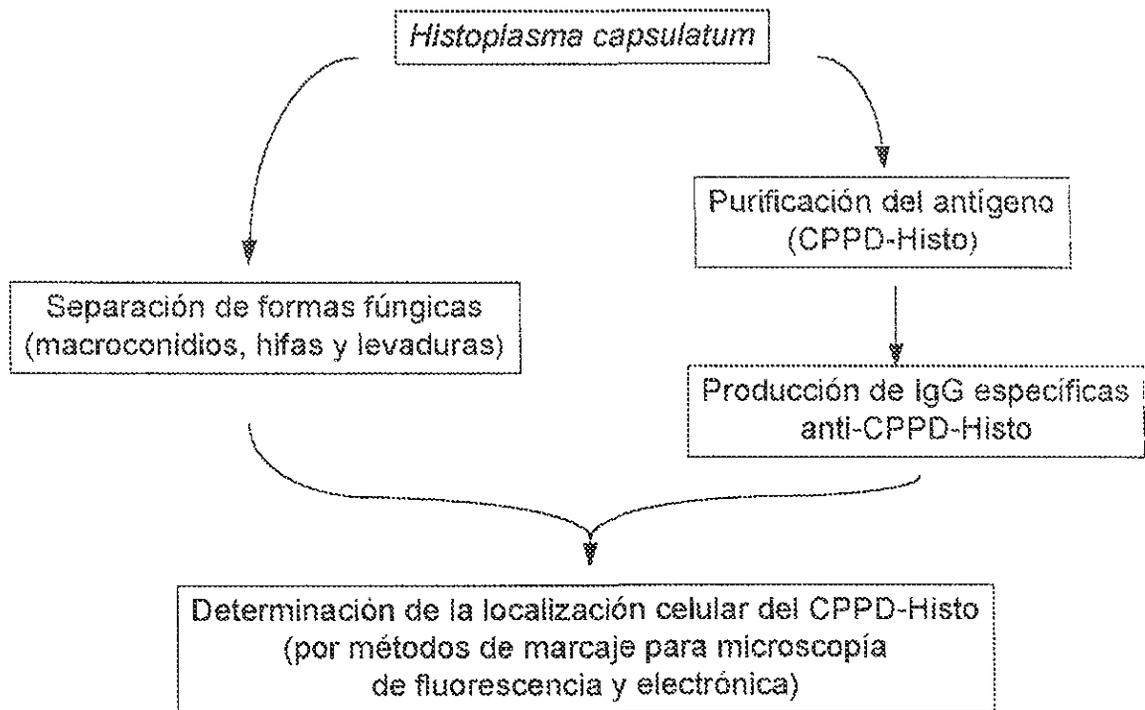


Figura 3: Diagrama general de trabajo

Para mejor comprensión de la ruta de investigación se propone el siguiente orden de experimentos:

- 1.- Producción del antígeno histoplasmina y del CPPD-Histo.
- 2.- Obtención de IgG's específicas anti-CPPD-Histo.

3.- Separación de formas fúngicas: microconidios, macroconidios e hifas. Obtención de levaduras en las diferentes fases de la curva de crecimiento.

4.- Localización celular del CPPD en las diferentes formas y estructuras fúngicas.

OBJETIVO GENERAL

Localizar la posición del antígeno CPPD en diferentes fases, formas y estructuras del hongo *Histoplasma capsulatum* e identificar su aparición durante el ciclo de crecimiento por métodos de marcaje en microscopía de fluorescencia y electrónica, usando anticuerpos policlonales antígeno-específicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Separar los diferentes componentes de la fase micelial del hongo: macroconidios, microconidios e hifas, y obtener levaduras para su procesamiento.

Obtener por medio de cromatografía de afinidad, anticuerpos (IgG's antígeno-específicas) a partir de ratones inmunizados con el antígeno CPPD-Histo.

Proceder al marcaje de formas y estructuras del hongo que permitan el uso de la microscopía de fluorescencia y electrónica para la inmunolocalización del antígeno CPPD-Histo.

OBJETIVO GENERAL

Localizar la posición del antígeno CPPD en diferentes fases, formas y estructuras del hongo *Histoplasma capsulatum* e identificar su aparición durante el ciclo de crecimiento por métodos de marcaje en microscopía de fluorescencia y electrónica, usando anticuerpos policlonales antígeno-específicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Separar los diferentes componentes de la fase micelial del hongo: macroconidios, microconidios e hifas, y obtener levaduras para su procesamiento.

Obtener por medio de cromatografía de afinidad, anticuerpos (IgG's antígeno-específicas) a partir de ratones inmunizados con el antígeno CPPD-Histo.

Proceder al marcaje de formas y estructuras del hongo que permitan el uso de la microscopía de fluorescencia y electrónica para la inmunolocalización del antígeno CPPD-Histo.

OBJETIVO GENERAL

Localizar la posición del antígeno CPPD en diferentes fases, formas y estructuras del hongo *Histoplasma capsulatum* e identificar su aparición durante el ciclo de crecimiento por métodos de marcaje en microscopía de fluorescencia y electrónica, usando anticuerpos policlonales antígeno-específicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Separar los diferentes componentes de la fase micelial del hongo: macroconidios, microconidios e hifas, y obtener levaduras para su procesamiento.

Obtener por medio de cromatografía de afinidad, anticuerpos (IgG's antígeno-específicas) a partir de ratones inmunizados con el antígeno CPPD-Histo.

Proceder al marcaje de formas y estructuras del hongo que permitan el uso de la microscopía de fluorescencia y electrónica para la inmunolocalización del antígeno CPPD-Histo.

HIPÓTESIS

El complejo polisacárido-proteína de *H. capsulatum* (antígeno CPPD-Histo), se expresa en las dos fases del hongo, durante las diferentes etapas del desarrollo, en las diferentes formas y fundamentalmente en pared celular del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Se utilizaron las siguientes cepas de *H. capsulatum* en fase micelial: EH-53 (cepa de referencia del Laboratorio de Inmunología de Hongos, aislada de paciente mexicano con histoplasmosis diseminada); EH-377 (aislada de murciélago infectado y capturado en el estado de Morelos, México). Las cepas hacen parte de la colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

La fase micelial de cada cepa, fue mantenida en agar micobiótico (Bioxón, Becton-Dickinson de México, D.F.) a 28°C, y para la estimulación de conidios se utilizó agar extracto de malta (EM) (Bioxón) con incubación a 25-28°C.

La fase levaduriforme de cada cepa fue obtenida a partir de un cultivo puro de la fase micelial del hongo, a saber: 1.- Disgregar el micelio en mortero de porcelana estéril con amortiguador salino de fosfatos (PBS) (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, H₂O destilada c.b.p. 1000 ml, pH 7.2); 2.- Sembrar el micelio en medio sintético (Tewari & Kegel, 1971); 3.- Incubar a 37°C en baño María con agitación; 4.- Resembrar cada 72 h, hasta obtener la conversión dimórfica; 5.- Finalmente, sembrar en medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI) (Bioxón) adicionado con cisteína (0.1%) y glucosa (1%) e incubar a 37°C para obtener levaduras a ser utilizadas en diferentes ensayos.

ANIMALES

Se emplearon ratones adultos machos de la cepa singénica BALB/c, procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Éstos, se alimentaron con Purina (Purina de México, D.F.) y agua destilada acidificada *ad libitum*.

ANTÍGENOS

Para la obtención de antígeno crudo se utilizó la cepa EH-53 de *H. capsulatum*; se siguió el siguiente procedimiento: Se sembraron, a partir de la fase micelial,

matraces Erlenmeyer con 300 ml de medio Smith (Smith *et al.*, 1948) enriquecido con asparagina, utilizando como inóculo 75-100 ml de precultivos en el mismo medio, conteniendo micelio fragmentado por agitación en presencia de perlas de vidrio. Los cultivos fueron incubados por 2-3 meses y el filtrado de cada uno fue separado, se dializó y concentró 10 veces por ultrafiltración en Amicon (Amicon Colerkington, MASS), utilizando una membrana PM-10 con corte para moléculas de 10 kDa, obteniéndose así el antígeno crudo histoplasmina. Previo almacenamiento a -20°C , se determinó concentraciones de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) y carbohidratos (Dubois *et al.*, 1956).

Obtención del complejo polisacárido-proteína (CPP): El antígeno purificado, complejo polisacárido-proteína (CPP), de la cepa EH-53, se obtuvo a partir del antígeno crudo histoplasmina, empleando el método modificado de Taylor & Bojalil (1977). Brevemente: 1.- Agregar 15 ml de fenol líquido por cada 10 ml de filtrado de histoplasmina; 2.- Incubar 1 h a 56°C , con agitación ocasional; 3.- Enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 500 g durante 1 hora; 4.- Remover la fase acuosa, mezclar con 3 volúmenes de alcohol etílico al 96% y añadir acetato de sodio al 1% para acelerar la precipitación; 5.- Incubar por 24 h a 4°C ; 6.- Recuperar el CPP precipitado, por centrifugación a 500 g por 1 hora; 7.- Disolver el CPP en agua destilada y reprecipitarlo con etanol al 96%, repitiendo esta última operación dos veces; 8.- Finalmente, liofilizar y conservar a -20°C .

Obtención del CPPD-Histo: El antígeno CPPD se obtuvo a partir del CPP previamente obtenido y según lo descrito anteriormente, empleando el método de Taylor *et al.* (1980). Brevemente: 1.- Disolver el antígeno CPP, anteriormente separado, en la cantidad necesaria de PBS pH 7.5 adicionado con cloruro de calcio 0.0001M; 2.- Agregar 25 μg de pronasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), por cada 500 μg de proteína del CPP para proceder a la primera desproteínización del CPP; 3.- Incubar la mezcla CPP-pronasa por una semana (7 días) a 37°C , añadiendo diariamente la enzima, a la mitad de la cantidad usada el día anterior y adicionar 1 a 2 gotas diarias de tolueno para evitar contaminación; 4.- Proceder, simultáneamente, a la elaboración de un testigo con 500 μg de albúmina sérica bovina (ASB) por ml de PBS; 5.- Determinar los grupos amino libres, como control de la digestión enzimática, a

través de la prueba de la ninhidrina (Kabat & Mayer, 1968), al inicio y al final del tiempo de digestión, usando lisina como testigo; 6.- Detener el tratamiento al séptimo día, por congelación; 7.- Proceder a un segundo tratamiento de desproteización por el método de Sevag (Sevag, 1934), para completar la desproteización del complejo y eliminar la pronasa, iniciando el tratamiento con la mezcla de 10 partes de complejo polisacárido-proteína tratado con pronasa con 50 partes del reactivo de Sevag (9 partes de cloroformo:1 parte de butanol); 8.- Colocar la mezcla en un embudo de separación agitando fuertemente previa separación en refrigeración, dejar reposar de 10 a 15 minutos; 9.- Separar la fase acuosa de las demás fases obtenidas (la inferior con el reactivo de Sevag, la media con las proteínas precipitadas y la superior con la fase acuosa enriquecida del CPPD-Histo); 10.- Lavar 2 ó 3 veces con agua destilada la fase cloroformo-butanol, para recuperar residuos del CPPD-Histo; 11.- Dializar las fases acuosas recuperadas, durante 24 h, cambiando el agua 4 o 5 veces; 12.- Precipitar el CPPD-Histo obtenido, con etanol y acetato de sodio; 13.- Almacenar a -20°C , previa determinación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) y carbohidratos (Dubois *et al.*, 1956). Para corroborar la actividad inmune, los antígenos histoplasmina y CPPD-Histo se probaron por IDG siguiendo el método descrito por Ouchterlony & Nilsson (1978).

OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE IgG ESPECÍFICAS ANTI-CPPD-Histo (IgG anti-CPPD-Histo)

Protocolo de inmunización: Se procedió a la obtención de sueros de ratones inmunizados con ambos antígenos, histoplasmina y CPPD-Histo, según la siguiente metodología: 1.- Inmunizar ratones con 0.25 ml de la histoplasmina (70 μg de proteína) mezclada en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF, relación v/v) (Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, N. Y.), los días 1, 15 y 30, por vía intraperitoneal; 2.- Inyectar el día 45, 0.25 ml de CPPD-Histo conteniendo 4-8 μg de carbohidrato en AIF (relación v/v), por vía intraperitoneal; 3.- Aplicar el día 55, 0.5 ml del CPPD-Histo, disuelto en solución salina fisiológica, conteniendo 8-16 μg de carbohidrato, por vía intraperitoneal; 4.- Sangrar a los ratones tres días después para determinar los títulos de anticuerpos, valorando éstos por ELISA indirecta (Voller *et al.*, 1979), utilizando 100

μg proteína/100 μl pozo del antígeno histoplasmina y el conjugado polivalente anti-gammaglobulina de ratón biotinilada con el sistema avidina-peroxidasa, para revelar la reacción. Para la lectura a 492 nm se utilizó el aparato Labsystems Multiskan MS modelo 352.

