



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Tesis Doctoral

**“Identificación y utilización de antígenos de
Paracoccidioides brasiliensis e *Histoplasma
capsulatum* para el desarrollo de métodos
serológicos de mayor sensibilidad y
especificidad”**

Tesista: Bqca. María de los Angeles Serradell

TESIS
Nº 984

Año 2003

DON. N.º
.....
Fecha
Inv. B. Inv. B.	ST044

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado bajo la dirección del Dr. Carlos Alberto Fossati y la codirección del Dr. Ricardo Negroni.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
▲.....
Fecha..... 15-07-03
Inv. R..... Inv..... B..... S7044

Estos últimos años no sólo han sido especialmente importantes para mi formación académica, sino también para mi crecimiento como persona, ya que he tenido la oportunidad de compartir gratos momentos y experiencias con todos los que me acompañaron durante esta etapa. Por todo esto, quisiera agradecer a todos aquellos que contribuyeron de diferentes maneras a la realización de este trabajo:

.... al Dr. Alberto Fossati, por haber sido mi guía en este largo camino, por su apoyo permanente, su comprensión y su confianza;

.... al Dr. Ricardo Negroni, por transmitirme su vasta experiencia en el tema y por su disposición para la preparación de los cultivos, lo cual facilitó mucho mi trabajo;

.... al CONICET, por haberme otorgado la beca para realizar este trabajo de Tesis;

.... a los Dres. María Luisa Cacace y Néstor Taranto de la Universidad Nacional de Salta, gracias a quienes buena parte de este trabajo pudo ser realizado;

.... a la Dra. Cristina Anón y todos los integrantes del CIDCA, por haberme permitido disponer libremente de las instalaciones y del equipamiento del instituto;

.... al personal del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la UBA, por permitirme acceder libremente a su amplia biblioteca;

.... a los chicos del IDEHU, especialmente a Pablo Baldi y Victoria Delpino, por facilitar la tarea de purificar los anticuerpos monoclonales.

A mis compañeros de laboratorio:

.... a Paula Rozenfeld, por los proyectos, ideas y sueños compartidos, y por su valiosa e incondicional amistad durante los últimos once años;

.... a Guillermo Docena, por haber guiado mis primeros pasos en el laboratorio, por sus charlas y mateadas;

.... a Federico Galizia, por su compañerismo y colaboración durante estos cinco años;

.... a Amanda Rey, por alentarme en los momentos indicados y estar siempre dispuesta a colaborar en cualquier circunstancia;

.... a Fernando Chirido y Martín Rumbo, quienes estuvieron siempre dispuestos a ayudar y compartir gratos momentos;

Y también:

.... a Gustavo Martínez y Marcos Civello, con quienes comencé a conocer las bondades y reveses de esta actividad;

.... a los integrantes del grupo de trabajo de la Dra. Angela Restrepo (Angel, Beatriz, Soraya, Martha, Lula y Juan) de la Corporación para Investigaciones Biológicas de Medellín, Colombia, quienes me adoptaron como un miembro más de la familia de "seguidores del Paracoccidioides".

Finalmente, a quienes han estado a mi lado compartiendo éxitos y fracasos fuera del laboratorio, especialmente:

.... a mis viejos, quienes me apoyaron siempre sin condiciones y a los que les debo el poder haber llegado hasta aquí;

..... a mis hermanas, Laura y Elisa, y a Cata, por ser quienes son;

.... a Juan, que apoyó siempre mis decisiones y me dio lo más lindo que tengo hoy en mi vida.....nuestra hija.



Tiras de Quino; Ediciones de la Flor; 1988

*A Juan y Paulita,
con todo mi amor*

INDICE GENERAL:

	<u>Página</u>
Introducción.....	1
Objetivos.....	49
Materiales y Métodos.....	50
Resultados.....	69
Discusión.....	104
Conclusiones.....	132
Bibliografía.....	135



Introducción

INDICE:

	<u>Página</u>
1.Aspectos generales de las micosis sistémicas.	1
2.Paracoccidioidomicosis.	2
2.1.Epidemiología.	2
2.2.Agente etiológico.	3
2.2.1.Aspectos morfológicos y ultraestructurales.	4
2.2.2.Biología molecular y genética.	5
2.2.3.Dimorfismo.	5
2.2.4.Condiciones de cultivo.	6
2.2.5.Ecología.	6
2.2.6.Virulencia.	7
2.3.Patogénesis y patología.	8
2.4.Aspectos clínicos.	10
2.4.1.Paracoccidioidomicosis infección.	10
2.4.2.Forma juvenil o aguda.	10
2.4.3.Forma crónica.	10
2.5.Aspectos inmunopatológicos.	12
2.5.1.Respuesta innata.	13
2.5.2.Respuesta inmune celular.	14
2.5.3.Respuesta inmune humoral.	16
2.6.Tratamiento.	17
3.Histoplasmosis.	18
3.1.Epidemiología.	19
3.2.Agente etiológico.	19
3.2.1.Aspectos morfológicos y ultraestructurales.	20
3.2.2.Biología molecular y genética.	21
3.2.3.Dimorfismo.	22
3.2.4.Condiciones de cultivo.	22
3.2.5.Ecología.	22

3.2.6. Virulencia.	23
3.3. Patogénesis y patología.	23
3.4. Aspectos clínicos.	24
3.4.1. Histoplasmosis en paciente inmunocompetentes.	24
3.4.1.1. Primo-infección pulmonar asintomática.	24
3.4.1.2. Infección pulmonar aguda.	24
3.4.1.3. Infección pulmonar crónica.	25
3.4.2. Histoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos.	25
3.4.3. Histoplasmosis mediada por respuesta inmune.	26
3.5. Aspectos inmunopatológicos.	26
3.5.1. Respuesta innata.	27
3.5.2. Respuesta inmune celular.	28
3.5.3. Respuesta inmune humoral.	29
3.6. Tratamiento.	30
4. Diagnóstico.	30
4.1. Diagnóstico micológico.	31
4.1.1. Paracoccidioidomicosis.	31
4.1.2. Histoplasmosis.	32
4.2. Diagnóstico serológico.	32
4.2.1. Métodos de detección de anticuerpos.	33
4.2.2. Antígenos de utilidad en el diagnóstico.	36
4.2.2.1. Paracoccidioidomicosis.	37
4.2.2.2. Histoplasmosis.	42
4.2.3. Métodos de detección de antígenos.	45
4.2.3.1. Paracoccidioidomicosis.	45
4.2.3.2. Histoplasmosis.	46
4.3. Métodos moleculares aplicados al diagnóstico.	48

1. ASPECTOS GENERALES DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS:

Dentro de las infecciones causadas por hongos encontramos las micosis sistémicas, que agrupan a todas aquellas afecciones causadas por agentes etiológicos capaces de diseminarse por vía linfohemática en algún momento de su evolución, provocando la agresión simultánea a diversos órganos con serio riesgo para la vida del paciente. Estas micosis deben dividirse en dos grandes categorías:

- aquellas ocasionadas por hongos de baja virulencia, llamadas micosis oportunistas, que se presentan en caso de pacientes inmunodeprimidos (ej: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffei*);
- aquellas producidas por hongos patógenos primitivos (ej: *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*)

Los hongos patógenos primitivos viven normalmente en el mundo exterior donde desarrollan una vida saprófita, y pueden infectar al hombre y otros vertebrados por medio de sus esporas. La vía de penetración es generalmente inhalatoria, y producen cuadros de primoinfección pulmonar habitualmente benignos, que en su mayor parte, curan espontáneamente (micosis-infección). Un reducido número de individuos infectados no se defiende adecuadamente y la afección se torna progresiva (micosis-enfermedad).

Estas micosis se caracterizan por presentar una distribución geográfica particular y porque sus agentes etiológicos (con excepción del *Cryptococcus neoformans*) son dimorfos, es decir que se presentan como hongos filamentosos en su vida saprófita y como elementos levaduriformes o como esferas con endosporas en la fase parasitaria.

Las encuestas realizadas mediante intradermorreacción han demostrado que la infección es muy frecuente en las zonas endémicas, particularmente en el continente americano. En contraste con la alta frecuencia de la infección, los casos clínicos evolutivos de estas micosis sistémicas son relativamente raros.

La edad, el sexo, la profesión, la raza, los hábitos (por ejemplo, alcoholismo) y enfermedades preexistentes constituyen factores predisponentes para la presentación de las formas progresivas de micosis-enfermedad.

Se han establecido numerosas alteraciones de la inmunidad celular en pacientes que padecen micosis sistémicas y la gravedad depende de la severidad de la afección, por lo que se deduce que éste es el mecanismo defensivo principal contra estos patógenos. Por el contrario,

la inmunidad humoral no parece contribuir en forma clara como mecanismo de defensa, pues los pacientes con formas clínicas graves presentan niveles normales o aumentados de inmunoglobulinas (Ig) séricas.

El diagnóstico definitivo de estas micosis se realiza a través de la observación microscópica del agente etiológico en materiales biológicos y su aislamiento en cultivos, pero es posible realizar un diagnóstico indirecto por medio de pruebas serológicas (aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígenos fúngicos, fijación de complemento, inmunodifusión, contraelectroforesis, ELISA, inmunoblotting). Las reacciones serológicas presentan un importante valor, no solo diagnóstico, sino pronóstico en estas enfermedades. En los últimos años se han sumado a este conjunto de pruebas, los ensayos de diagnóstico basados en la detección de fragmentos de ADN fúngico utilizando sondas específicas y PCR (polimerase chain reaction).

Aún no se dispone de vacunas para uso humano para la profilaxis de estas enfermedades, pero la inmunoterapia para favorecer el control de las formas diseminadas constituye un campo promisorio de investigación clínica. (Negroni, 1996a; Rippon, 1988).

2. PARACOCCIDIOIDOMICOSIS:

Esta micosis es de gran interés en Latinoamérica y es causada por el hongo dimorfo *Paracoccidioides brasiliensis*. En 1908, en la ciudad de San Pablo (estado de San Pablo, Brasil), el Dr. Adolpho Lutz (1885 – 1940) describió por primera vez esta enfermedad en dos pacientes (Lutz, 1908). Desde ese entonces la enfermedad ha recibido diferentes nombres, hasta que en 1971 fue oficialmente aceptado el término "paracoccidioidomicosis" (PCM) durante una reunión de micólogos americanos en Medellín, Colombia.

2.1. Epidemiología.

La enfermedad es considerada no contagiosa entre humanos (Restrepo-Moreno, 1993), y el conocimiento de la existencia de áreas endémicas, la prevalencia, la incidencia y la morbilidad de esta micosis está basado en estudios epidemiológicos mediante prueba cutánea y en el registro de casos clínicos.

Las áreas endémicas se extienden desde México (20^º latitud norte) hasta Argentina (35^º latitud sur) y se caracterizan por ser regiones tropicales o subtropicales, con abundantes

lluvias (500 a 2500 mm/año), temperaturas que varían entre 10 y 28°C, y suelos ácidos (Restrepo, 1985). El mayor número de casos han sido informados en Brasil, Colombia y Venezuela (Restrepo, 1985). Debido a los largos períodos de latencia que caracterizan a la PCM, el lugar donde se efectúa el diagnóstico (área endémica) no necesariamente coincide con el sitio en el cual el agente etiológico vive en la naturaleza y el paciente adquiere la enfermedad (reservárea) (Borelli, 1964; Brummer, 1993).

Aunque se considera una micosis restringida solo a América Latina, también han sido diagnosticados casos en Estados Unidos, Europa, Asia y Africa (Ajello, 1985).

Encuestas realizadas mediante intradermorreacción han demostrado índices de positividad que varían entre un 10 y un 60% según las zonas endémicas (Negroni, 1996a). Estudios epidemiológicos recientemente realizados en Tucumán, Argentina, indican que el porcentaje de pruebas cutáneas positivas puede alcanzar el 10% en ciertas áreas de la provincia (von Gelderen de Komaid, 1999). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad en las zonas endémicas no es homogénea y puede estimarse una prevalencia anual de 1 a 3 casos por cada 100000 habitantes en zonas altamente endémicas (Restrepo-Moreno, 1983). En la Argentina, la prevalencia es de aproximadamente un caso por cada 100000 habitantes por año (Mackinnon, 1972). Esta desproporción podría indicar, por una parte, deficiencias en el diagnóstico, y por otra, la existencia de numerosas infecciones subclínicas.

Las formas activas progresivas de la PCM ocurren con mayor frecuencia en pacientes entre 30 y 50 años de edad. La frecuencia disminuye gradualmente en individuos mayores de 50 años y abruptamente en pacientes menores de 29 años (Wanke, 1994).

La PCM ocurre más frecuentemente en individuos que realizan actividades agrícolas (Restrepo-Moreno, 1983; Bethlem, 1991), y aproximadamente un 80 a un 90 % de los pacientes con formas crónicas de la enfermedad son hombres adultos (Valle, 1992). En niños, ambos sexos son igualmente afectados (Hildebrand, 1987).

2.2. Agente etiológico.

El agente causante de la PCM es un hongo dimorfo, que aún no ha revelado su forma sexuada o perfecta, y cuya forma asexuada se denomina *Paracoccidioides brasiliensis* (PB).

Taxonómicamente pertenece a:

Phylum: Ascomycota

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

2.2.1. Aspectos morfológicos y ultraestructurales.

EL PB crece en agar Sabouraud a temperatura ambiente como colonias blancas adheridas al medio de cultivo. Estas colonias no crecen rápidamente, sino que comienzan a desarrollarse luego de 20 o 30 días de incubación. Cuando se observan al microscopio óptico, estas colonias muestran filamentos miceliares finos, septados, con clamidosporas terminales e intercalares (Lacaz, 1994a). Esta forma se conoce como forma M. Los tipos y morfología de los conidios varía de acuerdo al medio de cultivo utilizado (Bustamante, 1985).

A 37°C, especialmente en medios de cultivo enriquecidos con ciertos nutrientes, PB produce colonias cerebriformes. La microscopía revela células redondeadas, algunas con tubos germinativos, y otras similares a las formas encontradas en tejidos (elementos de 5 a 25 µm de diámetro con una pared celular aparentemente doble, bien definida y refringente; es frecuente observar formas multibrotadas que semejan una "rueda de timón") (Lacaz, 1994a). Esta forma se conoce como forma Y (Figura 1).



Figura 1. Levaduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tinción de Gomori (400x).

Cuando los conidios son incubados a 37°C son capaces de germinar y producir levaduras idénticas a las observadas en tejidos (Restrepo, 1986). Debido a esta característica, han mostrado ser infectantes en modelos de PCM experimental al ser inoculados por vía intranasal y probablemente jueguen el mismo papel en la infección humana (McEwen, 1987a).

El PB es un organismo eucariota multinucleado en su forma levaduriforme (Queiroz-Telles, 1994), mientras que la forma miceliar y los conidios presentan un único núcleo (San-Blas, 1994; McEwen, 1987b).

La pared celular está constituida por fibras de quitina y glucanos (polímeros de glucosa) (Kanetsuna, 1969). En la forma miceliar, prácticamente el 100% corresponde a 1,3- β -glucano. Por el contrario, la forma levaduriforme presenta un 95% de 1,3- α glucano, y el porcentaje del isómero β sólo asciende al 5% (San Blas, 1994).

2.2.2. Biología molecular y genética.

El análisis del cariotipo de aislados de PB de diferentes orígenes, utilizando métodos electroforéticos modernos, ha permitido identificar cuatro o cinco cromosomas (según la cepa) y estimar el tamaño del genoma en 23 a 30 Mb, lo cual sugiere la presencia de 10000 a 15000 genes (Montoya, 1997; Cano, 1998; Montoya, 1999). Aunque la ploidía del PB aún no se conoce con certeza, existen evidencias de que es un organismo diploide (Cano, 1998).

A través del estudio de los perfiles genéticos por RAPD (Soares, 1995; Calcagno, 1998) y RFLP (Niño-Vega, 2000a) se han podido caracterizar diferentes aislados de PB, tanto de origen ambiental como de muestras clínicas. Dichos estudios han revelado un gran polimorfismo genético entre cepas aisladas de diferentes regiones geográficas. De hecho, han sido caracterizados cinco grupos de cepas según el área geográfica: Colombia, Venezuela, Perú, Brasil y Argentina. Este último el grupo es el que presenta mayor divergencia genética (Calcagno, 1998; Niño-Vega, 2000a). Estas observaciones resultan muy útiles desde el punto de vista epidemiológico.

2.2.3. Dimorfismo.

El proceso dimórfico es relevante no sólo desde el punto de vista del estudio de la fisiología general del hongo sino también en su patogénesis.

Si bien es posible observar las formas extremas en tejidos e *in vitro* a 37°C (forma levaduriforme), y en cultivos por debajo de los 25°C (forma miceliar), a temperaturas intermedias se obtienen formas transicionales *in vitro* (Carbonell, 1965).

Según San-Blas y col. (San-Blas, 1991) la temperatura parece ser el único factor involucrado en el dimorfismo del PB (es independiente de la naturaleza y composición del

medio de cultivo). El proceso es reversible y el mecanismo aún no está completamente dilucidado.

La transformación de micelio a levadura va acompañada de la expresión diferencial de genes (Venancio, 2002) como los que controlan la síntesis de glucanos (Pereira, 2000) y de quitina (Niño-Vega, 2000b) de la pared celular, y de la síntesis diferencial de proteínas que caracterizan a ambos estados (Salem-Izacc, 1997; Cunha, 1999). Entre éstas últimas se han identificado y caracterizado proteínas de choque térmico (da Silva, 1999) y chaperonas (Jesuino, 2002). Hasta el momento se han logrado identificar un total de 3938 secuencias transcritas (EST) (1654 correspondientes a la fase levaduriforme y 2274 a la fase miceliar), lo cual permitió la construcción de un mapa parcial de los genes transcritos en cada fase (Felipe, 2003).

Ha sido descrita la inhibición de la transformación de M a Y por acción de los estrógenos en una manera dosis-dependiente (Restrepo, 1984a; Aristizabal, 1998), así como alteraciones en la expresión de proteínas asociadas a la presencia de estradiol (Clemons, 1989). Estos resultados proveen una explicación biológica del hecho de que la PCM es mucho más frecuente en la población masculina, dado que el nivel de estrógenos circulantes en la mujer podría bloquear la transformación de M a Y en la etapa inicial del desarrollo de la infección (inhibición de la transformación de las conidias en células levaduriformes). Sin embargo, se han obtenido algunos resultados contradictorios en ciertos modelos experimentales en animales (McEwen, 1987a).

2.2.4. Condiciones de cultivo.

Han sido utilizados a lo largo del tiempo una variedad de medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, para el aislamiento y estudio del PB, así como para la obtención de diferentes preparaciones antigénicas con fines diagnósticos. Entre ellos podemos mencionar el agar Sabouraud (en ocasiones con agregado de diferentes suplementos : miel, sangre, extracto de malta), el medio de Fava Netto (Fava Netto, 1955), el agar sangre, agar chocolate, infusión cerebro-corazón, y una amplia variedad de medios caseros.

Como se mencionó anteriormente, la temperatura a la que se realiza el crecimiento es un factor preponderante ya que el PB depende de ella para la expresión de su morfología.

2.2.5. Ecología.

La relación entre el PB y su ambiente continúa siendo motivo de debate, dado que el micronicho ecológico del hongo aún no ha sido descubierto.

Desde el primer reporte en 1963 (Shome, 1963), sólo se han producido otros cinco aislamientos de PB desde muestras de suelo, los que incluyen tres aislamientos en Venezuela (Albormoz, 1971), uno en Argentina (Negroni, 1966) y uno de una plantación de café en Brasil (Silva-Vergara, 1998). Debido a la dificultad de recuperar al microorganismo a partir de muestras ambientales por métodos convencionales (cultivo, inoculación en animales), están siendo desarrolladas nuevas técnicas de biología molecular (como PCR) para detectar bajas concentraciones de DNA fúngico (Diez, 1999; Motoyama, 2000). Recientemente se ha demostrado que diversos pesticidas son capaces de inhibir el crecimiento de levaduras de PB en agar Sabouraud en forma dosis-dependiente, lo cual sugiere que éstos agroquímicos podrían dificultar el aislamiento del hongo a partir de muestras ambientales (Ono, 2002).

Por otro lado, existen reportes de diversos aislamientos a partir de tejidos o excrementos de animales como murciélagos (Grosse, 1965), pingüinos (Gezuele, 1989) y armadillos de nueve bandas o *Dasypus novemcinctus* (Naiff, 1986; Bagagli, 1998; Corredor, 1999). Un alto porcentaje de armadillos de esta especie que habitan en regiones endémicas, están infectados con PB, y las cepas aisladas a partir de los mismos presentan características antigénicas, moleculares y de virulencia similares a las aisladas de humanos (Peraçoli, 1999; Sano, 1999). Recientemente se ha informado la observación de levaduras de PB en muestras de ganglio linfático de un perro doméstico (Ricci, 2002).

En base al análisis de los factores ecológicos predominantes de las áreas endémicas, el estudio de la enfermedad y la presencia de PB en diferentes hospederos animales se han podido definir algunas características del hábitat del hongo. En general, los resultados de estos estudios han destacado su relación con zonas forestadas y cursos de agua (ríos, arroyos), alto nivel de lluvias anuales y un rango limitado de variación de temperaturas (17-24°C) (Restrepo, 2001).

2.2.6. Virulencia.

En las infecciones fúngicas, así como en todas las infecciones microbianas, el genotipo y fenotipo del huésped y del microorganismo juegan un papel crucial en la interacción entre ambos, lo cual a su vez determina la evolución de la enfermedad. Varios experimentos utilizando modelos murinos han mostrado que diferentes cepas de PB varían en su virulencia

(Singer-Vermes, 1989; Acosta, 1992), hecho que puede explicar, al menos parcialmente, la amplia gama de manifestaciones clínicas de la PCM. De hecho, se ha estudiado la posible relación entre la patogenicidad de la cepa con la forma clínica presentada por el paciente del cual fue aislada, y solo se ha encontrado una asociación cuando se compararon aislados de formas leves de la enfermedad con muestras obtenidas de pacientes con formas graves (Singer-Vermes, 1994).

No se conoce demasiado acerca de los mecanismos por medio de los cuales el PB ejerce su virulencia, aunque entre los factores que intervienen en la infección se han descrito: la estructura de la pared celular (San-Blas, 1977), la expresión de ciertos antígenos proteicos y glucoproteicos solubles, la actividad de proteasas extracelulares (Vaz, 1994; Puccia, 1998), la capacidad de adhesión a la matriz extracelular (Vicentini, 1994), el pasaje a través animales de experimentación (Brummer, 1990) y factores relacionados al huésped (Brummer, 1993). Sin embargo, en algunas cepas estudiadas no ha sido posible establecer factores exclusivos de virulencia (Canteros, 2000), lo cual hace suponer que el grado de virulencia es, posiblemente, el resultado de la asociación de múltiples factores.

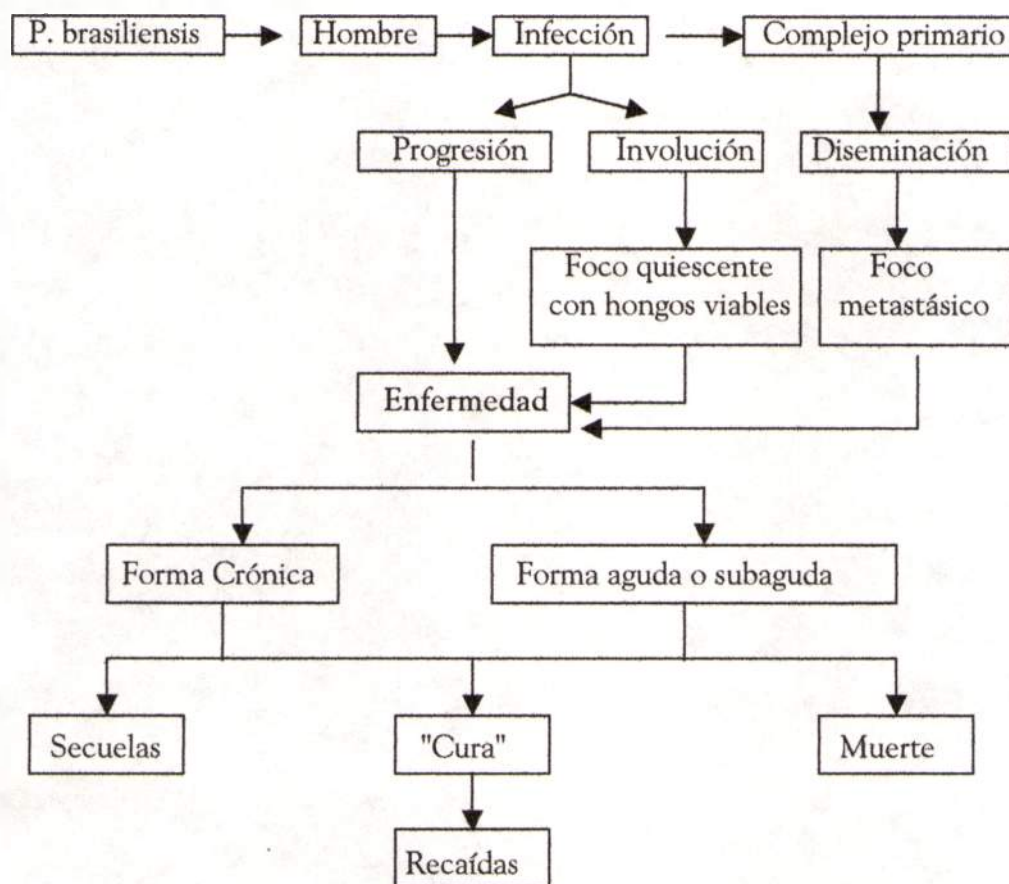
Por otro lado se ha encontrado, para ciertas cepas, una correlación entre patrones de ADN polimórfico (obtenidos por RAPD) y grado de virulencia (Molinari-Madlum, 1999).

2.3. Patogénesis y patología.

La mayoría de los reportes sobre la patología de la PCM en el hombre están basados en descripciones clínicas o radiológicas de las lesiones y en el estudio de biopsias obtenidas cuando la enfermedad ya está establecida, por lo que poco se conoce acerca de los estadios más tempranos de la enfermedad (Montenegro, 1994).

La mayoría de las observaciones (tanto clínicas como experimentales) indican que la PCM comienza con lesiones primarias en los pulmones por la inhalación de conidias (Negróni, 1965; Restrepo, 1977) y que las mismas pueden permanecer silenciosas durante años, de manera similar a otras micosis sistémicas y la tuberculosis. Posteriormente, la enfermedad puede diseminarse a través de los vasos linfáticos pulmonares o por vía hematogena. En este último caso, se ven involucrados otros órganos o sistemas (frecuentemente piel y mucosas) (Montenegro, 1994).

En el siguiente esquema se muestran las diferentes formas en las que puede evolucionar la enfermedad:



Montenegro, 1994.

La PCM suele comportarse como una dolencia insidiosa y de curso lento. Las variaciones en intensidad, duración, diseminación, y características de las lesiones dependen de la virulencia del hongo, de fluctuaciones en los mecanismos de defensa del huésped y también de factores ambientales. Cuando a un paciente se le diagnostica una determinada forma clínica de PCM, es conveniente recordar que la misma representa solo una etapa particular del proceso dinámico y polimórfico de esta enfermedad (Franco, 1987).

La aparición de recaídas es una de las características más importantes de esta enfermedad, y durante las mismas, las manifestaciones clínicas pueden diferir de las observadas durante la consulta previa.

La PCM no es considerada una micosis vinculada regularmente a inmunosupresión. Los trabajos publicados están enfocados principalmente a los aspectos clínicos de esta micosis en pacientes con SIDA, cáncer, o individuos con terapia inmunosupresora (Marques, 1994; Tobón, 1998).

2.4. Aspectos clínicos.

En la PCM, así como en otras micosis sistémicas, podemos distinguir la infección de la enfermedad.

2.4.1. Paracoccidioidomycosis infección.

El contacto inicial del hongo con el huésped generalmente evoluciona hacia una infección subclínica (pacientes con síntomas leves, anomalías radiológicas mínimas y presencia de anticuerpos séricos específicos) o asintomática, detectada por intradermorreacción, o por el hallazgo del hongo o lesiones en necropsias (Lacaz, 1959). La observación de nódulos necróticos, encapsulados o calcificados que contienen elementos fúngicos son también una prueba histológica de una infección subclínica (Brass, 1969). En dichas lesiones, el PB puede permanecer viable por muchos años (Restrepo, 1981).

La enfermedad se establece si la infección progresa. Se presenta en dos formas clínicas: una forma aguda o juvenil, y una forma crónica (Giraldo, 1976).

2.4.2. Forma aguda o subaguda, o forma juvenil.

Es la forma menos frecuente y se observa en niños de ambos sexos y en adultos menores de 30 años. Representa menos del 10% de la casuística general de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas ocurren de manera rápida y progresiva, involucrando órganos del sistema monocítico histiocitario. En general, es de peor pronóstico que la forma crónica (Mendes, 1994).

El principal aspecto clínico es la adenomegalia difusa, superficial o profunda, hepatoesplenomegalia y eventual disfunción de la médula ósea. En algunos casos se han descrito lesiones cutáneas y lesiones osteolíticas múltiples. Los primeros síntomas que aparecen son la fiebre y la pérdida de peso corporal, y en pocas semanas se establece un compromiso del estado general del paciente. También pueden ocurrir diarrea e hipoproteïnemia debido al bloqueo de los vasos linfáticos intestinales en perjuicio del drenaje de linfa y de la absorción intestinal (Mendes, 1994).

2.4.3. Forma crónica.

La PCM crónica o forma adulta es la que se presenta con mayor frecuencia. Ocurre predominantemente en pacientes de sexo masculino. La enfermedad puede desarrollarse

directamente desde un foco primario o, como sucede más frecuentemente, a partir de un foco quiescente luego de un período de latencia. Puede permanecer localizada en el pulmón (unifocal), o involucrar otros órganos o sistemas (multifocal). Se caracteriza por una evolución de varios meses, y en el último caso predominan la adinamia, la pérdida de peso corporal, las lesiones tegumentarias, y a veces, la linfadenopatía (Del Negro, 1994).

Su surgimiento puede darse con co-infección bacteriana como *Mycobacterium tuberculosis* o bacterias comunes.

En la mayoría de los casos, la PCM crónica comienza en el pulmón, lo cual da origen a manifestaciones clínicas de manera insidiosa, incluyendo tos seca (posteriormente productiva) y disnea en esfuerzo.

Las lesiones de la mucosa oral, faringe y laringe son muy comunes se producen por diseminación hematógena a partir de un foco primario pulmonar. Las lesiones faríngeas producen odinofagia y dificultad en la ingestión de alimentos, lo que conduce a pérdida de peso y empeoramiento del estado general del paciente.

Las lesiones cutáneas también son producto de la diseminación hematógena del hongo. Generalmente se correlacionan con la mayor gravedad del proceso infeccioso. Presentan un aspecto polimórfico y muchas veces aparecen en la cara y en torno a los orificios naturales del cuerpo (boca, nariz, ano) (Montenegro, 1994).

Otras localizaciones frecuentemente involucradas son los ganglios linfáticos, las glándulas suprarrenales, los intestinos y el sistema nervioso central. Con menor frecuencia se afectan el sistema osteoarticular, el hígado, el bazo, la próstata, los órganos genitales, la tiroides, el globo ocular y el pericardio.

Las secuelas más graves de esta micosis incluyen cuadros de insuficiencia pulmonar crónica, enfermedad de Addison y mala absorción intestinal.

Ciertos parámetros de laboratorio se encuentran frecuentemente afectados y por lo tanto puede observarse: anemia, leucocitosis, eosinofilia, linfopenia, transferrina y hierro sérico disminuídos, hipocalcemia (Martinez, 1994). En ratones infectados intraperitonealmente con PB, tanto susceptibles como resistentes, se observa aumento de triglicéridos y proteínas totales, y disminución del hierro; pero sólo en animales susceptibles se encuentra disminución de glucosa y colesterol-HDL, aumento de AST, bilirrubina y TIBC (Meloni-Bruneri, 1997).

2.5. Aspectos inmunopatológicos.

El sistema inmune posee diversas alternativas para inducir las funciones efectoras adecuadas con el fin de eliminar organismos patógenos.

En base a la respuesta inmunológica de los pacientes, la PCM puede ser clasificada en dos formas polares (Negroni, 1968; Franco, 1993):

-polo hiperérgico: infección localizada, con respuesta celular normal, histopatología mostrando granulomas epitelioides con pocos elementos fúngicos

-polo anérgico: infección maligna, diseminada con inmunidad celular deprimida, altos títulos de anticuerpos, histopatología mostrando una reacción inflamatoria débil, con extensas áreas de necrosis y gran cantidad de elementos fúngicos.

El reconocimiento de la existencia de una regulación cruzada entre los perfiles de respuesta celular Th1 y Th2 puede explicar parcialmente la polaridad observada en la respuesta inmune del huésped (Figura 2).

Musatti, 1994

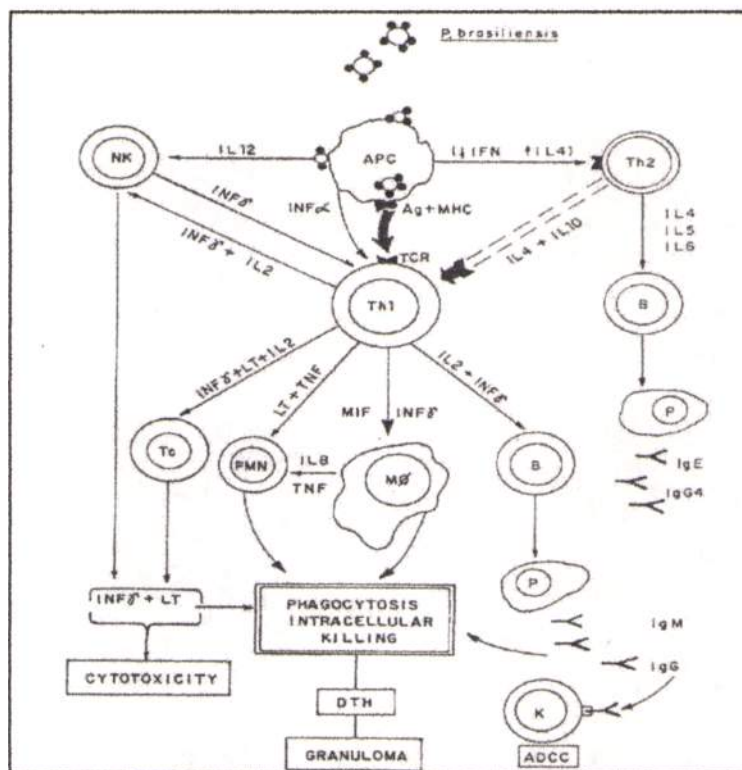


Figura 2. IL: interleuquina; IFN: interferón; LT: linfoxina; TNF: factor de necrosis tumoral; Ag: antígeno; APC: célula presentadora de antígeno; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor T; DTH: hipersensibilidad retardada; MIF: factor inhibidor de la migración; NK: célula natural killer; Tc: linfocito T citotóxico; Th: linfocito T helper; P: célula plasmática; MØ: macrófago; ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpo; Ig: inmunoglobulina; PMN: neutrófilo (=): supresión; (-): activación.

La caracterización de cepas de ratones con susceptibilidad diferencial a la infección por PB ha contribuido de manera significativa a la comprensión de los mecanismos de patogénesis de la PCM. En función de los resultados, se han definido cepas altamente resistentes (A/Sn, A/J, DBA/2), resistentes (C3H/HeJ), de resistencia intermedia (BALB/c, C57BL/10, CBA), y susceptibles (B10.A) (Calich, 1985). Las cepas murinas resistentes típicamente presentan una adecuada respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), producción de IFN- γ con una eficiente activación de macrófagos y secreción de anticuerpos de isotipos IgG2a e IgG3; mientras que las cepas susceptibles muestran una respuesta de DTH pobre, con activación ineficiente de los macrófagos y producción de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2b (Fazioli, 1994; Cano, 1998b; Calich, 1998), así como diseminación del agente infeccioso hacia diferentes órganos (Singer-Vermes, 1993). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la ruta de inoculación puede influir en el perfil de respuesta inmune que se monta contra el agente infeccioso.

2.5.1. Respuesta innata.

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa con la que cuenta el organismo para impedir el avance de un proceso infeccioso. En ella intervienen desde factores mecánicos (barreras epiteliales) hasta diferentes poblaciones celulares entre las que se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los macrófagos y las células *natural killer* (NK).

Se ha observado que los PMN humanos de sangre periférica exhiben un efecto fungistático sobre levaduras de ciertas cepas de PB, el cual se incrementa en presencia de IFN- γ y GM-CSF e IL-1 β pero no se ve afectado por IL-8 o TNF- α (Kurita, 1999; 2000).

Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra la infección. La multiplicación del PB dentro del macrófago es inhibida por IFN- γ (Moscardi-Bacchi, 1994). Resultados obtenidos *in vitro* por Cano y col. con macrófagos murinos, sugieren que la restricción de hierro es uno de los mecanismos por los cuales los macrófagos activados controlan la transformación intracelular de los conidios fagocitados y el crecimiento de las levaduras de PB (Cano, 1992; Cano, 1994). En modelos murinos de infección, la alteración del funcionamiento normal de estas células produjo un incremento de la gravedad y diseminación de la enfermedad, tanto en cepas resistentes como en animales susceptibles (Kashino, 1995).

Estudios recientes realizados con cepas murinas susceptibles y cepas resistentes a la infección por PB llevaron a la conclusión de que el óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos es esencial para hacer frente a la infección (Gonzalez, 2000). Sin embargo, niveles altos y persistentes de NO están asociados con una mayor susceptibilidad, lo cual indicaría que el NO juega un papel dual en la PCM (Nascimento, 2002).

Existen evidencias de la producción de TNF- α en respuesta al PB, la cual es a su vez regulada por constituyentes de la pared celular del hongo (Figuereido, 1993) y que cumple un papel importante en la resistencia a la infección (Souto, 2000; Parise-Forte, 2000). También se ha encontrado una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), sobre todo en pacientes con formas diseminadas de la enfermedad (Silva, 1995a).

Los pacientes con PCM muestran un incremento en el número de células NK circulantes pero con actividad citotóxica disminuída, lo cual puede contribuir a los desórdenes inmunológicos observados (Peraçoli, 1991).

Por otro lado se ha demostrado la capacidad del PB de activar el sistema del complemento en modelos experimentales murinos (Calich, 1972) y en sueros de pacientes con PCM activa (Munk, 1992), contribuyendo de esa manera al desarrollo de la respuesta inflamatoria.

2.5.2. Respuesta inmune celular.

Como se mencionó anteriormente, la inmunidad mediada por células parece ser el mecanismo de defensa efectivo contra el PB así como para el resto de la micosis sistémicas.

La respuesta inmune celular de tipo Th1 y su capacidad de inducir DTH parece ser el mecanismo principal de defensa contra el PB. En general, los pacientes con PCM activa muestran pruebas de DTH negativas. Como consecuencia de la DTH, los macrófagos y los neutrófilos son reclutados y activados en el sitio de infección. Los macrófagos activados son capaces de eliminar al PB, secretar citoquinas y diferenciarse a células epitelioides. Dichas células son las que se encuentran en los granulomas que se forman como respuesta inmunoespecífica con el fin de destruir o circunscribir al microorganismo para evitar su multiplicación y diseminación (Brummer, 1989). Macrófagos obtenidos a partir de animales infectados con PB muestran una disminución en la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (aún habiendo sido tratados con IFN- γ), lo cual

sugiere que el hongo y sus componentes estructurales tienen la capacidad de modificar el patrón de expresión de estas moléculas (Bocca, 1999).

En pacientes con diferentes formas clínicas de PCM se observa una disminución del porcentaje de linfocitos T (LT), mientras que el número de linfocitos B (LB) puede ser normal o aumentado (Mota, 1988). Estas observaciones pueden ser consecuencia de una depresión en la función de los LT, asociada a una activación policlonal de LB, como ha sido reportada por algunos autores (Chequer-Bou-Habib, 1989a; Arango, 1982).

En pacientes activos se observa una disminución de la respuesta de células T a mitógenos, relacionada a una menor producción de IL-2 y una expresión deficiente de receptores para dicha citoquina (Rezkallah-Iwasso, 1992). Existen evidencias de la presencia de factores inhibitorios en el plasma (complejos inmunes, productos fúngicos y otras sustancias) que podrían ejercer un efecto inmunosupresor sobre los LT (Franco, 1993; Sugizaki, 1999).

En cuanto a la respuesta proliferativa antígeno-específica de los LT, los resultados pueden variar de acuerdo a la preparación antigénica utilizada y a la forma clínica que presente el paciente. Sin embargo, en estudios hechos con preparaciones antigénicas crudas (Benard, 1996) y glucoproteínas purificadas (Benard, 1997), los pacientes siempre exhiben una menor reactividad si ésta se compara con la de individuos sanos sensibilizados o no a PB. Recientemente, Cacere y col. han observado un aumento de la apoptosis en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) de pacientes con PCM frente al estímulo con un antígeno de PB (Cacere, 2002). Ensayos realizados por Diniz y col. muestran diferentes patrones de respuesta *in vitro* cuando PBMC de pacientes con PCM son estimuladas con fracciones antigénicas de PB obtenidas por cromatografía, indicando que componentes fúngicos específicos pueden desempeñar un papel modulador (Diniz, 1999; 2001).

En cuanto a la producción de citoquinas, Bava y col. detectaron una producción disminuída de IFN- γ y TNF- α en sobrenadantes de células mononucleares de pacientes con PCM respecto de individuos control (Bava, 1991). Posteriormente, Karhawi et al. observaron que los niveles de producción de IFN- γ se recuperan luego de la remisión clínica (Karhawi, 2000). Utilizando un modelo experimental de PCM pulmonar, Cano y col. verificaron que el IFN- γ desempeña un papel importante en la resistencia a la infección por PB a través de su aporte a la eliminación de células fúngicas y a la inmunidad celular, así como por sus efectos regulatorios sobre la respuesta inmune humoral (Cano, 1998a).

En estudios más recientes, Marques Mello y col. y Oliveira y col. observaron que cultivos de PBMC de pacientes con PCM activa producen niveles más elevados de IL-4 e IL-5 al ser comparados con células provenientes de individuos no enfermos (sensibilizados y no sensibilizados a PB) (Marques Mello, 2002; Oliveira, 2002). Anteriormente, ya se había indicado que la producción de IL-4 y los niveles de IgE estaban aumentados en pacientes con PCM diseminada, y que dichos valores correlacionaban con la gravedad de las manifestaciones clínicas (Biagioni, 1984; Arango, 1982). A estos resultados pueden sumarse los obtenidos por Benard y col. quienes demostraron que las PBMC de pacientes con PCM aguda y crónica secretan niveles más bajos de IFN- γ e IL-2 y cantidades apreciables de IL-10 frente a un estímulo con un antígeno específico de PB (Benard, 2001), situación que se revierte por neutralización de la IL-10 o por adición de IL-12 (Romano, 2002).

Usando un modelo pulmonar murino de infección, Cano y col. demostraron que la depleción de LT CD8⁺ afecta la óptima eliminación del hongo de los tejidos, lo cual sugiere un papel protector para estas células, sobre todo en animales susceptibles (Cano, 2000).