Los sueros se sometieron a cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa CL-4B-Proteína A (Sigma) y posteriormente en Sefarosa activada (Sigma) unida a CPPD-Histo, para obtener una fracción enriquecida de isotipo IgG con actividad anti-CPPD-Histo.

Obtención de fracciones enriquecidas de IgG: Se siguió el procedimiento descrito por Ey *et al.* (1978): 1.- Equilibrar una columna de Sefarosa 4B-Proteína A (Sigma) con PBS 0.1M pH 8.0 y aplicar suero inmune de ratón; 2.- Incubar 30 min a 4°C; 3.- Lavar la columna con PBS 0.1M pH 8.2, hasta obtener una densidad óptica de cero; 4.- Recolectar con la ayuda de un cromatógrafo Gilson modelo 11B FC 203, las fracciones retenidas (FRs) por la columna, eluyéndolas con amortiguador de glicina-HCl 0.1M, pH 2.6; 5.- Ajustar con TRIS-base 0.1M, pH 9.0, el pH a 7.0 de cada una de las FRs y de las fracciones no retenidas (FNRs) recolectadas; 6.- Almacenar las FRs en nitrógeno líquido, previa concentración y diálisis por Amicon (Amicon) con membranas PM-10 con corte para moléculas de 10 kDa y cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951); 7.- Determinar la actividad inmunespecífica de ambas fracciones para el antígeno CPPD-Histo (50 μg proteína/100 μl pozo), por el método de ELISA indirecta (Voller *et al.*, 1979) utilizando el conjugado anti-IgG total de ratón biotinilado con el sistema avidina-peroxidasa; 8.- Repetir los procedimientos desde el paso 1, en caso de que las FNRs presenten actividad contra el antígeno; 9.- Proceder de modo similar en una columna adicional con un suero normal de ratón, como testigo; 10.- Las fracciones retenidas serán sometidas a cromatografía de afinidad Sefarosa activada unida a CPPD-Histo.

Acoplamiento de CPPD-Histo a Sefarosa: Se siguió el procedimiento de Parikh *et al.* (1974): 1.- Lavar la Sefarosa CL-4B (Sigma) con NaCl 0.1M y posteriormente con agua destilada; 2.- Agregar una solución de carbonato de potasio 2M a la Sefarosa lavada (1 ml de carbonato de potasio/ml de Sefarosa) con agitación

lenta a 4°C; 3.- Disolver 250 mg de bromuro de cianógeno en acetonitrilo a 4°C (0.5 g de bromuro de cianógeno/ml de acetonitrilo); 4.- Adicionar la solución anterior a la Sefarosa (1 ml de la solución por cada ml de Sefarosa), agitar lenta y constantemente durante 2 min a 4°C y ajustar el pH a 9.5; 5.- Lavar la Sefarosa mezclada con bromuro de cianógeno con agua destilada fría; 6.- Disolver el CPPD-Histo (40 mg de proteína/10 ml de Sefarosa) en una solución de bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.5 (1.5 ml de bicarbonato de sodio/ 20 mg de proteína del CPPD-Histo); 7.- Resuspender la Sefarosa en la solución de bicarbonato de sodio conteniendo el CPPD-Histo; 8.- Transferir la mezcla anterior a un recipiente color ámbar, agitando 24 h a 4°C; 9.- Lavar con agua fría y con bicarbonato de sodio 0.1M, 2 veces cada lavado; 10 .- Incubar en glicina 1M 2 h a 4°C, y lavar con bicarbonato de sodio 0.1M; 11.- Empacar y equilibrar la columna con PBS 0.1M pH 8.2.

Purificación de IgG's anti-CPPD-Histo: A partir de la preparación de la columna de Sefarosa-Proteína A (Sigma), se siguió el siguiente procedimiento: 1.- Aplicar 2.5 ml de la FR separada por la cromatografía de afinidad con Proteína A y adicionar 2 ml de PBS 0.1M, pH 8.0; 2.- Eluir las FRs en la columna con amortiguador de glicina-HCl 0.1M, pH 2.6; 3.- Ajustar con TRIS-base 0.1M, pH 9.0, el pH a 7.0 de cada una de las FRs; 4.- Almacenar las FRs en nitrógeno líquido, previa concentración y diálisis por Amicon (Amicon) con membranas PM-10 con corte para moléculas de 10 kDa y cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951); 5.- Determinar la actividad inmuno-específica por el método de ELISA indirecta (Voller *et al.*, 1979); utilizando el antígeno CPPD-Histo (50 µg proteína/100 µl pozo) y el conjugado anti-IgG total de ratón biotinilado con el sistema avidina-peroxidasà, según lo referido anteriormente.

OBTENCIÓN DE FORMAS FÚNGICAS

Separación de macroconidios e hifas: A partir del crecimiento de *H. capsulatum* en agar EM a 25-28°C, se procedió a obtener micelio para los ensayos de separación de conidios, según el siguiente procedimiento: 1.- Cosechar micelio después de un mes de desarrollo (tiempo óptimo para la esporulación); 2.- Homogeneizar la suspensión por sonicación, dando pulsos con diferentes ciclos; 3.-

acetona; 3.- Cortar en el criostato (cortes de 4-8 μm); 4.- Colocar los cortes sobre laminillas con poli L-lisina (Sigma); 5.- Hidratar los cortes con PBS (pH 7.2) 15 min a temperatura ambiente; 6.- Bloquear en PBS-albúmina sérica bovina (ASB) al 1%-Tween 20 al 0.15% (PBS/ASB/Tween), 15 min a temperatura ambiente; 7.- Incubar con el anticuerpo primario IgG anti-CPPD-Histo o con una IgG no específica (testigo), en cámara húmeda a 4°C, toda la noche (preparar varias diluciones del anticuerpo primario en PBS/ASB/Tween, centrifugando a 600 g, 4 min antes de usarlas); 8.- Lavar tres veces en PBS/ASB/Tween, 20 min a temperatura ambiente; 9.- Incubar con el anticuerpo secundario anti-isotipo del anticuerpo primario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) probando varias diluciones (1:20, 1:50, 1:100) por 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad; 10.- Lavar en PBS/ASB/Tween, 20 min a temperatura ambiente; 11.- Montar en PBS/glicerol (1:9); 12.- Guardar a 4°C en oscuridad y observar de inmediato en microscopio de fluorescencia (Nikon modelo HFX-DX).

Por microscopía electrónica: A partir de las estructuras fúngicas obtenidas, se procedió a la preparación para la microscopía electrónica, según Waele *et al.* (1983), brevemente: 1.- Fijar con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.2 % en PBS pH 7.2 por 2 horas; 2.- Lavar con PBS pH 7.2; 3.- Deshidratar en gradientes de etanol (50, 70, 80, 95, 100%, con un cambio al 100%) a -20°C por 1 h, cada cambio; 4.- Tratar con la resina Lowicryl 4x (Polysciences), para realizar la inclusión en la resina se colocaron las muestras en gradientes de resina/etanol en proporción 1:1 por 2 h, 2:1 por 2 h, resina pura 2 h, con último cambio de resina pura por 12 h, realizando los tratamientos a -20°C; 5.- Polimerizar la resina a -20°C con luz ultravioleta; 6.- Probar por inmunofluorescencia la conservación de la reactividad inmune de la muestra, siguiendo el método anterior, del paso 4 al 11, pero con cortes de 1 μm ; 7.- Realizar cortes finos (40 nm) de las muestras con fluorescencia positiva y depositarlas sobre rejillas de níquel recubiertas con Formvar (Polysciences), conservar a 4°C; 8.- Hidratar el tejido depositando las rejillas sobre gotas de PBS, pH 7.2, por 30 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda; 9.- Bloquear las muestras en las rejillas sobre gotas de PBS/ASB/Tween a temperatura ambiente; 10.- Incubar las rejillas en 50 μl del

anticuerpo primario IgG anti-CPPD-Histo o con una IgG no específica (testigo), preparar varias diluciones del anticuerpo primario en PBS/ASB/Tween (1:500, 1:1000, 1:2000), centrifugando a 600 g, 4 min antes de usarlas; 11.- Colocar cada rejilla en una cápsula BEEM.00 (Polysciences), con cada dilución del anticuerpo primario, incubando toda la noche a 4°C; 12.- Lavar con PBS/ASB/Tween, 20 ml, por rejilla, y flotar 5 min sobre PBS/ASB 1%; 13.- Incubar 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda con el anticuerpo secundario anti-isotipo del anticuerpo primario acoplado a oro coloidal de 10 o 15 nm (Sigma), probando varias diluciones (1:50-1:100), para ello, depositar las rejillas sobre gotas de anticuerpo secundario diluido en PBS/ASB/Tween y obtenido por centrifugación a 600 g 4 min, antes de usarlo; 14.- Lavar las rejillas con PBS/ASB/Tween, 20 ml por rejilla, flotar 5 min sobre PBS/ASB 1% y lavar con agua desionizada; 15.- Secar las rejillas y contrastar con acetato de uranilo (Sigma) 5% por 10 minutos; 16.- Lavar, secar y observar al microscopio electrónico de transmisión JEOL, modelo JEM-1200EXII.

RESULTADOS

ANTÍGENOS

Se obtuvieron los antígenos crudo (histoplasmina) y purificado (CPPD-Histo) de la cepa EH-53 de *H. capsulatum*, a los cuales se les determinó la concentración de carbohidratos y proteínas. Los resultados obtenidos se observan en el cuadro 1, destacando que predominan los carbohidratos en ambos antígenos, con la particularidad que en el CPPD-Histo, la relación carbohidratos:proteínas fue de 4:1 aproximadamente.

Cuadro 1: Determinaciones químicas de los antígenos obtenidos

Antígenos Cepa EH-53	Proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Carbohidratos ($\mu\text{g/ml}$)
Histoplasmina	4300	19400
CPPD-Histo	800	4000

La actividad inmune de los antígenos fue probada por IDG, siguiendo el esquema de la figura 4. Todos los antígenos analizados dieron reacción positiva frente al suero específico. Se observaron las bandas de precipitación H y M características de *H. capsulatum* en las histoplasminas, mientras que el CPPD-Histo sólo presentó una banda. La especificidad de la reacción se confirmó por ausencia de reacción en los testigos de solución salina y de suero de individuo sano.

FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE IgG ESPECÍFICAS ANTI-CPPD-Histo

Se procedió a purificar las fracciones de IgG's murinas que tuvieran actividad inmune al CPPD-Histo, a partir del suero de los ratones inmunizados. Se separaron, por cromatografía de afinidad en Sefarosa-Proteína A, fracciones enriquecidas de IgG totales (FR's eluidas de la columna) que mostraron una concentración de proteínas de 10.8 mg/ml y los títulos de 1:320 en ELISA, al utilizar el CPPD-Histo como antígeno

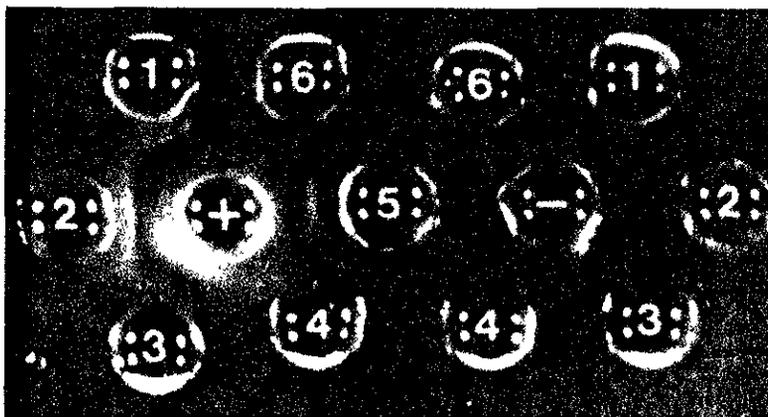


Figura 4: Actividad inmune de los antígenos de la cepa EH-53 en IDG. Los antígenos fueron obtenidos según lo descrito en materiales y métodos. 1=CPPD-Histo EH-53; 2=M210; 3=EH-53; 4=M222; 5=testigo de antígeno específico; 6=solución salina isotónica; +=suero de paciente con histoplasmosis comprobada; -=suero de individuo sano.

unido a fase sólida (Cuadro 2). Las fracciones enriquecidas de IgG's al ser seleccionadas para la actividad anti-CPPD-Histo, por cromatografía de afinidad en Sefarosa-CPPD-Histo, presentaron un rendimiento muy bajo con una concentración de proteínas de 0.05 mg/ml, y un título de 1:640 en ELISA frente al antígeno homólogo. Éstas fracciones fueron seleccionadas para los ensayos de microscopia de fluorescencia y electrónica. Las fracciones no retenidas (FNR) separadas tanto en la columna de Sefarosa-Proteína A como en Sefarosa-CPPD-Histo no fueron reactivas al CPPD-Histo (Cuadro 2). Un condensado de los resultados de cada una de las fracciones probadas, incluyendo las lecturas en densidades ópticas obtenidas, postseparación en el cromatógrafo, para cada una de las fracciones, así como, los datos registrados para los anticuerpos empleados como testigos (IgG normal), se registran en el cuadro 2.

FORMAS FÚNGICAS

La separación de formas fúngicas a partir del micelio de *H. capsulatum*, se procedió en la cepa EH-377, seleccionada por la gran cantidad de macroconidios que produce, la cual fue sembrada en agar extracto de malta para estimular la conidiación.

Cuadro 2: Actividad inmune de las IgG's obtenidas por cromatografía.

Anticuerpos (fracciones)	D.O.	Proteínas (mg/ml)	ELISA [§] (título)
IgG anti <i>Histoplasma</i> (FR) [†]	1.095	10.8	1:320
IgG anti <i>Histoplasma</i> (FNR) [†]	1.693	171	(-)
IgG anti CPPD-Histo (FR) [‡]	0.210	0.05	1:640
IgG anti CPPD-Histo (FNR) [‡]		3.2	(-)
IgG normal (FR) [†]	0.722	4.4	(-)
IgG normal (FNR) [†]	1.695	87.3	(-)

[§]Se utilizó el método de ELISA indirecta (Voller *et al.*, 1979) empleando el conjugado anti-IgG total de ratón biotilado (ver detalles en materiales y métodos). [†]Fracciones obtenidas por cromatografía en Sefarosa-Proteína A. [‡]Fracciones obtenidas por cromatografías en Sefarosa-Proteína A y Sefarosa-CPPD-Histo. FR=Fracción retenida en la columna; FNR= Fracción no retenida en la columna.

La disgregación de las formas fúngicas fue probada por sonicación, siendo la aplicación de 60 y 70 Hertz la adecuada (Cuadro 3). Por consiguiente, esta condición fue la elegida para proceder a la separación por centrifugación en gradiente de Percoll. En la centrifugación diferencial, se obtuvieron tres fracciones; en la primera, parte superior del gradiente (Figura 5), se observó una gran cantidad de fragmentos de hifas; en la segunda fracción, parte media del gradiente (Figura 6), se separó una fracción enriquecida de macroconidios; y en la tercera fracción, parte del sedimento (Figura 7), se encontraron restos de micelio y de medio de cultivo.

Cuadro 3: Separación de muestras de micelio de *H. capsulatum* por sonicación.

Muestra	Ciclos aplicados (Hertz)	Pulsos	Tiempo	Separación ⁺
1	30	5	30 seg/pulso	*
2	40	5	30 seg/pulso	*
3	50	5	30 seg/pulso	**
4	60	5	30 seg/pulso	***
5	70	5	30 seg/pulso	***
6	80	5	30 seg/pulso	**
7	90	5	30 seg/pulso	**
8	100	5	30 seg/pulso	**

Se utilizó la cepa EH-377 para este procedimiento.

⁺Valoración de la separación: * Mala; ** Regular; *** Buena.

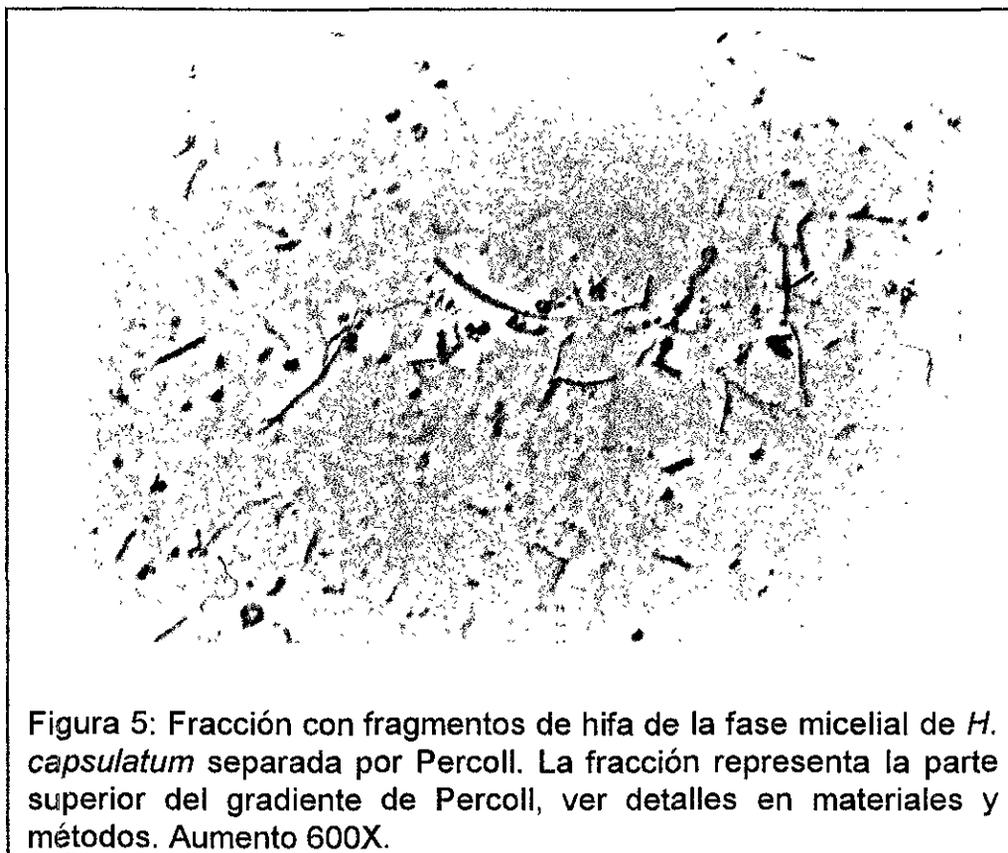


Figura 5: Fracción con fragmentos de hifa de la fase micelial de *H. capsulatum* separada por Percoll. La fracción representa la parte superior del gradiente de Percoll, ver detalles en materiales y métodos. Aumento 600X.

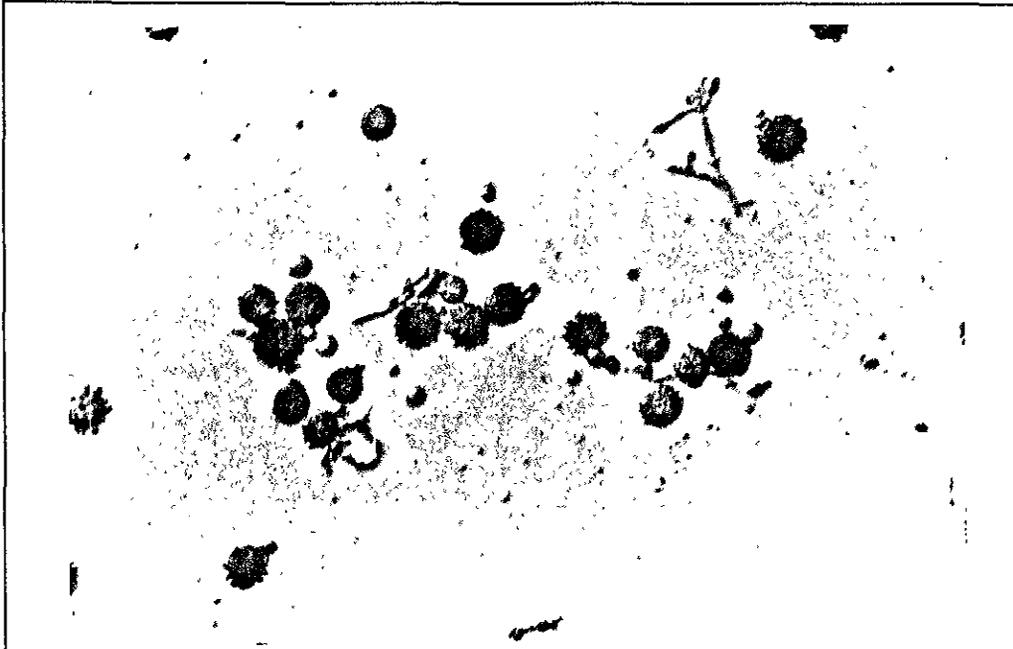


Figura 6: Fracción enriquecida de macroconidios de la fase micelial de *H. capsulatum* separada por Percoll. La fracción representa la parte media del gradiente de Percoll, ver detalles en materiales y métodos. Aumento 600X.

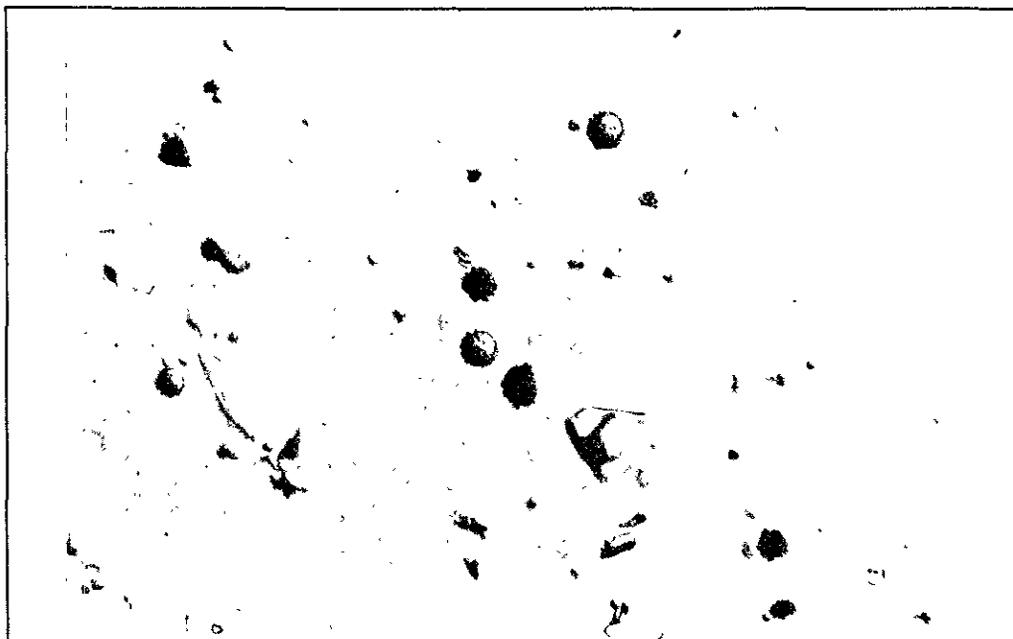


Figura 7: Fracción del sedimento de la fase micelial de *H. capsulatum* separada por Percoll. La fracción representa la parte del sedimento del gradiente de Percoll, ver detalles en materiales y métodos. Aumento 600X.

Para la obtención de las formas levaduriformes se realizaron las curvas de crecimiento de las dos cepas de *H. capsulatum*. Ambas curvas mostraron una cinética similar, con diferentes tiempos de generación (t_g). Para la cepa EH-53, el $t_g=2:13$ h y para la cepa EH-377, el $t_g=6:18$ horas. Se seleccionó la curva de crecimiento para la cepa EH 377 (Figura 8), con el $t_g=6:18$ h, el cual permite discriminar más fácilmente las tres etapas (temprana, media y tardía) de la fase logarítmica de crecimiento. Las levaduras de esta fase fueron usadas para el procesamiento en microscopía de fluorescencia y electrónica.

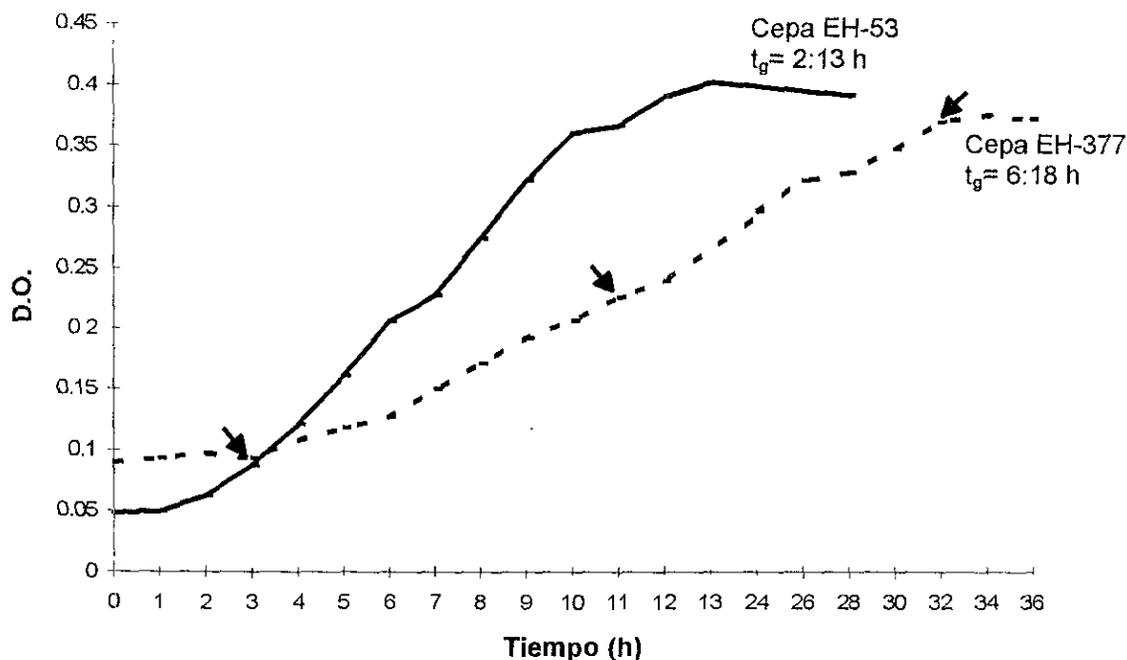


Figura 8: Curva de crecimiento de levaduras de *H. capsulatum*. Las levaduras fueron cultivadas en medio sintético a 37°C. A partir de un inóculo inicial se estimuló el crecimiento de las células en condiciones estables (ver detalles en materiales y métodos). El tiempo de generación se calculó según Amaral *et al.* (1967). Las flechas indican las etapas de la fase logarítmica de crecimiento, utilizada para el procesamiento en microscopía electrónica.