Recientemente, se observó que secuencias CpG no metiladas del genoma de PB, utilizadas como adyuvante en ratones susceptibles infectados con PB, inducen una respuesta inmune protectora de tipo Th1, con incremento de IFN- γ e IgG2a, y una disminución de la respuesta humoral y de la diseminación del patógeno (Souza, 2001).

Adicionalmente, ensayos realizados en modelos experimentales de infección han demostrado una baja eficiencia de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos) en estimular la secreción de citoquinas Th1 por los LT en ratones susceptibles (Almeida, 2001).

Los datos acumulados sugieren que el establecimiento de la enfermedad está asociado a una respuesta inmune de tipo Th2 y que la diseminación de la infección está relacionada con una disminución en la capacidad de los LT de producir IFN- γ , y montar una respuesta de tipo Th1. Por lo tanto, como en el caso de otros hongos patógenos, la inmunidad protectora estaría asociada a una adecuada respuesta inmune celular. Aún no existen reportes de inmunógenos protectores, aunque recientemente se han llevado a cabo estudios con un antígeno glicoproteico de 43 kDa (Taborda, 1998) y su DNA (Pinto, 2000), obteniéndose resultados promisorios.

2.5.3. Respuesta inmune humoral.

Diversos estudios indican que los pacientes con PCM presentan una hiperreactividad de la respuesta inmune humoral.

Se ha demostrado que estos pacientes poseen niveles séricos aumentados de IgG, IgE e IgA (Biagioni, 1984; Arango, 1982), característicos de una respuesta policlonal. Posteriormente se observó, por inoculación intraperitoneal de fracciones de la pared celular del PB (Oliveira, 1992) y por infección con levaduras de PB (Silva, 1995b), la inducción de hipergammaglobulinemia y producción de anticuerpos contra antígenos no relacionados en modelos experimentales murinos.

Por otro lado, se han encontrado niveles más elevados de IgG totales en pacientes con forma aguda progresiva respecto de pacientes con PCM crónica (Biagioni, 1984). Recientemente, se ha observado que los pacientes con forma adulta localizada presentan niveles séricos más bajos de IgE, IgA e IgG4 específicas contra antígenos de PB, que pacientes con PCM diseminada tanto adulta como juvenil (Mamoni, 2002). Resultados concordantes fueron publicados por Baida y col. y Juvenale y col. quienes analizaron la relación entre isotipos de anticuerpos séricos específicos producidos contra una mezcla antigénica (Juvenale, 2001) y un antígeno purificado de PB (gp-43) (Baida, 1999) por pacientes con PCM, observando una mayor producción de IgG4 en pacientes con forma juvenil y un aumento del nivel de IgG2 en pacientes con forma adulta de la enfermedad.

La detección de anticuerpos anti-idiotípicos en suero de pacientes con diferentes formas clínicas de PCM (Souza, 2000) sugiere la posibilidad de la existencia de un mecanismo de inmunomodulación a nivel de la respuesta humoral.

También se han detectado diferentes niveles de complejos inmunes circulantes en suero de pacientes (Unterkircher, 1996), y se ha sugerido que los mismos ejercen un efecto inhibitorio sobre la respuesta proliferativa de los LT (Chequer-Bou-Habib, 1989b; 1992).

2.6. Tratamiento.

El manejo terapéutico de la PCM debe comprender, además de la utilización de drogas antifúngicas, el empleo de medidas que mejoren las condiciones generales del paciente y el acompañamiento pos-terapéutico. La supresión del consumo de alcohol y tabaco, tan comunes entre los pacientes con PCM, contribuye significativamente a la recuperación del paciente.

El tratamiento incluye una etapa de ataque y otra de mantenimiento. La duración de la terapéutica es variable (de 6 meses a 3 años), y está relacionada a la obtención de criterios de

cura. Estos se basan en datos clínicos (desaparición de signos y síntomas), micológicos (exámenes micológicos periódicos negativos), radiológicos (estabilización del patrón radiológico pulmonar) e inmunológicos (disminución del título de anticuerpos y positivización o incremento de la intradermorreacción).

En 1940 se introdujeron las sulfonamidas en el tratamiento de la PCM (Ribeiro, 1940). Su utilización requiere un tratamiento de larga duración, lo cual representa un inconveniente si se tiene en cuenta que, en su mayoría, los pacientes con PCM son individuos de bajos recursos económicos. Estos compuestos producen remisiones clínicas en más del 60% de los casos si son utilizados adecuadamente (Negroni, 1996b). La asociación de trimetoprima y sulfametoxazol, también ha sido utilizada con buenos resultados para el tratamiento de la PCM.

La anfotericina B fue empleada en PCM por primera vez en 1958 (Lacaz, 1958) y es una droga muy efectiva en PCM, pero debido a sus efectos colaterales (sobre todo la nefrotoxicidad) y la necesidad de ser aplicada por vía intravenosa, se reserva para casos de mayor gravedad. Por otra parte, su aplicación aún durante lapsos prolongados, requiere el uso posterior de sulfamidas o compuestos azólicos para evitar recaídas.

Un importante avance en el tratamiento de la PCM fue la introducción de los derivados azólicos en la terapéutica (ketoconazol, fluconazol, itraconazol). El PB es un agente muy susceptible a estas drogas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Restrepo, 1984b; Borgers, 1987; Negroni, 1988). Son sustancias que pueden ser administradas por vía oral por largos períodos de tiempo, con pocos efectos colaterales. Actualmente, la droga de elección es el itraconazol, debido a su grado de eficacia y su baja toxicidad. Otros dos compuestos triazólicos, el saperconazol y el Sh39304, han sido estudiados pero la comprobación de su actividad carcinogénica en animales ha impedido su salida al mercado (Negroni, 1996b).

3. HISTOPLASMOSIS:

La histoplasmosis (HP) es una enfermedad granulomatosa causada por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Los primeros tres casos fueron descubiertos en Panamá en 1906 por Samuel Taylor Darling, quien concluyó que el agente etiológico, observado dentro de los histiocitos, era un protozoario (Darling, 1906). El primero en cultivar

H. capsulatum fue W.A. De Monbreun, quien correctamente describió a este microorganismo como un hongo dimorfo (DeMonbruen, 1934).

Existe una variedad de HP que ocurre exclusivamente en el continente africano, causada por el *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, cuya fase parasitaria presenta levaduras de mayor tamaño.

3.1. Epidemiología.

Aunque es una infección cosmopolita, su incidencia es mayor en América (Estados Unidos y Latinoamérica) y África (Rippon, 1988).

Los datos epidemiológicos se conocen a partir de resultados de pruebas cutáneas, del registro de casos clínicos, del aislamiento de *H. capsulatum* de muestras de tierra y de tejidos de animales autóctonos.

De igual manera que la PCM, la HP no es una enfermedad contagiosa entre humanos, ni de los animales al hombre.

Se han encontrado áreas de Estados Unidos donde el porcentaje de infección alcanza el 90% (Furcolow, 1958). En Argentina, se calcula que aproximadamente 7 millones de personas están infectadas con HC; la región de la pampa húmeda así como ciertas áreas del noroeste y noreste presentan aproximadamente un 35% de infección (Negroni, 1970, 1997; von Gelderen de Komai, 1999).

Si bien la HP no es una micosis oportunista, produce infecciones progresivas en individuos inmunocomprometidos debido a enfermedades hematológicas malignas, terapia citotóxica, o en personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La mayor parte de los casos no asociados al SIDA se observan en pacientes de sexo masculino y de más de 50 años de edad. La HP asociada al SIDA predomina en personas de 20 a 40 años de edad, sin diferencias entre ambos sexos (Bullock, 1995).

3.2. Agente etiológico.

El microorganismo causante de la HP clásica es un hongo dimórfico cuya fase asexual se conoce como *Histoplasma capsulatum* (HC) var. *capsulatum* y su fase sexual se llama *Ajellomyces capsulatus* (Ajello, 1967). Taxonómicamente pertenece, de igual manera que el PB, a:

Phylum: Ascomycota

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

Existen otras dos variedades: *duboisii* (causante de la HP africana), y *farcinosum* (que produce linfangitis en caballos).

3.2.1. Aspectos morfológicos y ultraestructurales.

En cultivo a temperaturas inferiores a 37°C (22 a 25°C) en agar Sabouraud y sobre sustratos naturales, el HC crece como micelio de color blanco o pardusco. Berliner ha denominado a estos dos tipos morfológicos como colonias albinas y colonias pardas (Berliner, 1971). En esta fase, el hongo elabora macroconidias características, erizadas, ovales, de 8 a 18 µm de diámetro, y microconidias de 2 a 5 µm habitualmente lisas (Rippon, 1988) (Figura 3).

En los tejidos del huésped, se encuentran levaduras (de 2 a 5 µm de diámetro) dentro del citoplasma de células mononucleares fagocíticas. Por lo tanto, el HC se comporta como un parásito intracelular facultativo, hecho relevante desde el punto de vista de la respuesta inmune en la HP (Schwarz, 1971). Esta fase levaduriforme es la que crece en cultivo a 37°C en medios enriquecidos (como el agar sangre), como colonias cremosas y plegadas, de crecimiento rápido, que alcanzan la madurez en 4 ó 5 días de cultivo.

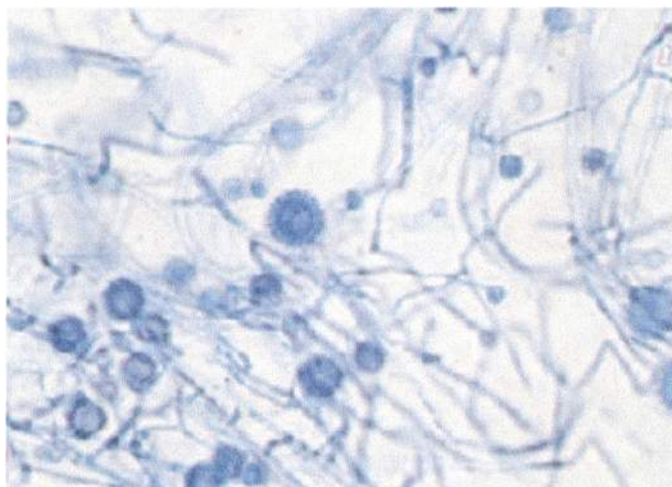


Figura 3. Micelio, macroconidias y microconidias de *Histoplasma capsulatum*. Tinción con azul de lactofenol (400x).

La fase sexuada es heterotálica, y los ascosporos dentro de los ascos contenidos en cleistotecios, son característicos. Pero, la inestabilidad de la cepas ha limitado el uso de esta fase de crecimiento en estudios genéticos.

Se han encontrado distintos serotipos entre cepas de HC, hecho que sugiere diferencias en la composición química de la pared celular (Kaufman, 1966). A su vez, Domer y col. clasificaron a las levaduras de HC en dos quimotipos, siendo las del quimotipo II las que contienen mayor cantidad de α -glucano en su pared celular (Domer, 1967). Al igual que en el PB, el α -glucano está ausente en la forma miceliar.

Las variedades *capsulatum* y *duboisii* son indistinguibles en su forma miceliar, pero la fase levaduriforme presenta marcadas diferencias. Las levaduras de la var. *duboisii* son más grandes (12-15 μ m) que las correspondientes a la var. *capsulatum* (Rippon, 1988).

3.2.2. Biología molecular y genética.

El HC es un ascomicete haploide muy relacionado a otros hongos dimórficos y se conoce poco acerca de sus características genómicas. El tamaño del genoma del HC es de aproximadamente 25-30 Mb, con un número más probable de 7 cromosomas, pero se ha encontrado que ambos valores varían entre diferentes cepas (Steele, 1989; Carr, 1998).

Originalmente, los aislados de HC fueron separados en tres grandes clases basadas en análisis de RFLP y ADN mitocondrial (Vincent, 1986), encontrándose cierta correlación con la distribución geográfica. La clase 2 incluye cepas aisladas en Norteamérica; la clase 3 corresponde a aislados predominantes en América Central y Sudamérica; mientras que la clase I es un grupo inusual de cepas aisladas de pacientes con inmunodeficiencia severa. Subsecuentes estudios con polimorfismos de ADN ribosomal y PCR con primers arbitrarios, demostraron que en realidad la diversidad entre cepas es aún mayor (Keath, 1992; Kersulyte, 1992).

Estudios genéticos más recientes sobre 46 aislados de HC sugieren la división del género *Histoplasma* en 6 especies filogenéticas, 5 de las cuales corresponden a la variedad *capsulatum* (subdivididas por regiones geográficas; una de ellas incluye a la variedad *furciminusum*) y la restante a la variedad *duboisii* (Kasuga, 1999).

Estudios similares utilizando estas tecnologías, llevados a cabo sobre muestras ambientales y de animales infectados en México y Brasil, confirman la diversidad genética entre diferentes aislados, y sugieren que el micronicho ambiental podría actuar como fuente de infección para los animales y la población humana local (Taylor, 2000; Medeiros Muniz, 2001).

3.2.3. Dimorfismo.

Debido a que la transición de micelio a levadura es fundamental para la patogénesis del hongo (Medoff, 1987), se han llevado a cabo trabajos con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares del dimorfismo del HC. Esta transformación está gobernada fundamentalmente por la temperatura, sin embargo existen otros factores que también pueden ser importantes.

Existen numerosos reportes referidos a la expresión diferencial de genes durante la transición dimórfica. Entre ellos encontramos genes asociados a cambios en los requerimientos nutricionales (Rippon, 1968) y a la adaptación al choque térmico (Shearer, 1987), aunque aún no se han detectado genes esenciales para dicha transición. También se ha informado la existencia de diferencias cuali y cuantitativas en la expresión de distintas proteínas de membrana (Kumar, 1988) y proteínas de unión al ADN (Abidi, 1998) entre ambas fases morfológicas.

En HC, han sido identificadas ciertas proteínas de choque térmico incluyendo hsp60, hsp70 (89,2% de homología con la de PB) y hsp82. Tanto hsp70 como hsp82 son expresadas constitutivamente a bajos niveles en todo momento, y su expresión es inducible por calor (Maresca, 2000).

3.2.4. Condiciones de cultivo.

El HC crece bien en agar Sabouraud, pero habitualmente se utiliza para su aislamiento el agar sangre (Rippon, 1988). Sin embargo existe un agar con extracto de levadura e hidróxido de amonio (Smith, 1975), que permite un mejor aislamiento del hongo de muestras muy contaminadas con otros tipos de microorganismos.

3.2.5. Ecología.

Se ha encontrado que la fase saprófita del HC habita en suelos ácidos, húmedos, ricos en materia orgánica y nitrógeno (Larsh, 1970). Ha sido aislado de suelos enriquecidos con guano de aves y murciélagos (gallineros, nidos de pájaros, cuevas de murciélagos, silos habitados por palomas). Los murciélagos presentan una infección natural que involucra el tracto gastrointestinal y sus deposiciones suelen estar muy contaminadas con este hongo (Howard, 1984; Rippon 1988).

En respectivos estudios Furcolow (Furcolow, 1958) y Carmona (Carmona, 1971) encontraron que las condiciones climáticas más favorables para el desarrollo del microorganismo corresponden a temperaturas medias de 22 a 29°C, precipitaciones moderadas y humedad relativa de 67 a 90%.

Además de las aves y los murciélagos, uno de los vectores principales para la diseminación de las conidias en ambientes abiertos es el viento, ya que dado su pequeño tamaño son fácilmente aerolizables.

3.2.6. Virulencia.

Es probable que los genes involucrados en la adaptación temprana a temperaturas mayores (37°C) y en la transición y mantenimiento del estado levaduriforme estén relacionados con el grado de virulencia (Medoff, 1986). Maresca y col. han reportado que los cambios en la fluidez de la membrana del micelio modulan la expresión de genes implicados en el choque térmico y disminuyen el nivel de virulencia en cepas de HC (Maresca, 1993).

La expresión de hsp70 en algunas cepas se induce a 34°C, mientras que en otras la expresión aumenta a 37°C, hecho que correlaciona con un mayor grado de virulencia en este último caso (Caruso, 1987).

Se han llevado a cabo estudios de virulencia con cepas que muestran diferencias en la expresión de α -glucano en su pared celular, y los resultados sugieren que la expresión de dicho componente contribuye al grado de virulencia de la cepa (Klimpel, 1988), de manera similar a lo hallado para PB. También se ha sugerido un papel de la proteína unidora de calcio (CBP-1) en la virulencia, ya que parece influir en la capacidad de la levadura para destruir al macrófago (Kugler, 2000).

3.3. Patogénesis y patología.

La infección primaria se produce por la inhalación de microconidias de la fase micelial que están dispersas en el aire. El curso de la enfermedad depende principalmente del número de esporas inhaladas y del estado inmunológico y edad del paciente (Negroni, 2000).

Las microconidias penetran las vías aéreas y alcanzan los alveolos pulmonares donde son fagocitadas (pero no lisadas) por los macrófagos. En unos 3 a 5 días, las conidias se transforman en elementos levaduriformes y se multiplican por gemación (Rippon, 1988; Bullock, 1995).

La capacidad del patógeno para adaptarse al medio hostil con el que puede encontrarse durante la infección (por ejemplo, bajo pH) está directamente relacionada a su patogenicidad (Kamei, 1992). La habilidad del HC para sobrevivir y replicarse dentro de los fagolisosomas del macrófago es crucial para la patogénesis (Retallack, 1999).

Cuando los mecanismos de inmunidad celular son normales, a partir de la tercera semana de producido el contacto, la infección progresa a un estado latente, con formación de granulomas epitelioides rodeados de una cápsula fibrosa que calcifica con el tiempo. En el interior de estos granulomas quedan levaduras de HC muertas o viables. Si existen deficiencias en este tipo de respuesta inmunológica, la infección primaria no cura espontáneamente o se reactivan los focos pulmonares o ganglionares latentes, y la micosis se torna progresiva y diseminada (Negróni, 2000).

3.4. Aspectos clínicos.

La HP presenta una amplia gama de manifestaciones clínicas, que abarcan desde procesos asintomáticos en individuos inmunocompetentes hasta infección diseminada progresiva en pacientes inmunodeprimidos.

3.4.1. Histoplasmosis en pacientes inmunocompetentes.

3.4.1.1. Primo-infección pulmonar asintomática.

La vasta mayoría de las infecciones con HC var. capsulatum son completamente asintomáticas, o al menos, subclínicas. Se presentan como infecciones leves y autolimitadas de las vías respiratorias superiores, y la única evidencia de contacto con el patógeno es la positividad de la intradermoreacción.

3.4.1.2. Infección pulmonar aguda.

El período de incubación varía entre 3 y 21 días, y es más corto en el caso de reinfecciones e infecciones masivas (Rippon, 1988).

Los síntomas más frecuentes son: fiebre, debilidad, dolor de cabeza, tos seca, anorexia, mialgias, pérdida de peso. El cuadro puede variar de leve a grave y requiere incluso, hospitalización.

Los estudios radiológicos revelan infiltrados difusos en la base de ambos pulmones y un incremento en el tamaño de los ganglios linfáticos mediastinales (Bullock, 1995).

La enfermedad resuelve espontáneamente en un período de 2 a 4 meses. Las secuelas incluyen nódulos fibrosos que posteriormente calcifican, y que contienen elementos fúngicos (vivos o muertos) (Goodwin, 1981).

3.4.1.3. Infección pulmonar crónica.

También se conoce como HP cavitaria y se observa en pacientes con enfermedades broncopulmonares obstructivas crónicas. Puede producirse por una reinfección exógena o por reactivación de un foco endógeno (Goodwin, 1981).

Esta forma clínica se presenta en aproximadamente un 10% de los pacientes con primo-infección sintomática. La mayor parte de los casos corresponden a pacientes de sexo masculino, mayores de 50 años y que son asiduos fumadores. Defectos en la arquitectura del pulmón son considerados factores predisponentes e impiden la completa resolución de la micosis (Negroni, 1993).

Se desencadena un proceso inflamatorio que conduce a la destrucción del parénquima pulmonar y al desarrollo de fibrosis. Las manifestaciones clínicas y radiológicas son similares a las de la tuberculosis, pero menos graves.

Generalmente cursa con fiebre, tos, expectoración mucopurulenta o sanguinolenta, dolor torácico, astenia, anorexia y pérdida de peso. Es similar a la tuberculosis cavitaria, pero su curso es más benigno y evoluciona con brotes.

3.4.2. Histoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos.

En este tipo de pacientes se desarrolla una HP diseminada, progresiva que puede ser aguda, subaguda o crónica. El factor condicionante más importante es un déficit en la inmunidad celular.

La forma crónica predomina en pacientes de sexo masculino y mayores de 50 años, y las lesiones mucocutáneas son las manifestaciones clínicas más frecuentes. Los síntomas son disfonía, odinofagia, disnea, tos y expectoración mucopurulenta. Las lesiones pulmonares se observan en un 10-20% de los casos (Negroni, 2000). En ciertos casos puede desarrollarse una meningoencefalitis crónica por HC, mucha veces confundida con tuberculosis, criptococosis o coccidioidomicosis (Negroni, 1995).

Las formas aguda y subaguda se observan en niños en algunas áreas endémicas, y en pacientes con un déficit grave de la inmunidad celular (SIDA, tratamiento quimioterápico, trasplantes) (Goodwin, 1980). En Latinoamérica, aproximadamente el 80% de los casos presentan lesiones mucocutáneas, mientras que en Estados Unidos, solo han sido informadas en un 10% de los pacientes (Wheat, 1985). También puede observarse, entre otras afecciones, compromiso del sistema nervioso central (meningoencefalitis) y lesiones óseas en pacientes pediátricos.

El advenimiento del SIDA ha producido un incremento significativo de la incidencia de HP diseminada en áreas endémicas. En nuestro medio se calcula que aproximadamente el 4% de los pacientes con SIDA presenta esta afección (Negroni, 1997).

Las manifestaciones clínicas generales son similares a las que ocurren en otros procesos infecciosos graves, con algún componente respiratorio en ciertos casos. Aproximadamente un 10% de los pacientes sigue un curso clínico fulminante que lleva al shock, distrés respiratorio, encefalopatía, falla multiorgánica y coagulación intravascular diseminada (Bullock, 1995).

3.4.3. Histoplasmosis mediada por respuesta inmune.

La fibrosis mediastinal y los histoplasmosomas (lesiones residuales), ambos secuelas de infecciones primarias, se producen por una respuesta inmune exagerada a los antígenos de HC (Negroni, 1994). El mayor problema con los histoplasmosomas, sobre todo los no calcificados, es que pueden ser confundidos con neoplasias.

Esta forma clínica no causa compromiso general del paciente, ni se aconseja tratamiento antifúngico.

3.5. Aspectos inmunopatológicos.

Dado que aproximadamente el 95% de los casos de HP son subclínicos, está claro que el ser humano dispone de vías eficientes de defensa contra este hongo potencialmente invasor y destructor.

El funcionamiento apropiado de los mecanismos de inmunidad involucra cierto control genético. De hecho, la susceptibilidad a la infección por HC varía enormemente entre cepas de ratones genéticamente diferentes (Chick, 1974). Además, en modelos experimentales de HP con ratones adultos de distintas cepas, se ha observado que las hembras son más resistentes a la infección (Taylor, 1982).

Existe una amplia evidencia experimental de que tanto los LT CD4 como los LT CD8 ejercen funciones fundamentales en la defensa del huésped contra la infección sistémica por HC. Dos determinantes críticos en el curso que seguirá la infección son: las citoquinas liberadas y la respuesta inflamatoria que se monta para responder a la invasión del patógeno. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el HC se comporta frecuentemente como un parásito intracelular, la no producción de citoquinas adecuadas para activar las propiedades microbicidas de los fagocitos llevan a menudo a una enfermedad progresiva (Cain, 1998).

3.5.1. Inmunidad innata.

Aunque el HC no es un parásito intracelular obligado, su entrada en las células del huésped es un evento frecuente. El HC puede ser internalizado por monocitos, macrófagos y neutrófilos a través de las vías tradicionales de opsonización, o por medio de vías alternativas como la unión a integrinas (Woods, 2002).

Las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria involucran a los PMN, los cuales no son capaces de dominar la infección, pero sí de limitar su diseminación. Se ha encontrado que las levaduras de HC estimulan el estallido respiratorio en los PMN humanos (Schnur, 1990) y son sensibles al H₂O₂ (Howard, 1981).

Tanto las levaduras como las microconidias de HC son fagocitadas por los macrófagos (Newman, 1990) y se han llevado a cabo experimentos que demuestran la interacción de proteínas de la membrana de macrófagos murinos con componentes del HC (Taylor, 1998). Recientemente se ha demostrado que una proteína de shock térmico, la hsp60, es el principal ligando que media la unión del hongo a macrófago humanos a través de CD11/CD18 (Long, 2003). Así mismo, experiencias con modelos murinos de infección han demostrado que, una vez fagocitado, el HC no es eliminado por fusión en los fagolisosomas, sino que se multiplica dentro de los macrófagos no activados y los destruye (Maresca 2000). Estos resultados, sugieren que la activación previa del macrófago es esencial para la eliminación del patógeno. Al respecto, Von Behren y col. habían observado que el bloqueo de las funciones de los macrófagos correlacionaba con una mayor susceptibilidad a la infección (Von Behren, 1983). Por otro lado, existen evidencias que sugieren una actividad supresora de los macrófagos mediada por NO en modelos experimentales (Wu-Hsieh, 1998), mientras que en humanos no se ha demostrado una función de los intermediarios reactivos del nitrógeno en la fungistasis. El HC requiere hierro tanto para su crecimiento intracelular como *in vitro*. El secuestro de hierro

por los macrófagos tratados con IFN- γ es un mecanismo de defensa específico contra HC (Lane, 1991).

La posibilidad de que las células NK contribuyan a la defensa contra HC, se basa en el hecho de que cepas de ratones con deficiencia en la funcionalidad de dicha población celular son más susceptibles a la infección luego de una inoculación intravenosa de levaduras de HC (Patino, 1987).

Tanto las levaduras vivas como muertas de HC son capaces de activar la vía alternativa de la cascada del complemento (Ratnoff, 1990).

3.5.2 Respuesta inmune celular.

La activación de la respuesta mediada por células es esencial para promover la resistencia a la infección primaria y reinfección con patógenos intracelulares.

Dado que tanto los LT CD4 como LT CD8 juegan un papel importante en este tipo de respuesta, el resultado óptimo dependerá de la coordinación de las funciones entre ambos tipos celulares. Estudios realizados en pacientes con diferentes formas clínicas de HP, muestran que en la forma aguda diseminada se registra un aumento de la relación CD8/CD4, mientras que en la forma cavitaria la relación CD4/CD8 supera los valores normales (Payan, 1984). Por otra parte, en estudios recientes en pacientes con HP HIV positivos, se ha observado una disminución en la respuesta inmune celular en los individuos con un recuento de LT CD4 inferior a 500 células/mm³ (Vail, 2002).

La ausencia, congénita o inducida, de LT CD4 condiciona una mortalidad acelerada de ratones infectados con dosis subletales de HC en modelos de infección diseminada y pulmonar (Williams, 1978; Gomez, 1988; Allendörfer, 1999). Sin embargo, la deficiencia en β 2-microglobulina o la depleción de LT CD8 dificulta la eliminación del hongo, pero no produce un aumento de la mortalidad según lo observado en modelos murinos de HP sistémica (Deepe, 1994). Recientemente, experimentos realizados por Zhou y col. con ratones deficientes en perforina sugieren que las células CD8⁺ podrían mediar la respuesta a HC a través de mecanismos dependientes e independientes de perforina (Zhou, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la resolución de la HP requiere de citoquinas que activen los macrófagos, las principales células efectoras en la respuesta frente al hongo.

Zhou y col. observaron que el tratamiento con IL-12 de ratones normales infectados con HC producía una disminución del número de elementos fúngicos y un aumento de la

supervivencia de los animales, a través de la inducción de la producción de IFN- γ (Zhou, 1995; 1997). Modelos murinos de infección han permitido demostrar el papel esencial de esta citoquina en la defensa contra HC, tanto en modelos de inoculación intravenosa (Zhou, 1995; Clemons, 2000) como en modelos de HP pulmonar (Allendörfer, 1997).

La producción de TNF- α es importante tanto en la respuesta primaria como secundaria a la infección, según lo demostrado en modelos de inoculación intravenosa e intranasal de levaduras (Allendörfer, 1998; Zhou, 1998). Adicionalmente, su papel como modulador de la respuesta inmune frente al HC ha sido demostrado mediante experimentos realizados con ratones deficientes en los receptores de tipo 1 y tipo 2 de TNF- α . Durante la infección primaria, la carencia de uno u otro receptor produce una mayor susceptibilidad (si bien el perfil de citoquinas producidas es diferente en ambos casos), mientras que sólo el receptor de tipo 1 parece ser importante para el mantenimiento de una adecuada respuesta secundaria (en ausencia de este receptor aumenta la expresión de citoquinas Th2) (Allendörfer, 2000).

Por otro lado, existen reportes que indican que el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) contribuye a la resistencia del huésped frente al HC. Un bloqueo del GM-CSF endógeno produce una disminución en la liberación de IFN- γ y TNF- α (Deepe, 1999), mientras que la administración de GM-CSF recombinante incrementa el control de la infección tanto en ratones inmunocompetentes como en ratones deficientes en LT CD4 y CD8 (Deepe, 2000).

Estudios con diferentes cepas de ratones (BALB/c, C57BL/6, CBA/J) han permitido identificar dos inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune de tipo Th1 que protege contra la infección por HC. Ambos corresponden a proteínas aisladas de un extracto de membrana y pared celular del hongo. Por un lado, una proteína de 62 kDa (HIS-62) identificada posteriormente como hsp60 (Gomez, 1991b, 1995; Deepe, 1996), y por el otro, una proteína de 80 kDa (HIS-80) que presenta homología con la familia de las hsp70 (Gomez, 1992). La vacunación con un tercer polipéptido (hsp70) no indujo protección en modelos similares de infección (Allendörfer, 1996).

3.5.2. Respuesta inmune humoral.

En pacientes con HP activa frecuentemente se observan altos niveles de anticuerpos en suero, particularmente en individuos con formas diseminadas progresivas de la enfermedad

(Rippon, 1988). Los niveles de IgG se encuentran elevados en la HP activa, mientras que el aumento de las IgA se observa especialmente en pacientes con forma pulmonar crónica (Caldwell, 1982). Con respecto a la IgE, existen reportes que indican que los niveles están elevados durante la infección activa (Cox, 1980).

3.6.Tratamiento.

Como en la PCM , debe tenerse en cuenta las circunstancias clínicas, tanto de hábitos como de afecciones subyacentes, que puedan contribuir a agravar el estado y la evolución del paciente (Negroni, 1996b).

La infección primaria sintomática no requiere tratamiento, la excepción se da cuando la sintomatología es muy marcada o en pacientes con deficiencias inmunitarias (SIDA, tratamiento de linfomas, trasplante de órganos). En estos casos se suelen indicar tratamientos cortos con ketoconazol o itraconazol, ambos por vía oral. Como ya fue señalado, las formas diseminadas progresivas de HP se asocian a distintas causas de inmunodeficiencia. Aún en estas circunstancias, el itraconazol es eficaz en la mayoría de los casos (Negroni, 1992). El fluconazol ha resultado menos satisfactorio que el ketoconazol y el itraconazol (Negroni, 1990). Estudios recientes en pacientes con HP diseminada y SIDA indican que el itraconazol produce una disminución más rápida de la fungemia cuando es comparado con el fluconazol (Wheat, 2002).

En los casos en que los derivados azólicos no puedan ser utilizados, se recomienda al administración de anfotericina B intravenosa (Negroni, 1996b). Esta droga debe ser indicada en pacientes con meningoencefalitis, en las formas clínicas extremadamente graves, cuando el enfermo presente alteraciones digestivas que hagan presumir inconvenientes en la absorción intestinal, o en los casos de coexistencia de tuberculosis (Negroni, 1993).

En los casos de HP pulmonar crónica que no responden a la terapéutica debe evaluarse la posibilidad de efectuar una lobectomía, si es que la capacidad funcional respiratoria y el riesgo quirúrgico lo permiten (Bullock, 1995).

4.DIAGNOSTICO.

Un punto trascendente a tener en cuenta es la importancia del diagnóstico diferencial entre ambas micosis debido a la gran superposición de áreas endémicas, la estrecha relación

taxonómica entre ambos agentes etiológicos y la similitud de manifestaciones clínicas que pueden presentar los pacientes.

Con respecto a la HP, en todas las etapas del patogénesis imita a la tuberculosis y puede coexistir con ella, por lo tanto el diagnóstico diferencial con dicha entidad es de vital importancia al momento de instaurar un tratamiento correcto.

El diagnóstico micológico, si bien tiene la ventaja de ser de certeza, presenta algunas desventajas asociadas básicamente a la demora en el crecimiento de los cultivos y un tiempo más prolongado de procesamiento de las muestras.

Los ensayos serológicos son una opción rápida, aunque no definitiva para el diagnóstico. Las técnicas disponibles son muy diversas, y se han desarrollado métodos de diferente especificidad y sensibilidad.

4.1. Diagnóstico micológico.

El diagnóstico definitivo de ambas micosis se realiza por la observación microscópica del agente etiológico en muestras o líquidos biológicos, seguido de aislamiento y posterior identificación.

Con respecto al PB, en la mayoría de los casos, el microorganismo puede ser visualizado por microscopía óptica por su morfología característica. Sin embargo, en exámenes histopatológicos, las formas pequeñas del hongo pueden ser confundidas con HC (Lacaz, 1994b).

4.1.1. Paracoccidioidomicosis.

El tipo de muestra biológica varía dependiendo de las manifestaciones que presente el paciente. Puede tratarse de esputo, muestras de biopsias, costras de lesiones, bordes de úlceras, pus de ganglios, LCR.

Reportes recientes indican que el análisis micológico de esputo (la muestra más común en casos de PCM crónica pulmonar) resulta positivo en un 54% de los exámenes directos y sólo en el 26% de los cultivos. En cambio, en casos de PCM juvenil, los cultivos a partir de biopsias y lesiones muestran un 100% de sensibilidad (Pimenta, 2002).

Generalmente se realiza un primer examen directo con KOH; si la observación no es concluyente se puede recurrir a la inoculación intratesticular en cobayos con inducción de orquitis y posterior observación directa del material colectado (Lacaz, 1994b).

Posteriormente, se realiza el cultivo en medio con antibióticos a 25°C. El crecimiento puede demorar de 15 a 25 días, lo cual es una desventaja si se necesita un diagnóstico rápido.

La conversión, por cultivo a 37°C, de micelio a levadura es un excelente método de identificación. Aproximadamente dentro de los 15 días de realizado el repique se obtienen colonias cerebriformes, cuya observación microscópica revela elementos ovales con una doble pared celular (Rippon, 1988).

4.1.2. Histoplasmosis.

En el caso de HP, la muestra más frecuente es el esputo, aunque también puede contarse con muestras de biopsias, lavados gástricos y hemocultivos (especialmente importante en paciente inmunocomprometidos) (Bianchi, 2000).

Dado que generalmente el ensayo directo con KOH es negativo, se utiliza el método de coloración de Giemsa, el cual permite la observación de los elementos levaduriformes en el citoplasma de los monocitos y macrófagos. Alrededor de las células fúngicas se observa un halo no teñido que corresponde a la pared celular (de allí la confusión con la existencia de una cápsula) (Rippon, 1988).

La adición de sangre al medio de cultivo favorece el aislamiento de HC, facilitando la transformación de micelio a levadura cuando se lleva a cabo la incubación a 37°C (Lacaz, 1994b).

4.2. Diagnóstico serológico.

En ocasiones, los resultados de la serología son la primera indicación de la naturaleza micótica de la afección del paciente. Han sido y están siendo utilizadas una diversidad de técnicas para la detección de anticuerpos específicos contra PB y HC en muestras de pacientes. Entre ellas podemos mencionar: pruebas de fijación de complemento, inmunodifusión doble, contrainmunolectroforesis, inmunofluorescencia, y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA e inmunoblotting).

Los valores de sensibilidad de los métodos desarrollados puede variar desde un 50 hasta un 100%, y en cada caso las fluctuaciones en dichos valores pueden deberse a la preparación antigénica utilizada, la condición clínica del paciente, y el tiempo transcurrido desde el momento de la infección.

La especificidad también depende del tipo de ensayo. Suele observarse reactividad cruzada entre paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, lobomicosis, y otras micosis no relacionadas. El grado de reactividad cruzada depende del tipo de antígeno utilizado, el tipo de ensayo y la población analizada (Mendes-Giannini, 1994).

En casos controversiales puede ser necesaria la realización de al menos dos pruebas serológicas diferentes, como ha sido recomendado en ciertos casos de PCM (Martins, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la prueba cutánea se utiliza básicamente con fines epidemiológicos (es un indicador de infección previa o presente), pero carece de utilidad diagnóstica. En caso de enfermedad diseminada, puede adquirir valor pronóstico, dado que la positividad de la prueba indica una evolución favorable del paciente (Negroni, 1974).

4.2.1. Ensayos de detección de anticuerpos.

En ambas micosis, pueden detectarse anticuerpos específicos en suero de pacientes en la primeras semanas luego de la infección y su título puede mantenerse durante largos períodos.

Fijación de complemento (FC):

El primer reporte del uso de esta prueba en el estudio de la PCM se remonta al año 1916. Se utilizaba un extracto salino de PB, y se alcanzaba una sensibilidad del 80% (Moses, 1916). Desde entonces, varias publicaciones han informado la utilización de la prueba de FC para la evaluación serológica de los pacientes con PCM. Según el ensayo desarrollado, los valores de sensibilidad varían desde un 50% hasta un 100% (Fava Netto, 1976).

En el caso de la HP, el uso de esta prueba también ha sido ampliamente difundido. Los valores de sensibilidad alcanzados varían entre un 50 a un 96% (Newberry, 1967; Wheat, 1982) dependiendo fundamentalmente de la forma clínica que presente el paciente; la menor sensibilidad se observa en casos de HP pulmonar crónica y HP diseminada crónica.

Las desventajas de este tipo de ensayo radican en la complejidad de la técnica, el tiempo que consume y su baja especificidad. Se han informado altos porcentajes de reactividad cruzada entre pacientes con HP y PCM (de un 10 a 35%), y también con pacientes con otras micosis. (Negroni, 1976a; Terry, 1978; Del Negro, 1991).

El principal valor de las pruebas de FC radica en su utilidad como herramienta para el seguimiento del curso de la enfermedad, ya que en la mayoría de los casos, los títulos de anticuerpos fijadores de complemento disminuyen durante la remisión.

Inmunodifusión:

Las técnicas de inmunodifusión doble (ID) en agar son regularmente utilizadas en serodiagnóstico de ambas micosis. Algunos laboratorios también utilizan la técnica de contrainmunolectroforesis.

Actualmente, la ID es uno de los ensayos que se utiliza de rutina en el diagnóstico de PCM. En general, la sensibilidad del mismo varía entre 65 y 100% (Restrepo, 1966; Cano, 1987), y se han informado valores de especificidad de hasta un 99%, aunque es posible observar reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras micosis profundas (especialmente HP). En 1992, un grupo internacional de investigadores estableció la estandarización de un método de ID (84,3% de sensibilidad y 98,9% de especificidad) con el fin de proveer a los laboratorios de las áreas endémicas un método simple para el diagnóstico de PCM (Restrepo, 1992).

El número de bandas de precipitación observadas depende del tipo de antígeno y de las condiciones del ensayo. Con la utilización de una preparación antigénica consistente en una mezcla de sobrenadante filtrado de cultivo de la fase miceliar y antígeno somático de PB, se han observado hasta un máximo de 12 bandas (Yarzabal, 1971). Restrepo y Moncada obtuvieron 3 bandas de precipitación utilizando un sobrenadante filtrado de cultivo de fase levaduriforme (Restrepo, 1974), una de las cuales (banda 1) fue revelada en el 96% de los sueros de pacientes analizados. La misma corresponde al antígeno E2 descrito por Yarzabal y col. (Yarzabal, 1977), que posteriormente fue identificado como una glicoproteína de 43 kDa (gp-43) por Puccia y col. (Puccia, 1986).

Heiner, quien fue el primero en describir un ensayo de inmunodifusión para el diagnóstico de HP, observó la aparición de dos bandas de precipitación. Dichas bandas, específicas de HC, fueron denominadas antígeno H y antígeno M (Heiner, 1958). La banda M se revela en aproximadamente el 75% de los pacientes con HP, tanto en la forma activa de la enfermedad como en casos de infección asintomática (Bauman, 1975). Por el contrario, la observación de la banda H (sola o en combinación con la banda M) es una fuerte evidencia de HP, pero solo ocurre en un 27% de los pacientes (Bauman, 1975; Wheat, 1982).

Generalmente, en pacientes que responden favorablemente al tratamiento, se observa una reducción en la intensidad o en el número de bandas de precipitación, lo cual confiere a la ID un cierto valor pronóstico en ambas micosis.

Aglutinación de partículas de látex:

Si bien es una técnica muy sensible (permite detectar anticuerpos específicos durante las primeras semanas de producida la infección), no ha sido muy difundida para el diagnóstico de PCM ni de HP. Existen trabajos donde se ha observado un alto grado de falsos positivos por reactividad cruzada entre ambas micosis (Restrepo, 1978) y con entidades no micóticas como tuberculosis y artritis reumatoidea (Bennett, 1966).

Inmunofluorescencia:

La técnica de inmunofluorescencia indirecta también ha sido utilizada en el diagnóstico de PCM y HP, así como en el estudio de relaciones antigénicas entre hongos. Si bien se trata de una técnica de alta sensibilidad (se han informado valores mayores al 90%), los valores de especificidad para PCM obtenidos hasta el momento son inferiores a los de las pruebas de FC e ID (Restrepo, 1972). Se han desarrollado ensayos de este tipo para la cuantificación de isotipos de anticuerpos específicos en suero de pacientes con PCM (Barbosa, 1981), en los que se han observado reacciones cruzadas particularmente con pacientes con HP.

Por otra parte, se han empleado ensayos de inmunofluorescencia directa para la detección de PB y HC en tejidos de pacientes (Kaplan, 1972; Hotchi, 1972).

Radioinmunoensayo (RIA):

El uso de esta técnica para la detección de anticuerpos específicos en ambas micosis no ha alcanzado amplia difusión, debido principalmente a la existencia de técnicas alternativas de similar sensibilidad y especificidad que no requieren de altos costos ni medidas de seguridad especiales para su implementación. Sin embargo, se la ha utilizado para la detección de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgM en pacientes con HP (Wheat, 1983).

Enzimoimmunoensayos:

Debido a su sencillez y gran sensibilidad, los métodos inmunoenzimáticos ofrecen ventajas significativas. Han sido desarrollados numerosos ensayos de este tipo, tanto para el diagnóstico de PCM como de HP. Fundamentalmente se han difundido ensayos de ELISA (en diferentes formatos) e inmunoblotting (IB), con la utilización de diferentes antígenos.

Los valores de sensibilidad de los diferentes métodos dependen del antígeno utilizado, del formato del ensayo, de la naturaleza de la muestra analizada y de la forma clínica que presente el paciente, habiéndose informado valores que varían entre un 64 (Zimmerman, 1990) y un 100% (Sekhon, 1994) para ensayos de ELISA, y de un 80 a un 100% para ensayos de IB (Martins, 1997; Do Valle, 2001).