INMUNOLocalIZACIÓN CELULAR DEL CPPD-Histo

Microscopía de fluorescencia: Las formas y estructuras fúngicas fueron inicialmente observadas en microscopía de fluorescencia. Las formas separadas por Percoll no desarrollaron fluorescencia en ninguna de sus fracciones, aún cuando se cambió el anticuerpo primario (suero anti-*Histoplasma* o IgG anti-*Histoplasma*). Dada la repetitividad de ausencia de reacción en las formas fúngicas provenientes de la separación con Percoll, se procedió a obtener formas directamente de la masa fúngica a partir de colonias en cultivo sólido. El resultado obtenido con estas muestras se observa en la figura 9, donde la inmunofluorescencia revela el antígeno distribuido en la pared celular y en los septos de las hifas. Para las levaduras cosechadas en las tres etapas de la fase logarítmica de crecimiento, las marcas de fluorescencia se observan distribuidas en la zona correspondiente a la pared celular (Figura 10), no habiendo diferencias en las muestras colectadas en las distintas etapas de la fase logarítmica de crecimiento. Por otro lado, en los controles negativos no se observó fluorescencia.

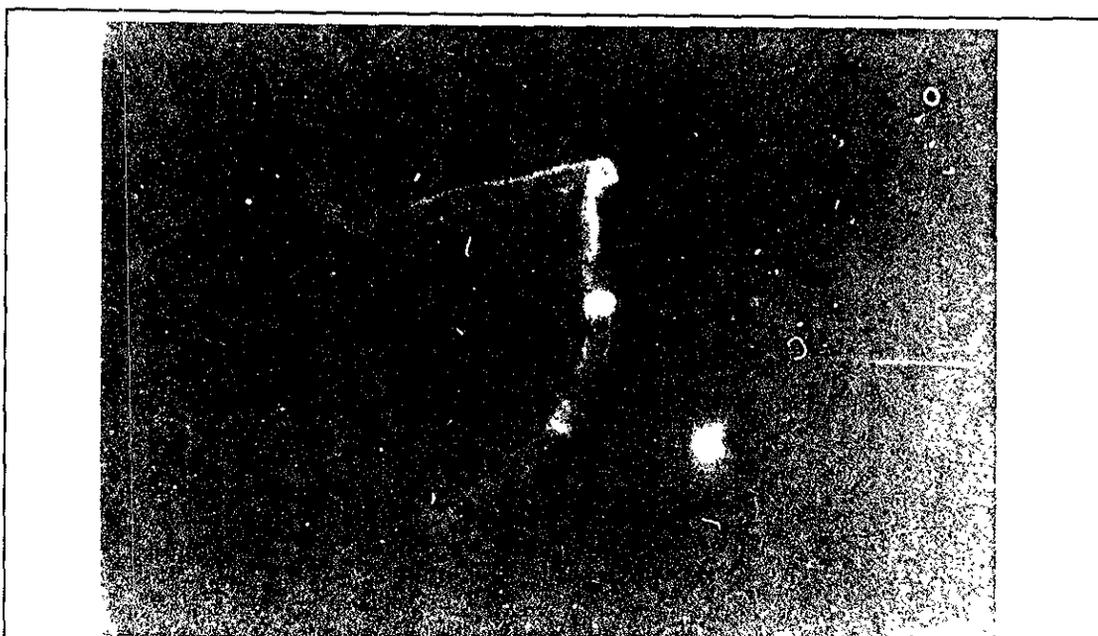


Figura 9: Inmunolocalización por fluorescencia del CPPD-Histo en la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-CPPD-Histo como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti IgG marcado con FITC, en dilución 1:50. (ver detalles en materiales y métodos). Aumento 1300X.

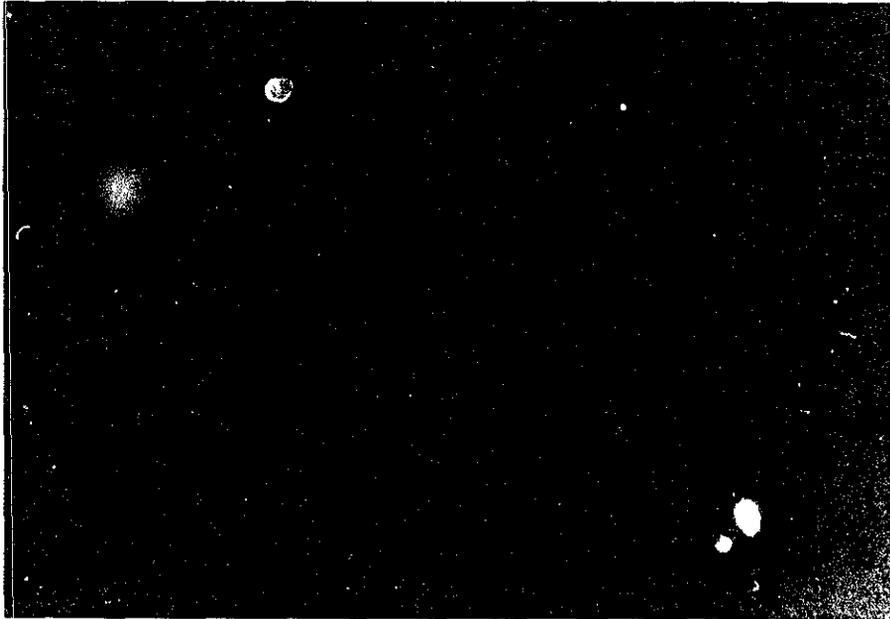


Figura 10: Inmunolocalización por fluorescencia del CPPD-Histo en la fase levaduriforme de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-CPPD-Histo como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti IgG marcado con FITC, en dilución 1:50. (ver detalles en materiales y métodos). Aumento 1300X.

Microscopía electrónica: El método de inmunoro permitió discriminar la ubicación del CPPD-Histo, en las diferentes estructuras fúngicas estudiadas. En hifas, la localización del antígeno no está muy bien definida (Figura 11). En los macroconidios, las marcas se ubican fundamentalmente en la pared celular de las proyecciones digitiformes como se observa en la secuencia de las figuras 12a, b y c, donde en el detalle de la figura 12c podemos apreciar con mayor claridad las marcas de oro coloidal. Una mejor observación de las marcas se ilustran en la secuencia de las figuras 13a, b y c, los acercamientos de las figuras 13b y c muestran abundantes marcas de oro coloidal en la zona de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de una sección de la proyección digitiforme de un macroconidio inmaduro

(Figura 13c), a diferencia de las capas delgadas de la pared de los macroconidios (Figuras 14a, b y c). En numerosas observaciones de los microconidios se encontraron depósitos específicos de oro coloidal distribuidos uniformemente en la pared celular (Figuras 15a y b). En las levaduras no se observaron localizaciones definidas de las marcas de oro coloidal, éstas se distribuyeron indiscriminadamente en células cosechadas en las diferentes etapas de la fase logarítmica de crecimiento y se distribuyeron en toda la célula, como se observan en las figuras 16a y b. Los controles negativos (Figuras 12d, 13d, 14d y 16c) mostraron muy poca marca inespecífica.

Figura 11: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en hifas de la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 10 nm, en dilución 1:50 (ver detalles en materiales y métodos). Aumento 22000X.



Figura 12: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en macroconidios de la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 10 nm, en dilución 1:50. a) Vista general de un macroconidio (aumento 16000X). b) Acercamiento de la estructura anterior, resaltando las marcas de oro coloidal (aumento 24000X). c) Detalle de la pared celular con abundantes marcas (aumento 38000X). d) Control negativo (aumento 14000X). pd= proyección digitiforme; o= marcas de oro coloidal.