En cuanto a la especificidad, se observan fluctuaciones más amplias (desde un 55 hasta un 100%) (Camargo, 1991; Zancopé-Oliveira, 1994; Ortiz, 1998) y las diferencias se deben básicamente a las características de la preparación antigénica empleada (mezclas complejas, antígenos purificados o recombinantes) y a las características de los anticuerpos utilizados en ensayos de ELISA de captura (antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales). En ocasiones, la reactividad cruzada puede deberse a determinantes no proteicos (por ejemplo: carbohidratos) que están presentes en muchos componentes de los extractos antigénicos crudos de diversas especies fúngicas.

Los reportes existentes sobre el uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) en ensayos de detección de anticuerpos para el diagnóstico de PCM y HP son relativamente escasos (Camargo, 1994;). Su empleo se ha centrado fundamentalmente en el desarrollo de métodos de búsqueda de antígenos específicos, como se discutirá posteriormente.

4.2.2. Antígenos de utilidad en el diagnóstico.

A lo largo del tiempo y con el desarrollo de los diferentes métodos de diagnóstico serológico, han sido descritas numerosas técnicas para el uso y preparación de los antígenos.

En los últimos años se han identificado, purificado, caracterizado y clonado diferentes antígenos de PB y HC, algunos de los cuales han sido utilizados en el desarrollo de métodos de diagnóstico como se discutirá más adelante. El gran polimorfismo genético que se observa entre cepas aisladas de diferentes zonas geográficas (Calcagno, 1998; Niño-Vega, 2000⁴; Kersulyte, 1992; Kasuga, 1999) puede verse acompañado de diferencias fenotípicas y antigénicas que podrían conducir a problemas de baja sensibilidad al utilizar tanto antígenos purificados como recombinantes en los ensayos de diagnóstico para ambas micosis.

4.2.21. Paracoccidioidomycosis.

En general, las preparaciones antigénicas empleadas en la detección de anticuerpos anti-PB han sido mezclas poco definidas y variables dependiendo del método por el cual ha sido obtenida, de la cepa empleada y de la fase morfológica del cultivo. Para la obtención de antígenos, se han utilizado diferentes cepas (por ejemplo: Linder 2511; Pb113; B339; Pb265; Pb18; PbSM; Pb192).

Los antígenos de PB utilizados en ensayos de prueba cutánea se conocen como paracoccidioidinas. Se han empleado diferentes preparaciones, obtenidas por distintos métodos, que contienen antígenos metabólicos (sobrenadantes filtrados de cultivo) o antígenos celulares o somáticos de forma miceliar o levaduriforme. La preparación que más ha sido utilizada en este tipo de prueba es un sobrenadante de cultivo de fase levaduriforme rico en polisacáridos, obtenido de acuerdo al método de Fava Netto y Raphael (Fava Netto, 1955; 1961). Esta preparación contiene una amplia variedad de componentes proteicos y glicoproteicos en un rango de pesos moleculares de 19 a 150 kDa, reconocidos por sueros de pacientes con PCM en ensayos de FC e IB (Mendes-Giannini, 1995).

Las preparaciones de antígenos metabólicos han sido ampliamente utilizadas en el desarrollo de diferentes métodos serológicos. Los resultados obtenidos dependen fundamentalmente de las características del antígeno y del tipo de ensayo. Se han informado resultados falsos positivos en pacientes con HP, lobomycosis, candidiasis, criptococosis y esporotricosis (Mendes-Giannini, 1984). Los ensayos realizados por Do Valle y col. han arrojado valores de sensibilidad de entre un 32,5% y un 90% en ID, y de hasta el 100% en IB (Do Valle, 2001). Antígenos de este tipo, que contienen fracciones proteicas de 10 a 82 kDa, han sido analizados por IB frente a sueros de ratones (susceptibles y resistentes) infectados con PB. Se han observado diferencias en la naturaleza de los componentes reconocidos en cada caso (Vaz, 1998).

También se han obtenido preparaciones que contienen antígenos de la superficie de la levadura ("cell-free antigens" o CFA), donde se revelan componentes de 10 a 110 kDa por SDS-PAGE, y con los cuales se han informado valores de sensibilidad y especificidad del 100% en pruebas de ID (Camargo, 1991). Sin embargo, posteriormente se observó hasta un 75% de falsos positivos en pacientes con lobomycosis por ELISA y se detectaron varios de los componentes de reactividad cruzada por IB (Camargo, 1998). El análisis de la reactividad frente a sueros de pacientes con diferentes formas clínicas de PCM ha revelado que la mayor

sensibilidad se obtiene con la determinación de anticuerpos de tipo IgG, que existen diferencias en el perfil de reconocimiento entre las formas aguda y crónica, y que están presentes antígenos predominantes, particularmente fracciones de 43 y 70 kDa (Blotta, 1993).

Las preparaciones de antígenos celulares o somáticos también han sido y son actualmente utilizadas. En ensayos de prueba cutánea Negroni y col. han obtenido resultados positivos en el 78,5% de los pacientes con PCM, pero también en el 13% de los individuos con HP estudiados (Negroni, 1976b). Casotto identificó y caracterizó los antígenos citoplasmáticos de una cepa de PB por SDS-PAGE y por IB frente a sueros de pacientes con PCM, HP, aspergilosis, candidiasis e individuos sanos. Observó reactividad frente a fracciones de diferente peso molecular (de 16 a 220 kDa), entre las cuales fue posible identificar componentes reconocidos de manera específica por los pacientes con PCM (antígenos de 21; 45; 48; 57 y 58 kDa) y componentes de reactividad cruzada con otras micosis (antígenos de 27,5; 37,5; 76; 82; 94; 114 y 220 kDa) (Casotto, 1990). Al analizar diferentes cepas de PB, se observó una gran variabilidad en la expresión de antígenos específicos y no se encontró correlación entre el número o intensidad de las bandas reconocidas y las formas clínicas de PCM (Casotto, 1991).

Recientemente, Da Silva y col. compararon la utilidad de diferentes preparaciones antigénicas (antígeno metabólico, antígenos somáticos y antígenos libres de células) en ensayos de ID. Se obtuvieron porcentajes de reactividad del 81,8, 95,5 y 78,9% respectivamente frente a sueros de pacientes con PCM (Da Silva, 2002).

En base a los resultados obtenidos con mezclas antigénicas complejas, se comenzaron a estudiar y caracterizar diferentes componentes y su potencial utilidad en el diagnóstico de PCM, entre los que se encuentran:

Glucoproteína de 43 kDa (gp43):

Puccia y col. describieron el aislamiento, a partir de sobrenadantes filtrados de cultivo, de un antígeno inmunodominante reconocido por el 100% de los pacientes con PCM en ensayos de ID (Puccia, 1986). Este antígeno es una glucoproteína de 43 kDa (gp43) y se corresponde con la banda E2 descrita por Yarzabal (ver sección 4.2.1). Dicha proteína también ha sido hallada en diferentes preparaciones antigénicas (extracto libre de células, antígeno polisacárido, extractos celulares o somáticos) (Camargo, 1988, 1991; Rodrigues, 1994).

Existe un reporte de Ferreira-da-Cruz y col. donde se describe la presencia, en un extracto citoplasmático de levaduras de PB, de un componente antigénico predominante de un peso molecular aproximado de 45 kDa, que es reconocido en IB por el 91% de los sueros de los pacientes con PCM (Ferreira-da-Cruz, 1992). Dada la similitud entre las propiedades antigénicas, podría tratarse del mismo polipéptido, si se considera que la pequeña diferencia en el peso molecular puede atribuirse a diferencias en las condiciones de la electroforesis.

La gp43 contiene epitopes de naturaleza peptídica que reaccionan con anticuerpos humanos (Puccia, 1991) y que son capaces de inducir reacciones de hipersensibilidad retardada (Rodrigues, 1994; Marques, 1996; Saraiva, 1996). También se demostró que ésta proteína induce proliferación de LT CD4 en ratones inmunizados con el antígeno y de PBMC de individuos infectados con PB (Travassos, 1995).

Se han detectado anticuerpos de isotipos IgG, IgM, IgA (Giannini, 1990; Bueno, 1997) e IgE (Biselli, 2001; Mamoni, 2001) específicos contra gp43 en sueros de pacientes con PCM, cuyos títulos disminuyen si el individuo responde adecuadamente a la terapia antifúngica. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra este antígeno en sueros de ratones control no infectados con PB (Vaz, 1992), así como en hasta un 21% de las muestras de suero correspondientes a individuos sanos que habitan en área endémicas (Botteon, 2002).

El gen que codifica para este polipéptido fue clonado y caracterizado en 1996. La secuencia deducida de aminoácidos presenta hasta un 56-58% de homología con las α -1,3- β -glucanasas de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Un fragmento del extremo C-terminal fue expresado en *E. coli*, y el producto de expresión mostró reactividad frente a un antisuero policlonal y a sueros de pacientes con PCM (Cisalpino, 1996). Recientemente se ha expresado el gen completo de gp43 junto con el gen de la glutatona-S-transferasa en *E. coli*, y la proteína recombinante de fusión fue reconocida por inmunoblotting por la totalidad de los sueros de pacientes con PCM crónica y aguda estudiados (Diniz, 2002).

Por otro lado, se ha descrito que la expresión de este antígeno varía según la cepa (Canteros, 2000), y la fase morfológica del cultivo (Mattar-Filho, 1997). Además existen reportes de la expresión de diferentes isoformas en distintas cepas (Campos, 1998), algunas de las cuales no son reconocidas por algunos sueros de pacientes con PCM (Souza, 1997). Recientemente se ha descrito que el gen de gp43 es polimórfico (Morais, 2000), hecho que podría explicar, en parte, la existencia de las diferentes isoformas.

Teniendo en cuenta estas características, la gp43 ha sido utilizada como antígeno para el desarrollo de métodos de diagnóstico como ELISA indirecto y dot-blot, en los cuales puede alcanzarse hasta un 100% de sensibilidad, pero donde también se han descrito altos porcentajes de reactividad cruzada frente a sueros de pacientes con HP y lobomycosis (Puccia, 1991; Tabora, 1994). La especificidad de estos ensayos mejora cuando se utiliza el antígeno previamente tratado con periodato de sodio.

También se ha desarrollado un ELISA de captura con un AcMo para la detección de anticuerpos específicos en suero. El ensayo (realizado sobre 30 pacientes con PCM) mostró ser altamente sensible (100%) y específico (96,7%), teniendo en cuenta que en el estudio se incluyeron 37 sueros de pacientes con HP, lobomycosis, candidiasis y aspergilosis (Camargo, 1994). Esta proteína ha sido detectada por IB (Mendes-Giannini, 1989) y por ELISA de inhibición (libre y formando parte de complejos inmunes circulantes) (Miura, 2001) en suero de pacientes con PCM aguda y crónica.

Se ha sugerido que esta glucoproteína juega un papel en la patogénesis de la enfermedad, ya que es capaz de unirse a laminina (Vicentini, 1994; Gesztes, 1996), tiene actividad proteolítica (Puccia, 1998), y puede ejercer un efecto de regulación negativo tanto sobre las células NK (Peraçoli, 1995) como sobre los macrófagos (Flavia Popi, 2002) en modelos animales de PCM. Adicionalmente, existen evidencias de modulación idiotípica en la respuesta inmune a gp43, así como de una respuesta de LT antígeno-específica disminuida en pacientes con PCM (Benard, 1997; Souza, 1998, 2000).

Proteína de 27 kDa (p27):

En un trabajo publicado por Casotto y col. en 1991, se caracterizaron diversos antígenos de PB, entre los que se encontraba un componente con un peso molecular estimado de 23 kDa, que era reconocido por 81% de los pacientes con PCM (Casotto, 1991). A partir de la construcción de una biblioteca de ADN complementario y del análisis de los clones obtenidos frente a un pool de sueros de pacientes, McEwen y col. clonaron, secuenciaron y expresaron en un sistema bacteriano, el gen que codifica para una proteína antigénica de 27 kDa (259 aminoácidos) (McEwen, 1996). La reactividad de la proteína recombinante (p27r) frente a sueros de pacientes con PCM por IB fue del 91%, mientras que no se observó reacción cruzada con sueros de individuos con otras micosis (HP, esporotricosis, aspergilosis, criptococosis) ni tuberculosis (Ortiz, 1996). Sin embargo, en ensayos de ELISA indirecto,

tanto la sensibilidad como la especificidad disminuyen abruptamente (73,4% y 58,7%, respectivamente), registrándose el mayor porcentaje de reactividad cruzada frente a sueros de pacientes con aspergilosis (73,3%) e HP (40%) (Ortiz, 1998). Actualmente, se están llevando a cabo modificaciones en el proceso de obtención y purificación de la p27r tendientes a mejorar los parámetros del ensayo de ELISA.

Proteína de choque térmico 60 (hsp60):

Las proteínas de choque térmico de esta familia (hsp60) participan en diversos procesos celulares y han demostrado ser antígenos importantes en diferentes parásitos y hongos. Recientemente se ha publicado la clonación y caracterización del gen de la hsp60 de PB. Este gen presenta alta homología (mayor al 89%) con hsp60 de *Coccidioides immitis* y de HC, y codifica para una proteína de 62 kDa de localización mitocondrial. A su vez, la proteína fue identificada y aislada por electroforesis bidimensional a partir de un extracto citoplasmático de PB, donde se observó la presencia de dos isoformas de puntos isoelectrónicos 5,6 y 5,8. Se observó además que, la expresión de ésta última isoforma (la más abundante) se incrementó durante la transición de fase micelial a levadura (Salem-Izacc, 2001). Al analizar la reactividad en ensayos de IB, se observó que la hsp60 purificada fue reconocida por un pool de sueros de pacientes con PCM; por otro lado, con la proteína recombinante se obtuvieron resultados positivos en 8 de 10 sueros de individuos con PCM y no detectó reactividad cruzada frente a pacientes con HP, criptococosis y candidiasis (Salem-Izacc, 2001). En un estudio posterior con mayor número de pacientes analizados, se obtuvo un porcentaje de reactividad del 97,3% con sueros de pacientes con PCM, aunque también se detectaron algunos casos de reactividad cruzada con HP (4 de 26) y sueros de individuos sanos (3 de 42) (Cunha, 2002).

Proteína de 87-kDa:

Recientemente, Gómez y col. describieron el uso de un ensayo de ELISA de inhibición con un AcMo que reconoce un componente de 87-kDa, para la detección de antígeno en suero de pacientes con PCM (Gómez, 1998), que se discutirá en la sección 4.2.3. La secuencia del extremo N-terminal presenta alta homología con proteínas de choque térmico de diferentes organismos, tanto que, un AcMo dirigido contra la hsp80 de HC presentó reactividad en IB frente a esta proteína (Díez, 2002). Mediante ensayos de ELISA e inmunofluorescencia con un AcMo específico se demostró que durante la transformación de

micelio a levadura se induce un aumento de su expresión. Adicionalmente, la expresión de éste antígeno en tejidos humanos infectados con PB fue detectada por inmunohistoquímica, y solo se observó reactividad cruzada con muestras procedentes de pacientes con aspergilosis (Diez, 2002).

Actualmente se está desarrollando un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra esta proteína en sueros de pacientes.

Existen reportes de otros componentes antigénicos, entre los que se encuentran:

- una glucoproteína de 22-25 kDa detectada en muestras de biopsias infectadas con PB utilizando AcMO específicos (Figueroa, 1994).

- una glucoproteína exocelular de 58 kDa cuya secuencia no presenta homología significativa con proteínas conocidas y que fue reconocida por 21 de 26 sueros de pacientes con PCM en ensayos de IB (Figueroa, 1995).

Por otro lado, recientemente, da Fonseca y col. identificaron y caracterizaron por electroforesis bidimensional, seis antígenos celulares preferencialmente expresados en la fase levaduriforme del hongo, que presentan alta homología de secuencia con algunas enzimas (catalasa, aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y triosafosfato isomerasa) de diferentes orígenes (da Fonseca, 2001).

4.2.2.2 Histoplasmosis.

De la misma forma que en PCM, una de las preparaciones antigénicas crudas que más ha sido utilizada, es un filtrado de sobrenadante de cultivo (antígeno metabólico) de HC en fase miceliar, conocido como histoplasmina. Ha sido muy empleado en prueba cutánea, donde los valores de sensibilidad varían entre un 3 y un 94% (Fava, 1996; Muotoc-Okafor, 2000), dependiendo de las características de la población analizada. En pruebas serológicas, se han informado valores de sensibilidad que varían entre un 99 y un 100%, pero se ha registrado un alto porcentaje de reactividad cruzada en pacientes con PCM (Negróni, 1976a).

También se ha ensayado un antígeno polisacárido de fase levaduriforme, tanto en intradermorreacción (Fava Netto, 1961; Fava, 1997), como en pruebas de ID y CIE (Taylor, 1980), obteniéndose valores de sensibilidad que oscilan entre 48 y un 100 % según el tipo de ensayo utilizado.

Negróni y col. obtuvieron y caracterizaron una preparación antigénica obtenida a partir de sobrenadantes de cultivo de fase levaduriforme, la cual reveló dos componentes antigénicos principales de 66 y 97 kDa. Dicha preparación mostró mayor sensibilidad que la histoplasmina cuando fue utilizada en ensayos de FC, ID y CIE con sueros de pacientes con HP (100% de sensibilidad en pacientes HIV negativos y 35% en pacientes HIV positivos) (Negróni, 1998).

Dado que en las pruebas de ID, utilizadas de rutina, las bandas de precipitación conocidas como banda H y banda M aparecen como los antígenos de mayor importancia, gran parte de los trabajos se han dirigido hacia la purificación y caracterización de dichas fracciones antigénicas.

Banda H:

Corresponde a una glucoproteína que contiene entre un 10 y un 30% de carbohidratos. Su peso molecular, determinado por electroforesis, se encuentra entre 108 y 120 kDa, mientras que el valor calculado mediante cromatografía de exclusión molecular es de 144 kDa; su punto isoeléctrico es de 4,5 (Green, 1985).

Se encuentra tanto en la histoplasmina (sobrenadante filtrado de cultivo de fase miceliar), como en la fase levaduriforme. Como se mencionó anteriormente, se ha observado que este antígeno es reconocido específicamente por sueros de individuos con HP en ensayos de ID. Además, en un estudio realizado durante un brote de la enfermedad, se encontró que la forma glucosilada es reconocida en IB por sueros de pacientes con HP pulmonar aguda (72,5%) y por individuos asintomáticos (65%), mientras que el ensayo mejora notablemente (sensibilidad=95%; especificidad=100%) cuando se realiza un tratamiento previo del antígeno con periodato de sodio (Pizzini, 1999).

El gen que codifica para esta proteína fue clonado, secuenciado y expresado en *Escherichia coli*, y se estudiaron las propiedades inmunológicas de la proteína recombinante. Se observó que, si bien el antígeno es capaz de inducir una respuesta proliferativa de LT de ratones BALB/c infectados con HC o inmunizados con el antígeno, no genera una respuesta *in vivo* capaz de proteger contra la infección (Decpe, 1995). Posteriormente se encontró que tanto la proteína aislada del medio de cultivo como la proteína recombinante expresada en un sistema nativo (que facilite una adecuada glucosilación) poseen actividad de β -glucosidasa y

que los niveles de expresión de la misma varían entre grupos de cepas de HC con diferentes perfiles de RFLP (Fisher, 1999; 2000).

Banda M:

La proteína M se libera durante el crecimiento de la fase micelial y debido a su naturaleza glucoproteica, su peso molecular varía de 70 a 94 kDa, aunque también puede agregarse y formar un dímero de 175 kDa (Reiss, 1986; Hamilton, 1990a; Zancopé-Oliveira, 1993). Posee un punto isoeléctrico de 4,7 (Green, 1985).

Se ha demostrado su capacidad de inducir proliferación de clones de LT murinos específicos contra histoplasmina (Harris, 1988).

Históricamente ha presentado inconvenientes para su aislamiento por métodos convencionales, pero finalmente pudo purificarse por cromatografía de intercambio iónico a partir de histoplasmina (Zancopé-Oliveira, 1993).

Ensayos de IB con la forma glucosilada han demostrado un 100% de sensibilidad con sueros de pacientes con HP, pero los porcentajes de reactividad frente a sueros de individuos con otras micosis son altos (PCM=81%, blastomicosis=25%, coccidioidomicosis=33%, aspergilosis=75%). Cuando la proteína es previamente tratada con periodato de sodio, la especificidad del ensayo alcanza el 91,2% (Zancopé-Oliveira, 1994), lo cual sugiere que la reactividad cruzada puede atribuirse en gran parte a la presencia de epitopes glucosídicos.

Finalmente, fue posible obtener la secuencia de aminoácidos de este antígeno, información que permitió el aislamiento, clonación y secuenciación del gen completo. La secuencia de aminoácidos posee hasta un 61% de homología con catalasas de otros hongos, lo cual contribuye al soporte de la hipótesis, sugerida previamente en base a ensayos con AcMo (Hamilton, 1990b), de que la proteína M pertenece a esta familia de enzimas fúngicas (Zancopé-Oliveira, 1999). La proteína recombinante expresada en *E. coli* es reconocida en ensayos de IB por AcMo específicos contra la proteína nativa, por un antisuero anti-M y por el suero de un paciente con HP (Zancopé-Oliveira, 1999).

HSP-82:

Como se mencionó oportunamente (secciones 3.2.3 y 3.5.2), ésta glucoproteína pertenece al grupo de las proteínas de choque térmico, su expresión es inducible, posee

homología con la hsp70 y es capaz de inducir inmunidad celular y protección en animales infectados con HC.

Se conoce la secuencia del gen que la codifica (Minchiotti, 1992), su punto isoeléctrico es de 4,7, y fue revelada por métodos inmunoquímicos tanto en preparaciones antigénicas citoplasmáticas como en sobrenadantes de cultivo (Jeavons, 1994). Estudios realizados con AcMo demuestran la presencia de epitopes glucosídicos compartidos con otros hongos como *P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *B. dermatitides*, y *S. schenkeii* (Jeavons, 1994).

Aún no se han publicado estudios de reactividad en ensayos inmunoquímicos frente a sueros de pacientes con HP.

Adicionalmente, Chandrashekar y col. clonaron, expresaron y caracterizaron una proteína de HC que es reconocida específicamente por sueros de pacientes con HP en ensayos de IB. Los anticuerpos producidos contra esta proteína recombinante reconocen un componente de 60 kDa en un extracto celular de HC en fase levaduriforme (Chandrashekar, 1997). No se han publicado estudios posteriores sobre esta proteína.

4.2.3. Ensayos de detección de antígenos.

El diagnóstico serológico basado en la detección de anticuerpos específicos puede presentar inconvenientes cuando se trata de pacientes inmunodeprimidos, aspecto especialmente relevante en el caso de la HP en pacientes con SIDA. En los últimos años se han desarrollado métodos de detección de antígenos fúngicos en muestras biológicas, particularmente en suero y orina. La reciente incorporación de los AcMo dirigidos contra antígenos específicos en el desarrollo de métodos de detección de antígenos, ha permitido mejorar la especificidad de dichos ensayos.

4.2.3.1. Paracoccidioidomicosis.

Existen reportes de la utilización de diferentes métodos de este tipo para el diagnóstico de PCM. Un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) con un antisuero policlonal desarrollado por Ferreira-da-Cruz y col., mostró alta sensibilidad en la detección de antígenos de PB en una matriz de suero humano normal (0,12 µg/ml), mientras que no se observó reactividad cruzada con antígenos de HC, *A. fumigatus* y *C. albicans* (Ferreira-da-Cruz, 1991).

En 1992, Freitas-da-Silva y Roque-Barreira publicaron el desarrollo de un ensayo de ELISA competitivo utilizando un antisuero de conejo anti-PB para detectar antigenemia en suero de pacientes con PCM. El límite de detección alcanzado fue de 6 ng/ml de antígeno y se obtuvieron resultados positivos en el 31% de los pacientes con PCM, pero también en pacientes con HP, aspergilosis y criptococosis (Freitas-da-Silva, 1992). El ensayo previamente descrito fue posteriormente modificado para analizar la presencia de antígenos circulantes en muestras de orina, obteniéndose resultados positivos en un 75% de los pacientes estudiados (Salina, 1998).

Mediante ensayos de IB fue detectada la presencia de la gp43 y de un componente de 70 kDa en orina de pacientes con PCM (Salina, 1998), aún durante el período de tratamiento antimicótico. Estudios previos en suero, habían demostrado la presencia de gp43 por IB, así como su ausencia en circulación luego de 2 años de tratamiento (Mendes Giannini, 1989). Recientemente se ha desarrollado un ELISA con un AcMo, para la detección de gp43 en líquidos biológicos. La sensibilidad del ensayo es del 94,7% para muestras de suero, y alcanza el 100% cuando el análisis se realiza en líquido cefalorraquídeo (pacientes con neuroparacoccidiodomicosis) y lavado broncoalveolar (Silva, 2002a, b).

También se ha utilizado un AcMo capaz de detectar un componente de 87 kDa en suero de pacientes con PCM mediante un ensayo de ELISA de inhibición. El límite de detección del método es de 5,8 ng/ml de antígeno, y la sensibilidad alcanza el 80,4% (este parámetro varía según la forma clínica que presente el paciente). Sin embargo también se observaron resultados positivos en pacientes con HP (40%), aspergilosis (100%), criptococosis (10%), esporotricosis (11%), tuberculosis (55,5%), y en individuos sanos que habitan en zonas endémicas (18,4%); aunque en todos los casos la cantidad promedio detectada es inferior a la de los casos de PCM (Gómez, 1997a). Un trabajo posterior sugiere que la detección de este componente de 87 kDa puede ser una herramienta adicional en la evaluación de la terapia antifúngica de pacientes con PCM (Gómez, 1998).

4.2.3.2. Histoplasmosis.

En este campo, ha sido muy significativo el aporte de L. Joseph Wheat y su grupo de trabajo, quienes han desarrollado métodos para la detección del antígeno polisacárido de HC. Dicho antígeno ha sido detectado por RIA (utilizando un antisuero policlonal) en suero, orina (Wheat, 1986; Fojtasek, 1994), líquido cefalorraquídeo (Wheat, 1989a) y lavado

broncoalveolar (Wheat, 1992) de pacientes con HP, particularmente en aquellos con formas diseminadas de la enfermedad. El ensayo de detección del antígeno es más sensible en orina que en suero, obteniéndose valores de sensibilidad que varían desde un 21% hasta un 92% según la forma clínica que presente el paciente (Williams, 1994), aunque se observaron falsos positivos en pacientes con blastomycosis (Zimmerman, 1989), y con meningitis por *Coccidioides immitis* (Wheat, 1992). El antígeno también ha sido detectado en hasta un 96,7% de los casos de HP en individuos con SIDA (Wheat, 1989b). Este mismo grupo de investigadores desarrolló un ensayo de ELISA de captura con un antisuero de conejo para la detección del antígeno en orina cuya sensibilidad resultó, inicialmente, menor (89,5%) que la del RIA (Zimmerman, 1989). Posteriormente, con la introducción de modificaciones, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad comparables entre ambos métodos (Durkin, 1997); sin embargo también se observaron altos porcentajes de reactividad cruzada en pacientes con PCM (88,9%), blastomycosis (63,2%) e infección por *Penicillium marneffei* (94,4%) (Wheat, 1997). Dicho ensayo mostró escasa utilidad en la evaluación del tratamiento antifúngico en pacientes con SIDA (Wheat, 2002).

Por otro lado, Gómez y col. desarrollaron un método de ELISA de inhibición para detectar antigenemia y antigenuria, utilizando un AcMo que reconoce un componente de 69-70 kDa en un extracto citoplasmático de HC. El ensayo puede detectar hasta 1,09 µg/ml de antígeno, y es más sensible en suero (71,4%) que en orina (43,8%). La especificidad es del 85,4%, teniendo en cuenta que se analizaron sueros de individuos sanos de áreas endémicas y pacientes con PCM, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis y tuberculosis (Gómez, 1997b). Este ensayo demostró ser útil en el seguimiento de pacientes HIV-negativos con formas aguda y diseminada de HP durante el tratamiento, mientras que en el caso de los pacientes con SIDA, no se observó una disminución en la antigenemia durante dicho período (Gómez, 1999).

Si bien existe un reporte de Wheat y col. que siembra ciertas dudas en torno a la utilidad del enzimoimmunoensayo desarrollado por Gómez y col. (Wheat, LJ; Letter; 1999), es necesario tener en cuenta las grandes diferencias existentes entre ambos métodos, y que cada uno de ellos posee tanto ventajas como desventajas frente al otro. Existe un trabajo en el cual Garringer y col. muestran que tanto la especificidad como la sensibilidad de un ensayo de ELISA de inhibición son inferiores a las del ELISA de captura previamente desarrollado, pero

en este caso el ensayo de inhibición no es comparable con el publicado por Gómez y col. (Garringer, 2000).

4.3. Métodos moleculares aplicados al diagnóstico.

El desarrollo de diversos métodos de tipificación molecular, entre los que podemos mencionar: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y microsátélites, han contribuido al conocimiento de importantes aspectos biológicos de los microorganismos como los modos de reproducción, las características genéticas poblacionales y la ecología. El conocimiento adquirido a partir de estos estudios ha sido utilizado para el desarrollo de métodos innovadores de diagnóstico, así como de nuevas estrategias terapéuticas y producción de vacunas.

Hasta el presente, existen publicaciones de varias secuencias del ADN de PB y HC con potencial uso diagnóstico.

En el caso de PB, se han clonado y amplificado por PCR fragmentos de ADN genómico (Goldani, 1995), del extremo 5' de la subunidad ribosomal 28S (Sandhu, 1997), de la subunidad ribosomal 5.8S (Imai, 2000; Motoyama, 2000) y de la gp43 (Bialek, 2000; Gomes, 2000; Nakagawa Itano, 2002; Semighini, 2002), los cuales han sido utilizados en el desarrollo de métodos de hibridización *in situ* (De Brito, 1999) y de detección de ADN fúngico en suero (Goldani, 1998), tejidos (Bialek, 2000) y esputo (Gomes, 2000) de huéspedes infectados.

De manera similar, para HP, Bialek y col. desarrollaron y compararon dos ensayos de PCR a partir de material de biopsias, amplificando un fragmento correspondiente al gen de una proteína de 100 kDa y genes de la subunidad ribosomal 18S respectivamente. El primer ensayo resultó ser específico para HC, mientras que para el segundo caso se necesitó de una etapa posterior de secuenciación para confirmar los resultados positivos (Bialek, 2002). Los mismos autores habían utilizado este último ensayo en el seguimiento de modelos murinos de HP (Bialek, 2001) y habían observado amplificación de secuencias de otros hongos como PB (Bialek, 2000). Recientemente, Guedes y col. han desarrollado una PCR basada en la secuencia del antígeno M capaz de identificar específicamente aislados de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Guedes, 2003).

En general, los ensayos desarrollados muestran alta sensibilidad y son muy específicos, pero hasta el momento, no se han llevado a cabo con un número significativo de muestras.



Objetivos

Con el desarrollo del siguiente trabajo nos proponemos:

- ❖ Caracterizar antígenos celulares de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* mediante ensayos inmunoquímicos con antisueros específicos y anticuerpos monoclonales específicos.
- ❖ Caracterizar la reactividad cruzada entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.
- ❖ Caracterizar la reactividad de sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis y otras micosis frente antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- ❖ Desarrollar nuevos métodos inmunoquímicos de detección de anticuerpos específicos y de antígenos circulantes empleando anticuerpos monoclonales y evaluar su utilidad en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis.



*Materiales y
Métodos*

INDICE:

	<u>Página</u>
1.Cepas utilizadas.	50
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	50
1.2. <i>Histoplasma capsulatum</i> .	50
1.3.Condiciones de cultivo.	50
2.Obtención de extractos antigénicos.	50
3.Cuantificación de proteínas.	51
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	51
5.Electroforesis preparativa.	52
6.Obtención de antisueros específicos.	52
6.1.Plan de inmunización.	52
6.2.Titulación de los sueros.	52
7.Sueros de pacientes.	52
8.Electroelución.	53
9.Obtención, caracterización y producción de anticuerpos monoclonales.	53
9.1.Obtención.	53
9.2.Reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.	55
9.3.Determinación de isotipo por ELISA de captura.	55
9.4.Producción.	56
9.5.Purificación.	56
10.Ensayos inmunoquímicos desarrollados.	56
10.1.ELISA indirecto.	56

10.2. Inmunoblotting.	58
10.3. Dot-blot.	58
10.4. ELISA competitivo secuencial.	59
10.5. ELISA de captura con anticuerpos monoclonales.	59
10.6. ELISA de captura para la detección de antígenos en suero de pacientes.	61
11. Oxidación de hidratos de carbono.	61
ANEXO I.	62

1. CEPAS UTILIZADAS.

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*.

Para la obtención de los extractos antigénicos se utilizó la cepa Utero, aislada originalmente del cuello uterino de una paciente con PCM diseminada. Posteriormente, también se obtuvieron extractos a partir de las cepas: Benitez407, Gontchar, Duarte, Heredia y PbV9. Las cepas mencionadas, excepto la PbV9, corresponden a aislamientos realizados en Argentina y pertenecen a la colección del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de Universidad de Buenos Aires; la cepa PbV9 fue aislada en Venezuela y pertenece a la colección del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC).

1.2. *Histoplasma capsulatum*.

Los extractos antigénicos se obtuvieron a partir de un pool de las cepas Almeida, Hámster y Pastrana, pertenecientes a la colección del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de Universidad de Buenos Aires. Las cepas Almeida y Pastrana fueron aisladas de pacientes HIV positivos con HP diseminada, mientras que la cepa Hámster es una cepa derivada de un aislamiento anterior (cepa Varela), el cual se realizó a partir de un paciente con HP crónica.

1.3. Condiciones de cultivo.

Se realizaron cultivos en estufa a 37°C (fase levaduriforme) en medio de cultivo con 5% de carne desgrasada, 2% de glucosa y 3% de caldo tripteína-soya. Cuando el cultivo se llevó cabo en medio sólido, se adicionó agar al 2% a la preparación. Las levaduras se cosecharon a los 7 días de cultivo, y se inactivaron con borato de sodio y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) como inhibidor de proteasas. En ciertas ocasiones se recurrió al cultivo en medio líquido, con el objetivo de recuperar mayor cantidad de levaduras en cada cosecha.

2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIGÉNICOS.

Las levaduras cosechadas e inactivadas se lavaron tres veces con dos volúmenes de solución PBS (Anexo I) con 1mM de PMSF. Luego de cada lavado, se realizó una centrifugación a 2000g durante 5 minutos. Las células lavadas fueron lisadas utilizando una

Prensa X, y posteriormente centrifugadas a 12000g durante 30 minutos a 4°C. Los extractos citosólicos (antígenos celulares o somáticos) así obtenidos, fueron fraccionados y conservados a -20°C hasta su utilización.

Adicionalmente, a partir de los residuos de la centrifugación, se obtuvieron extractos de pared celular y membrana. Para la obtención de los mismos se siguió el protocolo descrito por Gomez y col. (Gomez, 1991a). Brevemente, luego de 3 lavados con PBS, el material particulado se colocó en un buffer de extracción (Tris-HCl 125 mM, pH= 6.9, urea 6M, 2-mercaptoetanol 20 mM, Tween 20 1%) y se mantuvo en ebullición durante 5 minutos. La solubilización en el buffer se continuó a 4°C durante 16 horas. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 11000g durante 20 minutos y se dializó contra PBS hasta el día siguiente.

Los sobrenadantes de cultivo en medio sólido fueron filtrados y posteriormente concentrados mediante un sistema Amicon (BioRad, USA) con membrana de 8000-10000 dalton.

3.CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para la cuantificación de proteínas en los extractos fúngicos se utilizaron el método descrito por Bradford (Bradford, 1976) y el ensayo con ácido bicinonínico (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce). La determinación de proteínas en muestras de otro origen fue realizada por el método de Lowry (Lowry, 1951).

4.ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Los extractos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). Para la preparación de los geles de apilamiento y de separación se utilizaron las cantidades y los reactivos que figuran en la Tabla I del Anexo I.

La composición de las soluciones tampón utilizadas para la preparación de las muestras y para la corrida electroforética, se detalla en el Anexo I.

La electroforesis se llevó a cabo a 25mA/gel durante 20 minutos (para el gel apilador), y a 50mA/gel durante 50 minutos para el gel separador.

Para el revelado de los geles, se utilizó la técnica de tinción con plata, aunque en ocasiones se ha realizado la tinción con Coomassie Blue R250 (Anexo I).

Para la determinación de pesos moleculares se utilizaron los patrones de Pharmacia: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa).

5.ELECTROFORESIS PREPARATIVA.

Se llevó a cabo una electroforesis preparativa en un equipo Mini Prep Cell (Bio Rad, USA) para separar componentes del extracto de PB. La composición del gel (12.5% de acrilamida-bisacrilamida) y de las soluciones utilizadas se detallan en el Anexo I.

Se realizó una corrida previa a la siembra de la muestra durante 16 horas a 100V, y luego de la siembra (aproximadamente 8-10 mg de proteína) se llevó a cabo a la corrida durante 24 horas a un voltaje constante de 200V. Se recolectaron fracciones de 1 ml.

Cada una de las fracciones recolectadas fue analizada por SDS-PAGE y por inmunblotting frente a antiseros anti-PB y anti-HC (ver sección 9.1.2).

6.OBTENCIÓN DE ANTISUEROS ESPECÍFICOS.

6.1.Plan de inmunización.

Se inmunizaron 4 conejos New Zealand, dos con el extracto de PB (cepa Utero) y dos con el extracto de HC. Se realizaron cinco inoculaciones de 200 μ g de antígeno/conejo por vía intramuscular, a intervalos de aproximadamente tres semanas; la primera de ellas con adyuvante de Freund completo (Sigma), y las restantes con adyuvante incompleto (Sigma).

6.2.Titulación de los sueros.

El seguimiento del plan de inmunización se llevó a cabo mediante la titulación de muestras de suero, extraídas de la vena de la oreja luego de cada inoculación, por ELISA indirecto (ver sección 8.1) frente al extracto fúngico utilizado como inmunógeno. Se analizaron diluciones seriadas de cada suero (1/400 a 1/4096000).

7.SUEROS DE PACIENTES.

Para los ensayos desarrollados se utilizaron:

-51 sueros* de pacientes con diagnóstico confirmado de PCM; 44 de ellos correspondientes a pacientes con forma crónica y 7 a pacientes con forma juvenil o aguda. Los sueros fueron

provistos por el Servicio de Micología del Hospital Muñiz (18), la Cátedra de Microbiología de la Universidad Nacional de Salta (sede Orán) (31), el Laboratorio de Micología del HIGA San Martín de La Plata (1) y el Laboratorio de Microbiología del Hospital San Juan de Dios de La Plata (1).

-38 sueros* de pacientes con diagnóstico confirmado de HP, algunos de ellos HIV positivos, provistos por el Servicio de Micología del Hospital Muñiz (37) y el Laboratorio de Micología del HIGA San Martín de La Plata (1).

-4 sueros* de pacientes con aspergilosis y 2 sueros de pacientes con candidiasis pertenecientes al Servicio de Micología del Hospital Muñiz.

-50 sueros de donadores voluntarios sanos (utilizados como controles).

*Los sueros pertenecen a las respectivas serotecas de las instituciones mencionadas anteriormente, y corresponden a pacientes que residen o han residido en el nordeste y noroeste argentinos, en la Provincia de Buenos Aires y en Paraguay. Se proporciona mayor información acerca de cada uno de los sueros empleados en Resultados (Tablas VIII y IX).

8.ELECTROELUCIÓN.

Con el fin de obtener una fracción de componentes de bajo peso molecular del extracto de PB (cepa Utero) se recurrió al aislamiento a partir de geles de poliacrilamida mediante la técnica de electroelución.

Se corrieron muestras del extracto de PB en geles de 12,5% de acrilamida-bisacrilamida en condiciones desnaturizantes, y posteriormente se procedió al corte de los mismos por debajo de los 43 kDa (tomando como referencia los patrones de Pharmacia ya mencionados). Los geles, cortados en pequeños trozos, fueron electroeluidos en un equipo BioRad (USA) en buffer de electroelución (Anexo I) durante 5 horas con agitación constante, a razón de 10 mA por cada tubo con muestra.

Una vez finalizado el proceso, la muestra fue recolectada, liofilizada y posteriormente dializada contra PBS. La conservación se llevó a -20°C hasta su utilización.

9. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

9.1.Obtención.

Para la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos se utilizó la técnica de hibridación de células somáticas de Galfré y Milstein (Galfré, 1981). A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado.

Se inmunizaron ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad con los extractos de PB ó HC. Se realizaron al menos 4 inoculaciones con 15-25 µg de proteína/ratón por vía intraperitoneal; la primera de ellas con adyuvante de Freund completo y las restantes con adyuvante incompleto. El seguimiento del plan de inmunización se realizó mediante la titulación de muestras de suero de los animales inmunizados (diluciones seriadas desde 1/100 a 1/100000) por ELISA indirecto (ver sección 9.1.1) frente al extracto fúngico correspondiente.

Como método alternativo para obtener animales sensibilizados contra antígenos de PB, se utilizó un protocolo de infección subletal. Diez ratones BALB/c de 8 semanas de vida fueron infectados intraperitonealmente con 10⁹ levaduras (85% de viabilidad) de PB (cepa Utero). El seguimiento de la respuesta inmune generada por la infección se realizó a través de la titulación periódica del suero de los animales infectados (diluciones seriadas desde 1/100 a 1/10000) por ELISA indirecto (ver sección 9.1.1) frente al extracto de PB.

Paralelamente, se cultivaron células NSO (línea de mieloma originada en ratones BALB/c) hasta alcanzar aproximadamente 5x10⁷ células.

Los ratones que produjeron los títulos más altos de anticuerpos específicos fueron sacrificados (en el caso de animales infectados, el sacrificio se realizó a las 8 y 11 semanas luego de la infección) para ser posteriormente empleados en el experimento.

Para llevar a cabo la fusión (hibridación), se extrajo el bazo del animal seleccionado en condiciones asépticas, se disgregó en un homogeneizador con GKN (Anexo I), se filtró por malla metálica y se realizó el recuento de glóbulos blancos con líquido de Turk en el filtrado. El recuento de células NSO se realizó por coloración vital con azul tripán. Posteriormente se mezclaron aproximadamente 1x10⁸ células de bazo con 5x10⁷ NSO en un tubo Falcon y se centrifugó la mezcla a 300g durante 5 minutos. El paquete celular se lavó con GKN, se colocó sobre baño de agua a 37°C y se procedió al agregado de polietilenglicol (PEG) al 50% y posterior lavado, según el siguiente protocolo:

- Agregado de 1 ml de PEG durante 1 minuto
- Agitación durante 1 minuto
- Agregado de 2 ml de GKN lentamente durante 2 minutos
- Agregado de 5 ml de GKN durante 2-3 minutos

-Agregado de 10 ml de GKN rápidamente

Todas las etapas se realizaron con agitación continua.

Posteriormente se adicionó GKN hasta completar 50 ml y se centrifugó a 300g durante 5 minutos. Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 50 ml de medio HAT (Anexo I) y distribuido en 5 placas de cultivo de 96 pocillos, a razón de 100 μ l por fosa.

A los 7 días de realizada la fusión, las fosas fueron alimentadas con 100 μ l adicionales de medio HAT fresco y se evaluó el crecimiento de células en las mismas. De acuerdo a los resultados de la observación microscópica, aproximadamente a los 15 días de llevada a cabo la fusión, se procedió a analizar la reactividad de los sobrenadantes de cultivo por ELISA indirecto.

9.2.Reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

El análisis de reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas obtenidos se realizó por ELISA indirecto (ver sección 10.1) frente al extracto fúngico utilizado como inmunógeno. La especificidad de los hibridomas que resultaron positivos en el ELISA fue analizada por inmunoblotting (ver sección 10.2) frente a los extractos fúngicos.

Los hibridomas positivos fueron posteriormente clonados por dilución límite y conservados en nitrógeno líquido.

9.3.Determinación de isotipo por ELISA de captura.

Se sensibilizaron microtiras de 8 fosas (Nunc™, Maxisorp) con 100 μ l/fosa de diluciones adecuadas de anticuerpos anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 y anti-IgM de ratón (The binding site, Birmingham, UK) a razón de 1 μ g de proteína/fosa durante 1 hora a 37°C en solución de sensibilización (Anexo I). Luego de un ciclo de lavado (3 lavados de 3 a 5 minutos con solución fisiológica con Tween 0,05%), se realizó la incubación con 200 μ l/fosa de solución de bloqueo (Anexo I) a la misma temperatura durante 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l/fosa de los sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos monoclonales seleccionados y se realizó una incubación a 37°C durante 90 minutos. Finalmente, y luego de un ciclo de lavado, se llevó a cabo una incubación con 100 μ l de una dilución 1/2000 de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Anexo I) a 37°C durante 1 hora.

Como controles se incluyeron fosas sin sobrenadante de cultivo.

El revelado se realizó utilizando como sustrato 100 μ l/fosa de una solución de ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (Anexo I). Luego de 10 minutos, la reacción de color se detuvo con 50 μ l/fosa de solución de parada (Anexo I). La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro para placas Emax (Molecular Devices) a 490 nm.

9.4. Producción.

Con el objetivo de producir AcMo en mayor cantidad, se indujo el crecimiento de los hibridomas seleccionados en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c y la producción de líquido ascítico. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 0,5 ml de Pristane, y al cabo de 7 a 10 días, se inyectó un inóculo de 2×10^6 células/ratón por la misma vía. El líquido producido fue colectado por drenaje, centrifugado y conservado a -20°C hasta su utilización.

9.5. Purificación.

Como primera etapa se realizó una precipitación isocléctrica de la fracción de gammaglobulinas del líquido ascítico con sulfato de amonio al 50% de saturación. El agregado del sulfato de amonio se llevó a cabo lentamente con agitación continua sobre baño de hielo y luego se mantuvo la muestra a 4°C durante 16 horas sin suspender la agitación. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 3000g durante 30 minutos a 4°C . El precipitado obtenido fue lavado, redisolto en PBS y dializado contra la solución buffer que se utilizaría en la etapa cromatográfica (buffer A).

La etapa de purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico en un sistema FPLC, utilizando una columna MonoQ HR 5/5 (Pharmacia). Las características de las soluciones utilizadas se detallan en el Anexo I. Se empleó un gradiente continuo de NaCl de 0 a 1M en 40 ml de volumen total de elución. La corrida cromatográfica se realizó a flujo constante de 1ml/minuto y se recolectaron fracciones de 1ml.

10. ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS DESARROLLADOS.

10.1. ELISA indirecto.

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos o microtiras de 8 pocillos (NuncTM, Maxisorp) con 100 μ l/fosa de una dilución del antígeno en solución de sensibilización (Anexo I) y se

incubaron en estufa a 37°C durante 1 hora o a 4°C durante 16 horas. Luego se realizaron 3 lavados de 3-5 minutos con solución fisiológica más Tween 0,05% (ciclo de lavado). Posteriormente se adicionaron 200µl de solución de bloqueo (Anexo I) a cada pocillo y se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora o a 4°C durante 16 horas. Luego de un ciclo de lavado, se adicionaron 100µl de las muestras a analizar a cada fosa, y se realizó la incubación a 37°C durante 1-2 horas o a 4°C durante 16 horas. Después de un nuevo ciclo de lavado, se incubó con 100 µl/fosa de la dilución adecuada del anticuerpo anti-inmunoglobulina correspondiente (Anexo I) conjugado a peroxidasa de rábano, durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, y luego de un ciclo de lavado, se llevó a cabo el revelado utilizando como sustrato 100 µl/fosa de una solución de ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (Anexo I) o de una mezcla comercial de TMB y peróxido de urea (Organon Teknika BV, Bostel, NL). Al cabo de 5-10 minutos, la reacción de color se detuvo con 50 µl/fosa de solución de parada (Anexo I). La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de placas Emax (Molecular Devices) a 490 nm (para OPD) o a 450 nm (para TMB).

Ensayos con antisueros específicos y anticuerpos monoclonales:

En el caso de los ensayos para determinar la reactividad de antisueros específicos y anticuerpos monoclonales, se utilizaron como antígeno los extractos fúngicos de PB y HC, a razón de 1 µg de proteína por fosa.

Ensayos con sueros humanos:

El ensayo para detectar anticuerpos específicos en suero humanos fue optimizado de manera de obtener los mejores parámetros de sensibilidad y especificidad posibles. Los extractos fúngicos fueron empleados como antígeno a razón de 0,5 µg por fosa y la incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. Se utilizaron diluciones 1/500 de los sueros en solución diluyente (Anexo I) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. A su vez, se empleó una dilución 1/3000 del anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado a peroxidasa y la incubación se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora.

Se incluyeron al menos 20 sueros de donadores sanos como controles en cada uno de los ensayos realizados. Para el cálculo del valor de corte se consideró el valor promedio más 3 desviaciones estándar.

10.2. Inmunoblotting.

Los geles de poliacrilamida sembrados con 5 a 10 μg de proteína/calle fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (NitroME, MSI) en una celda Transblot System (BioRad, USA) con buffer de transferencia (Anexo I) (Towbin, 1979). La transferencia se llevó a cabo a 300mA durante 60 minutos. Posteriormente se colorearon las membranas con una solución de Ponceau S al 0.2% en TCA 3% durante 5 minutos; las calles correspondientes a las muestras fueron decoloradas con sucesivos lavados con agua destilada, y las correspondientes a los patrones de PM fueron secadas y conservadas hasta su utilización.

Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (Anexo I) durante 1 hora a 37°C. Luego de un ciclo de lavado, se realizó la incubación con las muestras a analizar durante 1-2 horas a 37°C o a 4°C durante 16 horas.

Después de un nuevo ciclo de lavado, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado correspondiente (ver Anexo I) durante 1 hora a 37°C. En ocasiones se recurrió a la utilización del sistema de amplificación biotina-streptavidina (Anexo I), y en dichos casos se realizó una primera incubación con anti-inmunoglobulina /biotina diluída 1/2000 durante 90 minutos a 37°C, y una segunda incubación con streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina o a peroxidasa de rábano 1/2000 a 37°C durante 1 hora.

Ensayos con antisueros específicos:

Los antisueros de conejo fueron empleados en dilución 1/1000 y los antisueros de ratón en dilución 1/500, ambos en solución diluyente (Anexo I).

Ensayos con sueros humanos:

Los ensayos con sueros humanos se realizaron con una dilución 1/50 de los mismos en solución diluyente y la incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C o a 4°C durante 16 horas. Para este sistema el revelado se realizó con un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado a fosfatasa alcalina (Anexo I) durante 90 minutos a 37°C. Como sustrato de empleó una solución comercial de NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) y BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolphosphate p-toluidine salt)(Biokit).

10.3. Dot-blot.

Se sensibilizaron membranas de nitrocelulosa (NitroME, MSI) con 3 o 4 aplicaciones sucesivas de 2 μ l de extracto antigénico, dejando secar las membranas en la estufa a 37°C luego de cada aplicación.

Las etapas siguientes (bloqueo, incubación con suero, incubación con anticuerpo conjugado y revelado) se llevaron a cabo siguiendo el protocolo oportunamente descrito para el ensayo de inmunoblotting en la sección 9.2.

10.4.ELISA competitivo secuencial.

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc™, Maxisorp) con 100 μ l/fosa de una dilución de los extractos de PB y HC en solución de sensibilización (Anexo I), a razón de 1 μ g de proteína por pocillo, y se incubaron en estufa a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, y luego de un ciclo de lavado, se adicionaron 200 μ l de solución de bloqueo (Anexo I) a cada pocillo y se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora. Simultáneamente, se prepararon cuatro series de mezclas en las que se incubaron volúmenes iguales de diluciones 1/10 a 1/10⁶ de los extractos de PB y HC con una dilución 1/25000 de los antisueros de conejo anti-PB 1 y anti-HC 1 (Resultados, sección 1.1.2) durante 1 hora a 37°C.

Luego de un nuevo ciclo de lavado, se adicionaron 100 μ l de las muestras preincubadas a cada fosa, y se realizó la incubación a 37°C durante 90 minutos. Como controles se incorporaron fosas sin antisuero y con dilución 1/50000 de ambos antisueros (Am). Finalmente, se incubó con 100 μ l/fosa de una dilución 1/3000 del anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Anexo I) durante 1 hora a 37°C.

Las condiciones de revelado y lectura del ensayo fueron las descriptas en la sección 9.1.

Se graficó el porcentaje de inhibición en función de la concentración de proteína soluble. El porcentaje de inhibición fue calculado como:

$$\% \text{ de inhib.} = 100 \times (A_m - A_x) / A_m$$

donde, A_x corresponde a la lectura de absorbancia obtenida con cada una de las diluciones del extracto soluble.

10.5.ELISA de captura con anticuerpos monoclonales.

Se sensibilizaron placas de 96 fosas (Nunc™, Maxisorp) con 100 μ l/fosa de una dilución adecuada de AcMo purificado (2C3 a-PB, 3F9 a-PB o 5E1 a-HC), a razón de 1 μ g de

proteína/ fosa durante 1 hora a 37°C en solución de sensibilización. Luego de un ciclo de lavado, se realizó la incubación con 200 µl/fosa de solución de bloqueo (Anexo I) a la misma temperatura durante 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 100 µl/fosa de diferentes diluciones del extracto antigénico en solución diluyente (Anexo I) a razón de 1 ó 10 µg de proteína/fosa, y se realizó una incubación a 37°C durante 2 horas. Después de un nuevo ciclo de lavado, las fosas fueron incubadas con 100 µl de una dilución adecuada de la muestra a analizar en solución diluyente (Anexo I) durante 90 minutos a 37°C. Finalmente, y luego de un ciclo de lavado, se llevó a cabo una incubación con 100 µl de una dilución del anticuerpo conjugado a peroxidasa correspondiente (Anexo I) a 37°C durante 1 hora.

Las condiciones de revelado y lectura del ensayo fueron las descritas previamente en la sección 10.1.

Ensayos con antisueros de conejo:

En estos ensayos se emplearon los correspondientes extractos antigénicos a razón de 1 µg de proteína/ fosa. Los antisueros de conejo anti-PB1 (para el caso del extracto antigénico de PB) y anti-HC1 (para el caso del extracto antigénico de HC) se emplearon en dilución 1/1000 y las fosas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. El revelado se llevó a cabo utilizando una dilución 1/3000 del anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado. Por otro lado, se incluyeron fosas sin antígeno y fosas sin antisuero como controles.

Ensayos con sueros humanos:

Para la detección de anticuerpos específicos en sueros humanos, la incubación con el extracto antigénico correspondiente se realizó con 10 µg de proteína/fosa. Se emplearon diluciones 1/200 de los sueros humanos y una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado a peroxidasa con 3% de suero normal de ratón. Estas condiciones fueron seleccionadas de acuerdo a los valores óptimos de sensibilidad y especificidad obtenidos.

En estos ensayos se incluyeron un control sin antígeno y sin suero humano, y controles sin antígeno para cada suero analizado. El resultado del ensayo se expresó como la diferencia entre la absorbancia leída en la fosa con antígeno y la leída en la fosa sin antígeno (ΔDO). Se analizaron 20 sueros de dadores sanos para el cálculo del valor de corte en cada ensayo, el cual se llevó a cabo considerando el valor promedio más 3 desviaciones estándar.

10.6. ELISA de captura para la detección de antígenos en suero de pacientes.

Placas de 96 fosas (Nunc™, Maxisorp) fueron incubadas con 100 µl/fosa de una dilución adecuada de AcMo purificado (2C3 a-PB o 5E1 a-HC), a razón de 1µg de proteína/fosa durante 1 hora a 37°C en solución de sensibilización. Luego de un ciclo de lavado, se realizó la incubación con 200 µl/fosa de solución de bloqueo (Anexo I) a la misma temperatura durante 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 100 µl/fosa de una dilución 1/2 de sueros de pacientes en solución diluyente (Anexo I) y se realizó una incubación a 37°C durante 2 horas. Para la curva de calibración, en esta etapa se realizó la incubación con diluciones seriadas del extracto antigénico correspondiente en solución diluyente (Anexo I), con 20% de suero humano normal. Luego de un ciclo de lavado, las fosas fueron incubadas con 100 µl de una dilución 1/1000 de antisuero de conejo anti-PB1 (en el caso de pacientes con PCM) o del antisuero de conejo anti-HC1 (en el caso de pacientes con HP) durante 90 minutos a 37°C. Finalmente, y luego de un ciclo de lavado, se llevó a cabo una incubación con 100 µl de una dilución 1/3000 de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Anexo I) a 37°C durante 1 hora.

Las condiciones de revelado y lectura del ensayo fueron las descritas previamente en la sección 10.1.

En el ensayo se incluyeron controles sin suero humano y un control sin antígeno y sin suero humano.

11. OXIDACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO.

Membranas de nitrocelulosa previamente electrotransferidas con extracto de PB y de HC fueron lavadas con una solución de ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH=4.5 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una incubación con una solución de periodato de sodio 100 mM durante 1 hora en oscuridad, y finalmente se llevó a cabo una serie de 3 lavados con la solución utilizada en la primera etapa. Es importante destacar que tanto la concentración de periodato como el tiempo de exposición a este agente oxidante utilizados en este trabajo superan los valores empleados por la Figueroa y col. con un extracto celular de PB (Figueroa, 1994) y son comparables a los empleados por Zancopé-Oliveira y col. con los antígenos H y M purificados a partir de un extracto de HC (Zancopé-Oliveira, 1994).

Las membranas tratadas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con solución de bloqueo para ser utilizadas en ensayos de inmunoblotting.

ANEXO I

SOLUCIONES UTILIZADAS EN ELECTROFORESIS:

➤ **Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE):**

Acrilamida	30%
Bisacrilamida	0,8%

➤ **Buffer gel de apilamiento 4X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	0,5 M
SDS	0,4%
pH=6,8	

➤ **Buffer separador 4X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	1,5 M
SDS	0,4%
pH=8,8	

➤ **Buffer de corrida 10X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1%
pH=8,	

➤ **Buffer muestra 4X:**

Buffer de apilamiento	2,5 ml
SDS	1 g
Sacarosa	5 g
Azul de bromofenol	pizca
Llevar a 10 ml con agua desionizada	

COMPOSICIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA:

➤ **Gel de apilamiento: (2 ml)**

Solución	Volumen
Acrl-bisacrilam.	200 μ l
Buffer	500 μ l
Agua desionizada	1,3 ml
TEMED	2 μ l
Persulfato 10%	12 μ l

➤ **Gel separador: (4,8 ml)**

Solución	10%	12.5%	14%	15%
Acril-bisacrilam.	1,6 ml	2 ml	2,25 ml	2,4 ml
Buffer	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
Agua desionizada	2 ml	1,6 ml	1,36 ml	1,12 ml
TEMED	3,75 μ l	3,75 μ l	3,75 μ l	3,75 μ l
Persulfato 10%	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

➤ **Gel separador para electroforesis preparativa: (80 ml)**

Solución	12,5%
Acril-bisacrilam.	20 ml
Buffer	33,3 ml
Agua desionizada	26,7 ml
TEMED	37,5 μ l
Persulfato 10%	200 μ l

COLORACIONES:➤ **Tinción con plata: (para geles de policarilamida)**

<u>Reactivos:</u>	<u>Solución fijadora:</u>	
	Metanol	50%
	Acido acético glacial	12%
	Formol 37%	0,05%
	<u>Solución de nitrato de plata:</u>	
	AgNO ₃	2 g/l
	Formol 37%	0,075%
	<u>Desarrollador:</u>	
	Na ₂ CO ₃	60 g/l
	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	4 mg/l
	Formol 37%	0,05%
	<u>Solución de parada:</u>	
	Metanol	50%
	Acido acético glacial	12%

Procedimiento:

- 1) Incubar el gel en solución fijadora durante un tiempo mayor a 60 minutos.
- 2) Realizar 3 lavados con una solución de etanol al 50% en agua deionizada durante 20 minutos cada uno

- 3) Pretratar con solución de tiosulfato de sodio durante exactamente 1 minuto
- 4) Realizar 3 lavados con agua deionizada de 20 segundos cada uno
- 5) Colocar en solución de nitrato de plata durante 20 minutos
- 6) Realizar 3 lavados con agua deionizada de 20 segundos cada uno
- 7) Colocar en desarrollador hasta que la coloración sea adecuada
- 8) Lavar con agua deionizada
- 9) Detener con solución de parada

➤ **Tinción con Coomasie Blue: (para geles de policarilamida)**

<u>Reactivos:</u>	<u>Colorante:</u>	
	Coomasie Blue R250	0,25g
	Metanol	45 ml
	Acido acético glacial	10 ml
	Agua destilada	45 ml
	<u>Decolorante:</u>	
	Metanol	45 ml
	Acido acético glacial	10 ml
	Agua destilada	45 ml

Procedimiento:

- 1) Colocar el gel en solución colorante durante al menos 2 horas
- 2) Incubar con solución decolorante hasta que la coloración sea adecuada

➤ **Tinción con Ponceau S (para membranas de nitrocelulosa)**

<u>Reactivos:</u>	<u>Solución colorante:</u>	
	Ponceau S	0,2% p/v
	Acido tricloroacético	3%
	<u>Decolorante:</u>	
	Agua destilada	

Procedimiento:

- 1) Colocar la membrana transferida en solución colorante durante 5 minutos
- 2) Decolorar totalmente

BUFFER DE ELECTROELUCIÓN:

Bicarbonato de amonio	0,5M
SDS	0,1%

SOLUCIONES PARA ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS:

➤ **Buffer transferencia 1X:**

Tris-hidroximetil-aminometano	0,025 M
Glicina	0,195 M
Metanol	20%

➤ **PBS 5X:**

NaCl	0,14 M
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8,1 mM
pH=7,4	

➤ **Buffer de sensibilización:**

NaHCO ₃	0,077M
Na ₂ CO ₃	7,7mM
pH=9,0	

➤ **Solución de bloqueo:**

Leche en polvo descremada Molico	3 g
PBS	100ml

➤ **Solución diluyente:**

Leche en polvo descremada Molico	1 g
PBS	100ml

➤ **TBS 5X:**

NaCl	0,14 M
KCl	2,7 mM
Tris-hidroximetil-aminometano	50 mM
pH=8.4	

➤ **Solución de sustrato de peroxidasa para ELISA:**

Acido cítrico	0,1 M
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,1 M
pH=5	
Ortofenilendiamina	2 mg/ml
H ₂ O ₂ 100 volúmenes	1 µl/ml

➤ **Solución de sustrato de peroxidasa para IB:**

TBS	15 ml
4-cloronaftol	9 mg
Metanol	3 ml
H ₂ O ₂ 100 volúmenes	12 µl

➤ **Solución de parada:**

H ₂ SO ₄	4N
--------------------------------	----

ANTICUERPOS CONJUGADOS:

- # **Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa:** anti-IgG (H+L) de conejo producido en cabra (BioRad, USA)
- # **Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa:** anti-IgG (H+L) de ratón producido en cabra (BioRad, USA)
- # **Anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina:** anti-IgG (H+L) de ratón producido en cabra (Sigma Immunochemicals, SIGMA, USA)
- # **Anti-IgG humano conjugado a peroxidasa:** anti-IgG (H+L) humana producido en cabra (BioRad, USA)
- # **Anti-IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina:** anti-IgG (H+L) humana producido en cabra (Sigma Immunochemicals, SIGMA, USA)
- # **Anti-Ig de ratón conjugado a biotina:** anti-Ig de ratón producido en cabra (Sigma Immunochemicals, SIGMA, USA)
- # **Anti-IgG de conejo conjugado a biotina:** monoclonal anti-IgG (cadena gamma) de conejo producido en cabra (SIGMA, USA)
- # **Conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina:** ExtrAvidin®, SIGMA
- # **Conjugado estreptavidina-peroxidasa:** Immunopure®, Pierce

MEDIOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS EN CULTIVO DE CELULAS:➤ **Solución salina tamponada de NaCl y KCl (GKN):**

NaCl	8g
KCl	0,4g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,77g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,69g
Glucosa	2g
Rojo fenol	0,01g
Agua desionizada	csp 1000 ml

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22µm

➤ **Base para medio de cultivo (RPMI base):**

RPMI 1640 (Gibco)	1 sobre
NaHCO ₃	2 g
Agua desionizada	csp 1000 ml
pH=7.4	

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22µm

➤ **Solución de antibióticos (50X):**

Penicilina (Bagó)	312 mg
Estreptomina (Bagó)	500 mg

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22µm

➤ **Medio de cultivo:**

Suero Fetal Bovino (Gibco)	10%
Antibióticos 50X	2ml
RPMI base	hasta volumen final de 100ml

➤ **Medio selectivo para hibridomas:**

Suero fetal bovino	20ml
ATB 50X	2 ml
HAT 50X (ICN, USA)	2 ml
PRMI base	76ml

➤ **Congelación de células:**

Suero fetal bovino	90%
Dimetilsulfóxido	10%



Resultados

INDICE:

	<u>Página</u>
1.Caracterización inmunoquímica de componentes antigénicos presentes en extractos celulares de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>.	69
1.1.Caracterización de extractos fúngicos.	69
1.1.1. Cuantificación de proteínas y perfil proteico por electroforesis.	69
1.1.2. Antigenicidad frente a antisueros específicos.	71
1.2.Reactividad cruzada entre <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i> .	72
1.2.1.Ensayos de inmunoblotting.	72
1.2.2.Ensayos de ELISA competitivo secuencial.	74
1.3.Separación de componentes del extracto de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> por electroforesis preparativa.	75
1.3.1.SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.	75
1.3.2. Antigenicidad de las fracciones I a VI.	76
2.Anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>.	77
2.1.Anticuerpos monoclonales anti- <i>Histoplasma capsulatum</i> .	77
2.1.1.Hibridomas obtenidos.	77
2.1.2.Especificidad de reconocimiento.	77
2.1.3. Determinación de isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.	79
2.1.4. Purificación del anticuerpo monoclonal 5E1.	80
2.1.5.Ensayos de ELISA de captura con el anticuerpo monoclonal 5E1.	81
2.2.Anticuerpos monoclonales anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	81
2.2.1.Hibridomas obtenidos.	81
2.2.2.Especificidad de reconocimiento.	83
2.2.3. Determinación de isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.	85
2.2.4. Purificación de los anticuerpos monoclonales 2C3 y 3F9.	85

2.2.5.Reactividad de los anticuerpos monoclonales 2C3 y 3F9 frente a antígenos de diferentes cepas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	85
2.4.Otros experimentos desarrollados.	88
3.Métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de paracoccidioidomicosis.	89
3.1.Reactividad de antígenos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> frente a sueros de pacientes.	89
3.1.1.ELISA indirecto.	89
3.1.1.Inmunoblotting.	91
3.2.Utilización de anticuerpos monoclonales en el desarrollo de métodos de utilidad diagnóstica.	95
3.2.1.Ensayos de detección de anticuerpos.	95
3.2.2.Ensayos de detección de antígenos circulantes.	101
4.Métodos inmunoquímicos aplicados a la detección de anticuerpos específicos y antígenos en suero de pacientes con histoplasmosis.	102
4.1.Reactividad de antígenos de <i>Histoplasma capsulatum</i> frente a sueros de pacientes.	102
4.2.Métodos inmunoquímicos empleando anticuerpos monoclonales.	102
4.2.1.Ensayos de detección de anticuerpos.	102
4.2.2.Ensayos de detección de antígenos circulantes.	102

1. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE COMPONENTES ANTIGÉNICOS EN EXTRACTOS CELULARES DE *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

1.1. Caracterización de extractos fúngicos.

1.1.1. Cuantificación de proteínas y perfil proteico por electroforesis.

Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de cepas de PB (Utero) y HC, así como los respectivos sobrenadantes de cultivo, fueron analizados por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y se determinó la concentración de proteínas en los mismos, obteniéndose valores entre 0,5 y 2,5 mg de proteína/ml de extracto.

Tanto en el extracto de PB como en el extracto de HC, el revelado con Coomassie Blue como la tinción con plata mostraron un gran número de bandas, con pesos moleculares (PM) aparentes entre 17 y 100 kDa. También se detectaron diferencias cuali y cuantitativas entre las bandas en los extractos de PB y HC. Las bandas de mayor intensidad en el extracto de PB corresponden PM de 17,7; 18,8; 25,2; 27,0; 34,6; 50,7 y 60,7 kDa, mientras que en el extracto de HC se destacan bandas de 28,0; 36,6; 45,7 y 50,7 kDa (Figura 1).

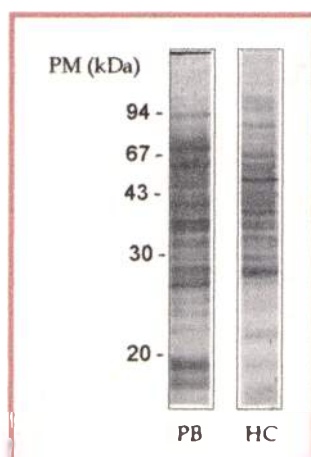


Figura 1. SDS-PAGE de extractos celulares de PB y HC. Siembra: 8 μ g de proteína/calle.

Las muestras correspondientes a los sobrenadantes de cultivo de cada microorganismo, también revelaron un gran número de bandas y no se observaron diferencias significativas respecto de lo observado en los correspondientes extractos celulares (no mostrado).

Adicionalmente, en los extractos de pared celular y membrana de PB y HC se reveló un escaso número de bandas. En el caso de PB, se observó una banda predominante con un PM aproximado de 85 kDa; mientras que en el caso de HC se observaron dos bandas intensas a aproximadamente 15 y 60 kDa respectivamente (no mostrado).

Por otro lado, los extractos de PB obtenidos a partir de las cepas Duarte, Gontchar, Heredia presentaron un perfil electroforético muy similar entre sí. A su vez, dichos perfiles no mostraron diferencias significativas con los que presentaron los extractos de PB Utero y V9 (excepto que estas dos cepas revelan un mayor número de componentes con PM entre 18 y 25 kDa). Por otro lado, la cepa Benitez407 es la que presentó mayores diferencias y en su perfil no se observaron bandas de PM inferior a 27,6 kDa (Figura 2).

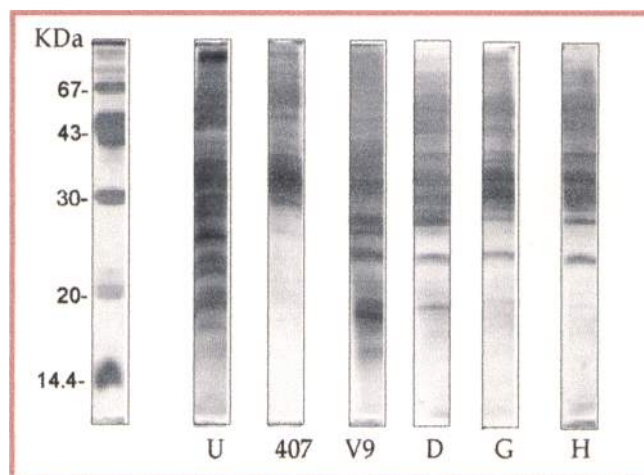


Figura 2. SDS-PAGE de las distintas cepas de PB. U: Utero; 407: Benitez407; V9: PbV9; D: Duarte; G: Gontchar; H: Heredia. Siembra: 10 μ g de proteína/calle.

Es importante destacar que parte de los componentes revelados en los sobrenadantes de cultivo (tanto de PB como de HC) pueden corresponder a material intracelular liberado al medio por muerte celular, y los mismos no han sido específicamente identificados en nuestro caso. Por otro lado, la mayoría de los antígenos descritos hasta el momento para ambos sistemas corresponden a proteínas extracelulares (exoantígenos). Por lo tanto, dado que nuestro objetivo principal se centró en el estudio de nuevos antígenos con potencial utilidad en el diagnóstico, todos nuestros experimentos posteriores se llevaron a cabo empleando como fuente de antígenos los extractos intracitoplasmáticos obtenidos por ruptura celular.

1.1.2. Antigenicidad frente a antisueros específicos.

Tanto el extracto de PB como el extracto de HC contienen componentes antigénicos capaces de ser reconocidos por los antisueros específicos de conejo. Los antisueros obtenidos fueron designados como Sco anti-PB 1 y 2, y Sco anti-HC 1 y 2. Los títulos de anticuerpos alcanzados contra los correspondientes extractos específicos al finalizar el plan de inmunización se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Títulos alcanzados por los antisueros de conejo frente a sus extractos específicos.

Antisuero	Título
Sco anti-PB 1	1/93000
Sco anti-PB 2	1/120000
Sco anti-HC 1	1/160000
Sco anti-HC 2	1/160000

Los ensayos de inmunoblotting realizados con los antisueros específicos revelaron bandas en un amplio rango de pesos moleculares. En el extracto de PB de la cepa Utero se revelaron bandas en un rango de 13,8 a 97 kDa, y no se observaron diferencias significativas entre la reactividad de los antisueros Sco anti-PB 1 y 2 (Figura 3a).

En los extractos obtenidos a partir de las cepas de PB Duarte, Gontchar, Heredia y PhV9, el perfil de componentes reconocidos por el antisuero Sco anti-PB 1 fue muy similar en todas las cepas, destacándose la presencia de una banda de aproximadamente 75 kDa que no se detectó en el extracto de la cepa Utero. La cepa Benitez407 también reveló esta banda 75 kDa, pero en el extracto no se detectaron componentes de PM inferior a 29 kDa. A su vez, en los extractos de las cepas Duarte, Gontchar y Heredia se reveló una banda intensa de 27,4 kDa que sólo se observó débilmente en las cepas Utero y V9 (Figura 3b).

Por otro lado, en el extracto de HC, los antisueros Sco anti-HC 1 y 2 reconocieron componentes de entre 27,3 a 105 kDa, entre los que se destacan bandas de 87 y 103 kDa. No se observaron diferencias en la respuesta de ambos antisueros (Figura 3a).

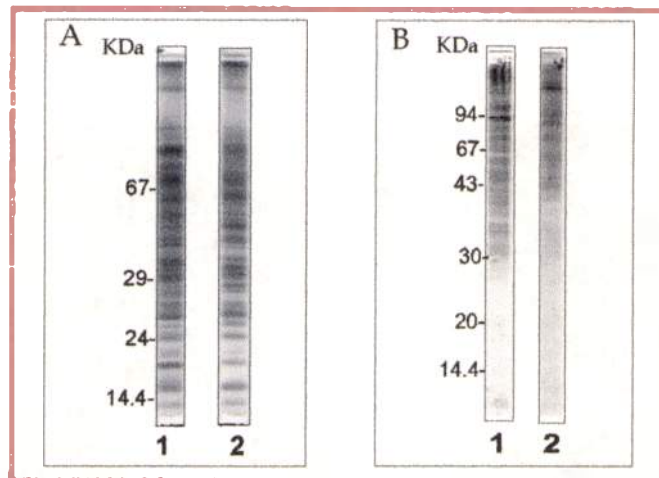


Figura 3a. Inmunoblotting de antisueros de conejo frente a sus respectivos extractos específicos. A: antisueros de conejo 1 y 2 anti-PB frente al extracto de PB. B: antisueros de conejo 1 y 2 anti-HC frente al extracto de HC.

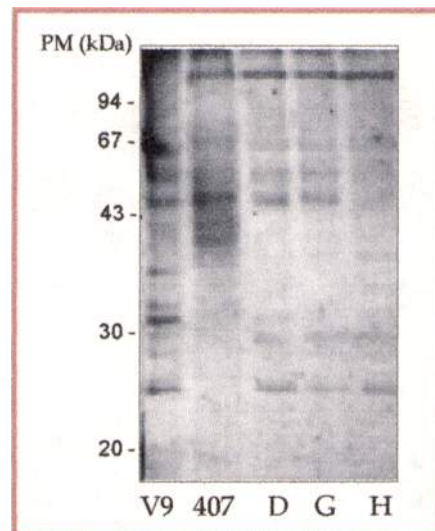


Figura 3b. Inmunoblotting de Sco anti-PB frente a distintas cepas de PB. U: Utero; 407: Benitez407; V9: PbV9; D: Duarte; G: Contchar; H: Heredia.

1.2. Reactividad cruzada entre *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

1.2.1. Ensayos de inmunoblotting.

Se observó que los antisueros Sco anti-HC (1 y 2) reconocen una gran variedad de componentes de reactividad cruzada en el extracto de PB (cepa Utero), tal como puede observarse en la Figura 4a. Entre dichos componentes se destacan bandas de 32,3-37,3 y 62,8

kDa que también son reveladas por Sco anti-PB 1 y 2, y dos bandas de 21,6 y 29,4 kDa que no son reconocidas por los antisueros específicos.

Al analizar la reactividad del Sco anti-HC 1 frente a los extractos obtenidos a partir de las otras cepas de PB, se observó que dicho antisuero reconoce componentes en todas ellas y en ninguno de los casos se revelaron bandas de PM inferior a 30 kDa (Figura 4b).

De manera similar, los antisueros Sco anti-PB (1 y 2) revelaron bandas en el extracto de HC (Figura 4a). En este caso se observó que el Sco anti-PB 1 reconoce sólo un número pequeño de bandas de reactividad cruzada, en comparación con el Sco anti-PB 2. Ambos antisueros revelaron con mayor intensidad componentes de 56,3; 68.3 kDa y una banda de aproximadamente 12 kDa que no es revelada por los antisueros específicos (Sco anti-HC 1 y 2).

Por otro lado, se observó que los antisueros anti-PB reconocen dos bandas de un PM aproximado de 17,9 y 19,2 kDa en el extracto de PB que no son reveladas por los antisueros anti-HC. Así mismo, las dos bandas más intensas reveladas en el extracto de HC (de aproximadamente 87 y 103 kDa) y que son reconocidas por los antisueros anti-HC, no presentaron reactividad frente a los antisueros anti-PB (Figura 4a).

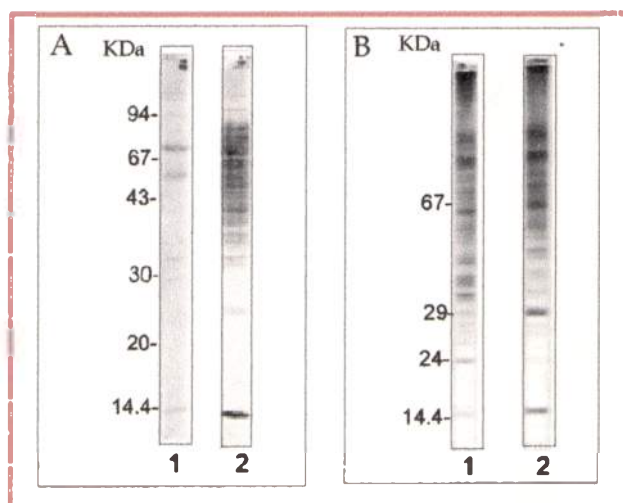


Figura 4a. Reactividad cruzada: inmunoblotting de antisueros de conejo frente a extractos no homólogos. A: antisueros de conejo 1 y 2 anti-PB frente al extracto de HC. B: antisueros de conejo 1 y 2 anti-HC frente al extracto de PB.

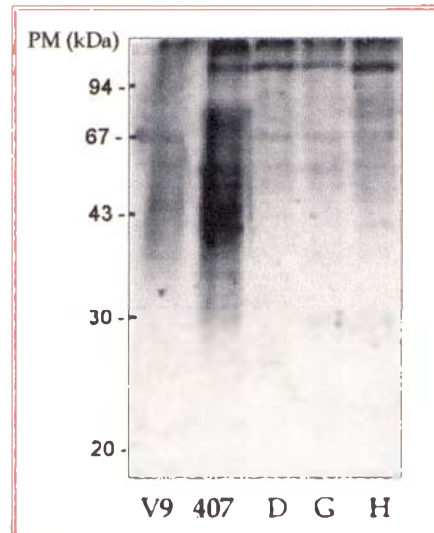


Figura 4b. Reactividad cruzada: inmunoblotting de Sco anti-HC frente a distintas cepas de PB. U: Utero; 407: Benitez407; V9: PbV9; D: Duarte; G: Contchar; H: Heredia.

1.2.2. Ensayos de ELISA competitivo secuencial.

La reactividad cruzada entre PB y HC también fue ensayada por ELISA competitivo, utilizando los antisueros Sco anti-PB 1 y Sco anti-HC 1, según se detalla en Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 5a, los componentes antigénicos presentes en el extracto de PB fueron capaces de inhibir completamente el reconocimiento de los antígenos de HC por el antisuero específico Sco anti-HC 1.

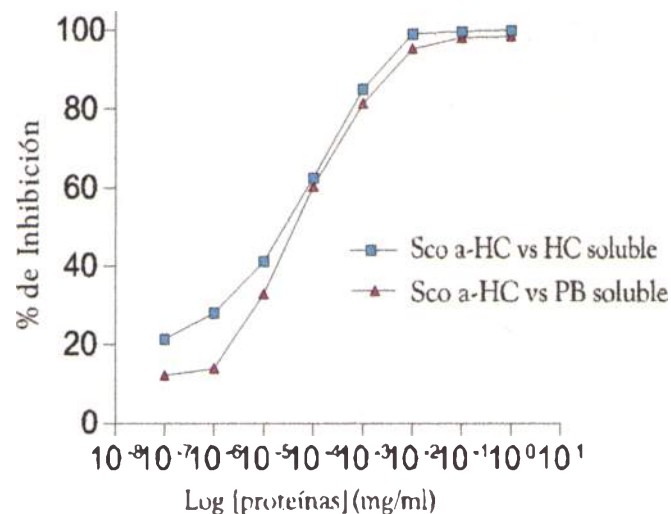


Figura 5a. ELISA competitivo secuencial: antisuero anti-HC frente al extracto de HC, en presencia de PB y HC solubles.

Por otro lado, al enfrentar el antisuero Sco anti-PB 1 con el extracto de HC soluble, sólo fue posible obtener hasta aproximadamente un 50% de inhibición cuando la concentración de proteínas del extracto en la mezcla de preincubación fue de 1 mg/ml. (Figura 5b).

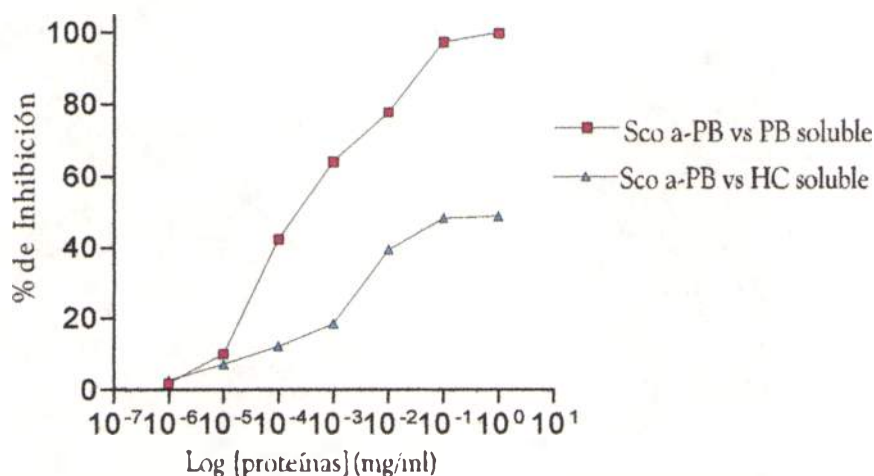


Figura 5b. ELISA competitivo secuencial: antisuero anti-PB frente al extracto de PB, en presencia de PB y HC solubles.

1.3. Separación de componentes del extracto de *Paracoccidioides brasiliensis* por electroforesis preparativa.

1.3.1. SDS-PAGE de las fracciones recolectadas.

Tal como se observa en la Figura 6, mediante esta técnica se han obtenido fracciones con PM entre 24 y 63 kDa presentes en el extracto de PB de la cepa Utero con un buen grado de separación. De las fracciones colectadas se seleccionaron aquellas donde se observó una sola banda en geles desnaturizantes teñidos con plata. Los PM aparentes correspondientes a dichas fracciones (I a VI) se muestran en la Tabla II. En las condiciones en la que se llevó a cabo la electroforesis, no fue posible recuperar fracciones con PM inferiores a 20 kDa ni superiores a 63 kDa.

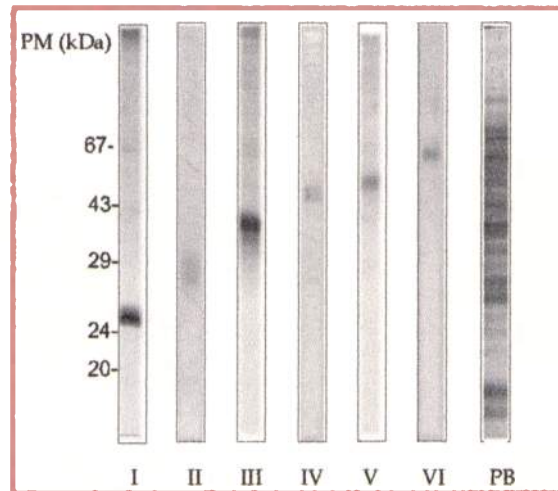


Figura 6. SDS-PAGE analítico de las fracciones recolectadas por electroforesis preparativa. I-VI: diferentes fracciones; PB: extracto celular de PB.

1.3.2. Antigenicidad de las fracciones I a VI.

Los ensayos de inmunoblotting realizados con las fracciones previamente seleccionadas mostraron que los componentes presentes en todas ellas son capaces de ser reconocidos por el antisuero específico Sco anti-PB 1, mientras las fracciones V y VI también son reactivas frente al antisuero Sco anti-HC 1 (Tabla II).

Por otro lado, de las fracciones seleccionadas, sólo la fracción I reveló una banda intensa en ensayos de inmunoblotting frente a un pool de sueros de pacientes con PCM.

Tabla II. Fracciones I a VI del extracto de PB obtenidas por electroforesis preparativa.

Fracción	I	II	III	IV	V	VI
PM (kDa)	24,2	30,6-32,8	41,0-43,8	50,2	52,9	62,9
IB	Sco anti-PB	+	+	+	+	+
	Sco anti-HC	-	-	-	-	+

IB: inmunoblotting; Sco: suero de conejo

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE *Paracoccidioides brasiliensis* E *Histoplasma capsulatum*.