c



d

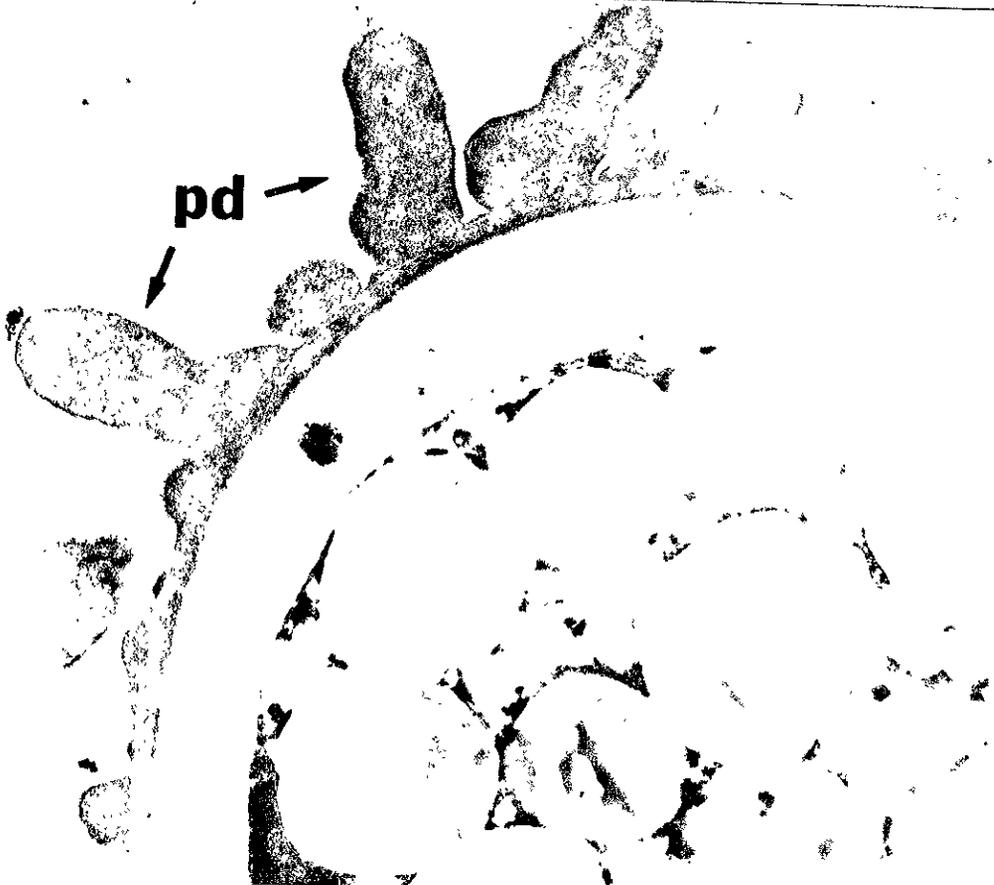
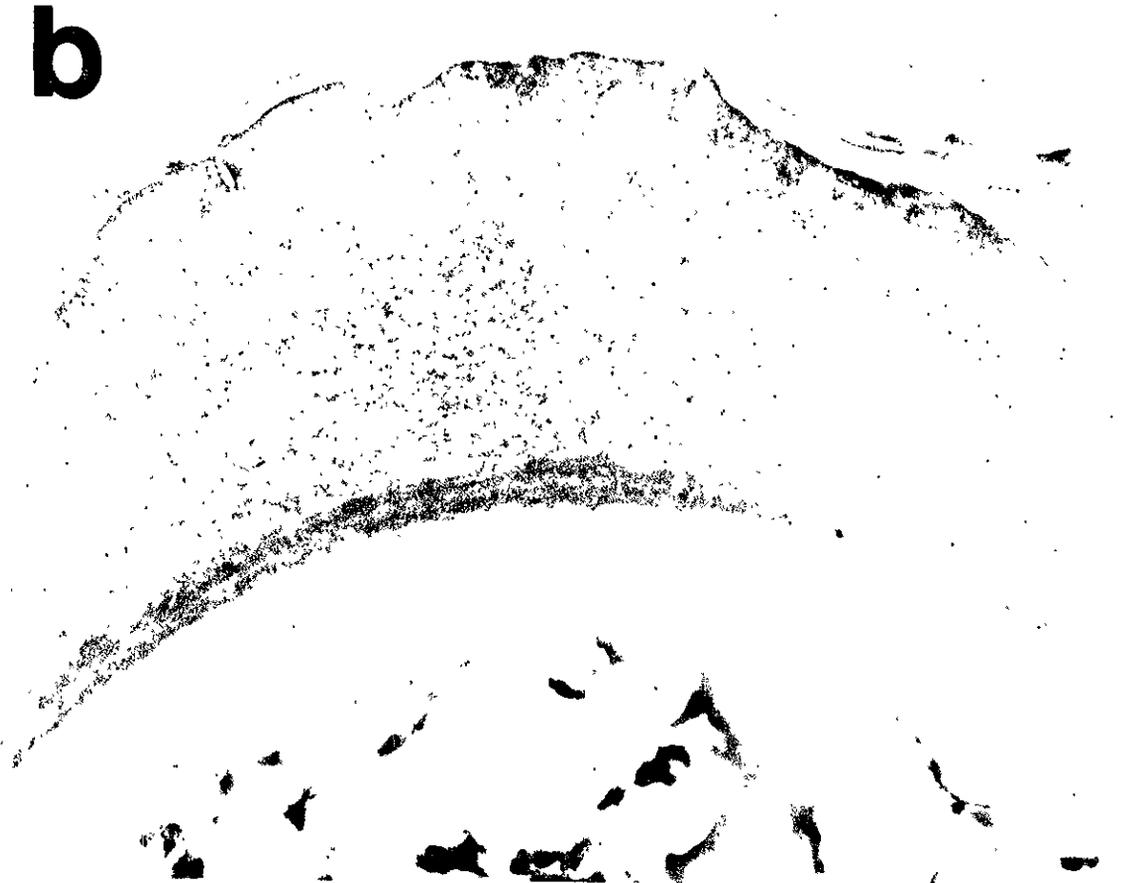
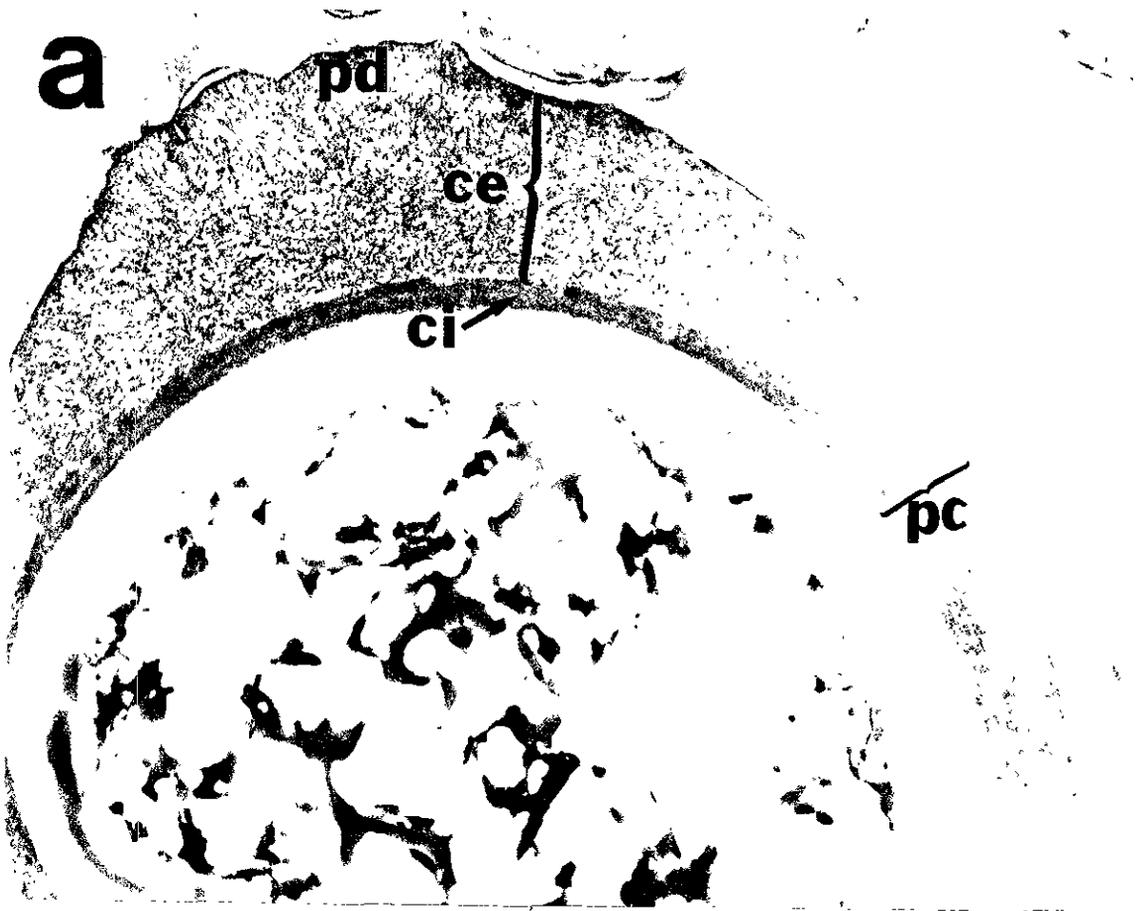


Figura 13: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en la zona de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de macroconidios de la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 10 nm, en dilución 1:50. a) Vista general de un macroconidio inmaduro (aumento 16000X). b) Acercamiento de la estructura anterior, resaltando las marcas de oro coloidal (aumento 24000X). c) Detalle de la proyección digitiforme con las marcas en la zona de mayor grosor de la capa externa de la pared celular (aumento 20000X). d) Control negativo (aumento 13000X). pc= pared celular; pd= proyección digitiforme; ce= capa externa de la pared celular; ci= capa interna de la pared celular; o= marcas de oro coloidal.



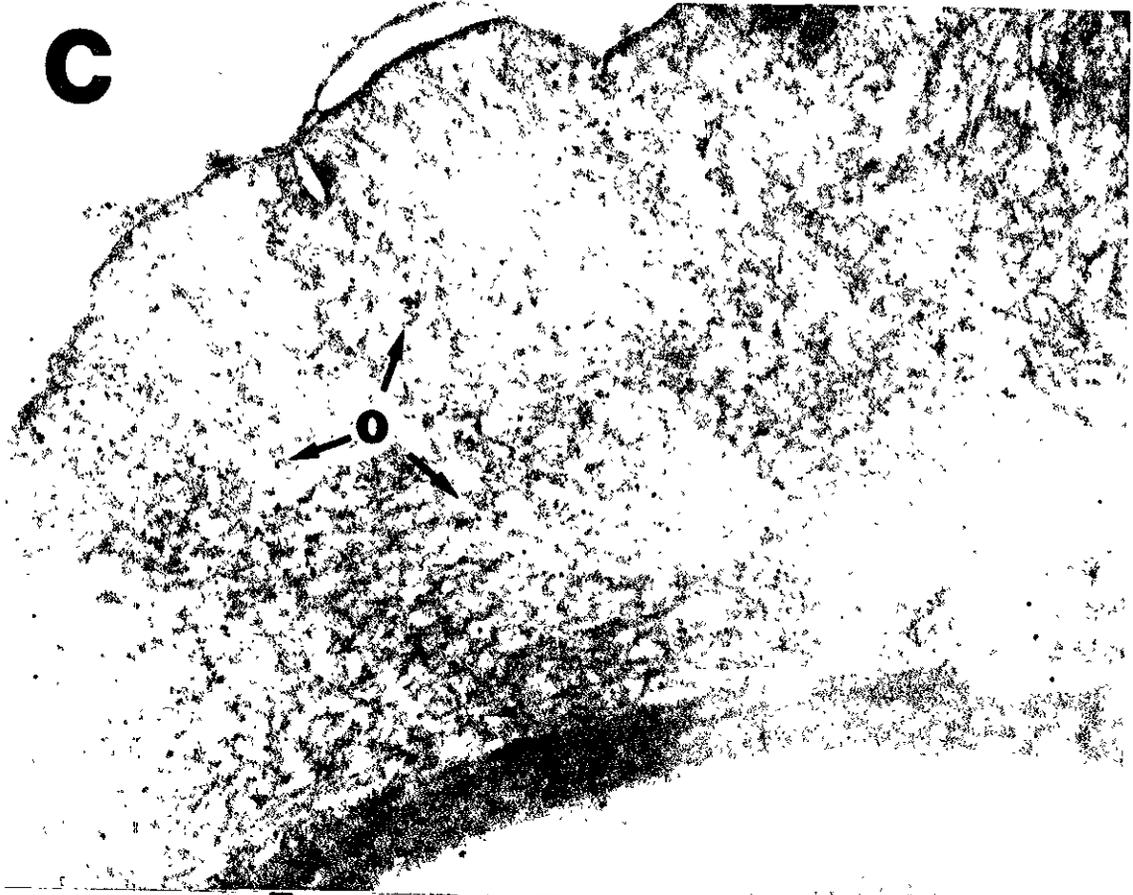
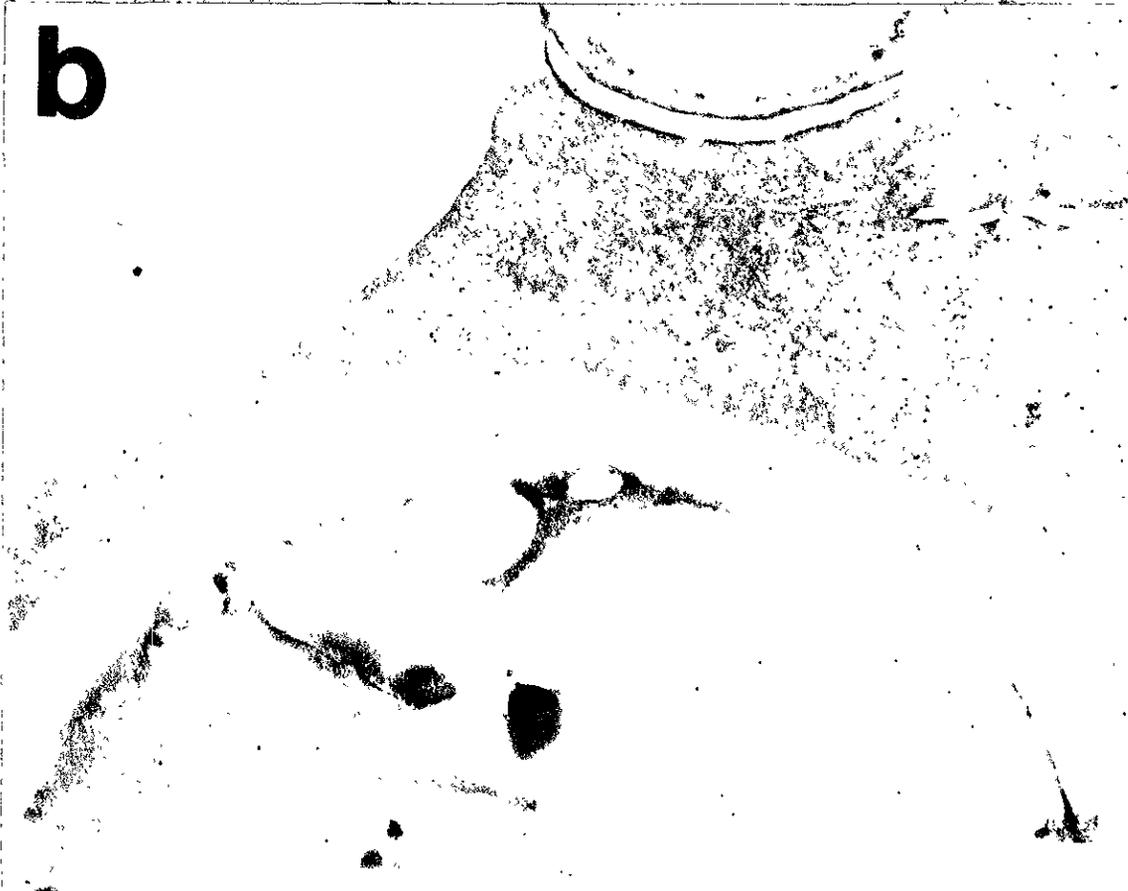
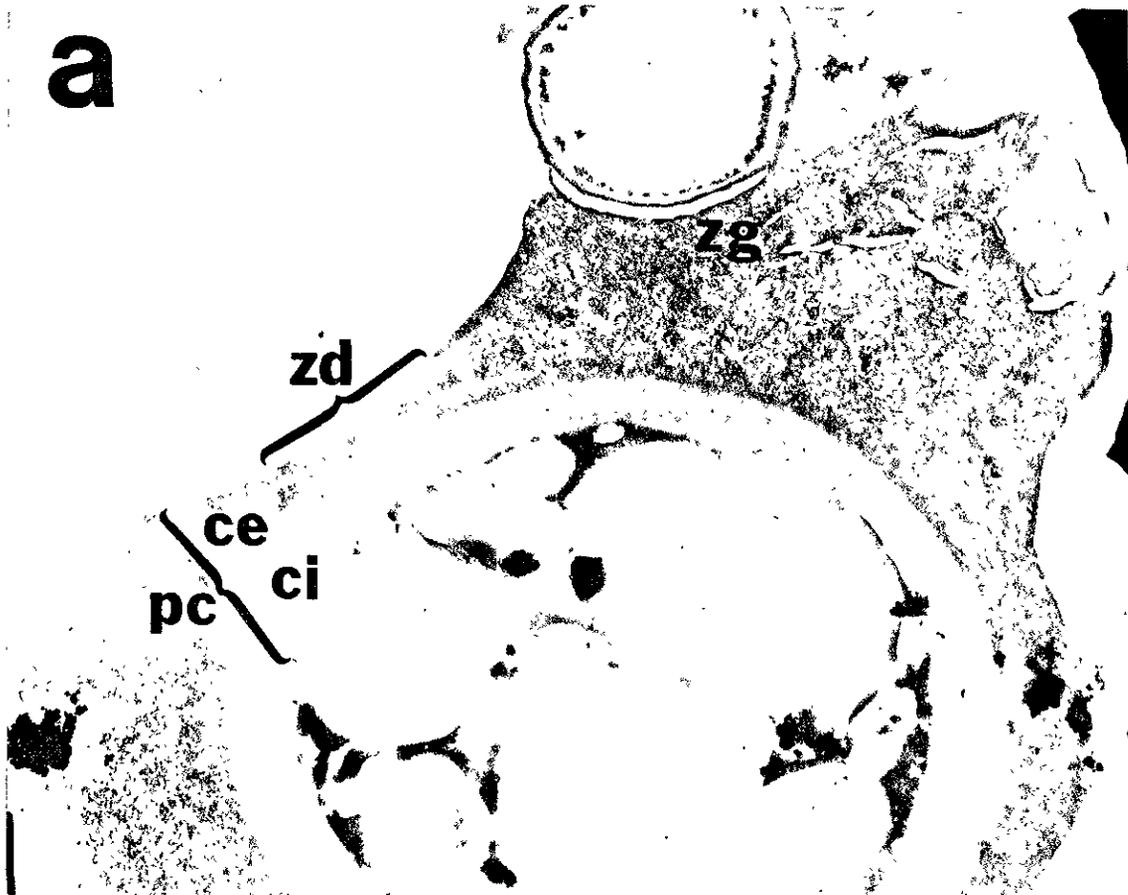
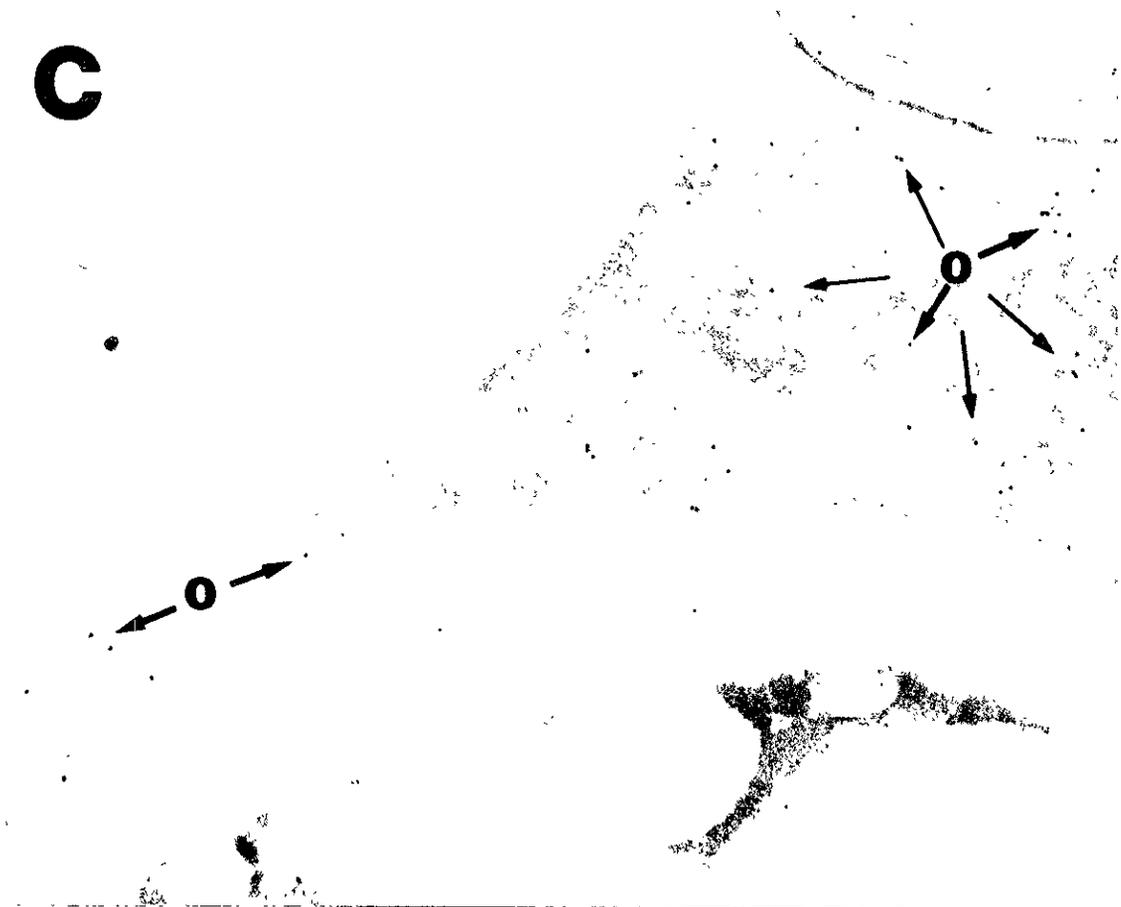