2.1. Anticuerpos monoclonales anti-*Histoplasma capsulatum*.

2.1.1. Hibridomas obtenidos.

Para la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos contra componentes antigénicos del extracto de HC, se llevaron a cabo dos experimentos de hibridación de células somáticas de acuerdo al protocolo oportunamente descrito en Materiales y Métodos. Los ratones BALB/c fueron inmunizados con el extracto celular de HC por vía intraperitoneal.

En el primero de los experimentos se obtuvieron tres hibridomas que resultaron positivos en los primeros ensayos de screening. Sólo el hibridoma 5E1 mantuvo esta propiedad luego de sucesivas etapas de expansión y de la correspondiente etapa de clonación, por lo cual los otros dos hibridomas fueron descartados.

Como resultado del segundo experimento de fusión, se obtuvieron seis hibridomas productores de AcMo contra componentes antigénicos del extracto de HC que resultaron positivos en los dos primeros ensayos de screening. Cuatro de ellos (3A12, 4D2, 5B1 y 5B8) mantuvieron su reactividad por ELISA e inmunoblotting luego de varias etapas de expansión y de las respectivas clonaciones. Con los dos hibridomas restantes no pudieron obtenerse resultados positivos en ensayos inmunoquímicos luego de la etapa de clonación, por lo que ambos fueron descartados.

2.1.2. Especificidad de reconocimiento.

Todos los AcMo obtenidos mostraron reactividad en ensayos de ELISA indirecto, dot-blot (no mostrado) e inmunoblotting frente al extracto de HC. En el ensayo de inmunoblotting se observó que todos los AcMo revelan más de una banda y que las mismas poseen un PM entre 63 y 102 kDa (Figura 7 y Tabla III).

Los clones 4D2 y 5B1 presentaron un perfil de reactividad muy similar; ambos revelaron cuatro bandas con PM aparentes 63,4; 72,6; 84,4 y 102 kDa en el extracto de HC.

Con los AcMo 5B8 y 5E1 se observó que ambos reconocen dos bandas de igual PM (69,5 y 75,7 kDa) en el extracto de HC, pero sólo el clon 5B8 fue capaz de revelar

componentes de reactividad cruzada con PB. En este caso, por inmunoblotting se revelaron dos bandas de aproximadamente 52,8 y 60,3 kDa en el extracto de PB.

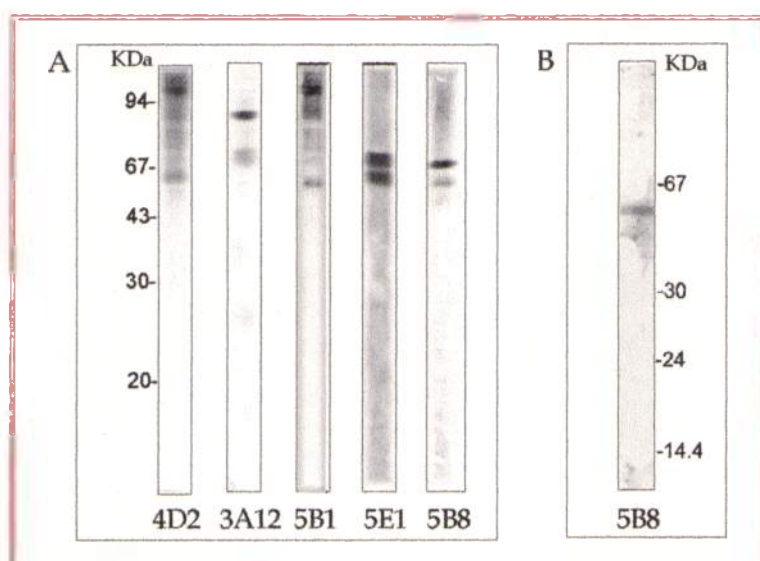


Figura 7. Inmunoblotting de AcMo anti-HC frente a: A: extracto de HC; B: extracto de PB.

Tabla III.: Análisis de la reactividad de los hibridomas anti-HC frente a extractos de PB y HC por ELISA e inmunoblotting.

AcMo	Extracto HC		Extracto PB	
	ELISA	IB	ELISA	IB
3A12	Reactivo	66,1 kDa 69,3 kDa 83,6 kDa	No reactivo	No reactivo
4D2	Reactivo	63,4 kDa 72,6 kDa 84,4 kDa 102 kDa	No reactivo	No reactivo
5B1	Reactivo	63,4 kDa 72,6 kDa 84,4 kDa 102 kDa	No reactivo	No reactivo
5B8	Reactivo	69,5 kDa 75,7 kDa	Reactivo	52,8 kDa 60,3 kDa
5E1	Reactivo	69,5 kDa 75,7 kDa	No reactivo	No reactivo

IB: inmunoblotting

Además de los ensayos de especificidad antes mencionados, se llevaron a cabo experimentos de oxidación de hidratos de carbono sobre las membranas de nitrocelulosa transferidas con el correspondiente extracto antigénico.

No se observaron diferencias en los perfiles de reactividad de los AcMo 4D2, 5B8, 5B1 y 5E1 cuando se los enfrentó al extracto de HC previamente tratado con periodato de sodio, lo cual indicaría la naturaleza peptídica de los epitopes reconocidos (Figura 8). En cambio, en el caso del clon 3A12, no se reveló la banda de 83,6 kDa cuando el inmunoblotting se realizó con membranas sometidas previamente al tratamiento de oxidación de hidratos de carbono ya mencionado (Figura 8).

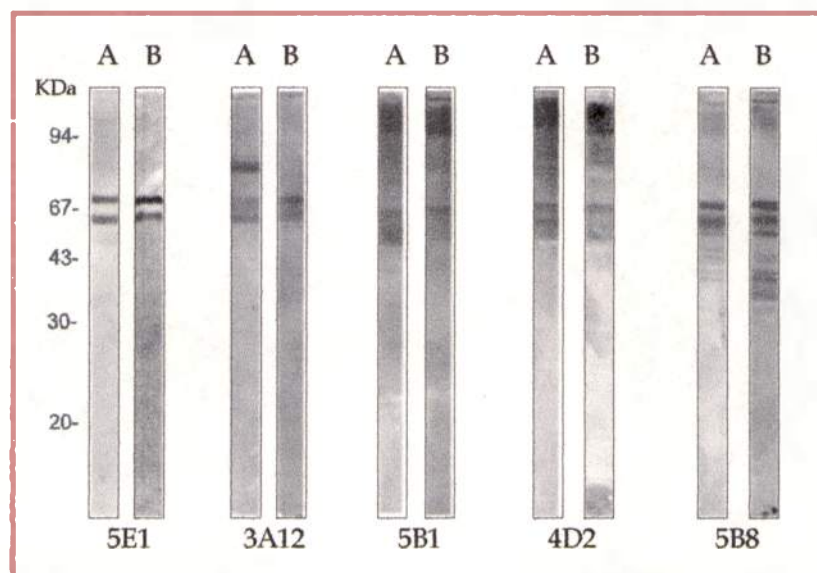


Figura 8. Inmunoblotting de AcMo anti-HC frente al extracto de HC. A: membranas sin tratar; B: membranas tratadas con periodato de sodio.

Por otro lado, se evaluó la reactividad por inmunoblotting del AcMo anti-HC 5E1 frente al extracto de membrana y pared celular de HC. Se observó que dicho anticuerpo reconoce dos bandas con PM aparentes entre 80 y 100 kDa en el mencionado extracto (no mostrado).

2.1.3. Determinación de isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA de captura realizado a los AcMo anti-HC 5E1, 3A12, 4D2, 5B1 y 5B8 mostraron que dichos anticuerpos pertenecen al isotipo IgG1.

2.1.4. Purificación del anticuerpo monoclonal 5E1.

En base a sus características de especificidad, el AcMo anti-HC 5E1 fue seleccionado para la producción de líquido ascítico en ratones BALB/c siguiendo el protocolo oportunamente descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, se llevaron a cabo las etapas de aislamiento por precipitación isoeléctrica y de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

La Figura 9 muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos. En el cromatograma mostrado se registraron tres picos principales. Según lo observado por SDS-PAGE de las fracciones colectadas (no mostrado) el primero de ellos (Pico N° 1) corresponde a un componente de 67 kDa (presumiblemente, albúmina) y en el tercero (Pico N° 3) se reveló una banda de aproximadamente 60 kDa. El pico que eluye entre 0,2 y 0,3M de NaCl (Pico N° 2) correspondería al AcMo 5E1, ya que por SDS-PAGE se reveló una banda muy intensa con un PM superior a 94 kDa (no mostrado). Posteriormente se realizó un ensayo de ELISA indirecto frente al extracto de HC y solo se observó reactividad en las fracciones correspondientes al pico N°2. Este resultado confirma que el pico N° 2 corresponde al AcMo 5E1.

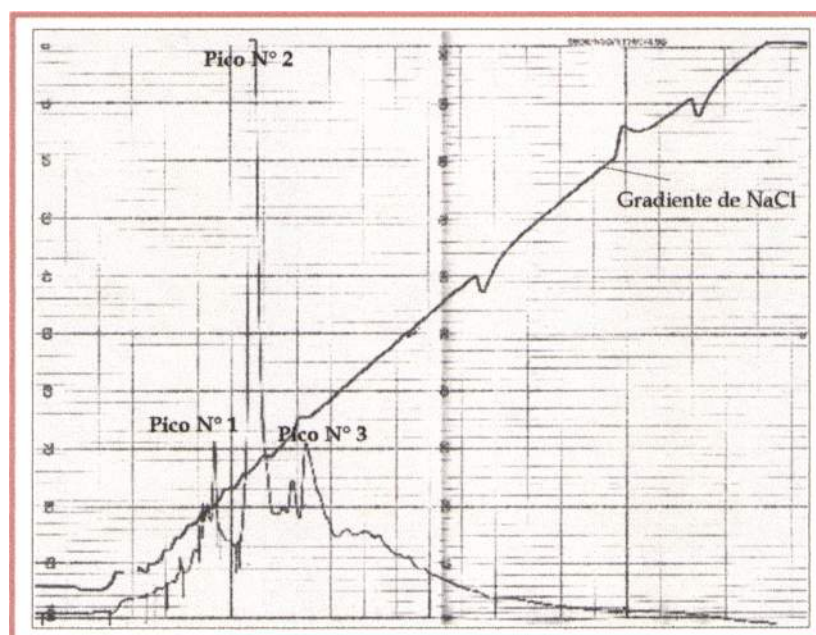


Figura 9. Cromatograma (lectura de absorbancia a 280 nm) de la purificación del AcMo 5E1 por cromatografía de intercambio iónico.

2.1.5. Ensayos de ELISA de captura con el anticuerpo monoclonal 5E1.

Como se mencionó anteriormente, el AcMo 5E1 fue seleccionado para la producción en mayor escala y fue purificado a partir de líquido ascítico. Se observó, mediante ensayos de captura, que el AcMo 5E1 a-HC purificado es capaz de captar su antígeno específico desde una mezcla antigénica compleja (extracto de HC), y que no presenta reactividad frente al extracto de PB en las condiciones del ensayo (Figura 10).

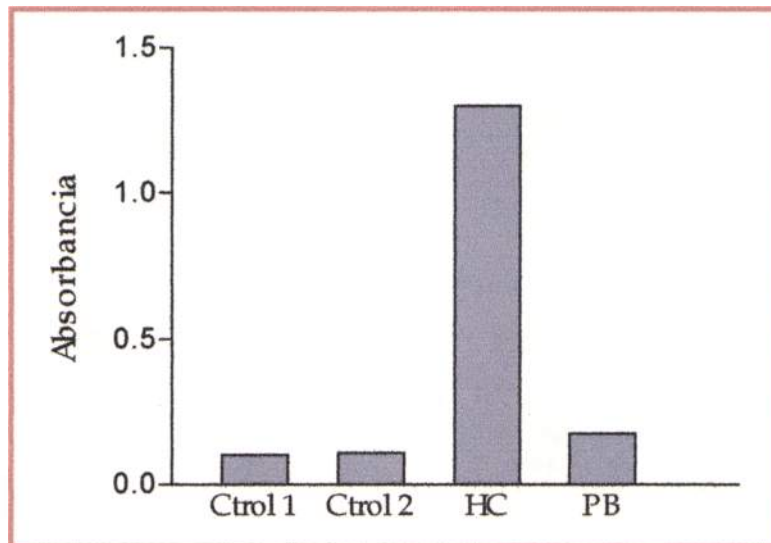


Figura 10. ELISA de captura con el AcMo 5E1. HC: extracto de HC; PB: extracto de PB; Ctról 1: sin antisuero de conejo; Ctról 2: sin antígeno.

2.2. Anticuerpos monoclonales anti-*Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2.1. Hibridomas obtenidos.

Con el fin de obtener hibridomas productores de AcMo específicos contra determinantes antigénicos de PB, se realizaron numerosos experimentos de hibridación de células somáticas siguiendo diferentes estrategias de sensibilización de los ratones BALB/c contra los antígenos de PB. En algunas oportunidades surgieron inconvenientes con el medio de cultivo selectivo (HAT) el cual no ejerció adecuadamente su efecto sobre el crecimiento celular, lo cual obligó a la interrupción de los experimentos en curso. Como consecuencia, se produjo una demora en la realización de nuevos experimentos.

Los primeros tres experimentos se llevaron a cabo inmunizando los ratones con el extracto celular de PB. Como resultado se obtuvieron ocho hibridomas positivos, cuatro de los

cuales mantuvieron su reactividad luego de sucesivas etapas de expansión y las respectivas clonaciones. Estos hibridomas se denominaron 2A8, 2C3, 3F11 y 5F10.

Al analizar los perfiles de reactividad por inmunoblotting de los antisueros específicos correspondientes a los ratones inmunizados con el extracto total, sólo se observó el reconocimiento de bandas con PM superiores a 30 kDa (Figura 11).

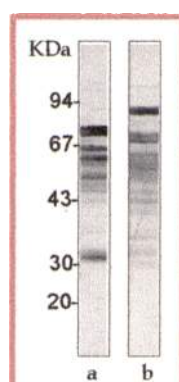


Figura 11. Inmunoblotting de suero de ratones (a y b) inmunizados con el extracto celular de PB frente al extracto celular de PB).

Por otro lado, como se mencionó en la sección 1.2.1, los componentes de reactividad cruzada con HC poseen en su gran mayoría PM superiores a 30 kDa. Debido a estas observaciones, evaluamos la posibilidad de obtener AcMo capaces de reconocer antígenos de menor PM para reducir las probabilidades de reactividad cruzada con HC. Dado que el extracto celular total de PB parecía no poseer las propiedades inmunogénicas adecuadas para nuestro propósito, se llevó a cabo un nuevo plan de inmunización empleando como inmunógeno una fracción de dicho extracto con componentes de PM inferior a 45 kDa aislada por electroelución. Con este protocolo de inmunización nunca se lograron obtener títulos altos de anticuerpos en los ratones inoculados (de 1/200 a 1/1500). De todas maneras, se realizaron dos hibridaciones que no fueron exitosas, dado que los hibridomas que arrojaron resultados positivos en el primer ELISA de screening no mantuvieron esta propiedad en ensayos posteriores. Esto determinó que dichos clones fuesen descartados.

Finalmente, viendo que los protocolos de hiperinmunización no produjeron los resultados esperados, se recurrió a la estrategia de infección subletal con una inoculación intraperitoneal de levaduras de PB. En este caso, los títulos de anticuerpos medidos por ELISA indirecto frente al extracto celular de PB son inferiores a los correspondientes a animales

hiperinmunizados (inferiores a 1/200). Se llevaron a cabo dos experimentos de fusión. El primero de ellos, se realizó a la octava semana post-infección, pero no se produjo un buen crecimiento celular y no se obtuvieron hibridomas. En el segundo experimento (realizado a las 11 semanas luego de la infección), se obtuvieron cinco hibridomas, de los cuales sólo el 3F9 mantuvo la reactividad frente al extracto celular de PB luego de las etapas de expansión y clonación correspondientes.

2.2.2. Especificidad de reconocimiento.

La totalidad de los AcMo obtenidos fueron reactivos frente al extracto de PB (cepa Utero) en ensayos de ELISA indirecto y dot-blot (no mostrado). Sin embargo, sólo los clones 2C3 y 3F9 mostraron reactividad en ensayos de inmunoblotting y revelaron bandas de entre 50 y 63 kDa (Figura 12 y Tabla IV).

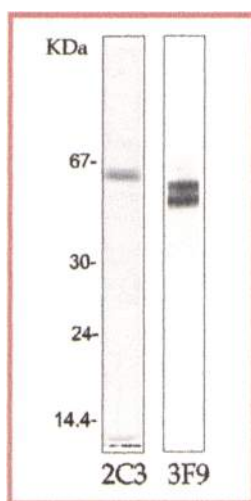


Figura 12. Inmunoblotting de AcMo anti-PB frente al extracto de PB.

Por otro lado, se observó que los clones 2A8, 3F11 y 5F10 reconocen componentes del extracto de HC en ensayos de ELISA indirecto, mientras que los AcMo 2C3 y 3F9 son específicos de PB (Tabla IV).

Tabla IV. Análisis de la reactividad de los hibridomas anti-PB frente a extractos de PB y HC por ELISA e inmunoblotting.

AcMo	Extracto PB		Extracto HC	
	ELISA	IB	ELISA	IB
2A8	Reactivo	No reactivo	Reactivo	No reactivo
2C3	Reactivo	63,0 kDa	No reactivo	No reactivo
3F9	Reactivo	48,4 kDa 54,6 kDa	No reactivo	No reactivo
3F11	Reactivo	No reactivo	Reactivo	No reactivo
5F10	Reactivo	No reactivo	Reactivo	No reactivo

IB: inmunoblotting

El tratamiento con periodato de sodio de las membranas transferidas con el extracto de PB no afectó el perfil de reactividad de los AcMo 2C3 a-PB y 3F9 a-PB, resultado que indica que los epitopes reconocidos por dichos anticuerpos no serían de naturaleza glucosídica (Figura 13).

Adicionalmente, se observó que el AcMo 3F9 a-PB revela una banda de aproximadamente 52,5 kDa en ensayos de inmunoblotting frente a la fracción V del extracto de PB obtenida por electroforesis preparativa.

Por otra parte, el AcMo 2C3 fue ensayado por inmunoblotting frente al extracto de PB sometido a electroforesis bidimensional a partir del cual se identificaron diferentes antígenos, entre los que se encuentra una proteína de 61 kDa y la hsp60 (membrana provista gentilmente por el grupo de la Dra. Celia Maria Almeida de Soares, de la Universidad Federal de Goiás, Brasil), contra las cuales no se observó reactividad.

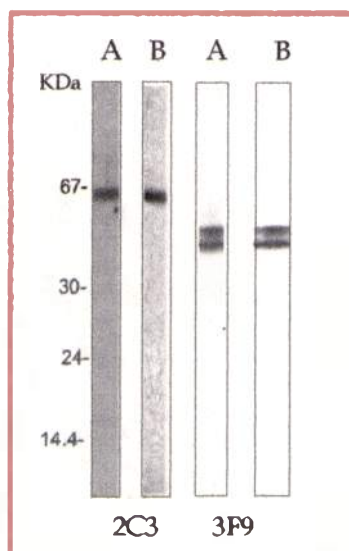


Figura 13. Immunoblotting de AcMo anti-PB frente al extracto de PB. A: membranas sin tratar; B: membranas tratadas con periodato de sodio.

2.2.3. Determinación de isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA de captura realizado a los AcMo anti-PB 2A8, 2C3, 3F11, 5F10 y 3F9 mostraron que todos pertenecen al isotipo IgG1.

2.2.4. Purificación de los anticuerpos monoclonales 2C3 y 3F9.

Dichos anticuerpos fueron seleccionados para la producción de líquido ascítico y posterior purificación debido a su especificidad de reconocimiento por componentes antigénicos de PB. Se utilizaron los mismos procedimientos que los oportunamente mencionados en la sección 2.2.4. para la purificación del AcMo anti-HC 5E1. De manera similar a los resultados mostrados en la Figura 9, en este caso pudimos observar la presencia de tres picos principales en el cromatograma. Según lo observado por SDS-PAGE y los resultados obtenidos por ELISA indirecto frente al extracto de PB, el segundo pico corresponde a la inmunoglobulina purificada (no mostrado).

2.2.5. Reactividad de los anticuerpos monoclonales 2C3 y 3F9 frente a antígenos de diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Los ensayos de ELISA captura desarrollados mostraron que los AcMo 2C3 a-PB y 3F9 a-PB son capaces de captar sus respectivos antígenos específicos desde el correspondiente extracto crudo de PB (cepa Utero) (Figuras 14a y 14b). En ambos casos se observó que la densidad óptica registrada frente al extracto de HC es similar a la del control sin antígeno,

por lo cual se consideró que la reactividad es significativamente menor a la reactividad frente al extracto específico.

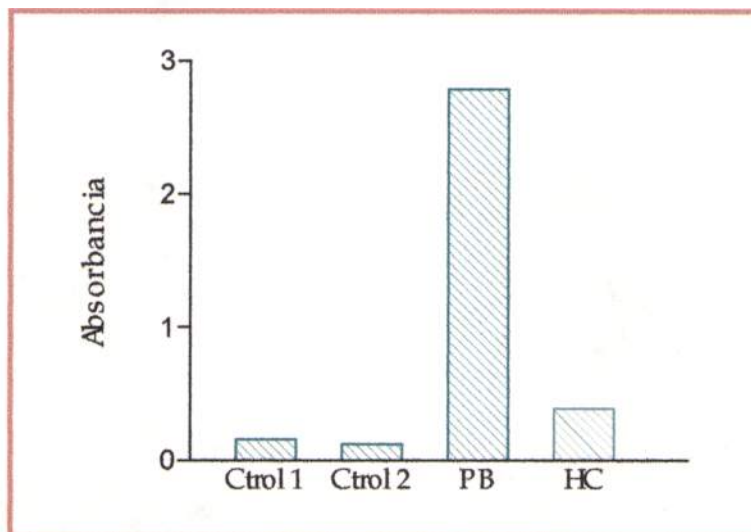


Figura 14a. ELISA de captura con el AcMo 2C3. HC: extracto de HC; PB: extracto de PB; Ctról 1: sin antisuero de conejo; Ctról 2: sin antígeno.

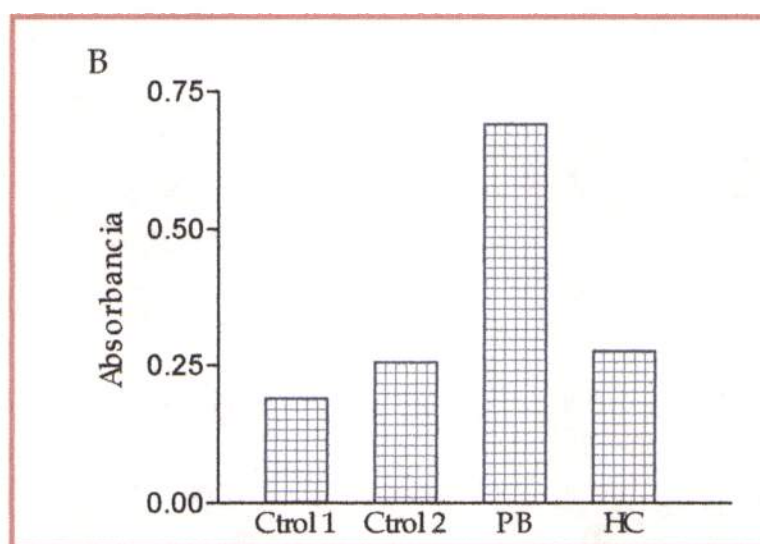


Figura 14b. ELISA de captura con el AcMo 3F9. HC: extracto de HC; PB: extracto de PB; Ctról 1: sin antisuero de conejo; Ctról 2: sin antígeno.

Por otro lado, ambos AcMo fueron capaces de reconocer su antígeno específico en extractos obtenidos a partir de otras cepas de PB, tanto en ensayos de captura como por inmunoblotting.

En ambos casos la mayor reactividad en el ensayo de ELISA de captura se observó frente a la cepa PbV9 (Figura 15), mientras que no se detectaron diferencias significativas en la reactividad frente al resto de las cepas ensayadas. Sin embargo, los experimentos con sueros

humanos mostrados posteriormente (sección 3.2.1), fueron realizados en su mayoría con la cepa Utero, originalmente seleccionada para la producción de antígenos.

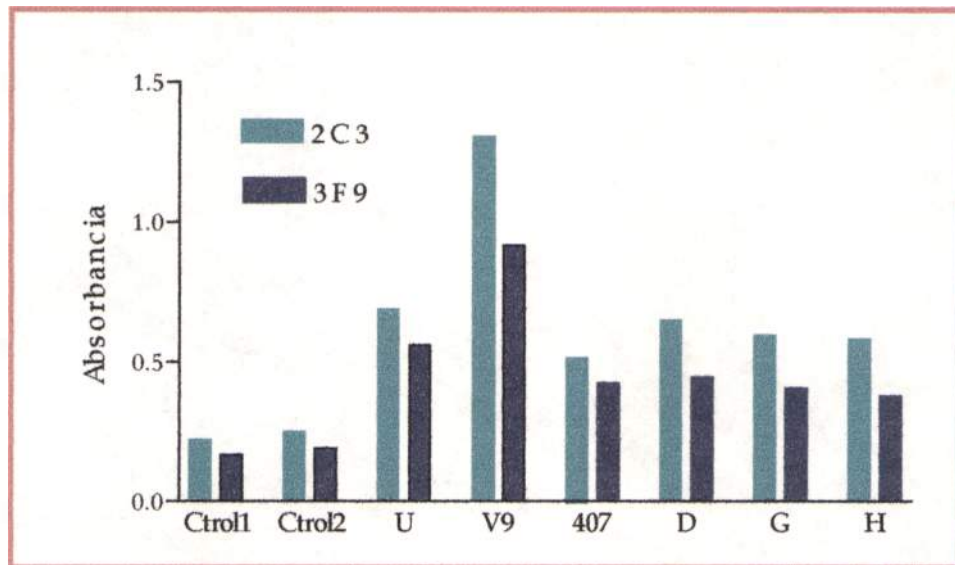


Figura 15. ELISA de captura con AcMo anti-PB 2C3 y 3F9 frente a diferentes cepas de PB. Ctról 1: sin antisuero de conejo; Ctról 2: sin antígeno; U: Utero; V9: PbV9; 407: Benitez407; D: Duarte; G: Gontchar; H: Heredia.

En los ensayos de inmunoblotting, ambos anticuerpos presentaron reactividad frente a todas las cepas de PB analizadas (Figura 16), aunque las bandas que se revelaron en el extracto correspondiente a la cepa PbV9 son ligeramente más intensas.

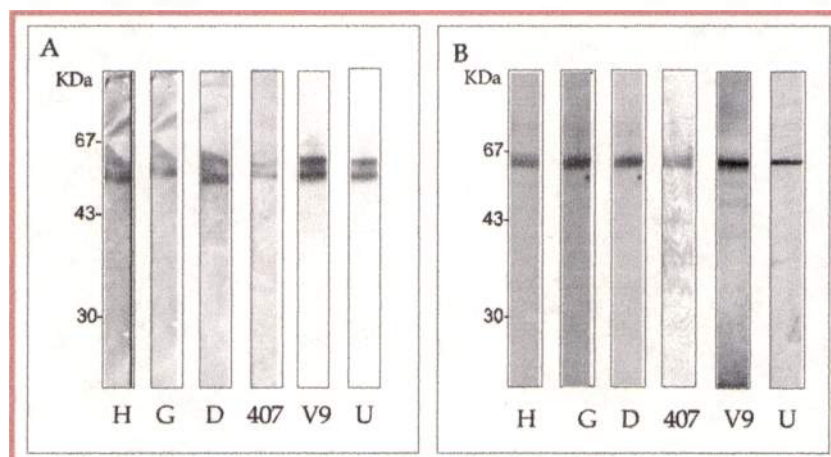


Figura 16. Inmunoblotting de AcMo anti-PB frente a diferentes cepas de PB. A: AcMo 3F9; B: AcMo 2C3. H: Heredia; G: Gontchar; D: Duarte; 407: Benitez407; V9: PbV9; U: Utero.

2.4. Otros experimentos desarrollados.

Adicionalmente se llevaron a cabo ensayos de cromatografía de afinidad empleando Sepharosa 4B (Pharmacia) y los anticuerpos monoclonales anti-PB 2C3 y 3F9, con el fin de purificar y posteriormente identificar los respectivos antígenos específicos. Hasta el momento no se han identificado los correspondientes antígenos.

3.MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS.

3.1.Reactividad de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a sueros de pacientes.

3.1.1.ELISA indirecto.

Se analizaron por ELISA indirecto frente al extracto de PB (cepa Utero), 51 sueros de pacientes con PCM, 38 sueros de pacientes con HP, 4 sueros de pacientes con aspergilosis, 2 sueros de pacientes con candidiasis y 20 sueros de dadores sanos, siguiendo el protocolo oportunamente descrito en Materiales y Métodos.

El ensayo reveló la presencia de anticuerpos específicos de tipo IgG en el 96% (49/51) de los individuos analizados (Tabla VIII y Figura 17). Sin embargo, también se obtuvo una lectura de absorbancia alta con uno de los sueros pertenecientes a individuos sanos (oportunamente descartado para el cálculo del valor de corte). Por otro lado, 2/3 pacientes con aspergilosis analizados fueron positivos en éste ensayo, mientras que los 2 sueros de pacientes con candidiasis no mostraron reactividad frente a PB en ésta prueba (Figura 17).

Al realizar el ensayo con pacientes con HP se observó que el 50% (19/38) de los sueros analizados arrojaron resultados positivos (Figura 17). Es importante destacar que los 19 pacientes con HP que resultaron positivos en este ensayo también presentaron anticuerpos específicos de tipo IgG frente al extracto de HC por ELISA indirecto, mientras que sólo en 8 de los 19 sueros restantes se detectaron anticuerpos contra HC en este tipo de ensayo. Por otro lado, dentro de los sueros que dieron un resultado positivo en este ensayo, se conoce que al menos 14 de ellos corresponden a pacientes HIV positivos, mientras que 4 de ellos pertenecen a individuos HIV negativos (Tabla IX).

Por otra parte, se observó que en 42 de los 44 sueros de pacientes con PCM crónica se detectaron anticuerpos específicos contra antígenos de PB, mientras que en el caso de pacientes con PCM aguda, los 7 sueros analizados fueron positivos en el ensayo.

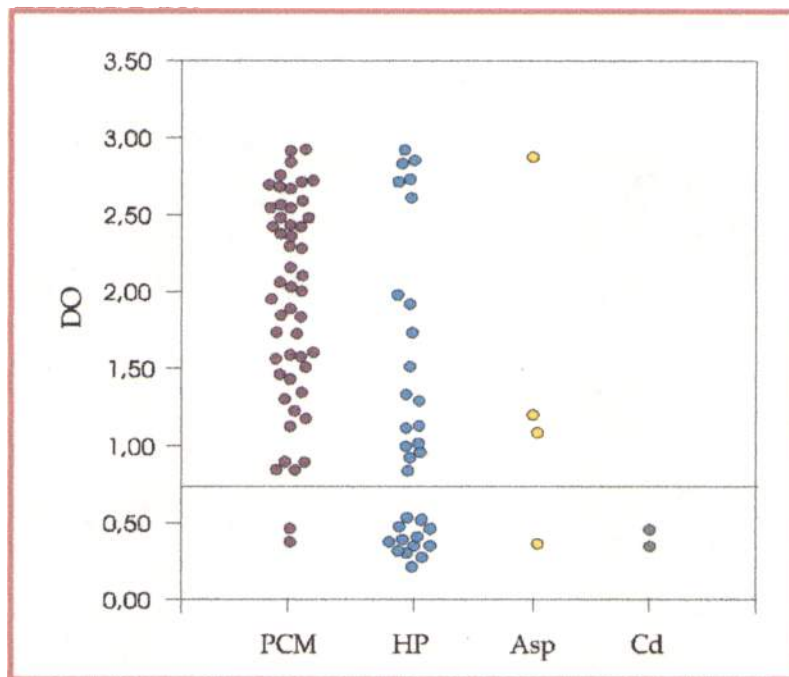


Figura 17. Resultados del ELISA indirecto con sueros humanos. PCM: paracoccidioidomicosis; HP: histoplasmosis; Asp: aspergilosis; Cd: candidiasis.

Los cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se hicieron utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

Donde: VP= verdaderos positivos; VN= verdaderos negativos;
FN= falsos negativos; FP= falsos positivos

Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos con la población analizada, se obtuvieron los siguientes valores:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{49}{49 + 2} \times 100 = 96\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{42}{42 + 22} \times 100 = 65,6\%$$

$$\text{VPP} = \frac{49}{49 + 22} \times 100 = 69\%$$

$$\text{VPN} = \frac{42}{42 + 2} \times 100 = 95,4\%$$

3.1.2. Inmunoblotting.

Todos los sueros correspondientes a pacientes con PCM, así como algunos sueros de individuos no enfermos fueron sometidos a ensayos de inmunoblotting frente a membranas transferidas con el extracto de PB (cepa Utero). Dada la gran cantidad de muestras, no fue posible estudiar todos los sueros simultáneamente en un mismo ensayo, lo cual introduce algunas variables adicionales a la hora de analizar los resultados obtenidos.

En las condiciones elegidas para la realización de este ensayo, se detectó la presencia de IgG específica contra el extracto de PB (cepa Utero) en el suero de 50 de los 51 pacientes (98%) con PCM analizados, los cuales revelaron una numerosa cantidad de bandas de diferentes PM. Por otro lado, los sueros de individuos sanos utilizados como control no reconocieron componentes en el extracto en las condiciones de éste ensayo (no mostrado).

A pesar de observarse zonas de reactividad comunes, el perfil y el número de bandas reconocidas son diferentes en los distintos individuos, tal como puede observarse en las Figuras 18, 19 y 20). Sin embargo, en más de la mitad de los sueros analizados se revelaron componentes con PM de aproximadamente 24,7-28,7 kDa, 50,7-53,7 kDa (que se destaca particularmente en el ensayo mostrado en la Figura 20) y 82,9-87,0 kDa (Tabla V).

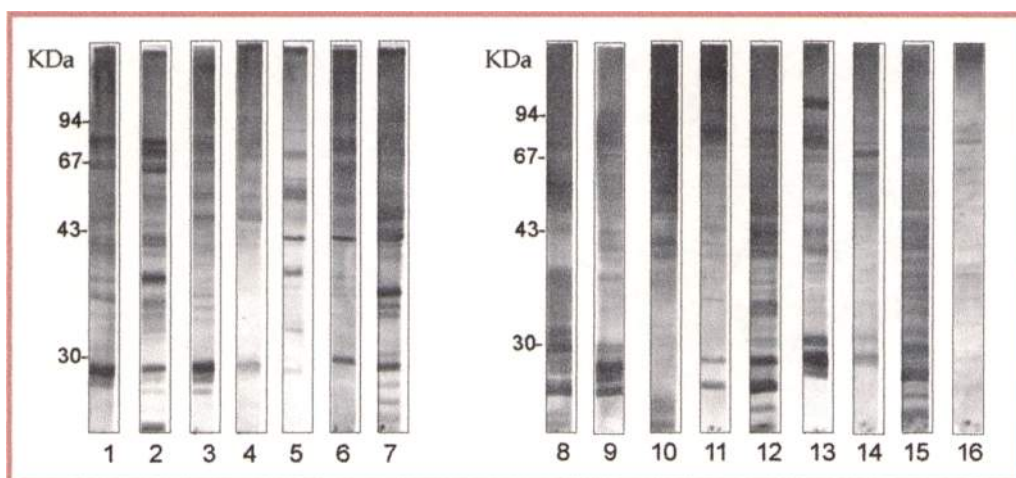


Figura 18. Inmunoblotting de sueros de pacientes con PCM (N° 1 a 16) contra antígenos de PB.

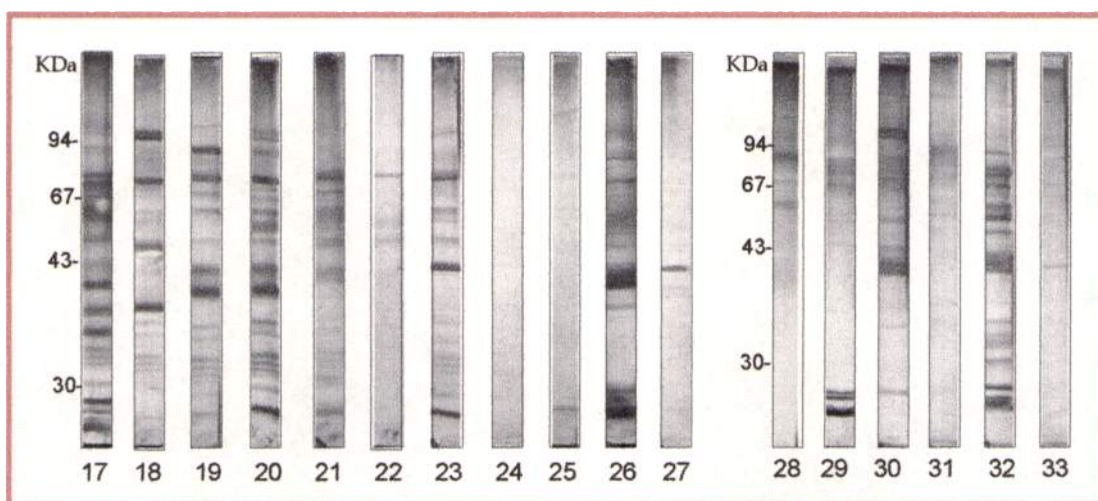


Figura 19. Inmunoblotting de sueros de pacientes con PCM (N° 17 a 33) contra antígenos de PB.

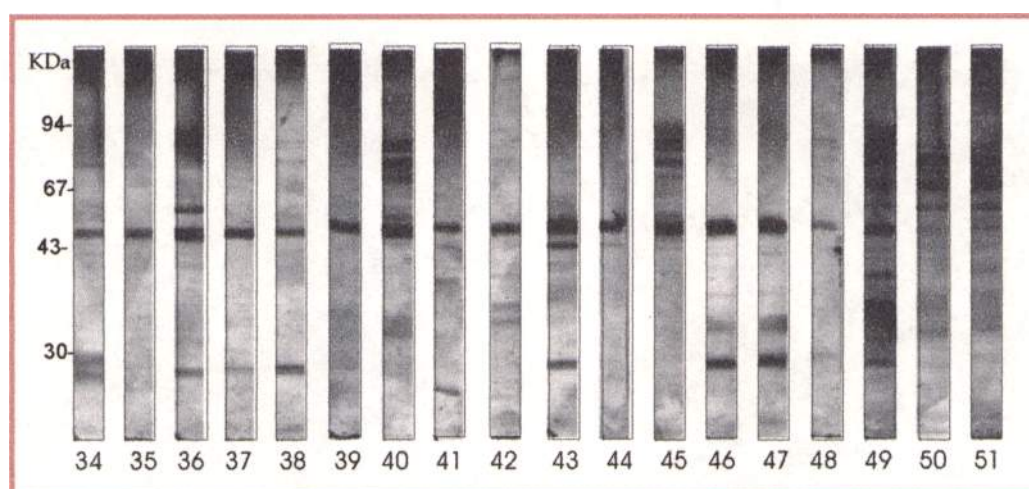


Figura 20. Inmunoblotting de sueros de pacientes con PCM (N° 34 a 51) contra antígenos de PB.

Tabla V. Componentes del extracto de PB revelados con mayor frecuencia en ensayos de inmunoblotting de pacientes con PCM.

Rango de PM	Porcentaje de sueros que la revelan
116,7 – 124,4 kDa	17/51 (33%)
82,9 – 87,0 kDa	30/51 (59%)
74,2 – 78,3 kDa	15/51 (29%)
56,2 – 57,4 kDa	17/51 (33%)
50,7 – 53,7 kDa	28/51 (55%)
24,7 – 28,7 kDa	29/51 (57%)

Al analizar los perfiles de reactividad correspondientes a sueros de pacientes con PCM crónica y los correspondientes a pacientes con forma aguda de la enfermedad, se observó que:

- no fue posible establecer un perfil característico para cada forma clínica de PCM.
- no se detectaron diferencias significativas entre los perfiles al comparar ambas formas clínicas de la enfermedad.

Adicionalmente, los sueros designados como N° 50 y N° 51 corresponden a muestras del mismo paciente antes (control de tratamiento) y después de una recaída, respectivamente. En ambos casos se observó el mismo perfil de bandas (Figura20).

Por otro lado, el suero N° 44 corresponde a una muestra tomada para control de tratamiento de un paciente cuya muestra antes del tratamiento es la N° 43. En este caso se observó que una banda de aproximadamente 25 kDa revelada por la muestra 43 no aparece en inmunoblotting de la muestra 44 (Figura 20).

Por otra parte, el ensayo de inmunoblotting de las diferentes cepas de PB estudiadas frente a un pool de sueros de pacientes con PCM mostró que, de manera similar a lo observado con antisueros específicos, existen diferencias en los perfiles de reactividad de cada extracto (Figura 21). En todos los casos se revelaron numerosas bandas entre 43 y 67 kDa. Con las cepas Duarte, Gontchar y Heredia, el perfil de reactividad fue prácticamente idéntico. Con la cepa Benitez407 no se detectaron componentes de PM inferior a 34 kDa, mientras que con la cepa PbV9 se observó una intensa banda a 27,5 kDa que no se reveló en el resto de los extractos.

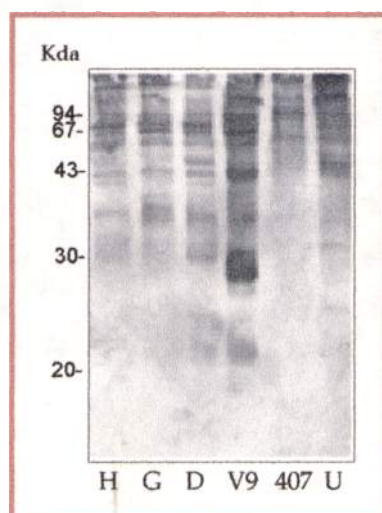


Figura 21. Inmunoblotting de un pool de sueros de pacientes con PCM frente a diferentes cepas de PB. H: Heredia; G: Gontchar; D: Duarte; V9: PbV9; 407: Benites407; U: Utero.

Adicionalmente, al analizar la reactividad por inmunoblotting frente a PB de 12 de los sueros pertenecientes a pacientes con HP (con resultado positivo en el ensayo de ELISA indirecto frente al extracto de PB), se observó que 8 de ellos revelaron una banda de aproximadamente 50 kDa, mientras que los 4 restantes fueron negativos (Figura 22). Los 12 pacientes analizados fueron seleccionados en base a su reactividad en los ensayos de ELISA captura frente a PB (Tabla IX).

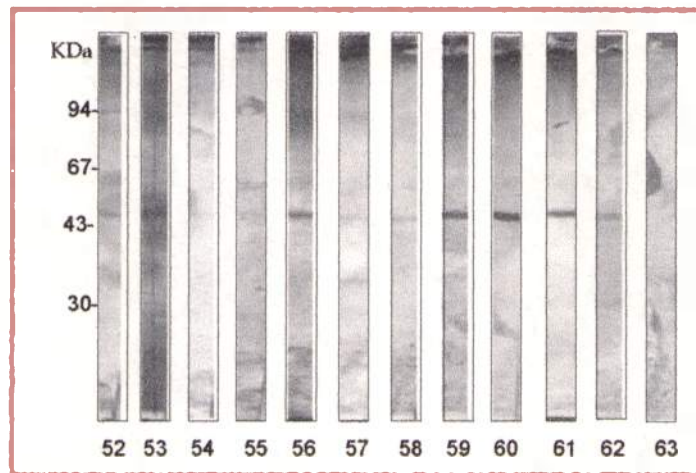


Figura 22. Inmunoblotting de sueros de pacientes con HP (N° 52 al 63) frente al extracto de PB.

Con respecto a los 3 sueros correspondientes a pacientes con aspergilosis que dieron resultado positivo en el ELISA indirecto frente al extracto de PB, se observó que todos reconocen una banda con un PM aproximado a 50 kDa y algunas bandas adicionales con PM menores (suero N° 90) y mayores (sueros N° 91 y 92) de 50 kDa (Figura 23).

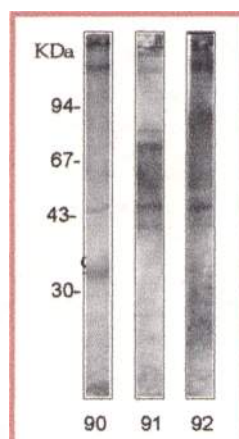


Figura 23. Inmunoblotting de sueros de pacientes con ASP (N° 90 al 92) frente al extracto de PB.

3.2. Utilización de anticuerpos monoclonales en el desarrollo de métodos serológicos de utilidad diagnóstica.

3.2.1. Ensayos de detección de anticuerpos.

Tal como se mencionó oportunamente en Materiales y Métodos, se desarrollaron dos ensayos de ELISA de captura, uno utilizando el AcMo 2C3 a-PB y otro utilizando el AcMo 3F9 a-PB, con el objetivo de detectar anticuerpos específicos en sueros de pacientes con PCM y evaluar la potencial utilidad de los mismos para métodos de diagnóstico serológico de dicha micosis.

Ensayo de captura con el AcMo 2C3 a-PB:

Por este método se analizaron 51 sueros de pacientes con PCM, 23 sueros de pacientes con HP, 4 sueros de pacientes con aspergilosis, 2 sueros de pacientes con candidiasis y 20 sueros de donadores voluntarios no enfermos. En este caso se empleó el extracto celular de PB obtenido a partir de la cepa Utero.

El ensayo desarrollado arrojó resultados positivos en el 70,6% (36/51) de los pacientes con PCM (Tabla VIII y Figura 24). No se observaron diferencias de reactividad entre los pacientes con una forma aguda o juvenil de la enfermedad (71,4%) y los pacientes con PCM crónica o forma adulta (70,4%) de dicha micosis (Tabla VI).

Por otro lado, se observó que 9 de los 23 pacientes (39,1%) con HP analizados resultaron positivos en este ensayo, mientras que la totalidad de los mismos presentó anticuerpos específicos contra antígenos de HC por ELISA indirecto. Los 4 sueros correspondientes a pacientes con aspergilosis y los 2 correspondientes a pacientes con candidiasis no fueron reactivos (Figura 24). No se observó reactividad en ninguno de los 20 sueros empleados como controles.

Empleando las fórmulas mencionadas en la sección 3.1.1., se llevaron a cabo los cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN correspondientes al método, obteniéndose los siguientes valores para la población estudiada:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{36}{36 + 15} \times 100 = 70,6\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{40}{40 + 9} \times 100 = 81,6\%$$

$$VPP = \frac{36}{36 + 9} \times 100 = 80\%$$

$$VPN = \frac{40}{40 + 15} \times 100 = 72,7\%$$

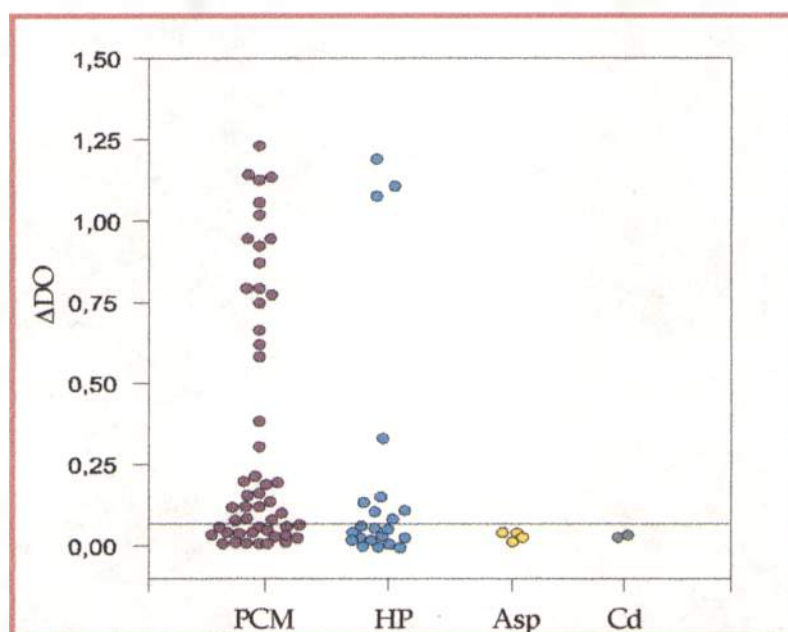


Figura 24. Resultados del ELISA de captura con el AcMo 2C3 anti-PB. PCM: paracoccidioidomycosis; HP: histoplasmosis; Asp: aspergilosis; Cd: candidiasis.

Tabla VI. Reactividad de sueros de pacientes con PCM crónica y juvenil en ELISA de captura con el AcMo 2C3 anti-PB.

Forma clínica	Positivos	Negativos
Diseminada crónica	31	13
Infanto-juvenil	5	2

Ensayo de captura con el AcMo 3F9 a-PB:

Por este método se analizaron 51 sueros de pacientes con PCM, 38 sueros de pacientes con HP, 4 sueros de pacientes con aspergilosis, 2 sueros de pacientes con candidiasis y 20 sueros de donadores voluntarios no enfermos. Para este ensayo se empleó un extracto celular obtenido a partir de levaduras de la cepa PhV9.

Se observó que en éste ensayo, el 78,4% (40/51) de los pacientes con PCM resultaron positivos (Tabla VIII y Figura 24). El porcentaje de positividad alcanzó el 75% dentro del grupo de pacientes con PCM crónica, mientras que todos los pacientes con forma infanto-juvenil de la enfermedad fueron positivos en éste ensayo (Tabla VII).

Al analizar sueros de individuos con otras micosis, se obtuvieron resultados positivos en 6/38 (15,8%) de los pacientes con HP (Figura 25). Es importante considerar que de los sueros de HP que resultaron positivos en este ensayo de captura, 4 fueron positivos en ELISA indirecto frente al extracto de PB, mientras que en 2 de los sueros dicho ensayo resultó negativo (sueros N° 62 y 63).

Por otro lado, 2 de los 4 pacientes con aspergilosis, con anticuerpos específicos contra el extracto de PB detectados por ELISA indirecto, también resultaron positivos en este ensayo. Los 2 sueros de pacientes con candidiasis y los 20 sueros empleados como controles fueron negativos (Figura 25).

De acuerdo a las fórmulas ya utilizadas en la sección anterior y a la población estudiada, los cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN correspondientes al método son:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{40}{40 + 11} \times 100 = 78,4\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{56}{56 + 8} \times 100 = 87,5\%$$

$$\text{VPP} = \frac{40}{40 + 8} \times 100 = 83,3\%$$

$$\text{VPN} = \frac{56}{56 + 11} \times 100 = 83,6\%$$

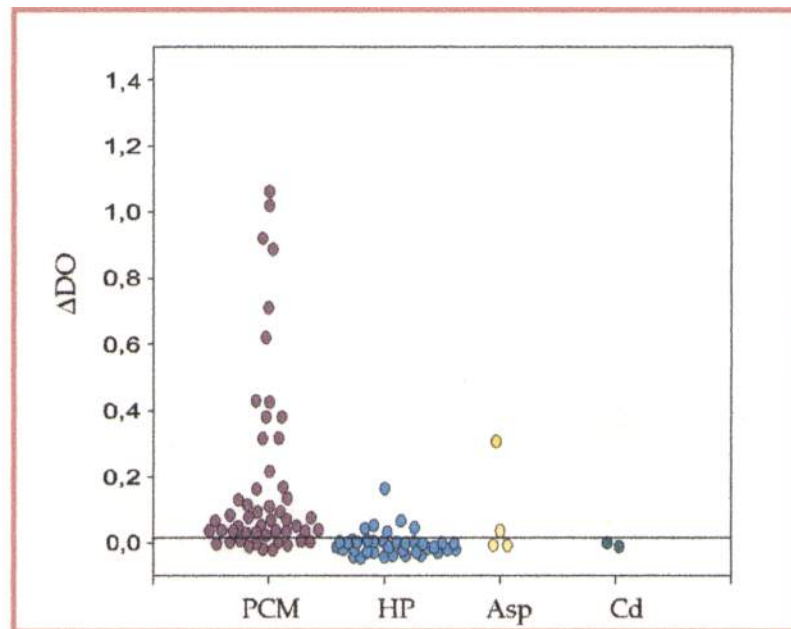


Figura 25. Resultados del ELISA de captura con el AcMo 3F9 anti-PB. PCM: paracoccidioidomycosis; HP: histoplasmosis; Asp: aspergilosis; Cd: candidiasis.

Tabla VII. Reactividad de sueros de pacientes con PCM crónica y juvenil en ELISA de captura con el AcMo 3F9 anti-PB.

Forma clínica	Positivos	Negativos
Diseminada crónica	33	11
Infanto-juvenil	7	0

Las tablas que se muestran a continuación (Tabla VIII y IX) contienen información relevante sobre los pacientes cuyos sueros fueron analizados por los diferentes métodos inmunoquímicos desarrollados, así como los resultados que arrojaron en cada uno de los ensayos antes mencionados.

Tabla VIII. Sueros de pacientes con PCM.

Nro	ID*	PCM	Edad	Observ	Sexo	ELISA Indirecto	ELISA Capt 2C3	ELISA Capt 3F9
1	P	dis-cron	Adulto		M	P	N	P
2	P	Inf-Juvenil	18 años		M	P	P	P
3	ND	dis-cron	Adulto		M	P	P	N
4	P	dis-cron	Adulto	disem cut	M	P	P	N
5	P	dis-cron	Adulto		M	N	P	P
6	P	dis-cron	Adulto		M	P	N	N

Nro	ID*	PCM	Edad	Observ	Sexo	ELISA Indirecto	ELISA Capt 2C3	ELISA Capt 3F9
7	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
8	P	dis-cron	Adulto	lar-pulmón	M	P	P	P
9	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
10	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
11	P	dis-cron	Adulto		M	P	N	N
12	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
13	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
14	P	dis-cron	Adulto		M	P	N	N
15	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
16	N	dis-cron	Adulto	recaídas	M	N	P	N
17	P	dis-cron	65 años		M	P	P	P
18	ND	dis-cron	43 años		M	P	N	P
19	P	dis-cron	Adulto		F	P	P	P
20	P	dis-cron	61 años		M	P	P	P
21	N	dis-cron	66 años		F	P	P	P
22	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	N
23	P	dis-cron	45 años		M	P	P	P
24	P	dis-cron	Adulto		F	P	N	N
25	ND	dis-cron	67 años		M	P	P	P
26	P	dis-cron	Adulto		M	P	P	P
27	P	dis-cron	63 años		M	P	P	P
28	N	dis-cron	Adulto		M	P	P	N
29	ND	dis-cron	Adulto		M	P	N	P
30	N	dis-cron	24 años		F	P	P	P
31	N	dis-cron	36 años		M	P	N	P
32	P	dis-cron	30 años		F	P	P	P
33	P	dis-cron	Adulto		F	P	N	N
34	N	dis-cron	48 años		M	P	P	P
35	N	dis-cron	34 años		M	P	N	P
36	P	dis-cron	55 años		M	P	P	P
37	P	dis-cron	50 años		M	P	N	P
38	P	dis-cron	45 años		F	P	P	N
39	N	dis-cron	43 años		M	P	P	P
40	P	dis-cron	44 años		F	P	P	P
41	N	dis-cron	59 años	ctrol trat	M	P	P	P
42	P	Inf-juvenil	7 años		M	P	N	P
43	P	dis-cron	37 años		M	P	P	P
44	P	dis-cron	37 años	ctrol trat	M	P	P	P
45	N	Inf-juvenil	7 años		M	P	N	P
46	ND	dis-cron	Adulto		M	P	N	P
47	ND	dis-cron	Adulto		M	P	N	P
48	P	Inf-juvenil	12 años		F	P	P	P
49	P	Inf-juvenil	8 años		M	P	P	P
50	N	Inf-juvenil	18 años	gang pura	M	P	P	P
51	N	Inf-juvenil	18 años	recaída	M	P	P	P

ID: inmunodifusión; Dis-cron: forma diseminada crónica; Inf-juvenil: forma infanto-juvenil; Capt: ELISA de captura; M= Masculino; F= Femenino; P= Positivo; N= Negativo; NR: no realizado; ND: dato no disponible. disen. Cut: diseminación cutánea; lar-pulmón: laringe y pulmón afectados; ctrol trat: control de tratamiento; gang pura: forma ganglionar pura;

*Datos disponibles al momento de comenzar el trabajo.

Tabla IX. Pacientes con otras micosis.

Nro	Micosis	Edad (años)	Sexo	HIV	ELISA ind. vs	ELISA ind. vs	ELISA capt.	ELISA capt.
					HC	PB	2C3	3F9
52	HP	ND	ND	ND	P	P	P	P
53	HP	61	M	N	P	P	P	N
54	HP	31	M	P	P	P	N	P
55	HP	34	M	P	P	P	P	P
56	HP	56	M	N	P	P	P	N
57	HP	35	M	P	P	P	P	N
58	HP	40	M	P	P	P	P	P
59	HP	30	M	P	P	P	P	N
60	HP	31	M	P	P	P	P	N
61	HP	34	M	P	P	P	P	N
62	HP	28	M	P	N	N	NR	P
63	HP	32	M	P	N	N	NR	P
64	HP	25	F	P	P	P	N	N
65	HP	27	M	P	P	P	N	N
66	HP	30	M	P	P	N	N	N
67	HP	27	F	P	P	P	N	N
68	HP	30	M	P	P	N	N	N
69	HP	27	M	P	P	N	N	N
70	HP	76	M	N	P	N	N	N
71	HP	ND	ND	ND	P	N	N	N
72	HP	29	M	P	P	P	N	N
73	HP	29	M	P	P	P	N	N
74	HP	59	M	N	P	P	N	N
75	HP	41	M	P	P	P	N	N
76	HP	43	M	P	N	N	NR	N
77	HP	36	F	P	N	N	NR	N
78	HP	27	M	P	N	N	NR	N
79	HP	28	F	P	N	N	NR	N
80	HP	34	F	P	N	N	NR	N
81	HP	29	M	P	N	N	NR	N
82	HP	31	M	P	N	N	NR	N
83	HP	32	M	P	N	N	NR	N
84	HP	29	M	P	P	P	NR	N
85	HP	28	M	P	N	N	NR	N
86	HP	61	M	N	P	P	N	N
87	HP	ND	ND	ND	N	N	N	N
88	HP	ND	ND	ND	P	N	N	N
89	HP	ND	ND	ND	P	N	N	N
90	ASP	ND	ND	ND	NR	P	N	P
91	ASP	Adulto	F	ND	P	P	N	P
92	ASP	ND	ND	ND	NR	P	N	N
93	ASP	ND	ND	ND	NR	N	N	N
94	Cd	ND	ND	ND	NR	N	N	N
95	Cd	ND	ND	ND	NR	N	N	N

HP: Histoplasmosis; ASP: Aspergilosis; Cd: Candidiasis

Ind: ELISA indirecto; Capt: ELISA de captura; M= Masculino; F= Femenino; P= Positivo; N= Negativo; NR: no realizado, ND: dato no disponible.

3.2.2. Ensayos de detección de antígenos circulantes.

Según se describió anteriormente en la sección 2.2.4, el AcMo 2C3 a-PB es capaz de captar su antígeno específico a partir del extracto de PB en un ensayo de ELISA de captura.

Con el objetivo de probar la utilidad de un ensayo de este tipo para la detección de antígeno circulante en suero de pacientes con PCM, se construyó una curva de calibración empleando diferentes cantidades de antígeno (de 0,02 a 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) en solución diluyente conteniendo 20% de suero humano normal. El ensayo se comporta linealmente entre 0,2 y 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, tal como se muestra en la Figura 26.

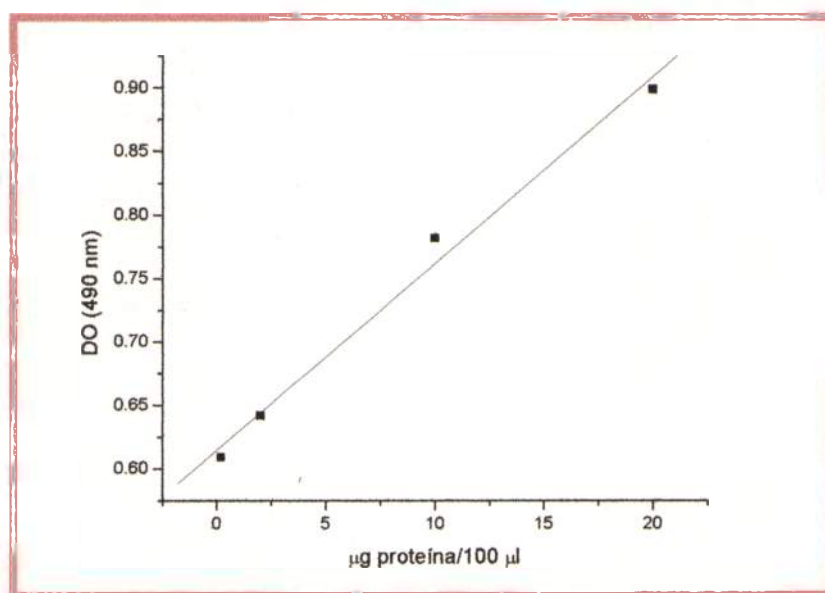


Figura 26. Curva de calibración de ELISA de captura con AcMo 2C3 a-PB para detección de antígenos de PB.

Los 51 sueros de pacientes con PCM fueron analizados por este método. Sin embargo, con éste ensayo no fue posible detectar antígeno en ninguna de las muestras estudiadas.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
 ▲
 Fecha.....
 Inv. B..... Inv..... B. 37044

4. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS APLICADOS A LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y ANTÍGENOS EN SUERO DE PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS.

4.1. Reactividad de antígenos de *Histoplasma capsulatum* frente a sueros de pacientes.

En los ensayos de ELISA indirecto se analizaron 38 sueros de pacientes con HP, de los cuales 27 son HIV positivos y 6 son HIV negativos (no se cuenta con información al respecto en el caso de los 5 pacientes restantes). El 68,4% (26/38) de los mismos presentaron anticuerpos de tipo IgG frente al extracto de HC (Tabla IX). Dentro de la población de dadores sanos, se obtuvieron resultados positivos para este ensayo hasta en un 15 % de las muestras analizadas (no mostrado). Los resultados de este ensayo correspondientes a los grupos de pacientes HIV positivos y negativos se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Resultados del ELISA indirecto frente al extracto de HC en pacientes con HP.

HIV	ELISA indirecto para HC	
	Positivos	Negativos
Positivo	16/27	11/27
Negativo	6/6	0/6

4.2. Métodos inmunoquímicos empleando anticuerpos monoclonales.

4.2.1. Ensayos de detección de anticuerpos.

Con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra los antígenos del extracto de HC reconocidos por el AcMo, se desarrolló un ensayo de ELISA de captura similar a los ya mencionados con los AcMo 2C3 y 3F9 anti-PB. Si bien se observó que el AcMo 5E1 anti-HC es capaz de captar su antígeno específico a partir del extracto de HC en un ensayo de este tipo, no fue posible detectar anticuerpos específicos en suero de pacientes con HC utilizando esta misma técnica.

4.2.2. Ensayos de detección de antígenos circulantes.

Dado que un alto porcentaje (al menos el 71%) de los pacientes con HP analizados en este trabajo son HIV positivos y que, como se observó previamente, para muchos de ellos no se obtienen resultados positivos en el ensayo de ELISA indirecto frente al extracto de HC, intentamos desarrollar un ensayo de detección de antígenos circulantes empleando el AcMo 5E1. Se probó un ensayo de inhibición, siguiendo las pautas generales del protocolo publicado por Gomez y col. (Gomez, 1997b), pero no fue posible obtener una respuesta adecuada para diferentes cantidades de antígeno.

Alternativamente y de manera similar a lo anteriormente descrito para PCM (sección 3.2.2), se recurrió a un ensayo de ELISA de captura.

En este caso se construyó una curva de calibración con cantidades conocidas de proteína total del extracto celular de HC (de 0,125 a 8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) en solución diluyente con un 20 % de suero normal humano y MgCl_2 20 mM.

Como se observa en la Figura 27, se obtuvo una respuesta lineal entre la lectura de absorbancia y la cantidad de proteína total de HC para concentraciones entre 0,25 y 8 μg de proteína por cada 100 μl , con un coeficiente de correlación de 0,9837. Cuando la concentración supera los 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, no se observa aumento de absorbancia.

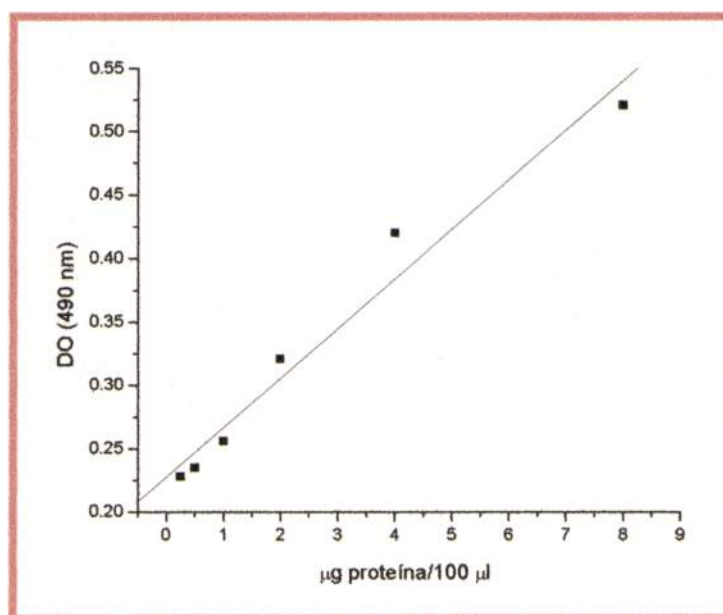


Figura 27. Curva de calibración de ELISA de captura con AcMo 5E1 a-HC para detección de antígenos de HC.

A pesar de los resultados obtenidos con la curva de calibración, no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los 38 sueros de pacientes con HP analizados.



Discusión

INDICE:

	<u>Página</u>
1.Caracterización inmunoquímica de componentes antigénicos presentes en extractos celulares de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>.	104
1.1.Caracterización de extractos fúngicos.	104
1.1.1. Perfil proteico por electroforesis.	104
1.1.2.Antigenicidad frente a antisueros específicos.	106
1.2.Reactividad cruzada entre <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i> .	107
1.3.Separación de componentes del extracto de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> por electroforesis preparativa.	108
2.Anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>.	110
2.1.Anticuerpos monoclonales anti- <i>Histoplasma capsulatum</i> .	110
2.2.Anticuerpos monoclonales anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	112
2.3.Consideraciones generales.	114
3.Métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de paracoccidiomicosis.	115
3.1.Reactividad de antígenos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> frente a sueros de pacientes.	115
3.1.1.ELISA indirecto.	115
3.1.1.Inmunoblotting.	117
3.2.Utilización de anticuerpos monoclonales en el desarrollo de métodos de utilidad diagnóstica.	122
3. 2.1.Ensayos de detección de anticuerpos.	122
3. 2.2.Ensayos de detección de antígenos circulantes.	127
4.Métodos inmunoquímicos aplicados a la detección de anticuerpos específicos y antígenos en suero de pacientes con histoplasmosis.	129

4.1.Reactividad de antígenos de <i>Histoplasma capsulatum</i> frente a sueros de pacientes.	129
4.2.Métodos inmunoquímicos empleando anticuerpos monoclonales.	130
4.2.1.Ensayos de detección de anticuerpos.	130
4.2.2.Ensayos de detección de antígenos.	130

1. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE COMPONENTES ANTIGÉNICOS EN EXTRACTOS CELULARES DE *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

1.1. Caracterización de extractos fúngicos.

1.1.1. Perfil proteico por electroforesis.

De acuerdo a lo observado por electroforesis, los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de levaduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* y los correspondientes sobrenadantes de cultivo contienen una gran variedad de componentes proteicos con un rango de pesos moleculares de entre 17 y 100 kDa (Figura 1).

En el caso de PB, estos resultados concuerdan con lo observado por Casotto para extractos celulares de la cepa PB Linder 2511 preparados por cosecha de las levaduras a los 8 días de cultivo (Casotto, 1990) y para extractos celulares correspondientes a otras cepas de PB (Casotto, 1991). Es de destacar que nuestro protocolo de obtención de los extractos es una adaptación del método utilizado por dicho autor, lo cual refuerza la validez de las comparaciones que se realicen. Otros autores han informado resultados similares con preparaciones antigénicas diferentes como "cell-free antigens" (Blotta, 1993) y filtrado de sobrenadantes de cultivo (Vaz, 1998), obtenidas a partir de distintas cepas de PB.

Tal como lo indican los datos aportados por numerosos investigadores respecto al polimorfismo genético observado en pruebas de RFLP y RAPD (Calcagno, 1998; Niño-Vega, 2000a), no sería extraño encontrar diferencias en los perfiles electroforéticos de los extractos celulares obtenidos entre las diferentes cepas de PB, y de hecho, esto es lo que se observa con las cepas utilizadas en este trabajo (Figura 2). Observaciones similares fueron descritas por Mendes-Giannini y col. al analizar, por SDS-PAGE, extractos antigénicos ricos en polisacáridos obtenidos a partir de 9 cepas diferentes de PB (Mendes-Giannini, 1995). Adicionalmente, Salem-Izacc y col. observaron diferencias en los patrones de proteínas analizados por electroforesis bidimensional (tanto en la fase miceliar como levaduriforme) de siete cepas de PB, donde la mayoría de los componentes revelados posee PM de entre 30 y 80 kDa (Salem-Izacc, 1997), lo cual concuerda con nuestras observaciones sobre las seis cepas de PB estudiadas.

En cuanto a la cepa Utero, ha sido caracterizada como una cepa de virulencia intermedia y con baja producción de gp-43 en el sobrenadante de cultivo (Gago, 1995; Canteros, 2000). En este último aspecto, los resultados son congruentes con nuestras observaciones, ya que dicho antígeno no es uno de los predominantes en los extractos celulares analizados, ni en las muestras correspondientes al sobrenadante de cultivo.

En el caso de HC, se han empleado fundamentalmente antígenos exocelulares, aunque también existen reportes de la utilización de antígenos celulares obtenidos por ruptura de levaduras (Kamel, 1989), pero no se ha hecho demasiado hincapié en cuanto a la composición de estos últimos. Los trabajos se han centrado básicamente en el estudio de los antígenos H y M, ya que a ellos corresponden las dos bandas de precipitación que se observan en las pruebas de inmunodifusión (una de las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de HP). Dado que los PM informados para ambas proteínas son variables debido al diferente grado de glicosilación (H: entre 108 y 120 kDa; M: entre 70 y 94 kDa) y que los mismos se encuentran dentro del rango de PM observados en nuestro extracto de HC (Figura 1), es muy probable que dichos componentes estén presentes en nuestras preparaciones antigénicas aunque no hayan sido específicamente identificados. No se observan bandas predominantes de PM cercanos a los correspondientes a los antígenos H y M en nuestros geles desnaturalizantes teñidos con plata (Figura 1), lo cual podría deberse al hecho de que ambos componentes han sido descritos como mayoritarios en sobrenadantes filtrados de cultivo y no en preparaciones de antígenos citoplasmáticos (Green, 1985; Zancopé-Oliveira, 1994). De todas maneras, en nuestro caso, dichos componentes no fueron identificados como predominantes en las muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo de HC en geles sometidos a tinción con plata.

En cuanto a las características de los extractos obtenidos a partir de los restos de pared celular y membrana de PB y de HC, no concuerdan con los resultados informados por Gomez y col., cuyo protocolo de obtención de dicho extracto utilizamos como referencia. Dichos autores obtuvieron un extracto de pared celular y membrana a partir de levaduras de HC (cepa G217B), en el cual observaron un gran número de bandas con PM desde 14 hasta más de 200 kDa por SDS-PAGE (Gomez, 1991a), mientras que nosotros observamos sólo una o dos bandas predominantes en cada extracto. Las diferencias observadas entre nuestros

resultados y los obtenidos por este grupo, podrían deberse a que se utilizaron distintas cepas de HC y que las condiciones de cultivo de los microorganismos fueron diferentes (distintos tiempos y medios de cultivo).

1.1.2. Antigenicidad frente a antisueros específicos.

Según lo observado en los ensayos de ELISA indirecto e inmunoblotting, todos los extractos celulares, tanto de PB como de HC, contienen componentes con capacidad antigénica (Tabla I y Figura 3).

En el caso de PB, los resultados observados aquí en los ensayos de inmunoblotting con antisueros específicos de conejo no son discordantes con los que se presentan en bibliografía con diversas preparaciones antigénicas, en referencia a la amplia variedad de componentes antigénicos reconocidos y el rango de PM de las bandas reveladas (13.8 a 97 kDa) (Figura 3a). En este sentido, Vaz y col. obtuvieron resultados comparables por inmunoblotting, al enfrentar sobrenadantes filtrados de cultivo de las cepas Pb18 y Pb265 con sueros de ratones infectados con dichas cepas, revelando bandas de entre 10 y 82 kDa (Vaz, 1992; 1998). Por otro lado, no es extraño encontrar diferencias en los perfiles de reconocimiento de las distintas cepas de PB frente al mismo antisuero en los ensayos de inmunoblotting (Figura 3b), ya que como se mencionó previamente, existen diferencias en los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis. Estas observaciones también concuerdan con los resultados encontrados en la bibliografía, dado que los distintos autores utilizan diferentes cepas de PB, lo cual implica que las características de las preparaciones antigénicas obtenidas no sean homogéneas. Esto conduce a diferencias en los perfiles de reconocimiento de antígenos de un mismo huésped infectado o inmunizado frente a antígenos provenientes de distintas cepas de PB. Esta variabilidad característica del *Paracoccidioides brasiliensis* es uno de los inconvenientes que se presenta en el momento de intentar estandarizar un método de diagnóstico serológico de alta sensibilidad con antígenos purificados o recombinantes.

Con respecto a HC, los trabajos se han dirigido hacia la caracterización de reactividad antigénica de las proteínas H (108-120 kDa) y M (70-94 kDa) tanto en su forma nativa como recombinante (Zancopè-Oliveira, 1999, Pizzini, 1999). Negroni y col., obtuvieron un exoantígeno de HC (a partir de sobrenadantes de cultivo de fase levaduriforme), en el cual sólo dos fracciones de PM 66 y 97 kDa mostraron ser antigénicas (Negroni, 1998). En nuestro caso, los antisueros específicos muestran reactividad contra una gran cantidad de

componentes de PM entre 45 y 100 kDa, y la cercanía de las bandas reveladas dificulta enormemente la identificación e individualización de los antígenos reconocidos. Sin embargo, se destacan dos bandas de 87 y 103 kDa (Figura 3a), que podrían corresponder a determinadas isoformas (según el grado de glicosilación) de los antígenos M y H respectivamente, los cuales no pudieron ser oportunamente revelados en nuestros geles desnaturalizantes. No pudimos confirmar esta hipótesis por no contar con antisueros específicamente dirigidos contra estos antígenos, sin embargo el hecho de que la presencia de dichas proteínas haya sido descrita en numerosas cepas de HC, aumenta en gran medida la probabilidad de que nuestra hipótesis sea correcta.

1.2 Reactividad cruzada entre *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

Si bien son numerosas las publicaciones que demuestran la existencia de reactividad cruzada entre PB y HC a través de la aplicación de métodos serológicos para la detección de anticuerpos específicos en enfermos e individuos infectados, no se han encontrado reportes en los que se haya estudiado éste aspecto con la metodología aplicada en este trabajo. Kumar y col., mediante estudios de la reactividad por inmunoblotting de antisueros de conejo producidos contra antígenos de HC frente a extractos antigénicos de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, observaron la presencia de antígenos de reactividad cruzada entre las especies mencionadas (Kumar, 1985).

El análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoblotting (Figuras 4a y 4b) y ELISA competitivo secuencial (Figuras 5a y 5b) refleja dos aspectos importantes que deben ser tenidos en cuenta:

- que existen numerosos componentes de reactividad cruzada entre ambas especies fúngicas
- que existe variabilidad en la respuesta de anticuerpos de animales inmunizados con el mismo extracto de PB frente al extracto de HC

El primero de ellos es congruente con la existencia de una estrecha relación taxonómica entre ambas especies. Si bien la metodología aplicada aquí no nos permite asegurar que los componentes de reactividad cruzada detectados correspondan a proteínas idénticas, los resultados obtenidos sugieren la existencia de numerosos epitopes compartidos entre muchos de los componentes antigénicos presentes en los respectivos extractos celulares.

El segundo aspecto está relacionado al hecho de que distintos animales son capaces de responder de manera diferente, al menos desde el punto de vista de la especificidad de los anticuerpos producidos, frente al mismo inmunógeno. Estos hechos se reflejan en los resultados del inmunoblotting donde se observa que el antisuero anti-PB 1 solo reconoce un número pequeño de componentes de reactividad cruzada frente al extracto de HC comparado con el antisuero anti-PB 2 (Figura 4a). Estos resultados se correlacionan con lo observado en el ensayo de ELISA competitivo secuencial, donde el antisuero anti-PB 1 no es capaz de inhibir el 100% del reconocimiento de los antígenos presentes en el extracto de HC (Figura 5b).

1.3. Separación de componentes del extracto de *Paracoccidioides brasiliensis* por electroforesis preparativa.

Como se mencionó oportunamente, existen varios antígenos de PB que han sido purificados a partir de mezclas antigénicas complejas de diferente naturaleza (extractos celulares, sobrenadantes de cultivo, etc). Entre ellos se encuentran la gp-43, la proteína de 27 kDa, la hsp60, la proteína de 87 kDa, y algunos otros antígenos que han sido identificados recientemente y que están siendo caracterizados.

Dentro de las metodologías utilizadas para la separación de componentes proteicos a partir de mezclas antigénicas, podemos encontrar la cromatografía de intercambio iónico (Zancopé-Oliveira, 1993), la cromatografía de exclusión molecular (Puccia, 1986) y la electroforesis preparativa (Diez, 2002). Esta última técnica ha sido la de elección de nuestro caso y mediante la misma se ha logrado una buena separación de algunas fracciones del extracto celular de PB (cepa Utero) de acuerdo de su peso molecular (Figura 6).

Dentro de las fracciones seleccionadas, la fracción I posee un PM de 24,2 kDa, cercano al correspondiente a la proteína de 27 kDa (Mc Ewen, 1996) y a un componente de un extracto celular con PM estimado de 23 kDa descrito previamente por Casotto (Casotto, 1991). Dicha fracción es la única, dentro de las seleccionadas, que ha presentado reactividad frente a un pool de sueros de pacientes con PCM por inmunoblotting (Tabla II). Este último resultado, junto con el hecho de que en los trabajos citados anteriormente se observa un alto porcentaje de reactividad frente sueros de enfermos con PCM, sugieren la posibilidad de que estemos frente a la misma proteína.

La fracción II corresponde a una banda más ancha, con un PM de entre 41,0 y 43,8 kDa (Figura 6 y Tabla II). Esta característica nos lleva a tener en cuenta uno de los antígenos de PB mejor descritos, y considerado por algunos autores como el más importante: la glicoproteína de 43 kDa (gp-43). Si bien la fracción II es antigénica frente a un antisuero específico, no fue reconocida por el pool de pacientes con PCM. Este resultado siembra la fuerte sospecha de que, o bien estamos frente a proteínas diferentes, o en nuestro extracto está presente una isoforma de gp-43 que no es reconocida por los sueros de pacientes que forman el pool (Souza, 1997).

La fracción VI posee un PM aproximado de 62,9 kDa, lo cual pone en consideración la potencial relación con dos antígenos de PB ya descritos: la proteína de shock térmico de 60 kDa (hsp60) (Izacc, 2001) o una proteína de 61 kDa que presenta homología con la familia de las catalasas fúngicas (da Fonseca, 2001). Tanto la hsp60 como la proteína de 61 kDa son reconocidas por sueros de pacientes con PCM, siendo ésta la principal diferencia con lo observado con la fracción VI. Además, la fracción VI muestra reactividad cruzada con un antisuero específico para antígenos de HC, mientras que con respecto a las proteínas mencionadas anteriormente se cuenta sólo con información acerca de reactividad cruzada frente a pacientes con HP: positiva en el caso de la hsp60 (Cunha, 2002), y negativa en el caso de la proteína de 61 kDa (da Fonseca, 2001).

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA DETERMINANTES ANTIGÉNICOS DE *Paracoccidioides brasiliensis* E *Histoplasma capsulatum*.

2.1. Anticuerpos monoclonales anti-*Histoplasma capsulatum*.

Todos los AcMo obtenidos en nuestro laboratorio revelan bandas en ensayos de inmunoblotting en las condiciones en las que se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante.

Existen varios trabajos sobre obtención y caracterización de AcMo dirigidos contra antígenos de HC.

En 1986, Reiss y col. obtuvieron un AcMo (clon EC2) capaz de reconocer dos bandas de entre 70 y 75 kDa presentes en la histoplasmina en ensayos de inmunoblotting, sugiriendo que se trataba del antígeno M (Reiss, 1986). Posteriormente, Hamilton y col. informaron la obtención de un AcMo capaz de revelar una fracción de entre 70 y 75 kDa a partir de una mezcla antigénica de fase levaduriforme y que presentaba una cierta reactividad cruzada con componentes de extractos de PB y *Sporothrix schenckii* con el mismo PM (Hamilton, 1990). Más recientemente, se ha publicado el empleo de un AcMo en la detección de un antígeno de 70 kDa en suero y orina de pacientes con HP (Gomez, 1997).

Nuestros AcMo 5E1 y 5B8 presentan un perfil de reactividad muy similar al de los de los AcMo mencionados anteriormente ya que reconocen bandas de 69,5 y 75,7 kDa en el extracto celular de HC, pero sólo el último de ellos presenta reactividad cruzada con el extracto de PB (Figura 7 y Tabla III).

Por otro lado, Kamel y col. obtuvieron un panel de AcMo dirigidos contra antígenos celulares de HC, capaces de reconocer componentes de fase levaduriforme y micelial en diferentes cepas (Kamel, 1989). Las características de reactividad de los clones mencionados en ensayos de inmunoblotting, se resumen en la siguiente tabla:

AcMo	Isotipo	Inmunoblotting
1	IgG2b	13, 16, 21, 28, 44, 62 y 72 kDa
2	IgG3	21, 28, 44, 62 y 72 kDa
3	IgG1	28, 44 y 72 kDa
4	IgG3	No reactivo

Kamel, 1989

Además, los autores observaron que los AcMo 1 y 2 reconocían componentes de fase levaduriforme de HC y de *Blastomyces dermatitides*, mientras que los AcMo 3 y 4 mostraban un de espectro más amplio de reactividad cruzada con otros hongos y microorganismos:

-AcMo 3: con *P. brasiliensis*, *B. dermatitides*, *Sporothrix schenckii*, *Candida albicans*

-AcMo 4: con *B. dermatitides*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Nuestros resultados comparten, de alguna manera, ciertas características con las observaciones de los autores recientemente citados. Entre ellas podemos mencionar:

-que todos los AcMo revelan más una banda en ensayos de inmunoblotting cuando son enfrentados a un extracto antigénico de HC. Según lo mostrado oportunamente en la Figura 7, los AcMo 5E1 y 5B8 revelan dos bandas (69,5 y 75,7 kDa), el clon 3A12 reconoce tres bandas (66,1; 69,3 y 83,6 kDa), y en el caso de los clones 5B1 y 4D2 se revelan cuatro bandas (63,4; 72,6; 84,4 y 102 kDa). Esto podría deberse a que los epitopes reconocidos se expresen en más de un componente antigénico, o bien a que los antígenos que contienen dichos epitopes pueden ser polímeros que se rompen en fragmentos de diferente PM.

-que existe una gran similitud entre los perfiles de reactividad de los diferentes AcMo obtenidos. Los AcMo 4D2 y 5B1 revelan el mismo número de bandas con pesos moleculares coincidentes (Tabla III), mientras que los clones 5E1 y 5B8 muestran reactividad contra dos bandas de 69,5 y 75,7 kDa. Este resultado, tal como ocurre en el caso de los trabajos previamente citados en esta sección, sugiere la presencia de ciertos componentes antigénicos de HC que parecen poseer una mayor capacidad inmunogénica, dado que la cantidad de AcMo capaces de reconocer determinantes antigénicos sobre los mismos es mayor que frente a otros componentes.

-que alguno de los anticuerpos obtenidos presenta reactividad cruzada con otros hongos. En nuestro caso, el AcMo 5B8 reconoce dos bandas de aproximadamente 52,8 y 60,3 kDa en el extracto celular de PB (Tabla III); cabe destacar que no se analizó la reactividad frente a extractos antigénicos obtenidos a partir de otras especies fúngicas. Además, el AcMo 5B8 revela el mismo perfil de bandas que el AcMo 5E1 en el extracto de HC, mientras que este último no presenta reactividad cruzada con PB. Esta situación también se observa con el AcMo 3 y los AcMo 1 y 2 de Kamel y col., donde el primero reconoce componentes de igual PM que los anteriores en el extracto celular de HC y a su vez presenta reactividad cruzada con

PB, mientras que los otros dos no son reactivos frente al PB. Esto indica claramente que ambos anticuerpos reconocen diferentes determinantes antigénicos, pero los resultados obtenidos frente al extracto de HC en el inmunoblotting podrían explicarse teniendo en cuenta que:

- los anticuerpos podrían estar reconociendo diferentes epitopes sobre el mismo antígeno,
- los AcMo podrían reconocer diferentes epitopes sobre antígenos con el mismo PM (bandas compuestas por más de una proteína)

Los ensayos realizados hasta el momento no nos permiten diferenciar ambas situaciones.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados del tratamiento con periodato de sodio, nuestros AcMo anti-HC reconocen mayoritariamente epitopes de naturaleza peptídica. Este hecho es destacable dado que existen numerosas publicaciones en la que se demuestra que la eliminación de epitopes glucosídicos (química o enzimáticamente) disminuye drásticamente los porcentajes de reactividad cruzada de los antígenos de HC con sueros de pacientes con otras micosis (Zancopé-Oliveira, 1994; Zancopé-Oliveira, 1999). De allí la importancia de contar con AcMo capaces de reconocer epitopes proteicos para ser empleados en el desarrollo de métodos inmunoquímicos destinados al diagnóstico de la enfermedad.