Figura 14: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en las zonas delgadas de la capa externa de la pared celular de macroconidios de la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 10 nm, en dilución 1:50. a) Vista general de un macroconidio (aumento 16000X). b) Acercamiento de la estructura anterior, resaltando las marcas de oro coloidal (aumento 23000X). c) Detalle de la proyección digitiforme con pocas marcas en las capas delgadas de la pared celular (aumento 36000X). d) Control negativo (aumento 10000X). pc= pared celular; ce= capa externa de la pared celular; ci= capa interna de la pared celular; zd= zona delgada de la capa externa de la pared celular; zg= zona de mayor grosor de la capa externa de la pared celular; o= marcas de oro coloidal.



c



d

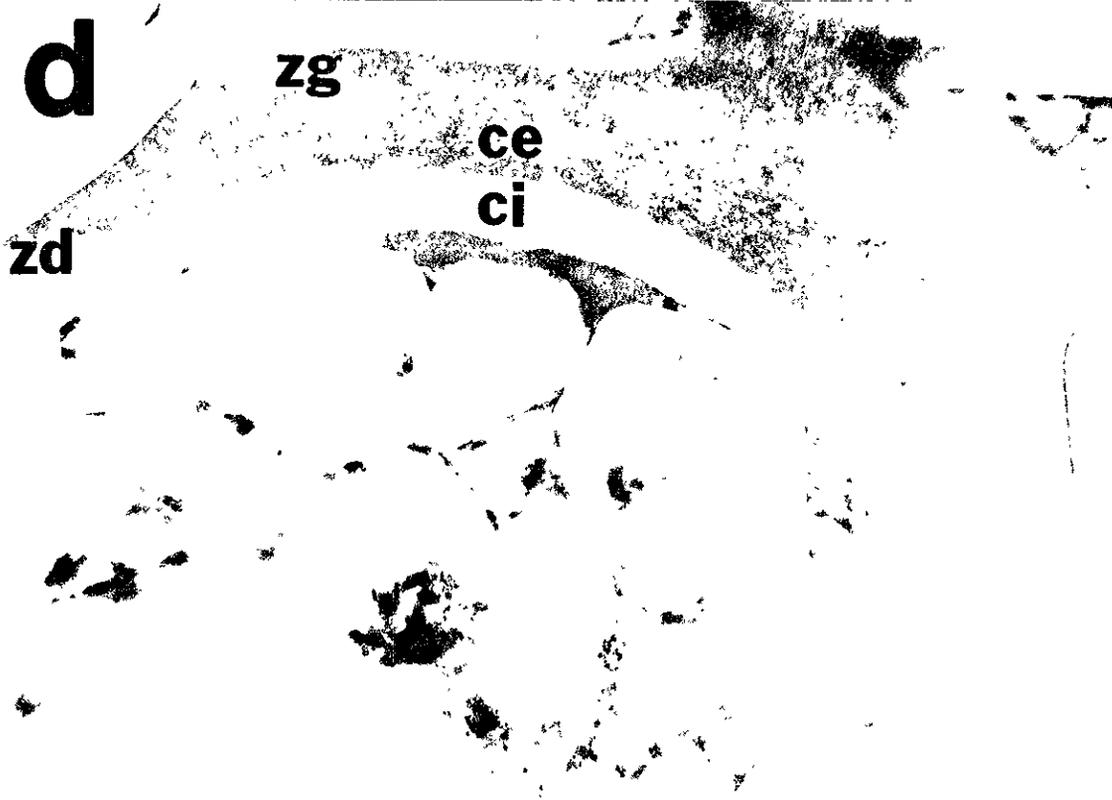
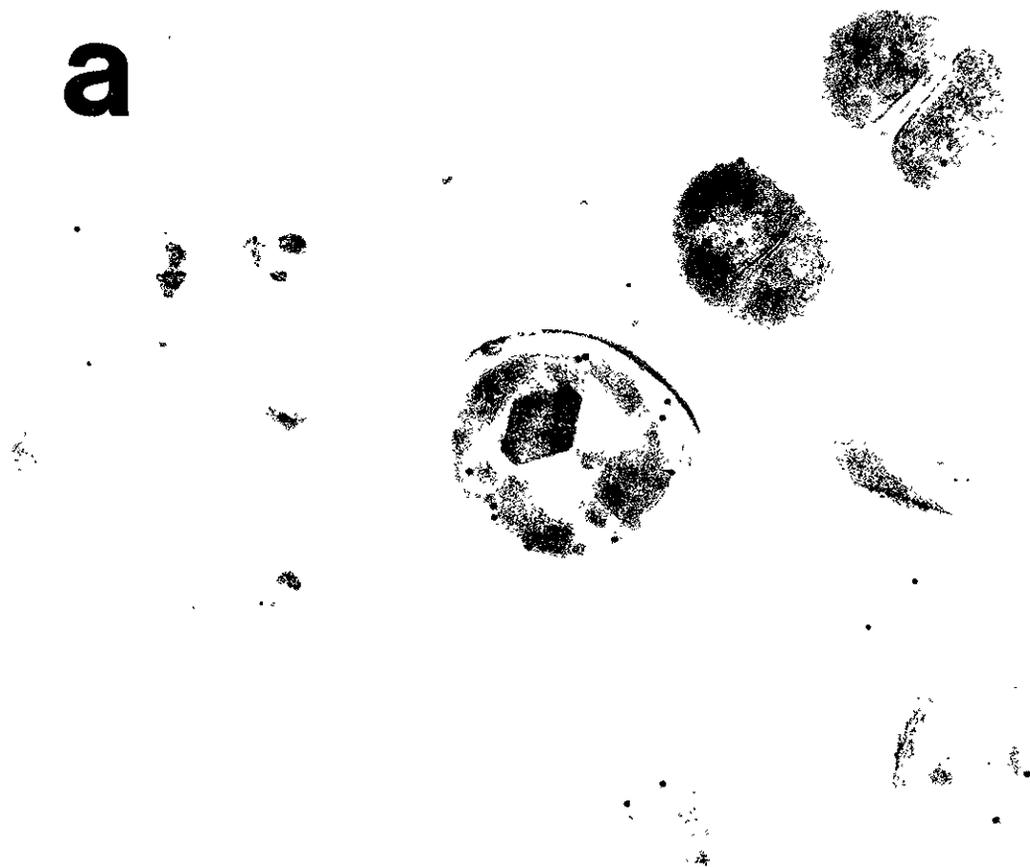
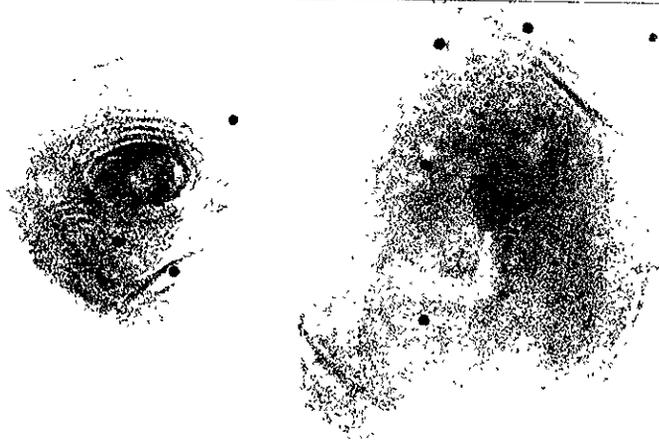