2.2. Anticuerpos monoclonales anti-*Paracoccidioides brasiliensis*.

La bibliografía disponible referida a la obtención y caracterización de AcMo contra antígenos de PB no es abundante. Figueroa y col. obtuvieron un AcMo específico contra antígenos de fase levaduriforme de PB capaz de reconocer un antígeno de 70-75 kDa por inmunoblotting (Figueroa, 1990). Posteriormente fue publicado el empleo de un AcMo (capaz de reconocer epitopes glicosilados sobre una proteína de 22-25 kDa) en pruebas de inmunohistoquímica (Figueroa, 1994). En 1994, Camargo y col. caracterizaron un panel de AcMo específicos para gp-43 (purificada a partir de sobrenadante de cultivo de la cepa B-339) y no detectaron reactividad cruzada con antígenos de HC, *A. fumigatus* y *C. albicans*. Más recientemente, Gomez y col. obtuvieron un AcMo específico contra una proteína de 87 kDa presente en un extracto celular de PB (cepa B-339), que no presenta reactividad cruzada con HC, pero sí con *A. fumigatus* (Gomez, 1997).

En nuestro caso, tres de los AcMo (2A8, 3F11 y 5F10) dirigidos contra determinantes antigénicos del extracto de PB no muestran reactividad por inmunoblotting (Tabla IV), lo cual podría deberse a la pérdida de epitopes conformacionales debido al proceso de desnaturalización que sufren las proteínas en las condiciones en las que se lleva a cabo la electroforesis. Estos anticuerpos son los que a su vez reconocen componentes de reactividad cruzada en el extracto de HC en ensayos de ELISA indirecto.

Con respecto a los AcMo 2C3 y 3F9, los resultados del tratamiento con periodato de sodio muestran que reconocen epitopes de naturaleza peptídica sobre componentes de diferente PM en el extracto de PB. Este hecho adquiere relevancia, como ya se discutió en la sección anterior, a la hora de emplear estos anticuerpos en el desarrollo de métodos inmunoquímicos de alta especificidad con finalidad diagnóstica. Según lo mostrado oportunamente en la Figura 12 y en la Tabla IV, el AcMo 2C3 revela una banda de 63,0 kDa y el AcMo 3F9 reconoce dos bandas de 48,4 y 54,6 kDa respectivamente. A su vez, no presentan reactividad cruzada con HC, sugiriendo la especificidad de los determinantes antigénicos reconocidos.

Por otro lado, estos anticuerpos son capaces de reconocer sus respectivos antígenos en extractos celulares obtenidos a partir de diferentes cepas de PB, entre las que se encuentra una cepa aislada en Venezuela (Figura 14). Este hecho es relevante, debido a la importancia de poseer un AcMo específico para un antígeno que se expresa en diferentes cepas del mismo hongo a la hora de emplear dicho anticuerpo en el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico. Sobre todo teniendo en cuenta el polimorfismo que se ha observado entre diferentes cepas de PB, su relación al área geográfica donde se realizó el aislamiento, y los inconvenientes que esta característica ha producido sobre los intentos de estandarizar antígenos o mezclas antigénicas para uso diagnóstico.

En cuanto al AcMo 2C3, la ausencia de reactividad frente al extracto de PB provisto por la Dra. Soares, sugeriría que ni la hsp60 ni la proteína de 61 kDa identificadas en dicho extracto (Da Fonseca, 2001) corresponden al antígeno específico de nuestro AcMo.

En lo que respecta a los cambios introducidos en la estrategia empleada para la obtención de ratones sensibilizados contra antígenos de PB no condujeron a los resultados esperados. Con el cambio del protocolo de inoculación intraperitoneal del extracto celular

total de PB por la inmunización con fracciones de bajo PM obtenidas por electroelución y luego el desarrollo de un protocolo de infección subletal con levaduras de PB no fue posible obtener AcMo dirigidos a componentes de bajo PM. Algunas de las razones que podrían explicar lo sucedido, son:

-que los componentes de PM inferior a 30 kDa no se encuentran en cantidad suficiente en el extracto empleado como inmunógeno

-que si bien los componentes de bajo PM están presentes en el extracto celular, no poseen una buena capacidad inmunogénica comparada con la que presentan otros componentes del extracto de PB.

2.3.Consideraciones generales.

La obtención de AcMo de isotipo IgG1 exclusivamente, puede estar directamente relacionada al protocolo de inmunización. Existen evidencias de que el adyuvante de Freund dirige la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2, y la IgG1 es uno de los isotipos que se ve favorecido en este tipo de respuesta en el ratón. En el caso del AcMo 3F9 obtenido por infección (y no por hiperinmunización), el isotipo resultante puede estar relacionado con el tipo de respuesta que son capaces de montar los ratones de la cepa BALB/c frente a la infección con levaduras de PB; dicha cepa ha sido caracterizada como de susceptibilidad intermedia por Calich y col. (Calich, 1985).

3.MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS.

3.1.Reactividad de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a sueros de pacientes.

3.1.1.ELISA indirecto.

Este ensayo muestra una alta sensibilidad (96%) en la detección de anticuerpos específicos contra antígenos de un extracto celular de PB en pacientes con PCM (Tabla VIII y Figura 17). Como se mencionó oportunamente, ésta es una de las ventajas que presentan en general los métodos inmunoenzimáticos de diagnóstico, y los factores que influyen sobre este parámetro están relacionados al ensayo (tipo de antígeno empleado, formato del ensayo) y a la muestra analizada (naturaleza de la misma, forma clínica que presenta el paciente). En este sentido, nuestros resultados no son discordantes con los datos disponibles en bibliografía. En 1984, Mendes-Giannini y col. describieron un ensayo de ELISA indirecto con sobrenadante de cultivo como fuente de antígenos, donde observaron un 100% de reactividad en sueros de pacientes con PCM (Mendes-Gianini, 1984). En cambio, Martins y col. informaron valores de sensibilidad de sólo un 84% en un ensayo de ELISA indirecto para detectar IgG específica contra una mezcla antigénica preparada a partir de sobrenadante de cultivo y antígenos celulares en pacientes con diferentes formas clínicas de PCM (Martins, 1997).

Por otra parte, se observa un elevado porcentaje de reactividad cruzada en el caso de individuos con HP (Figura 17), ya que se obtuvo un 50% de resultados falsos positivos dentro de la población de pacientes con HP estudiada. Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones previas en ensayos de inmunoblotting y ELISA competitivo secuencial con antisueros específicos (Figura 4 y Figura 5) respecto de la existencia de epitopes comunes o similares entre antígenos de PB y HC. Cabe destacar que en la totalidad de los sueros (19) de pacientes con HP que arrojaron resultados positivos en el ELISA indirecto frente al extracto de PB, también se detectaron anticuerpos específicos contra el extracto celular de HC en un ensayo de similares características. Mientras que, sólo en 8 de los 19 pacientes con HP donde no se detectaron anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de PB se obtuvieron resultados positivos en el ensayo de ELISA indirecto frente al extracto de HC. Esto indicaría, de alguna manera, que estamos frente a una reactividad cruzada real entre antígenos de ambas especies,

y no que los resultados obtenidos se deban meramente a artificios del ensayo desarrollado. Además, es interesante mencionar que de los sueros de pacientes con HP HIV negativos, el 80% (4/5) resultaron positivos en este ensayo, mientras que el porcentaje de reactividad se reduce al 46,4% (13/28) dentro del grupo de pacientes con HP HIV positivos.

En cuanto a los resultados obtenidos con los pacientes con aspergilosis (donde se observa que 3 de los 4 sueros presentan reactividad frente al extracto celular de PB en el ensayo) y los pacientes con candidiasis (donde ambos sueros resultaron negativos en el ELISA indirecto), el escaso número de muestras analizadas no nos permite realizar un análisis muy profundo (Figura 17). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía, ya que existen numerosos reportes acerca de la existencia de reactividad cruzada entre PCM y otras micosis en pruebas serológicas que emplean antígenos complejos. En ensayos de ELISA indirecto frente a antígenos de PB, se han observado falsos positivos en pacientes con HP y candidiasis al utilizar antígenos metabólicos (Mendes-Gianini, 1984), así como con el empleo de antígenos citoplasmáticos (Cano, 1986). En ciertos casos se ha sugerido que los componentes no proteicos de los extractos antigénicos son los responsables, en gran parte, de la reactividad cruzada observada.

Al comparar los resultados obtenidos con los sueros de pacientes con una forma crónica de PCM (todos ellos adultos) con los resultados de los sueros correspondientes a pacientes con una forma aguda o infanto-juvenil de la enfermedad, no se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla VIII). Si bien el número de muestras (sólo 7) pertenecientes a individuos con PCM infanto-juvenil (la forma menos frecuente de esta enfermedad) no es suficiente como para llevar a cabo un análisis demasiado profundo y nosotros sólo hemos analizado la respuesta de anticuerpos específicos de isotipo IgG, nuevamente nuestros resultados concuerdan con lo informado por otros investigadores. Recientemente, Juvenale y col. detectaron la presencia de anticuerpos de tipo IgG específicos contra un extracto celular de la cepa de PB B339 en sueros de 33 pacientes con PCM crónica y 14 pacientes PCM subaguda, y no observaron diferencias al comparar los resultados obtenidos dentro de cada grupo de individuos (Juvenale, 2001).

Al comparar los porcentajes de positividad de la prueba de inmunodifusión (ID) y del ensayo de ELISA indirecto (Tabla VIII), se observa que:

-la sensibilidad del ensayo de ELISA indirecto es superior en ambos grupos,

- existen diferencias en los resultados de la ID dentro de cada uno de los grupos de pacientes:

PCM	ID	ELISA indirecto
Crónica	80%	95.5%*
Aguda	57.1%	100%

*De los 2 pacientes que resultan negativos en este ensayo, uno da positivo y el otro negativo por ID.

Con respecto utilización de la prueba de inmunodifusión para el diagnóstico de PCM, la bibliografía disponible es numerosa y los valores de sensibilidad informados varían entre un 65 y un 100% (Restrepo, 1966; Cano, 1987). Recientemente, Do Valle y col. encontraron que el porcentaje de positividad de la prueba de inmunodifusión en un grupo de pacientes (n=28) con una forma juvenil de PCM alcanzaba el 71,5%, mientras que dicho porcentaje ascendía al 92,6% dentro del grupo de pacientes con forma adulta de PCM (n=217) (Do Valle, 2001). Estos resultados concuerdan con los datos de inmunodifusión correspondientes a los pacientes analizados en nuestro estudio.

3.1.2 Inmunoblotting.

Los resultados obtenidos por inmunoblotting para cada uno de los sueros de pacientes con PCM son concordantes con los resultados obtenidos por ELISA indirecto. Sólo uno de los sueros (N° 24) no revela bandas en el inmunoblotting, mientras que resulta positivo en el ELISA indirecto frente a PB.

Los perfiles de reactividad no son homogéneos y se revelan gran cantidad de bandas de diferente PM (Figuras 18, 19 y 20). Como se muestra en la Tabla V (la cual se reproduce nuevamente a continuación), en nuestra población de pacientes estudiados, algunas de las bandas se revelan con mayor frecuencia.

Tabla V. Componentes del extracto de PB revelados con mayor frecuencia en ensayos de inmunoblotting de pacientes con PCM.

Rango de PM	Porcentaje de sueros que la revelan
116,7 – 124,4 kDa	17/51 (33%)
82,9 – 87,0 kDa	30/51 (59%)
74,2 – 78,3 kDa	15/51 (29%)
56,2 – 57,4 kDa	17/51 (33%)
50,7 – 53,7 kDa	28/51 (55%)
24,7 – 28,7 kDa	29/51 (57%)

Al respecto, Casotto describió un conjunto de antígenos presentes en un extracto celular de PB (cepa Linder 2511) dentro de los cuales identificó antígenos reconocidos específicamente por sueros de pacientes con PCM (componentes de 21, 45, 48, 57 y 58 kDa) y componentes de reactividad cruzada con otras micosis como histoplasmosis, aspergilosis y candidiasis (antígenos de 27,5; 37,5; 76; 82; 94; 114 y 220 kDa) (Casotto, 1990). Los antígenos descritos por Casotto, se detallan en la siguiente tabla:

PM (kDa)	% sueros PCM reactivos
220	45
114	38
94	25
84	50
76	70
58	17
57	70
48	50
45	20
37,5	30
27,5	20
21	8

Casotto, 1990

Otros autores han informado resultados concordantes empleando preparaciones antigénicas diferentes. Empleando un extracto libre de células, Camargo y col., identificaron cinco componentes de 23, 43, 45, 55 y 70 kDa reactivos por inmunoblotting frente a sueros de pacientes con PCM crónica activa (Camargo, 1991). Ferreira-da-Cruz y col. observaron que

ciertos componentes de un extracto celular de PB eran reconocidos por más del 10% de los sueros de pacientes con PCM en ensayos de inmunoblotting (Ferreira-daCruz, 1992), los cuales se listan en la siguiente tabla:

PM (kDa)	% de sueros PCM reactivos
90	55
86	23
66	16
50	33
45	91
15	13

Ferreira da Cruz, 1992

A su vez, algunos de los antígenos mencionados eran reconocidos por un alto porcentaje de sueros de pacientes con histoplasmosis (66 kDa: 80%; 50 kDa: 30%), aspergilosis (66 kDa: 66%) y tuberculosis (50 kDa: 53%). Martins y col., desarrollaron un ensayo de inmunoblotting con una mezcla de antígenos somáticos y sobrenadante de cultivo, cuya sensibilidad alcanza el 96%. En dicho ensayo, los anticuerpos IgG específicos en sueros de pacientes con PCM revelan bandas de entre 16 y 78 kDa, siendo las más frecuentes las correspondientes a PM de 27, 33 y 43 kDa (Martins, 1997).

Una comparación minuciosa entre nuestros resultados y los obtenidos por otros investigadores en los ensayos de inmunoblotting, no es tan simple y directa. Fundamentalmente debido a las numerosas variables puestas en juego. Entre ellas podemos mencionar:

- la cepa de PB empleada como fuente de antígenos
- el tipo de preparación antigénica utilizada (antígenos celulares o somáticos, antígenos metabólicos, "cell-free antigens", etc). Nosotros, de la misma manera que Casotto, Ferreira-da-Cruz y col. y Martins y col., hemos empleado un extracto celular de fase levaduriforme.
- las condiciones en las que se llevó a cabo la corrida electroforética y la electrotransferencia.
- las condiciones en las que se llevó a cabo en el ensayo de inmunoblotting (diluciones de los sueros y anticuerpos conjugados, tiempos y temperaturas de incubación).

Sin embargo, las discordancias existentes entre los diferentes ensayos, no invalida la realización de un análisis general comparativo. Al respecto, algunas de las características

comunes que podemos encontrar entre nuestros resultados y los disponibles en bibliografía son:

-el revelado de componentes antigénicos en un rango amplio de PM

-la variabilidad entre los perfiles de reactividad correspondientes a los distintos individuos. Esta observación está estrechamente relacionada al previamente mencionado polimorfismo que caracteriza al PB, y como ya fue discutido oportunamente, es uno de los factores desfavorables a la hora de intentar estandarizar antígenos o preparaciones antigénicas para optimizar métodos de diagnóstico serológico de PCM.

-la presencia de un grupo de bandas de diferente PM reveladas con mayor frecuencia por sueros de pacientes con PCM

-la presencia de componentes de reactividad cruzada reconocidos por sueros de pacientes con otras micosis

De todas maneras, algunas de las observaciones que podemos detallar son las siguientes:

- 1) En nuestro caso, el componente de 43-45 kDa (gp-43) no aparece como uno de los antígenos predominantes, como ocurre en los trabajos citados. Como se mencionó oportunamente en la sección 1.1.1., se ha descrito que la cepa Utero (empleada para la preparación del extracto de PB) produce gp-43 en pequeña cantidad, lo cual explicaría nuestras observaciones. Además, existe la posibilidad de que dicho antígeno no sea predominante en las cepas que habitan nuestra área geográfica y que son las responsables de infectar a nuestros pacientes (recordemos nuevamente el gran polimorfismo genético observado entre distintas cepas de PB y su relación con la distribución geográfica de las mismas), con lo cual no se generaría una respuesta de anticuerpos importante frente a dicha proteína.
- 2) En nuestro ensayo se detectan bandas de entre 116,7 y 124,4 kDa en el 33% de los sueros de pacientes con PCM. Un componente de 114 kDa aparece en el 38% de los casos descritos por Casotto.
- 3) Tanto en nuestro ensayo, como en los desarrollados por Casotto y Camargo y col., se revela una banda con un PM aproximado a 55-57 kDa., la cual es reconocida por un buen porcentaje de los sueros analizados (33% en nuestro caso). Adicionalmente, Figueroa y col., describieron una glucoproteína exocelular de 58 kDa que fue

reconocida por 21 de 26 sueros de pacientes con PCM en ensayos de inmunoblotting (Figueroa, 1995).

- 4) La banda más frecuente se encuentra, en nuestro caso, un rango de PM de entre 82,9 y 87 kDa (59%). Casotto describió un componente de 84 kDa reconocido por el 50% de los sueros, mientras que una banda de aproximadamente 86 kDa es revelada por el 23% de las muestras analizadas, según el trabajo realizado por Ferreira-da-Cruz y col.
- 5) La banda de 24,7-28,7 kDa que se revela en el 57% de los sueros analizados en nuestro trabajo, podría corresponder a uno de los antígenos de PB que ha sido ampliamente caracterizado: la proteína de 27 kDa (McEwen, 1996). Aunque no se dispone de datos acerca de la reactividad de la proteína purificada, la reactividad por inmunoblotting de sueros de pacientes con PCM frente a dicha proteína en forma recombinante alcanza el 91% (Ortiz, 1996). Si suponemos que nuestra hipótesis es correcta, la diferencia en el porcentaje de reactividad observada en nuestros experimentos respecto del valor publicado por Ortiz y col., podría deberse no sólo a las diferencias en las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos, sino también en la diferencias en las propiedades inmunoquímicas de la proteína recombinante respecto de la proteína en estado nativo.
- 6) Al analizar la reactividad cruzada en pacientes con HP, se observa que la mayoría de los sueros estudiados en este ensayo revelan una única banda de aproximadamente 50 kDa, que parece coincidir con la banda de 50,7 – 53,7 kDa revelada por el 55% de los pacientes con PCM (Tabla VII). Estos resultados concuerdan con lo observado por Ferreira-da-Cruz y col., quienes habían descrito la presencia de un componente de 50 kDa en un extracto celular de PB, reconocido por el 33% de los sueros de PCM y por el 30% de los sueros de pacientes con HP.

Por otro lado, Casotto y col., observaron una gran variabilidad en la expresión de los antígenos específicos mencionados anteriormente (componentes de 21, 45, 48, 57 y 58 kDa), al analizar tres cepas distintas de PB. Los mismos presentan el mismo PM en cada una de las cepas, pero su reactividad frente a sueros de pacientes con PCM es variable (Casotto, 1991). Estos resultados se asemejan a nuestras observaciones, ya que nuestro ensayo de inmunoblotting de las distintas cepas de PB frente a un pool de sueros de pacientes con PCM (Figura 21), muestra diferencias en el perfil de bandas reconocidas en cada extracto.

Adicionalmente, los mismos autores no encontraron correlación entre el perfil de bandas reconocidas en un extracto celular de PB y las distintas formas clínicas de PCM, en ensayos de inmunoblotting para anticuerpos de tipo IgG (Casotto, 1991). Resultados similares fueron obtenidos por Blotta y col. al analizar la reactividad de sueros de pacientes con PCM aguda y crónica frente a un extracto libre de células obtenido a partir de la cepa B339 (Blotta, 1993). En este último caso, un componente de 43 kDa es reconocido por la totalidad de los sueros analizados. Nuestras observaciones concuerdan con lo descrito por los autores citados anteriormente (Figuras 18, 19 y 20).

Dentro de los pacientes estudiados, podemos analizar dos casos particulares:

-sueros N° 50 y N° 51: corresponden a muestras de un mismo paciente, antes y después de una recaída respectivamente. Se observa que ambas muestras son positivas por ELISA indirecto y negativas por ID, y que no se han producido variaciones en el perfil de bandas reveladas en el inmunoblotting. Esto indicaría que ninguno de los métodos antes mencionados parecen ser útiles para diferenciar ambos estadios en la evolución clínica del paciente.

-sueros N° 43 y N° 44: corresponden a muestras de un mismo paciente, antes y después de iniciado el tratamiento respectivamente. Ambas muestras son positivas por ELISA indirecto e ID. Se observa la desaparición de una banda de 24,7 kDa, mientras que las bandas restantes persisten luego del tratamiento. Con respecto a la utilización del inmunoblotting en el seguimiento de la respuesta al tratamiento, existen trabajos que sugieren la existencia de correlación, en términos de una disminución de la intensidad y el número de bandas reconocidas por los sueros de los pacientes y el tiempo de tratamiento (Martins, 1997; Do Valle, 2001). Martins y col. informaron la disminución en el número de pacientes reactivos por inmunoblotting frente a componentes antigénicos de PB con PM entre 21 y 29 kDa a medida que avanza el tratamiento antifúngico.

3.2.Utilización de anticuerpos monoclonales en el desarrollo de métodos serológicos de utilidad diagnóstica.

3.2.1.Ensayos de detección de anticuerpos.

La bibliografía disponible acerca del empleo de AcMo en el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico de PCM no es muy numerosa, y la mayoría de los trabajos se han dirigido hacia la detección de antígenos circulantes.

Existe un único reporte de la utilización de un AcMo en un ensayo de ELISA de captura para detectar anticuerpos específicos de isotipo IgG en pacientes con PCM (Camargo, 1994). En dicho trabajo, se empleó un AcMo específico para la proteína gp-43 (AcMo 17C) a razón de 2 µg/fosa, y una solución de gp-43 purificada con 30 ng de proteína/fosa. Se titularon diferentes diluciones (1/800 a 1/812900) de sueros de pacientes con PCM, HP, lobomiosis, aspergilosis, candidiasis, así como de sueros de individuos no enfermos. El ensayo se comparó con un ELISA indirecto frente a gp-43 purificada. Los valores de sensibilidad (100%) y especificidad (96,7%) fueron calculados en base a la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de los títulos obtenidos dentro de cada grupo de sueros analizados. Sin embargo, el ensayo de captura no mejoró sustancialmente los resultados obtenidos con el ensayo de ELISA indirecto con el cual se lo comparó (100% de sensibilidad; no hay datos de especificidad). Tampoco se observan grandes diferencias respecto de parámetros de sensibilidad y especificidad alcanzados con otros ensayos inmunoquímicos desarrollados con gp-43 purificada como dot-blot (Taborda, 1994) y ELISA indirecto (Bueno, 1997).

En nuestro caso, desarrollamos dos ensayos diferentes, empleando respectivamente los AcMo anti-PB 2C3 y 3F9. Dichos anticuerpos no reconocen componentes de HC (Tabla IV) ni por ELISA ni por inmunoblotting. Además son capaces de capturar sus respectivos antígenos específicos a partir de un extracto celular de PB en un ensayo de ELISA de captura (Figura 14). De acuerdo a los resultados del ensayo de inmunoblotting, el AcMo 2C3 reconoce un componente de aproximadamente 63 kDa, mientras que el AcMo 3F9 revela dos bandas de 48,4 y 54,6 kDa en el extracto de PB.

Como se mencionó oportunamente, se han descrito y caracterizado componentes antigénicos de PB con un PM aproximado a 60 kDa que podrían coincidir con el antígeno específico del AcMo 2C3: la hsp60 (Isaac, 2001), con un PM de 62 kDa, y una proteína de 61 kDa que presenta homología con catalasas (Da Fonseca, 2001). En el caso de la hsp60, la reactividad de la proteína recombinante por inmunoblotting frente a sueros de pacientes con PCM es del 97,3%, mientras que se observa un bajo porcentaje de reactividad cruzada en pacientes con HP (3/26) y en sueros de individuos sanos (4/42). En cuanto a la proteína de 61

kDa recientemente identificada, los datos de reactividad son aún escasos; sólo se conoce que es reactiva frente a un pool de sueros de pacientes con PCM, y que no es reconocida por un pool de sueros de pacientes con HP. Según lo informado en Resultados (sección 2.2.2), el AcMo 2C3 no reconoce ni a la hsp60 ni a la proteína de 61 kDa descrita por Da Fonseca y col.

En el caso del ensayo desarrollado con el AcMo 3F9, tanto la sensibilidad como la especificidad son superiores a las correspondientes al ensayo con el AcMo 2C3. La diferencia más notable entre los parámetros calculados para ambos métodos reside en el VPN (el cual es aproximadamente un 11% superior cuando se emplea el AcMo 3F9) que es reflejo de la diferencia en los porcentajes de resultados falsos negativos de ambos ensayos.

Parámetro	Ensayo 2C3	Ensayo 3F9
Sensibilidad	70,6%	78,4%
Especificidad	81,6%	87,5%
VPP	80%	83,3%
VPN	72,7%	83,6%

Por otro lado, al analizar individualmente cada uno de los pacientes con PCM, encontramos sueros que sólo resultan positivos en uno de los dos ensayos de ELISA de captura. A saber:

Suero PCM N°	Ensayo 2C3	Ensayo 3F9
3	P	N
4	P	N
16	P	N
18	N	P
22	P	N
28	P	N
31	N	P
37	N	P
38	P	N
42	N	P
45	N	P
46	N	P
47	N	P

En estos casos, no fue posible encontrar una correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos de captura y los resultados de los correspondientes ensayos de ELISA indirecto e inmunoblotting.

Por otra parte, dos pacientes (N° 5 y N° 16) son los únicos casos donde al menos uno de los ensayos de captura es positivo, mientras que no se detectan anticuerpos específicos por ELISA indirecto. Esto puede deberse al hecho de que ambos sueros poseen una proporción de anticuerpos específicos contra los antígenos reconocidos por los AcMo lo suficientemente alta como para ser detectada en los correspondientes ensayos.

En cuanto a los sueros correspondientes a pacientes con otras micosis, se observa una marcada disminución de la reactividad de los mismos en los ensayos de captura respecto de la reactividad en el ensayo de ELISA indirecto contra el extracto total de PB (Figuras 17, 24 y 25). Al comparar individualmente los distintos sueros de pacientes con HP y ASP, nuevamente se observa un cierto número de muestras donde los resultados de reactividad en ambos ensayos de captura son diferentes:

Suero N°	Ensayo 2C3	Ensayo 3F9
53 (HP)	+	-
54 (HP)	-	+
56 (HP)	+	-
57 (HP)	+	-
59 (HP)	+	-
60 (HP)	+	-
61 (HP)	+	-
90 (ASP)	-	+
91 (ASP)	-	+

Al estudiar la reactividad de los sueros mencionados anteriormente por inmunoblotting frente al extracto de PB, no se encuentra correlación entre los resultados obtenidos en los respectivos ensayos de captura, y el reconocimiento de bandas de PM cercanos a los de los antígenos específicos de los AcMo 2C3 y 3F9.

Consideraciones generales:

Estudios de inmunodifusión recientes indican que, empleando extractos antigénicos celulares (obtenidos por ruptura de levaduras de PB) se obtienen porcentajes de reactividad superiores a los obtenidos con el empleo de antígenos metabólicos y antígenos libres de células (Da Silva y col., 2002). Estas recientes observaciones avalan nuestra decisión inicial de emplear el extracto citoplasmático de PB, y no el sobrenadante de cultivo, para el desarrollo de los métodos inmunoquímicos.

Al comparar los resultados obtenidos por ELISA indirecto con los obtenidos en ambos ensayos de ELISA de captura, se observa un sensible mejoramiento de la especificidad (de un 65,6% a valores superiores al 80%), aunque acompañado de una marcada disminución de la sensibilidad (de 96% a valores de 70,6 y 78,4%).

Sin embargo, 4 de los 5 pacientes con PCM analizados que no pueden ser detectados en ninguno de los ensayos de captura (sueros N° 6, 11, 14 y 33), revelan bandas del extracto de PB en el ensayo de inmunoblotting (Figuras 18 y 19). En cuanto a los pacientes con HP que resultan positivos en al menos uno de los ensayos de captura (12 muestras), 8 revelan una banda de 50 kDa por inmunoblotting frente al extracto de PB y 4 no reconocen componentes en dicho ensayo. Con respecto a los pacientes con ASP, los 2 sueros que dieron resultado positivo en el ensayo de captura con el AcMo 3F9 (N° 90 y 91) también reconocen componentes en el extracto de PB por inmunoblotting. Sin embargo, los sueros correspondientes a pacientes con HP y ASP no se reconocen un número mucho menor de bandas que las que revelan los pacientes con PCM. De estas observaciones, puede deducirse que:

-si los resultados por ELISA de captura son negativos y existe firme sospecha de PCM, se puede recurrir al ensayo de inmunoblotting para una confirmación rápida del diagnóstico presuntivo

-si el resultado de al menos uno de los ensayos de ELISA de captura es positivo y existe sospecha de otra entidad distinta de PCM (por ejemplo: HP), se puede realizar el ensayo de inmunoblotting y de esa manera confirmar o descartar PCM.

3.2.2. Ensayos de detección de antígenos circulantes.

Dado que nuestros intentos de detectar antígenos circulantes en sueros de pacientes con PCM no han sido fructíferos, es importante analizar las causas que condujeron a dichos resultados.

Tal como se mencionó oportunamente en la Introducción (sección 4.2.3.1), los datos disponibles en la bibliografía respecto de la metodología desarrollada con el transcurso del tiempo, incluyen ensayos que emplean desde antisueros específicos hasta anticuerpos monoclonales. El ensayo de IRMA con la fracción de IgG de un antisuero policlonal (empleado a razón de 900 ng de proteína/fosa) desarrollado por Ferreira-da-Cruz y col., detecta desde 0,12 $\mu\text{g/ml}$ a 12 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno de PB en una matriz de suero humano normal y no muestra reactividad cruzada con antígenos de HC (Ferreira-da-Cruz, 1991). Los resultados óptimos los obtuvieron al emplear como fuente de antígenos, un extracto celular de PB de fase levaduriforme. Posteriormente, el mismo grupo de investigadores publicaron el desarrollo de un ensayo de ELISA competitivo con un antisuero policlonal para detectar antígenos de PB circulantes, obteniendo resultados positivos en sólo el 33% de los sueros de pacientes con PCM analizados (27/88), y también en sueros de pacientes con HP (Freitas-da-Silva, 1992). En este caso, el ensayo responde adecuadamente en el rango de 6 ng a 60 μg de proteína por ml de suero. Más recientemente, Gomez y col. desarrollaron un ELISA de inhibición empleando un AcMo específico (P1B) contra una proteína de 87 kDa, con el objetivo de detectar la presencia de dicho antígeno en suero de pacientes con diferentes formas clínicas de PCM (Gomez, 1997a). Construyeron la curva de calibración empleando un extracto celular de PB en una matriz con 50% de suero humano normal, y el rango de sensibilidad fue de 5.8 ng a 60 μg de proteína por ml. De esta manera se obtuvieron resultados positivos en hasta un 80,4% de los pacientes con PCM, aunque también se observaron porcentajes de reactividad cruzada superiores al 40% con suero de pacientes con HP, aspergilosis y tuberculosis.

Nuestro ensayo cubre un rango de detección de entre 0,2 μg (200 ng) a 200 μg de proteína por ml. El límite de detección es aproximadamente 40 veces superior a los descriptos para los ensayos de ELISA de inhibición previamente citados, mientras que es del mismo orden que el correspondiente al ensayo de IRMA.

El ensayo con el AcMo 2C3 para detectar antígenos de PB responde a diferentes cantidades de antígeno de acuerdo a lo mostrado en la Figura 26. Por lo tanto, la ausencia de reactividad al analizar los sueros de los pacientes, podría deberse a :

- un problema de diseño y puesta a punto del ensayo
- que, verdaderamente, los sueros analizados no presentaban el antígeno buscado en circulación.

4. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS APLICADOS A LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y ANTÍGENOS EN SUERO DE PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS.

4.1. Reactividad de antígenos de *Histoplasma capsulatum* frente a sueros de pacientes.

Desafortunadamente, los métodos existentes de detección de anticuerpos que utilizan mezclas de antígenos de HC poseen generalmente baja especificidad (fijación de complemento y ELISA) o baja sensibilidad (inmunodifusión). Diversos estudios han demostrado distintos grados de reactividad cruzada en estos ensayos. Sueros de pacientes con PCM, blastomycosis, candidiasis, aspergilosis, coccidioidomicosis son reactivos por ELISA indirecto y por inmunoblotting contra antígenos de HC de fase levaduriforme o micliar.

De acuerdo a lo descrito oportunamente en Resultados, la sensibilidad del ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con HP es del 68,4%. Dicho valor es comparable a los publicados por otros investigadores como Raman y col., quienes informaron la detección de anticuerpos contra histoplasmina por ELISA en el 75% de los pacientes estudiados (Raman, 1990). En tanto, Zimmerman y col., desarrollaron un ensayo de ELISA indirecto que arroja resultados positivos en sólo un 64% de los pacientes con HP (Zimmerman, 1990).

Es importante recalcar que la zona geográfica en la cual residimos es una de las áreas endémicas de HP en nuestro país (Negroni, 1996a). Por lo tanto, no sería extraño encontrar un cierto porcentaje de personas sanas sensibilizadas por el contacto con el hongo que presentan anticuerpos específicos en suero, lo cual explicaría los resultados positivos de nuestro ensayo de ELISA indirecto en un porcentaje relativamente alto de individuos sanos.

El hecho de que no detectemos anticuerpos específicos contra antígenos de HC en un alto porcentaje (31,6%) de pacientes con HP, podría estar relacionado al estado de inmunodeficiencia de dichos individuos. En este sentido, se observa que la totalidad de los sueros que resultaron negativos en el ELISA indirecto frente al extracto de HC corresponden a pacientes HIV positivos (11/28), mientras que en el 100% (5/5) de los pacientes que son HIV negativos se detectaron anticuerpos específicos contra antígenos de HC. Dentro del grupo de 5 pacientes con HP de los cuales no se conocen los resultados de la serología para HIV, el ensayo de ELISA indirecto frente a antígenos de HC resultó positivo en 4 de ellos (Tabla X).

4.2. Métodos inmunoquímicos empleando anticuerpos monoclonales.

4.2.1. Ensayos de detección de anticuerpos.

Los ensayos inmunoquímicos desarrollados hasta el momento que emplean AcMo para el diagnóstico de HP, están dirigidos exclusivamente a la detección de antígenos circulantes. Esto se debe principalmente al alto porcentaje de pacientes con HP que sufren algún tipo de inmunodeficiencia (entre ellas, el SIDA), con lo cual los métodos de detección de anticuerpos suelen presentar problemas de baja sensibilidad.

En nuestro caso, intentamos poner a punto un ELISA de captura empleando el AcMo 5E1 para detectar anticuerpos específicos contra antígenos de un extracto celular de HC, dado que los porcentajes de positividad del ensayo de ELISA indirecto dentro de la población de individuos no enfermos es alto.

El ensayo de captura no produjo los resultados esperados, ya que no fue posible detectar anticuerpos de tipo IgG específicos en ninguno de los pacientes con HP analizados. Esto puede deberse a:

-que no se producen anticuerpos contra el/los antígeno/s específicos reconocidos por el AcMo 5E1 (recordemos que dicho anticuerpo revela dos bandas de 69,5 y 75,7 kDa en el extracto celular de HC). Es decir, que dichos componentes no poseerían una buena capacidad inmunogénica.

-que el AcMo bloqueó el o los epitopes más reactivos que posee el/los antígeno/s y por eso no se reaccionan adecuadamente los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes.

4.2.2. Ensayos de detección de antígenos.

Como se mencionó anteriormente, los métodos de detección de antígenos de HC en fluidos (suero, orina, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar) de pacientes con HP que han sido desarrollados hasta el momento, son numerosos. Además, según algunos autores, la disminución de la antigenemia indica una buena respuesta al tratamiento antifúngico. Si bien se han puesto a punto radioinmunoensayos, en los últimos años se han desarrollado básicamente ensayos de ELISA de inhibición y de captura, empleando tanto antisueros específicos como anticuerpos monoclonales. En el caso del ensayo de ELISA de captura descrito por Durkin y col., se empleó la fracción IgG de un antisuero de conejo y se obtuvieron valores de sensibilidad de entre un 37 y 95%, correspondiendo éste último dato a

un grupo de pacientes con SIDA y con HP diseminada (Durkin, 1997). Los resultados están expresados en unidades, y no en concentración de antígeno, con lo cual no se cuenta con los datos correspondientes el rango útil del ensayo. En cambio, el ensayo de inhibición desarrollado por Gomez y col., emplea el AcMo H1C (específico para una proteína de 69-70 kDa de un extracto celular de HC) y posee un rango de detección de 4 ng a 60 µg de proteína por ml en una matriz con 50% de suero humano normal (Gomez, 1997b). En este caso, se obtuvieron resultados positivos en el 71,4% de los sueros de pacientes con HP, y la especificidad fue del 85,4% cuando se incluyeron pacientes con otras micosis.

En nuestro caso, hemos intentado desarrollar dos metodologías: un ensayo de ELISA de inhibición y un ELISA de captura, ambas empleando el AcMo 5E1. La elección de dicho AcMo se realizó tomando en cuenta que reconoce dos bandas de 69,7 y 75,7 kDa por inmunoblotting frente a un extracto celular de HC (Tabla III), las cuales poseen un PM cercano al antígeno de 70 kDa descrito por Gomez y col.

La ausencia de resultados promisorios con el ensayo de inhibición nos condujo a centrar nuestro trabajo en el desarrollo del ensayo de captura. En este caso, se obtuvo una respuesta adecuada con diferentes cantidades de antígeno (Figura 27), aunque el límite de detección del ensayo (hasta 2,5 µg/ml) no mejora lo informado por Gomez y col. para el ensayo de inhibición con el AcMo H1C. De todas maneras, no fue posible detectar antígeno circulante en ninguna de las muestras de suero de los pacientes con HP (Resultados, sección 4.2.2), lo cual nuevamente podría deberse a problemas de diseño y puesta a punto del ensayo, o bien a la ausencia real del antígeno pesquisado en circulación.



Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

- ❖ Los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de levaduras de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* contienen numerosos componentes proteicos en un amplio rango de PM, muchos de los cuales son antigénicos frente a antisueros específicos y sueros de pacientes con las respectivas micosis (paracoccidioidomicosis e histoplasmosis). En el caso de *Paracoccidioides brasiliensis*, existen diferencias en el perfil electroforético y en la antigenicidad de los extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de diferentes cepas.
- ❖ Existe una fuerte reactividad cruzada entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, la cual fue evidenciada y caracterizada mediante ensayos de inmunoblotting y ELISA con antisueros específicos con suero de pacientes.
- ❖ Por electroforesis preparativa se obtuvieron fracciones antigénicas del extracto celular de *Paracoccidioides brasiliensis* que parecen ser diferentes a los antígenos ya descritos (fracciones II y VI), mientras que la fracción I podría corresponder por peso molecular y reactividad antigénica a una proteína de 27 kDa ya identificada.
- ❖ Todos los anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* obtenidos en nuestro laboratorio, reconocen epitopes de componentes en el extracto homólogo (en su mayoría, de naturaleza peptídica) mientras que sólo algunos de ellos (clon anti-HC 5B8 y clones anti-PB 2A8, 3F11 y 5F10) muestran reactividad cruzada. Por otra parte, tanto el anticuerpo monoclonal anti-HC 5E1 como los clones anti-PB 2C3 y 3F9, son capaces de reconocer y captar sus antígenos específicos a partir de los respectivos extractos celulares en ensayos de ELISA de captura.
- ❖ El ensayo de ELISA indirecto frente al extracto de *Paracoccidioides brasiliensis* detecta anticuerpos específicos en el 96% de los sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis analizados, pero posee una especificidad de sólo un 65,6%. Esta

baja especificidad se debe fundamentalmente a la reactividad cruzada que presentan el 50% de los sueros de pacientes con histoplasmosis estudiados.

- ❖ De los ensayos desarrollados, el inmunoblotting es el que presenta la mayor sensibilidad (98%) en la detección de anticuerpos de isotipo IgG específicos contra antígenos celulares de *Paracoccidioides brasiliensis* en suero de pacientes con paracoccidioidomicosis. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que, si bien se observan bandas que se revelan con mayor frecuencia que otras, no es posible establecer un perfil de reactividad característico de los sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis frente a antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tampoco se encuentra una correlación entre el perfil de bandas reconocidas y las distintas formas clínicas de la paracoccidioidomicosis.
- ❖ Los ensayos de ELISA de captura con los anticuerpos monoclonales anti-PB 2C3 y 3F9 para la detección de anticuerpos específicos contra antígenos celulares de *Paracoccidioides brasiliensis* desarrollados en nuestro laboratorio, poseen una menor sensibilidad (70.6% y 78.4% respectivamente, frente a 96%) y una mayor especificidad (81.6% y 87.5% respectivamente, frente a 65.6%) que el correspondiente ensayo de ELISA indirecto.
- ❖ Dadas las diferencias en los parámetros de sensibilidad y especificidad de los ensayos inmunoquímicos de detección de anticuerpos específicos para el diagnóstico de paracoccidioidomicosis desarrollados en nuestro laboratorio, puede deducirse que:
 - ante un resultado negativo por ELISA de captura y firme sospecha de PCM, se puede recurrir al ensayo de inmunoblotting para una confirmación rápida del diagnóstico presuntivo
 - frente a un resultado positivo de al menos uno de los ensayos de ELISA de captura y la presunción de una entidad distinta de PCM (por ejemplo: IIP), se puede recurrir al ensayo de inmunoblotting para confirmar o descartar PCM.
- ❖ La detección de anticuerpos específicos contra antígenos de *Histoplasma capsulatum* en pacientes con histoplasmosis por ELISA indirecto presenta una sensibilidad de sólo

68,4%. El menor porcentaje de positividad de dicho ensayo corresponde al grupo de pacientes HIV positivos. Por otra parte, el ensayo de ELISA de captura con el anticuerpo monoclonal anti-HC 5E1 no es capaz de detectar anticuerpos específicos contra antígenos de *Histoplasma capsulatum* en suero de pacientes con histoplasmosis.

- ❖ Los correspondientes ELISA de captura con anticuerpos monoclonales para detectar antígenos circulantes de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* no arrojaron resultados positivos en sueros de pacientes, a pesar de haber respondido adecuadamente en los ensayos de calibración.