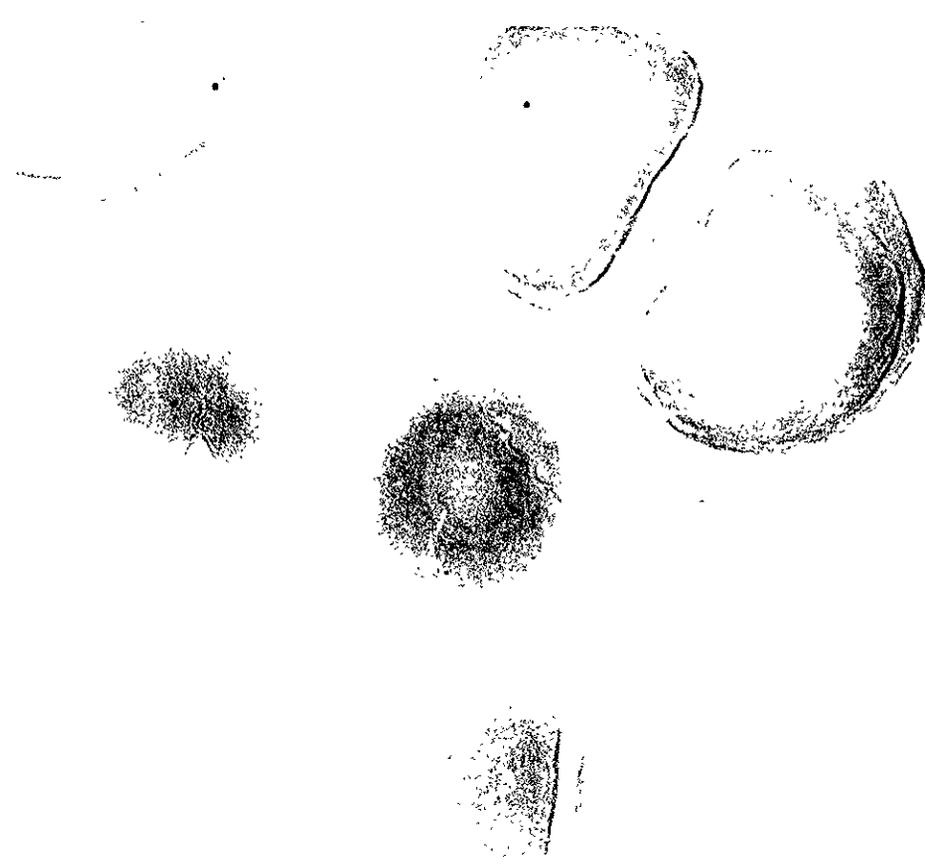
Figura 15: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en microconidios de la fase micelial de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 10 nm, en dilución 1:50. a) Vista general de un microconidio (aumento 20000X). b) Acercamiento de la estructura anterior, resaltando las marcas de oro coloidal (aumento 38000X). pc= pared celular; o= marcas de oro coloidal.



Figura 16: Inmunolocalización por microscopía electrónica del CPPD-Histo en la fase levaduriforme de *H. capsulatum*. Se utilizó IgG anti-*Histoplasma* como anticuerpo primario en dilución 1:100 y como segundo anticuerpo anti-IgG marcada con oro coloidal de 15 nm, en dilución 1:50. a y b) Distribución de la marca en toda la célula levaduriforme (aumento a 58000X, b 116000X). c) Control negativo (aumento 76000X).

a**b**

C



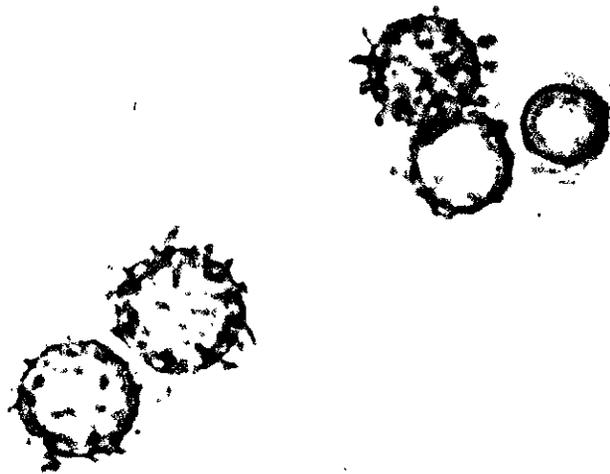


Figura 17: Macroconidios con unidades de crecimiento o de "germinación". Las unidades de crecimiento están representadas por las prolongaciones a partir de las proyecciones digitiformes. La foto fue tomada de macroconidios obtenidos del hongo crecido en EM. La observación se realizó en microscopía de luz. Aumento 1700X.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la actualidad, la producción de antígenos por técnicas de Biología Molecular, con base en la secuenciación y clonación de genes, ha permitido separarlos en alto grado de pureza y en cantidades deseadas. Eso es válido, cuando se trate de antígenos proteicos, pero en otros tipos de antígenos, tales como polisacáridicos, complejos polisacárido-proteína, glicoproteínas o lipoproteínas, la búsqueda para obtener la purificación y mayor cantidad de antígeno, toma un curso diferente. La ubicación celular de un antígeno ofrece otras alternativas, tal como obtener mayores datos sobre la composición de las diferentes estructuras del organismo, el cual permitiría seleccionar aquella (as), donde el antígeno en estudio está preferencialmente ubicado, lo que facilitaría la obtención y purificación del antígeno buscado.

Se seleccionó la cepa de referencia EH-53 para la producción de antígenos crudo y purificado en este estudio, por ser sus antígenos los rutinariamente empleados en el servicio de inmunodiagnóstico para la histoplasmosis en nuestra institución. La localización de la posición celular del antígeno purificado CPPD-Histo, repercutiría en una mejor producción del mismo. La histoplasmina de la cepa EH-53 presentó en IDG, las bandas de precipitación H y M características de *H. capsulatum* (Figura 4), lo que confirma su especificidad y concuerda con los antecedentes publicados, recordando que la histoplasmina es una mezcla de componentes antigénicos no purificados del filtrado crudo del hongo crecido en un medio químicamente definido (Heiner, 1958). Por otro lado, el CPPD-Histo sólo presentó una banda (Figura 4), éste antígeno tiene la característica de poseer en su composición química una mayor cantidad de carbohidratos (Cuadro 1) que guarda una relación de 3:1 a 5:1, con respecto a proteínas, en los diferentes lotes de extracción, a pesar de los métodos de desproteinización (Taylor & Bojalil, 1977; Taylor *et al.*, 1980; Toriello *et al.*, 1997), lo que indica que el componente proteico es muy estable a los tratamientos sometidos. Antecedentes de Taylor & Bojalil (1977) demostraron que los componentes

inmunoespecíficos del CPPD-Histo se encuentran muy relacionados a los polisacáridos, puesto que el tratamiento enzimático con β -glucosidasa elimina su reactividad inmune. Parece ser que éste antígeno no contiene los denominados antígenos H o M (Flores-Robles *et al.*, 1998).

Por otro lado, la cepa EH-377 fue utilizada para realizar la inmunolocalización en fase micelial, debido a su morfología con abundante conidiación, principalmente de macroconidios, característica que se ha asociado en las cepas aisladas de la naturaleza (Taylor com. pers.), particularmente de reservorios del hongo como los murciélagos infectados (Taylor *et al.*, 1998; Chávez-Tapia *et al.*, 1998).

Los tiempos de generación obtenidos para las levaduras de las dos cepas estudiadas (cepa EH-53 tg=2:13 h, cepa EH-377 tg=6:18 horas), confirman que *H. capsulatum* es un hongo de crecimiento lento. El tiempo de generación descrito para primoaislamientos o para cultivos de cepas recién aisladas de *H. capsulatum*, es en promedio de 6-8 horas *in vitro* (Berliner, 1973) y de 10-11 horas *in vivo* (Howard, 1964; 1965; 1967). La fase levaduriforme de la cepa EH-53, tuvo un tiempo generacional más corto (Figura 8), explicable por ser esa cepa muy adaptada a las condiciones de cultivo en medios artificiales, ya que tiene mucho tiempo de ser manipulada en condiciones experimentales, lo que pudo inducir una facilitación en el crecimiento de la cepa en fase levaduriforme repercutiendo en la disminución de su tiempo de generación. Con base en los antecedentes, la fase levaduriforme de la cepa EH-377 fue utilizada en los ensayos de inmunolocalización en microscopía, por ser la que presentó un tiempo de generación más acorde al reportado en la literatura (Berliner, 1973).

La inmunolocalización se desarrolló inicialmente en microscopía de fluorescencia, debido a que esta técnica es relativamente más fácil y menos costosa, además de que con ella se pueden revisar de forma adecuada y rápida los reactivos, como la preservación de la antigenicidad en las muestras y la conservación de la reactividad inmune de los anticuerpos, así se evitan resultados falsos negativos al

proceder a la microscopía electrónica, que es una técnica que implica más trabajo y más costo.

Al probar estrategias para obtener cantidades considerables de formas fúngicas, por sonicación y separación por Percoll, no se observaron marcas fluorescentes en la inmunolocalización inicial, en ninguna de las fracciones obtenidas. A pesar de que se repitieron ensayos con diferentes anticuerpos anti-*H. capsulatum*, el resultado al utilizar formas separadas por Percoll fue sistemáticamente negativo. Frente a esta respuesta repetitiva, la única explicación encontrada fue la de que la separación por Percoll interfiere o altera la conservación de la antigenicidad de las muestras, razón por la cual, se procedió a obtener formas directamente de la masa fúngica, a partir de colonias en cultivo sólido, para su uso en microscopía de fluorescencia y electrónica; aunque en menor cantidad y de modo menos eficiente a la que se obtenía por Percoll.

Los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia de las hifas no permitió discriminar la posición del antígeno a nivel muy fino, sin embargo se observó en las hifas que el antígeno estaba distribuido en la pared celular y se presentaba más concentrado en los septos de esta forma fúngica (Figura 9). En la inmunofluorescencia de la fase levaduriforme se encontró un resultado similar al de las muestras de hifas, ya que las marcas fluorescentes se distribuyeron sobre la zona correspondiente a la pared celular (Figura 10). La inmunolocalización en los conidios (macro y microconidios) por fluorescencia no fue detectada, debido a que estas formas por la fragilidad de unión a sus respectivos conidióforos no permanecieron unidas al soporte, después de múltiples lavadas para el tratamiento y no fueron además fijadas e incluidas en resina, como se procedió en microscopía electrónica. Sin embargo, los ensayos con hifas y levaduras comprobaron que no se alteró la antigenicidad de la muestra y que el anticuerpo utilizado fue adecuado (IgG-anti-*Histoplasma*), lo que permitió su empleo en el proceso de microscopía electrónica.

Se utilizaron preferencialmente las IgG's inmunes anti-*Histoplasma* (Cuadro 2), como reactivo de inmunolocalización porque presentaron mejor rendimiento y buena reactividad al CPPD-Histo, al probarlas en ELISA (considerando que el esquema de inmunización selecciona una respuesta dirigida, al utilizar para las últimas dosis de inmunización el antígeno purificado CPPD-Histo). Aunque el título de los anticuerpos obtenidos (1:320) fue bajo, se considera que este título como respuesta al antígeno purificado pegado a fase sólida (CPPD-Histo) es muy bueno (Toriello *et al.*, 1997), puesto que revela reacciones más específicas y prácticamente no expresa el cruce inmune, en pruebas de alta sensibilidad como ELISA, a diferencia del uso del antígeno crudo (histoplasmina), unido a fase sólida, donde los títulos para ser considerados positivos tienen que ser mayores de 1:640. (Taylor *et al.*, 1980; Reyes-Montes *et al.*, 1982; Toriello *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1993; Toriello *et al.*, 1997). El uso de IgG's con actividad específica anti-CPPD-Histo, separadas a través de la doble cromatografía de afinidad en Sefarosa-Proteína A y Sefarosa-CPPD-Histo, fue descartada debido a la baja cantidad de anticuerpos recuperados, a pesar de su mayor reactividad en ELISA al antígeno CPPD-Histo unido a fase sólida (Cuadro 2).

Al emplear el método de inmunoro, la ubicación del CPPD-Histo, permitió ser mejor discriminada en las diferentes estructuras fúngicas estudiadas. En hifas, la localización del antígeno por este método no fue bien definida (Figura 11), aunque como se observó en fluorescencia se manifestaba en pared celular y septos (Figura 9). En los macroconidios se observaron las mayores concentraciones de marcas de oro coloidal en la pared celular (Figuras 12a-c). Más abundantemente en las zonas de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de las proyecciones digitiformes de los macroconidios (Figuras 13a-c), a diferencia de las zonas delgadas de la pared (Figuras 14a-c). A diferencia de los macroconidios, los microconidios no concentraron gran cantidad de marcas de oro coloidal en la pared celular ni presentaron diferencias en la distribución de la marca (Figuras 15a, b). En las levaduras no se observó una localización definida de las marcas de oro coloidal (Figuras 16a, b), éstas se distribuyeron indiscriminadamente en toda la célula. Los controles negativos mostraron

que aunque existe marca inespecífica, éstas son escasas (Figuras 12d, 13d, 14d y 16c), lo que confirma la especificidad del reconocimiento inmune utilizado como estrategia en este método.

La pared celular de *H. capsulatum* esta compuesta de glucanas (predominantemente β en fase micelial y α en la fase levaduriforme), quitina, proteínas y lípidos, lo que sugiere que el antígeno CPPD-Histo es un componente de ella. Los CPPD-Histo tienen β glucanas como principal constituyente de la parte polisacáridica (Taylor & Bojalil, 1977), razón por la cual el antígeno esta más concentrado en la pared celular de la fase micelial que en levaduras, donde la inmunolocalización revela una distribución difusa del antígeno.

Observaciones previas sugieren que las proyecciones digitiformes de los macroconidios pueden funcionar como probables unidades de crecimiento o de "germinación", como se observa en la figura 17 (Taylor, com. pers.), y la presencia de mayor concentración del antígeno en las zonas de mayor grosor de la capa externa de la pared celular de los macroconidios sugiere su participación y síntesis en la función de crecimiento celular y compromete además a estas zonas, de las proyecciones digitiformes, como futuras unidades de crecimiento unidireccional del hongo.

Debido a que el tipo de resina utilizado para microscopía electrónica (resina Lowicryl) está dirigido a preservar la antigenicidad de las estructuras fúngicas y no a conservar la ultraestructura, las muestras procesadas no presentaron buena conservación de los organelos celulares.

En conclusión, se puede afirmar que la localización del antígeno CPPD-Histo se encuentra con mayor abundancia en la fase micelial, más en los macroconidios y particularmente en la capa externa de la pared celular de sus proyecciones digitiformes; la presencia en las hifas es notoria en septos, según los datos de

inmunodiagnóstico rápido de la enfermedad, particularmente cuando está asociada a otro padecimiento, como por ejemplo al SIDA.

BIBLIOGRAFÍA

Amaral, D., S.O.P. Costa, A. Schwab, E.N.S. De Oliveira, C.L. Branco, A. Cury & L.R. Travassos. (1967). Experimentos de Microbiología Geral. Curitiba: Ministério da Educação e Cultura e Universidade Federal do Paraná.

Azuma, I., F. Kanetsuna, Y. Tanaka, Y. Yamamura & L.M. Carbonell. (1974). Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. Mycopath. Mycol. Appl. 54: 111-125.

Becerril, M., G. Acosta, J. Casasola, F. Rébora-Gutierrez, M.L. Díaz-Gómez, O. Velasco-Castrejón, M.L. Taylor & C. Toriello. (1985). Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. Rev. Mex. Mic. 1: 211-226.

Berliner, M.D. (1973). *Histoplasma capsulatum*: effects of pH on the yeast and mycelial phases *in vitro*. Sabouraudia 11: 267-270.

Biguet, J., P. Tran Van Ky, S. Andrieu & T. Vaucelle. (1967). Premières caractérisations d'activités enzymatiques sur les immunoélectrophorogrammes des extraits antigéniques de *Histoplasma capsulatum*. Conséquences diagnostiques pratiques. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 47: 425-434.

Chávez-Tapia, C.B., R. Vargas-Yañez, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, J.J. Flores-Estrada, M.R. Reyes-Montes & M.L. Taylor. (1998). I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx., enviado a publicación.

Cole, G.T., D. Kruse & K.R. Seshan. (1991). Antigen complex of *Coccidioides immitis* which elicits a precipitin antibody response in patients. *Infect. Immun.* 59: 2434-2446.

Cole, G.T., D. Kruse, S. Zhu, K.R. Seshan & R.W. Wheat. (1990). Composition, serologic reactivity, and immunolocalization of a 120-kilodalton tube precipitin antigen of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 58: 179-188.

Daniels, L.S., M.D. Berliner & C.C. Campbell. (1968). Varying virulence in rabbits infected with different filamentous types of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 96: 1535-1539.

Deepe, G.S., & G.G. Durose. (1995). Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 63: 3151-3157.

Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Ey, P.L., S.J. Prowse & C.R. Jenkin. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436.

Flores-Robles, E., M.A. Pereyra-Morales, M.R. Reyes-Montes, C. Toriello, E. Zenteno & M.L. Taylor. (1998). Estudio químico e inmunológico del complejo polisacárido-proteína obtenido de *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.*, enviado a publicación.

Galgiani, J.N., S.H. Sun, K.O. Dugger, N.M. Ampel, G.G. Grace, J. Harrison & M.A. Wieden. (1992). An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during *in vitro* fungal development and evidence for humoral response in humans after infection or vaccination. *Infect. Immun.* 60: 2627-2635.

Garrison, R.G., J.W. Lane & M.F. Field. (1970). Ultrastructural changes during the yeastlike to mycelial-phase conversion of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 101: 628-635.

González-Ochoa, A. (1969). Las micosis pulmonares en México y Centro América. Aspectos epidemiológicos. Rev. Invest. Salud Pública 29: 179-196.

González-Zepeda, I., R. Vargas-Yañez, O. Velasco-Castrejón & M.L. Taylor. (1998). Histoplasmosis. Rev. Fac. Med. UNAM. 41:12-15.

Graybill, J.R., M. Patiño & J. Ahrens. (1988). *In situ* localization of antigens of *Histoplasma capsulatum* using colloidal gold immune electron microscopy. Mycopathologia 104: 181-188.

Grzanna, R. (1983). Light microscopic immunocytochemistry with fixed, unembedded tissues. In G.R. Bullock & P. Petrusz (eds.). Techniques in Immunocytochemistry, Vol. 1. Academic Press: Orlando. p. 183-204.

Hamilton, A.J., M.A. Bartholomew, J. Figueroa, L.E. Fenelon & R.J. Hay. (1990a). Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. J. Med. Vet. Mycol. 28: 479-485.

Hamilton, A. J., M. A. Bartholomew, L. E. Fenelon, J. Figueroa & R. J. Hay. (1990b). A murine monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. J. Gen. Microbiol. 136: 331-335.

Heiner, D.C. (1958). Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics 22: 616-627.

- Howard, D.H. (1964). Intracellular behaviours of *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 87: 33-38.
- Howard, D.H. (1965). Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 89: 518-523.
- Howard, D.H. (1967). Effect of temperature on the intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 93: 438-444.
- Ishizaki, H., Y. Nakamura & R.W. Wheat. (1981). Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. Mycopathologia 73: 65-68.
- Jiménez-Montiel J.A., M.L. Taylor & C. Toriello. (1988). Efecto del tratamiento con α y β -galactosidasas en antígenos de hongos productores de micosis profundas. Bioquímica 1: 13-18.
- Kabat, E.A. & M.M. Mayer. (1968). Determinación de proteínas con las reacciones del biuret y de la ninhidrina. *In*: Inmunoquímica Experimental, La Prensa Médica Mexicana: México, D. F. p. 529-533.
- Kwon-Chung, K.J. & J.E. Bennett. (1992). Medical Mycology. Lea & Febiger: Philadelphia.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Maresca, B. & G.S. Kobayashi. (1989). Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol. Rev. 53: 186-209.

Ouchterlony, Ö. & L.Å. Nilsson. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *In* D.M. Weir (ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publication: Oxford. p. 32.1-32.50.

Parikh, I., S. March & P. Cuatrecasas. (1974). Topics in the methodology of substitution reactions with agarose. *In* W.B. Jakoby & M. Wilchek (eds.). *Methods in Enzymology*. Academic Press: New York. p. 77-102.

Patiño, M.M., J.T. Hansen & J.R. Graybill. (1986). Immunocytochemical staining of *Histoplasma capsulatum* at the electron microscopic level. *Mycopathologia* 94: 157-161.

Reiss, E., J.B. Knowles, S.L. Bragg & L. Kaufman. (1986). Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Infect. Immun.* 53: 540-546.

Reyes-Montes, M.R. (1993). Identificación de antígenos de *Histoplasma capsulatum* por medio de anticuerpos monoclonales y electroinmunotransferencia. Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas (Inmunología), Facultad de Medicina, UNAM. México D.F.

Reyes-Montes, M.R., A. Martínez, C. Toriello & M.L. Taylor. (1982). Antigens from *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complex of both fungi. *Mycopathologia* 78: 17-23.

Rippon, J. W. (1988). *Medical Mycology*. 3 ed. W. B. Saunders: Philadelphia.

Sevag, M.G. (1934). Eine neue physikalische. Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch. Wirksamen Substanzen. Isolierung von Kohlenhydraten aus Huhnereiweiss and Pneumococcen. *Biochem. Z.* 273: 419.

- Smith, C.E., E.G. Whiting, E.E. Baker, H.G. Rosenberger, R.R. Beard & M.T. Saito. (1948). The use of coccidioidin. *Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 57: 330-360.
- Straus, A.H., E. Freymüller, L.R. Travassos & H.K. Takahashi. (1996). Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 181-186.
- Taylor, M.L., A. Perez-Mejía, J.K. Yamamoto-Furusho & J. Granados. (1997). Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 138: 137-141.
- Taylor, M.L., C.B. Chávez-Tapia, R. Vargas-Yañez, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, J.J. Flores-Estrada, C. Toriello, A. Pérez & M.R. Reyes-Montes. (1998). Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in natural Mexican harborages. *Ecology*, enviado a publicación.
- Taylor, M.L., J. Granados & C. Toriello. (1996). Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 39: 375-379.
- Taylor, M.L. & L.F. Bojalil. (1977). Inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmuno-específica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 8: 91-102.
- Taylor, M.L., M. Pedroza-Serés, A. Gámez-Aranda & C. Toriello. (1993). Retrospective serological study of histoplasmosis in Mexico. *Mycoses* 36: 25-30.
- Taylor, M.L., M.R. Reyes-Montes, A. Lachica, C. Eslava-Campos, J. Olvera & R. Maxwell. (1980). Immunology of histoplasmosis: humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. *Mycopathologia* 71: 159-166.

Tewari R.P. & H.I. Kegel. (1971). Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 44: 231-240.

Toriello, C., J.A. Jiménez-Montiel, M.R. Reyes-Montes & M.L. Taylor. (1993). Two-dimensional immunoelectrophoresis of histoplasmin and a purified polysaccharide-protein antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia* 122: 7-13.

Toriello, C., J.L. Rosas, A. Martínez, M.R. Reyes-Montes, J.P. Latgé & M.L. Taylor. (1982). Biochemical studies of polysaccharide-protein antigens from fungi causing systemic mycosis. *In* M. Baxter (ed.). *Proceedings VIIIth Congress International Society for Human and Animal Mycology*. Massey University, New Zealand: Palmerston North. p. 220-224.

Toriello, C., L.C. Arjona-Rosado, M.L. Díaz-Gómez & M.L. Taylor. (1991). Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses* 34: 133-140.

Toriello, C., M.R. Reyes-Montes & M.L. Taylor. (1997). Producción de antígenos fúngicos autóctonos en el inmunodiagnóstico de micosis en México. *Rev. Invest. Clín.* 49: 5-13.

Velasco-Castrejón, O. (1994). Micosis profundas. *In* M.L. García-García, S. Giono-Cerezo, C.R. Pacheco, A. Escobar-Gutiérrez & J.L. Valdespino-Gómez (eds.). *Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas*. INDRE: México, D.F. p. 231-249.

Voller, A., D.E. Bidwell & A. Bartlett. (1979). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. *Dynatech Europe Laboratories Inc.: London*. p. 35-40.

Waele, M., J. de Mey, M. Moeremans, M. de Brabander & B.V. Camp. (1983) Immunogold staining method for the detection of cell surface antigens with monoclonal antibodies. *In* G.R. Bullock & P. Petrusz (eds.). *Techniques in Immunocytochemistry* Vol. 2. Academic Press: Orlando. p. 2-23.

Wheat, L.J., M.L.V. French, S. Kamel & R.P. Tewari. (1986a). Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J. Clin. Microbiol.* 23: 493-499.

Wheat, L.J., R.B. Kohler, M.L.V. French, M. Garten, M. Kleiman, S.E. Zimmerman, W. Schlech, J. Ho, A. White & Z. Brahmi. (1983). Immunoglobulin M and G histoplasmal antibody response in histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 65-70.

Wheat, L.J., R.B. Kohler, & R.P. Tewari. (1986b). Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N. Engl. J. Med.* 314: 83-88