Conclusiones Generales:

Del análisis de los resultados obtenidos y de la comparación de los mismos con los datos aportados por la bibliografía, se desprenden algunas observaciones generales:

- ❖ Ambas especies fúngicas, *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) e *Histoplasma capsulatum* (HC), poseen numerosos componentes con diferentes grados de capacidad inmunogénica. Especialmente en el caso de PB, dichos componentes pueden variar según la cepa que está siendo analizada. Esta diversidad antigénica explica, en gran parte, las diferencias observadas en los perfiles de reactividad de anticuerpos específicos en los pacientes con paracoccidioidomicosis (PCM) y, por lo tanto, las dificultades que se presentan a la hora de encontrar el antígeno adecuado para estandarizar un método serológico de diagnóstico.
- ❖ Existen relativamente pocos reportes de la aplicación de anticuerpos monoclonales (AcMo) para el desarrollo de métodos inmunoquímicos potencialmente útiles para el diagnóstico de HP y PCM, sobre todo en la última de estas micosis. Los AcMo aportan importantes ventajas, especialmente la alta reproducibilidad y especificidad en comparación con los ensayos donde se emplean anticuerpos policlonales. Por otra parte, si bien el empleo de los mismos podría implicar problemas de baja sensibilidad en el ensayo desarrollado, dicha situación podría ser eventualmente superada con la utilización de "cócteles" de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, lo cual conduciría a una mejora en la sensibilidad sin modificar negativamente la especificidad del ensayo.
- ❖ Si bien los métodos inmunoquímicos de detección de anticuerpos específicos desarrollados en nuestro laboratorio no mejoran los parámetros de especificidad y sensibilidad que han sido informados para otros ensayos de similares características, constituyen una prueba más de las dificultades que puede presentar la serología aplicada al diagnóstico de las micosis. Particularmente, el alto porcentaje de reactividad cruzada y la influencia que ejerce una mejora de la especificidad de un ensayo en detrimento de la sensibilidad del mismo, son aspectos que caracterizan a casi

la totalidad de las pruebas serológicas que han sido desarrolladas en las últimas décadas, incluso a aquellas técnicas que han sido y son actualmente utilizadas de rutina en los laboratorios de micología .



Bibliografía

- ❖ Abidi, FE.; Roh, H.; Keath, EJ.; 1998. Identification and characterization of a phase-specific, nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 66; 8; 3867-3873.
- ❖ Acosta, MV.; Melo, L.; Castañeda, E.; 1992. Estudio del comportamiento *in vivo* e *in vitro* de seis cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*; *Rev Iberoam Micol*; 9; 7-11.
- ❖ Ajello, L.; Cheng, SL.; 1967. Sexual reproduction in *Histoplasma capsulatum*; *Mycologia*; 59; 689-697.
- ❖ Ajello, L.; Polonelli, L.; 1985. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas; *Eur. J. Epidemiol.*; 1; 160.
- ❖ Albormoz, MCB; 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela; *Sabouraudia*; 9; 248.
- ❖ Allendorfer, R.; Maresca, B.; Deepe, GS.; 1996. Cellular immune responses to recombinant heat-shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 64; 10; 4123-4128.
- ❖ Allendorfer, R.; Deepe, GS.; 1997. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice; *Infect Immun*; 65; 7; 2564-2569.
- ❖ Allendorfer, R.; Deepe, GS.; 1998. Blockade of endogenous TNF- α exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms; *J Immunol*; 160; 6072.
- ❖ Allendorfer, R.; Brunner, GD., Deepe, GS.; 1999. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis; *J Immunol*; 162; 7389-7396.
- ❖ Allendorfer, R.; Deepe, GS.; 2000. Regulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by TNFR1 y TNFR2; *J Immunol*; 165; 2657-2664.
- ❖ Almeida, SR.; Lopes, JD.; 2001. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response; *Braz J Med Biol Res*; 34; 529-537.
- ❖ Arango, M.; Yarzabal, L.; 1982. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis; *Mycopathologia*; 79; 115.
- ❖ Aristizabal, BH.; Clemons, KV.; Stevens, DA.; Restrepo, A.; 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females; *Infect. Immun.*; 66; 5587.
- ❖ Bagagli, E.; Sano, A.; Coelho, KI.; 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 58; 505.
- ❖ Baida, H.; Biselli, PJ.; Juvenale, M.; Del Negro, GM. et al.; 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis; *Microbes Infect*; 1; 4; 273-278.
- ❖ Barbosa, SFC.; Takeda, AK.; Chacha, J.; Cuce, LC.; Fava Netto, C.; 1981. Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução da doença; *Rev Inst Adolfo Lutz*; 41; 121.
- ❖ Bauman, DS.; Smith, CD.; 1975. Comparison of immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis; *J Clin Microbiol*; 2; 77-80.
- ❖ Bava, JA.; Mistchenko, AS.; Palacios, MF.; Estevez, ME.; et al.; 1991. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients; *Microbiol Immunol*; 35; 167.
- ❖ Benard, G.; Hong, MA.; Del Negro, GMB.; Batista, L.; et al.; 1996. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis; *Am J Trop Med Hyg*; 54; 7-12.
- ❖ Benard, G.; Mendes-Giannini, MJ.; Juvenale, M.; Miranda, ET.; Duarte, AJS.; 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response; *J Infect Dis*; 175; 1263-1267.
- ❖ Benard, G.; Romano, CC.; Cacere, CR.; Juvenales, M.; et al.; 2001. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis; *Cytokine*; 13; 4; 248-252.
- ❖ Bennett, DE.; 1966. The histoplasmin latex agglutination test: clinical evaluation and a review of the literature; *Am J Med Sci*; 251; 175-183.
- ❖ Berliner, MD.; 1971. Biological implications of morphological variants in *Histoplasma capsulatum* primary isolates, in *Histoplasmosis: Proceedings of the Second National Conference* (Ajello, L.; Chick, EW.; Furcolow, ML.; eds); C.C. Thomas Publishers; Springfield; IL.
- ❖ Bethlehem, NM.; Lemle, A.; Bethlehem, E. and Wanku, B.; 1991. Paracoccidioidomycosis; *Sem. Resp. Med.*; 12; 81.
- ❖ Biagioni, L.; Souza, MJ.; Chama, LG.; Muedes, RP.; et al.; 1984. Serology of paracoccidioidomycosis II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease; *Trans Roy Trop Med Hyg*; 78; 617.

- ❖ Bialek, R.; Ibricevic, A.; Aepinus, C.; Najvar, L.; et al.; 2000. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay; *J Clin Microbiol*; 38; 8; 2940-2942.
- ❖ Bialek, R.; Fischer, J.; Feucht, A.; Najvar, L.K.; et al.; 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay; *J Clin Microbiol*; 39; 4; 1506-1509.
- ❖ Bialek, R.; Feucht, A.; Aepinus, C.; Just-Nubling, G.; et al.; 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue; *J Clin Microbiol*; 40; 5; 1644-1647.
- ❖ Bianchi, M.; Robles, A.M.; Vitale, R.; Helou, S.; et al.; The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related systemic mycoses: evaluation of a manual lysis centrifugation method; *Med Mycol*; 38; 77-80.
- ❖ Biselli, P.J.C.; Juvenale, M.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Duarte, A.J.S.; Benard, G.; 2001. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis; *Med Mycol*; 39; 475-478.
- ❖ Blotta, M.H.S.; Camargo, Z.P.; 1993. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 31; 3; 671-676.
- ❖ Bocca, A.; Silva, M.F.; Silva, C.L.; Cunha, F.Q.; Figueiredo, F.; 1999. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice; *Am J Trop Med Hyg*; 61; 2; 280-287.
- ❖ Borelli, D.; 1964. Concepto de reservárea. La reducida reservárea de la paracoccidioidomycosis; *Dermatol. Venez.*; 4; 71.
- ❖ Borgers, M.; 1987. Changes in fungal ultrastructure after itraconazole treatment, in *Itraconazole Scientific Monograph*; Janssen Pharmaceutica; Beerse; Belgium; 23.
- ❖ Botteon, F.A.; Camargo, Z.P.; Benard, G.; Coelho, R.F.; et al.; 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors; *Med Mycol*; 40; 4; 387-391.
- ❖ Bradford, M.M.; 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal Biochem*; 7; 72; 248-254.
- ❖ Brass, K.; 1969. Observaciones sobre la anatomía, patogenia y evolución de la paracoccidioidomycosis; *Mycopathologia*; 37; 119.
- ❖ Brummer, E.; Hanson, L.H.; Restrepo, A.; Stevens, D.A.; 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages; *Infect Immun*; 57; 8; 2289-2294.
- ❖ Brummer, E.; Restrepo, A.; Hanson, L.E.; Stevens, D.A.; 1990. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vivo* passage and storage; *Mycopathologia*; 109; 13.
- ❖ Brummer, E.; Castañeda, E.; Restrepo, A.; 1993. Paracoccidioidomycosis. An update; *Clin. Microbiol Rev.*; 6; 89-117.
- ❖ Bueno, J.P.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Del Negro, G.M.B.; Assis, C.M.; 1997. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation; *J Med Vet Mycol*; 35; 213-217.
- ❖ Bullock, W.E.; 1995. *Histoplasma capsulatum*, in *Principles and practice of infectious diseases*; Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennett, J.E.; eds.; 4th ed.; New York; Churchill Livingstone; 2340-2353.
- ❖ Bustamante, B.; McEwen, J.G.; Tabares, A.M.; Arango, M. and Restrepo, A.; 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol*; 23; 407.
- ❖ Cacere, C.R.; Romano, C.C.; Mendes Giannini, M.J.; Duarte, A.J.; Benard, G.; 2002. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients; *Clin Immunol*; 105; 2; 215-222.
- ❖ Cain, J.A.; Deepe, G.S.; 1998. Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung; *Infect Immun*; 66; 4; 1474-1481.
- ❖ Calcagno, A.M.; Niño-Vega, G.; San-Blas, F.; San-Blas, G.; 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis; *J Clin Microbiol*; 36; 6; 1733-1736.
- ❖ Caldwell, C.W.; Sprouse, R.F.; Everett, E.D.; 1982. Antigen-specific immunoglobulins in patients with acute pulmonary, chronic pulmonary, or disseminated histoplasmosis; *Diagn Microbiol Infect Dis*; 1; 49-57.
- ❖ Calich, V.L.G.; Kipnis, T.L.; Mariano, M.; Fava-Netto, C.; Dias, W.D.; 1972. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection; *Clin Immunol Immunopathol*; 12; 200.
- ❖ Calich, V.L.G.; Singer-Vermees, L.M.; Siqueira, A.M.; Burguer, E.; 1985. Susceptibility and resistance in inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* strains; *Br J Exp Pathol*; 66; 585-594.

- ❖ Calich, VLG.; Kashino, SS.; 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection; *Braz J Med Biol Res*; 31; 615-623.
- ❖ Camargo, Zp.; Unterkircher, C.; Campoy, SP.; Travassos, LR.; 1988. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests; *J Clin Microbiol*; 27; 6; 2147-2151.
- ❖ Camargo, ZP.; Taborda, CP.; Rodrigues, EC.; Travassos, LR.; 1991. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests; *J Med Vet Mycol*; 29; 31-38.
- ❖ Camargo, ZP.; Gesztesi, JL.; Saraiva, ECO.; Taborda, CP.; et al.; 1994. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 32; 10; 2377-2381.
- ❖ Camargo, ZP.; Baruzzi, RG.; Maeda, SM.; Flonano, MC.; 1998. Antigenic relationship between *Loboia lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* shown by serological methods; *Med Mycol*; 36; 6; 413-417.
- ❖ Campos, MC.; Gesztesi, JL.; Vicentini, AP.; Lopes, JD.; Camargo, ZP.; 1998. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Med Vet Mycol*; 33; 4; 223-227.
- ❖ Cano, LE.; Restrepo, A.; 1987. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 29; 276-283.
- ❖ Cano, LE.; Brunner, E.; Restrepo, A.; 1992. Efecto inhibitorio de la deferoxanina en el desarrollo intracelular de las conidias del *Paracoccidioides brasiliensis*; *Rev Arg Mycol*; 15; 31.
- ❖ Cano, LE.; Gomez, B.; Brummer, E.; Restrepo, A.; Stevens, DA.; 1994. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin; *Infect Immun*; 62; 4; 1494-1496.
- ❖ Cano, MIN.; Cisalpino, PS.; Galindo, I.; Ramirez, JL.; et al.; 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Clin Microbiol*; 36; 3; 742-747.
- ❖ Cano, LE.; Kashino, SS.; Arruda, C.; André, D.; et al.; 1998a. Protective rol of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis; *Infect Immun*; 66; 2; 800-806.
- ❖ Cano, LE.; Singer-Vermes, LM.; Vaz, CAC.; Russo, M.; Calich, VLG.; 1998b. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype parttems; *Infect Immun*; 63; 5; 1777-1783.
- ❖ Cano, LE.; Singer-Vermes, LM.; Costa, TA.; Mengel, JO.; et al.; 2000. Depletion of CD8⁺ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosi; *Infect Immun*; 68; 1; 352-359.
- ❖ Canteros CE.; Soria, MA.; Rivas, MC.; Perez, C.; et al.; 2000. infección in vitro con diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*; *Rev Arg Micol*; 32; 116-122.
- ❖ Carbonell, LM.; Rodriguez, J.; 1965. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in culture and in experimental inoculations; *J Bacteriol.*; 90; 504.
- ❖ Carmona, FJ.; 1971. Análisis estadístico y ecología-epidemiológico de la sensibilidad a la histoplasmina en Colombia; 1950-1968; *Antioquia Med*; 21; 109-154.
- ❖ Carr J.; Shearer, G.; 1998. Genome size, complexity and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*; *J Bacteriol*; 180; 24; 6697-6703.
- ❖ Caruso, M.; Sacco, M.; Medoff, G.; Maresca, B.; 1987. Heat shock 70 genes is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity; *Mol Microbiol*; 1; 2; 151-158.
- ❖ Casotto, M.; 1990. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form; *J Clin Microbiol*; 28; 6; 1188-1193.
- ❖ Casotto, M.; Paris, S.; camargo, ZP.; 1991. Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Med Vet Mycol*; 29; 243-253.
- ❖ Chandrashekar, R.; Curtis, KC.; Rawot, BW.; Kobayashi, GS.; Weil, GJ.; 1997. Molecular cloning and caracterization of a recombinant *Histoplasma capsulatum* antigen for antibody-based diagnosis of human histoplasmosis; *J Clin Microbiol*; 35; 5; 1071-1076.
- ❖ Chequer-Bou-Habib, D.; Daniel-Daniel, C.; Banic, D.; et al.; 1989a. Policlonal B-cell activation in paracoccidioidomycosis; *Mycopathologia*; 108; 89.
- ❖ Chequer-Bou-Habib, D.; Oliveira-Neto, MP.; Ferreira-da-Cruz, MF.; Galvao-Castro, B.; 1989b. Possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis; *Braz J Med Biol Res*; 22; 205.
- ❖ Chequer-Bou-Habib, D.; Ferreira-da-Cruz, MF.; Galvao-Castro, B.; 1992. Immunosuppressive effect of paracoccidioidomycosis sera on the proliferative response of normal mononuclear cells; *Mycopathologia*; 119; 65-71.

- ❖ Chick, EW.; Roberts, GD.; 1974. The varyina susceptibility of different genetic strains of laboratory mice to *Histoplasma capsulatum*; *Mycopathol Mycol Appl*; 52; 3; 251-253.
- ❖ Cisalpino, PS.; Puccia, R.; Yamauchi, LM.; Cano, MIN.; et al.; 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Biol Chem*; 271; 8; 4553-4560.
- ❖ Clemons, KV.; Feldman, D.; Stevens, DA.; 1989. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J. Gen. Microbiol.*; 135; 1607.
- ❖ Clemons, KV.; Darbonne, WC.; Cumutte, JT.; Sobel, RA.; Stevens, DA. Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice; *Microbes Infect*; 2; 9; 997-1001.
- ❖ Corredor, GG.; Castaño, JH.; Peralta, LA.; et al.; 1999. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus* in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia; *Rev. Iberoam. Micol.*; 16; 216.
- ❖ Cox, RA.; Arnold, DR, 1980. Immunoglobulin E in histoplasmosis; *Infect Immun*; 29; 290-293.
- ❖ Cunha, AF.; Sousa, MV.; Silva, SP.; Jesuino, RSA.; Soares, CMA.; Felipe, MSS.; 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 37; 115-121.
- ❖ Cunha, DA.; Zancopé-Oliveira, RM.; Felipe, MSS.; Salem-Izacc, SM.; et al.; 2002. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*; *Clin Diag Lab Immunol*; 9; 2; 374-377.
- ❖ da Fonseca, CA.; Jesuino, RS.; Felipe, MSS.; Cunha, DA et al.; 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*; *Microbes Infect*; 3; 7; 535-542.
- ❖ da Silva, SP.; Borges-Walmsley, ML.; Silva Pereira, I.; et al.; 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*; *Mol Microbiol*; 31; 4; 1039-1050.
- ❖ Da Silva, DF.; Assis, CM.; Zmaboni, IM.; Oliveira, LE.; 2002. Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis: evaluation of different antigenic preparations; *Annual Review of Biomedical Sciences*; special issue 2002; VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis; pp79.
- ❖ Darling, ST; 1906. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis of the liver, spleen and lymph nodes; *J A M A*; 46; 1283-1285.
- ❖ De Brito, T.; Sandhu, GS.; Kline, BC.; Aleff, RA.; et al.; 1999. In situ hybridization in paracoccidioidomycosis; *Med Mycol*; 37; 207-211.
- ❖ De Monbreun, WA, 1934. The cultivation and characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*; *Am J Trop Med*; 14; 93-135.
- ❖ Deepe, GS.; 1994. Role of CD8⁺ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice; *J Immunol*; 152; 3491.
- ❖ Deepe, GS.; Durose, GO.; 1995. Immunobiological actividad of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 63; 8; 3151-3157.
- ❖ Deepe, GS.; Gibbons, R.; Brunner, GD.; Gomez, FJ.; 1996. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*; *J Infect Dis*; 174; 828-834.
- ❖ Deepe, GS.; Gibbons, R.; Woodward, E.; 1999. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*; *J Immunol*; 163; 4985-4993.
- ❖ Deepe, GS.; Gibbons, R.; 2000. Recombinant urine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the course of pulmonary histoplasmosis in immunocompetent and immunodeficient mice; *Antimicrob Agents Chem*; 44; 12; 3328-3336.
- ❖ Del Negro, GMB.; García, NM.; Rodrigues, EG.; Cano, MIN.; et al.; 1991. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 33; 277.
- ❖ Del Negro, G.; Lacaz, CS.; Zamith, VA.; Siqueira, AM.; 1994. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 15; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Diez, S.; García, EA.; Pino, PA.; et al.; 1999. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 41; 351.
- ❖ Diez, S.; Gómez, BL.; Restrepo, A.; Hay, RJ.; Hamilton, AJ.; 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry; *J Clin Microbiol*; 40; 2; 359-365.

- ❖ Diniz, SN.; Cisalpino, PS.; Koury, MC.; Andrade, GM.; et al.; 1999. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens; *Microbes Infect*; 1; 353.
- ❖ Diniz, SN.; Cisalpino, PS.; Freire, ATF.; Silva-Teixeira, DN.; et al.; 2001. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Human Immunol*; 62; 799-808.
- ❖ Diniz, SN.; Carvalho, KC.; Cisalpino, PS.; Silveira, JF.; et al.; 2002. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins; *Clin Diag Lab Immunol*; 9; 6; 1200-1204.
- ❖ Do Valle, Acf. ;Costa, RLB.; Fialho Monteiro, PC.; Von Helder, J. et al.; 2001. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis; *Med Mycol*; 39; 373-377.
- ❖ Domer, JE.; Hamilton, JG.; Harkin, JC.; 1967. Comparative study of the cell walls of the yeast-like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*; *J Bacteriol*; 94; 466-474.
- ❖ Durkin, MM.; Connolly, PA.; Wheat, LJ.; 1997. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigen; *J Clin Microbiol*; 35; 9; 2252-2255.
- ❖ Fava Netto, C.; 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico; *Arq Cir Clin Exp*; 18; 197.
- ❖ Fava Netto, C.; Raphael, A.; 1961. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 3; 161.
- ❖ Fava Netto, C.; Guerra, MAG.; Costa, EO.; Yasuda, PH.; 1976. Contribuição a sorologia da paracoccidioidomicose. Comparação entre reações de fixação de complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner y Maltaner e micro-método e reações de precipitação em meio líquido e gel de agar; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 18; 81.
- ❖ Fava, S di C.; 1996. Contribuição ao estudo da reação intradérmica de histoplasmina. Padronização de antígeno polissacarídeo e comparação com a histoplasmina clássica (antígeno filtrado) através de inquérito epidemiológico; *Tese de Doutorado*; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo.
- ❖ Fava, S di C.; Rivitti, EA.; Cucé, LC.; Weiss, S.; 1997. Histoplasmin reaction. Comparison of a polysaccharide antigen to the filtrate antigen; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 39; 5; 257-260.
- ❖ Fazoli, RA.; Singer-Vermes, LM.; Kashino SS.; Burguer, E.; et al.; 1994. Delayed-hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis; *Mycopathologia*; 126; 137-146.
- ❖ Felipe, MS.; Andrade, RV.; Petrofeza, SS.; Maranhao, AQ.; et al.; 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis; *Yeast*; 20; 3; 263-271.
- ❖ Ferreira-da-Cruz, MF.; Galvao-Castro, B.; Daniel-Ribeiro, CT.; 1991. Sensitive immunoradiometric assay for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in human sera; *J Clin Microbiol*; 29; 6; 1202-1205.
- ❖ Ferreira-da-Cruz, MF.; Galvao-Castro, B.; Daniel Ribeiro, C.; 1992. Isolation and antigenicity of a 45-kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen; *Infect Immun*; 60; 7; 2667-2671.
- ❖ Figueiredo, F.; Alves, LMC.; Silva, CL.; 1993. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof; *Clin Exp Immunol*; 93; 189-194.
- ❖ Figueroa, JL.; Hamilton, AJ.; Bartholomew MA.; Harada, T.; et al.; 1990. Preparation of species-specific murine monoclonal antibodies against the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Clin Microbiol*; 28; 8; 1766-1769.
- ❖ Figueroa, JL.; Hamilton, A.; Allen, M.; Hay, R.; 1994. Immunochemical detection of a novel 22- to 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies; *J Clin Microbiol*; 32; 6; 1566-1574.
- ❖ Figueroa, JL.; Hamilton, AJ.; Allen, MH.; Hay, RJ.; 1995. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera; *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 89; 5; 566-572.
- ❖ Fisher, KL.; Deepe, GS.; Woods, JP.; 1999. *Histoplasma capsulatum* strain variation in both H antigen production and b-glucosidase activity and overexpression of HAG1 from telomeric linear plasmid; *Infect Immun*; 67; 7; 3312-3316.
- ❖ Fisher, KL.; Woods, JP.; 2000. Determination of b-glucosidase enzymatic function of the *Histoplasma capsulatum* H antigen using a native expression system; *Gene*; 247; 191-197.
- ❖ Flavia Popi, AF.; Lopes, JD.; Mariano, M.; 2002. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus; *Cell Immunol*; 218; 1-2; 87-94.

- ❖ Fojtasek, MF.; Kleinman, MB.; Connolly-Stringfield, P.; Blair, R.; Wheat, LJ.; 1994. The *Histoplasma capsulatum* antigen assay in disseminated histoplasmosis in children; *Pediatr Infect Dis J*; 13; 9; 801-805.
- ❖ Franco, M.; Montenegro, MR.; Mendes, RP.; Marques, SA.; et al.; 1987. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its clinical forms; *Rev Soc Bras Med Trop*; 20; 129.
- ❖ Franco, M.; Peraçoli, MTS.; Soares, AMVC.; Montenegro, M.; et al.; 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis; *Curr Trop Med Mycol*; 5; 115.
- ❖ Freitas-da-Silva, G.; Roque-Barreira, MC.; 1992. Antigenemia in paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 30; 2; 381-385.
- ❖ Furcolow, ML.; 1958. Recent studies on the epidemiology of histoplasmosis; *Ann N Y Acad Sci*; 72; 127-164.
- ❖ Gago, J.; Godio, L.; Ochoa, R.; Negroni, R.; Nejanakis, MR.; 1995. Obtención de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* a partir de cultivos en medios sólidos; *Rev Arg Microbiol*; 27; 139-145.
- ❖ Galfré, GA.; Milstein, C.; 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures; *Methods Enzymol*; 73; 3-46.
- ❖ Garringer, TO.; Wheat, LJ.; Brizendine, EJ.; 2000. Comparison of an established antibody sandwich method with in inhibition method of *Histoplasma capsulatum* antigen detection; *J Clin Microbiol*; 38; 8; 2909-2913.
- ❖ Gesztesi, JL.; Puccia, R.; Travassos, LR.; Vicentini, AP.; 1996. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis; *Hybndoma*; 15; 6; 415-422.
- ❖ Gezuele, E.; 1989. Aislamiento de *Paracoccidioides brasiliensis* sp. de heces de un pingüino de la Antártida, in *Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis*, Caracas, Venezuela; abstract B-2.
- ❖ Giannini, MJ.; Bueno, JP.; Shikanai-Yasuda, MA.; Masuda, A.; et al.; 1990. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment; *Am J Trop Med Hyg*; 43; 2; 200-206.
- ❖ Giraldo, R.; Restrepo, A.; Gutierrez, F.; Robledo, M.; et al.; 1976. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients; *Mycopathologia*; 58; 63.
- ❖ Goldani, L.; Maia, AI.; Sugar, AM.; 1995. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Clin Microbiol*; 33; 6; 1652-1654.
- ❖ Goldani, L.; Sugar, Am.; 1998. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis; *Am J Med Trop*; 58; 2; 152-153.
- ❖ Gomes, GM.; Cisalpino, PS.; Taborda, CP.; Camargo, ZP.; 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 38; 9; 3478-3480.
- ❖ Gomez, AM.; Bullock, WE.; Taylor, CL.; Deepe, GS.; 1988. Role of L3T4 cells in host defense against *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 56; 1685.
- ❖ Gomez, AM.; Rhodes, JC.; Deepe Jr, GS.; 1991a. Antigenicity and immunogenicity of an extract from cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells; *Infect Immun*; 59; 1; 330-336.
- ❖ Gomez, FJ.; Gomez, AM.; Deepe, GS.; 1991b. Protective efficacy of a 62-kilodalton antigen, HIS-62, from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells; *Infect Immun*; 59; 12; 4459-4464.
- ❖ Gomez, FJ.; Gomez, AM.; Deepe, GS.; 1992. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat-shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice; *Infect Immun*; 60; 2565-2571.
- ❖ Gomez, FJ.; Allendörfer, R.; Deepe, GS.; 1995. Vaccination with recombinant heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis; *Infect Immun*; 63; 7; 2587-2595.
- ❖ Gómez, BL.; Figueroa, JI.; Hamilton, AJ.; Ortiz, BL.; et al.; 1997a. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens; *J Clin Microbiol*; 35; 12; 3278-3283.
- ❖ Gómez, BL.; Figueroa, JI.; Hamilton, AJ.; Ortiz, BL.; et al.; 1997b. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis; *J Clin Microbiol*; 35; 10; 2618-2622.
- ❖ Gómez, BL.; Figueroa, JI.; Hamilton, AJ.; Diez, S.; et al.; 1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy; *J Clin Microbiol*; 36; 11; 3309-3316.
- ❖ Gómez, BL.; Figueroa, JI.; Hamilton, AJ.; Diez, S.; et al.; 1999. Detection of the 70-kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up; *J Clin Microbiol*; 37; 3; 675-680.

- ❖ Gonzalez, A.; de Gregori, W.; Velez, D.; Restrepo, A.; Cano, LE.; 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia; *Infect Immun*; 68; 5; 2546-2552.
- ❖ Goodwin, JE.; Shapiro, JL.; Thurman, GH.; DesPresz, R.; 1980. Disseminated histoplasmosis. Clinical and pathogenic correlations; *Medicine*; 59; 1-33.
- ❖ Goodwin, JE.; Lloyd, R.; DesPresz, R.; 1981. Histoplasmosis in the normal host; *Medicine*; 60; 231-266.
- ❖ Green, JH.; Pine, L.; 1985. Preparation of H and M antigens of *Histoplasma capsulatum* free of heterologous antigens; *Curr Microbiol*; 12; 209-216.
- ❖ Grosse, E.; Tamsitt, J.; 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bras (*Artibeus lituratus*) in Colombia S.A.; *Sabouraudia*; 4; 124-125.
- ❖ Guedes HL.; Guimarães, AJ.; Muniz M de M.; Pizzini, CV.; et al.; 2003. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen; *J Clin Microbiol*; 41; 2; 535-539.
- ❖ Hamilton, A.; Bartholomew, MA.; Figueroa, J.; Fenelon, LE.; Hay, RJ.; 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; 6; 479-485.
- ❖ Hamilton, A.; Bartholomew, MA.; Fenelon, LE.; Figueroa, J.; Hay, RJ.; 1990b. A murine monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*; *J Gen Microbiol*; 136; Pt 2; 331-335.
- ❖ Harms, JE.; Deepe, GS.; 1988. Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate *Histoplasma capsulatum*-reactive T cells in vitro; *Infect Immun*; 56; 9; 2343-2349.
- ❖ Heiner, DC.; 1958. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel; *Pediatrics*; 22; 616-629.
- ❖ Hildebrand, TM.; Rosario Filho, NA.; Telles Filho, FQ.; Costa, O.; Miasaki, N.; Mira, JGS. and Miyaki, M.; 1987. Paracoccidioidomicose na criança. Aspectos clínicos e laboratoriais em 25 casos; *J. Pediatría*; 63; 92.
- ❖ Hotchi, M.; Schwarz, J.; Kaplan, W.; 1972. Limitations of fluorescent antibody staining of *Histoplasma capsulatum* in tissue sections; *Sabouraudia*; 10; 2; 157-63.
- ❖ Howard, DH.; 1981. Comparative sensitivity of *Histoplasma capsulatum* conidiospores and blastospores to oxidative antifungal systems; *Infect Immun*; 32; 381-387.
- ❖ Howard, DH.; 1984. The epidemiology and ecology of blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis; *Zbl Bakt Hyg*; A257; 219-227.
- ❖ Inai, T.; Sano, A.; Mikami, Y.; Watanabe, K.; et al.; 2000. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5 x 8S regions; *Med Mycol*; 38; 4; 323-326.
- ❖ Jeavons, L.; Hunt, L.; Hamilton, A.; 1994. Immunochemical studies of heat-shock protein 80 of *Histoplasma capsulatum*; *J Med Vet Mycol*; 32; 47-57.
- ❖ Jesuino, RS.; Azevedo, MO.; Felipe, MS.; Pereira, M.; De Almeida Soares, CM.; 2002. Characterization of a chaperone ClpB homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Yeast*; 19; 11; 963-972.
- ❖ Juvenale, M.; Del Negro, GM.; Duarte, AJS.; Benard, G.; 2001. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis; *J Med Microbiol*; 50; 127-134.
- ❖ Kamei, K.; Brummer, E.; Clemons, KV.; Stevens, DA.; 1992. Induction of stress protein synthesis in *Histoplasma capsulatum* by heat, low pH and hydrogen peroxide; *J Med Vet Mycol*; 30; 385-393.
- ❖ Kamel, SM.; Wheat, LJ.; Garten, ML.; Bartlett, MS.; et al.; 1989. Production and characterization of murine monoclonal antibodies to *Histoplasma capsulatum* yeast cell antigens; *Infect Immun*; 57; 3; 896-901.
- ❖ Kanetsuna, F.; Carbonell, LM.; Moreno, RE.; Rodriguez, J.; 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Bacteriol*; 97; 1036.
- ❖ Kaplan, W.; 1972. Application of immunofluorescence to the diagnosis of paracoccidioidomycosis; *PAHO Scient Publ*; 254; 224.
- ❖ Karhawi, ASK.; Colombo, AL.; Salomao, R.; 2000. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission; *Med Mycol*; 38; 225-229.
- ❖ Kashino, SS.; Fazioli, RA.; Moscardi-Bacchi, M.; Franco, M.; et al.; 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection; *Mycopathologia*; 130; 131-140.

- ❖ Kasuga, T.; Taylor, JW.; White, TJ.; 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling; *J Clin Microbiol*; 37; 3; 653-663.
- ❖ Kaufman, L.; Blumer, S.; 1966. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains; *J Bacteriol*; 91; 1434-1439.
- ❖ Keath, EJ.; Kobayashi, GS.; Medoff, G.; 1992. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphism in a nuclear gene; *J Clin Microbiol*; 30; 8; 2104-2107.
- ❖ Kersulyte, D.; Woods, JP.; Keath, EJ.; Goldman, WE.; Berg, DE.; 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers; *J Bacteriol*; 174; 22; 7075-7079.
- ❖ Klimpel, KR.; Goldman, WE.; 1988. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack α -(1,3)-glucan; *Infect Immun*; 56; 2997-3000.
- ❖ Kugler, S.; Sebghati, TS.; Eissenberg, LG.; Goldman, WE.; 2000. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*; *Proc Nat Acad Sci*; 97; 16; 8794-8798.
- ❖ Kumar, BV.; Maresca, B.; 1988. Purification of membranes and identification of phase-specific proteins of the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Arch Biochem Biophys*; 261; 1; 212-221.
- ❖ Kurita, N.; Oarada, M.; Ito, E.; Miyaji, M.; 1999. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 37; 261-267.
- ❖ Kurita, N.; Oarada, M.; Miyaji, M.; Ito, E.; 2000. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 38; 177-182.
- ❖ Lacaz, CS.; Sampaio, SAP.; 1958. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares; *Rev Paul Med*; 52; 443.
- ❖ Lacaz, CS.; Passos Filho, MCR.; Fava Netto, C. and Macarron, B.; 1959. Contribuição para o estudo da "blastomicose-infecção". Inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidino-positivos; *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*; 1; 245.
- ❖ Lacaz, CS.; 1994a. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 2; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Lacaz, CS.; 1994b. Mycological diagnosis, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 26; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Laemmli, UK.; 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*; 227; 680-685.
- ❖ Lane, TE; Wu-Hsieh, BA.; Howard, DH.; 1991. Iron limitation and the gamma interferon-mediated antihistoplasma state of murine macrophages; *Infect Immun*; 59; 2274-2278.
- ❖ Larsh, HW.; 1970. Ecology and epidemiology of histoplasmosis, in *Proceedings of the International Symposium on Mycoses*; Pan American Health Organization; 205; 59-63.
- ❖ Long, KH.; Gomez, FJ.; Morris, RE.; Newman, SL.; 2003. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages; *J Immunol*; 170; 1; 487-494.
- ❖ Lowry, OH.; Rosebrough, NJ.; Farr, AL.; Randall, RJ.; 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J Biol Chem*; 193; 265-275.
- ❖ Lutz, A.; 1908. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas; *Bras-Méd.*; 22; 121.
- ❖ Mackinnon, JE.; 1972. Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis in *Proceedings of First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis*; pp 45-52; Pan American Health Organization.
- ❖ Mamoni, RL.; Rossi, CL.; Camargo, ZP.; Blotta, MH.; 2001. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis; *Am J Trop Med Hyg*; 65; 3; 237-241.
- ❖ Mamoni, RL.; Nouér, SA.; Oliveira, SJ.; Musatti, CC. et al.; 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis; *Med Mycol*; 40; 153-159.
- ❖ Maresca, B.; Kobayashi, GS.; 1993. Changes in membrane fluidity modulate heat shock gene expression and produced attenuated strains in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Arch Med Res*; 24; 3; 247-249.
- ❖ Maresca, B.; Kobayashi, GS.; 2000. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*; in *Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeast*; Contrib Microbiol; Ernst, JF.; Schmidt, A.; eds.; Basel: Karger; 5; 201-216.

- ❖ Marques, S.; Shikanai-Yasuda, MA.; 1994. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, AIDS, and cancer; in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 30; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Marques, M.; Soares, A.; Franco, M.; Camargo, ZP.; et al.; 1996. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen in the detection of delayed dermal hypersensitivity in experimental and human paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 34; 265-272.
- ❖ Marques Mello, L.; Silva-Vergara, ML.; Rodrigues Junior, V.; 2002. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production; *Human Immunol*; 63; 149-154.
- ❖ Martinez, R.; 1994. Other laboratory tests: hematologic and biochemical changes; in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 28; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Martins, R.; Marques, S.; Alves, M. et al.; 1997. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using dot-blot, ELISA and western-blot; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 39; 261-269.
- ❖ Mattar-Filho, R.; Azevedo, MO.; Pereira, M.; Jesuino, RSA.; et al.; 1997. Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Med Vet Mycol*; 35; 341-345.
- ❖ McEwen, JG.; Bedoya, V.; Patiño MM.; Salazar, ME.; Restrepo, A.; 1987a. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia; *J Med Vet Mycol*; 25; 165.
- ❖ McEwen, JG.; Restrepo, B.L.; Salazar, ME.; Restrepo, A.; 1987b. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia; *J Med Vet Mycol*; 25; 343-345.
- ❖ McEwen, JG.; Ortiz, BL.; García, AM.; Florez, AM.; et al.; 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*; *Fungal Genet Biol*; 20; 125-131.
- ❖ Medeiros Muniz, M.; Pizzini, CV.; Peralta, JM.; Reiss, E.; Zancopé-Oliveira, RM.; 2001. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals and clinical specimens in Rio de Janeiro state, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay; *J Clin Microbiol*; 39; 12; 4487-4494.
- ❖ Medoff, GB.; Maresca, B.; Lambowitz, G.; Kobayashi, A. et al.; 1986. Correlation between pathogenicity and temperature in different strains of *Histoplasma capsulatum*; *J Clin Invest*; 78; 1638-1647.
- ❖ Medoff, GB.; Kobayashi, GS.; Painter, A.; Travis, S.; 1987. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 55; 1355-1358.
- ❖ Meloni-Bruneri, LH.; Picina, C.; Burguer, E.; Friedrich, M.; et al.; 1997. Changes in plasmatic biochemical parameters during experimental murine paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 35; 237-241.
- ❖ Mendes, RP.; 1994. The genus of clinical manifestations, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 16; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Mendes-Giannini, MJS.; Camargo, ME.; Lacaz, CS.; Ferreira, AW.; 1984. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 20; 1; 103-108.
- ❖ Mendes Giannini, MJS.; Bueno, JP.; Shikanai-Yasuda, MA.; Ferreira, AW.; Masuda, A.; 1989. Detection of the 43000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis; *J Clin Microbiol*; 27; 12; 2842-2845.
- ❖ Mendes-Giannini, MJS.; Del Negro, GB.; Siqueira, AM.; Serodiagnosis, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 27; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Mendes-Giannini, MJS.; Toscano, E.; Del Negro, GB.; Assis, CM.; Garcia, NM.; 1995. Immunochemical study of a *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide-like antigen; *J Med Vet Mycol*; 33; 379-383.
- ❖ Minchiotti, G.; Gargano, S.; Maresca, B.; 1992. Molecular cloning and expression of hsp82 gene of the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Biochim Biophys Acta*; 1131; 1; 103-107.
- ❖ Miura, CSN.; Esteveao, D.; Lopes, JD.; Itano, EN.; 2001. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients; *Med Mycol*; 39; 423-428.
- ❖ Molinari-Madlum, EEWI.; Felipe, MSS.; Soares, CMA.; 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis; *Med Mycol*; 37; 269-276.
- ❖ Montenegro, MR.; Franco M.; 1994. Pathology, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 9; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Montoya, AE.; Moreno, MN.; Restrepo, A.; McEwen, JG.; 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Fungal Gen Biol*; 21; 223-227.

- ❖ Montoya, AE.; Alvarez, AL.; Moreno, MN.; Restrepo, A.; WeEwen, JG.; 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 37; 219-222.
- ❖ Morais, FV.; Barros, TF.; Fukada, MK.; Cisalpino, PS.; Puccia, R.; 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Clin Microbiol*; 38; 11; 3960-3966.
- ❖ Moscardi-Bacchi, M.; Brummer, E.; Stevens, DA.; 1994. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes; *J Med Microbiol*; 40; 159-164.
- ❖ Moses, A.; 1916. Fixação de complemento na blastomicose; *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 8; 68.
- ❖ Mota, NGS.; Peraçoli, MTS.; Mendes, RP.; Gattass, CR.; et al.; 1988. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 26; 105.
- ❖ Motoyama, AB.; Venancio, EJ.; Brandao, GO.; Petrofeza-Silva, S.; et al.; 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA; *J Clin Microbiol*; 38; 8; 3106-3109.
- ❖ Munk, ME.; Kajdacsy-Balla, A.; Del Negro, G.; Cuce, LC.; Silva, WD.; 1992. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 30; 317.
- ❖ Muotoc-Okafor, Fa.; Gugnani, HC.; Gugnani, A.; Okafor, G.; 2000. Antibodies to antigens of *Histoplasma*, *Blastomyces* and *Candida* in HIV patients and carriers in Nigeria; *Mycoses*; 43; 173-175.
- ❖ Musatti, CC.; Peraçoli, MTS.; Soares, AMVC.; Rezkallah-Iwasso, MT.; 1994. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis, in *Paracoccidioidomycosis*; cap. 11; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Naiff, R.; Ferreira, L.; Barrett, T.; Naiff, M.; Arias, J.; 1986. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 28; 19.
- ❖ Nakagawa Itano, E.; Uno, J.; Sano, A.; Yama, K.; et al.; 2002. Detection of the gp43 gene and (1-3)-beta-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice; *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*; 43; 1; 29-35.
- ❖ Nascimento, FRF.; Calich, VLG.; Rodriguez, D.; Russo, M.; 2002. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility; *J Immunol*; 168; 4593-4600.
- ❖ Negroni, P.; Negroni, R.; Nuestra experiencia de la blastomicosis sudamericana en la Argentina; *Mycopathologia*; 26; 264.
- ❖ . Negroni, P.; 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino; *Prensa Med. Argent.*; 53; 2381.
- ❖ Negroni, R.; Negroni, P.; 1968. Clinical and immunological aspects of South American blastomycosis in Argentina; *Torax*; 17; 1; 63-66.
- ❖ Negroni, R.; 1970. Las micosis broncopulmonares en la República Argentina; *El Tórax*; 19: 67-75; Montevideo.
- ❖ Negroni, R.; Robles, AM.; 1974. Pronostic value of the skin test in paracoccidioidomycosis; *Med Cutan Ibero Lat Am*; 2; 6; 453-457.
- ❖ Negroni, R.; Iovanitti, C.; Robles, AM.; 1976a. Estudio de las reacciones serológicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*; *Rev Asoc Arg Microbiol*; 8; 68.
- ❖ Negroni, R.; Elias Costa, MR.; Bianchi, O.; Galimberti, R.; 1976b. Preparation and study of a *Paracoccidioides brasiliensis* antigen needed for skin test; *Saboraudia*; 14; 3; 265-273.
- ❖ Negroni, R.; 1988. Azole derivatives in the treatment of paracoccidioidomycosis, in *Antifungal Drugs*; Georgiev, V. *Ann NY Acad Sci*; 544; 487.
- ❖ Negroni, R.; Robles, AM.; Arechavala, A.; Taborda, A.; 1990. Experiencia terapéutica con el fluconazol en las micosis profundas; *Rev Arg Micol*; 13; 26-31.
- ❖ Negroni, R.; Taborda, A.; Robles, AM.; Arechavala, A.; 1992. Itraconazole in the treatment of histoplasmosis associated with AIDS; *Mycoses*; 35; 281-287.
- ❖ Negroni, R.; 1993. Histoplasmosis, en *Micología Médica*; Torres Rodrigues JM et al., eds.; Barcelona; Masson; 247-256.
- ❖ Negroni, R.; 1994. Histoplasmosis; *Monografías Dermatológicas*; 7; 271-284.
- ❖ Negroni, R.; Robles, AM.; Arechavala, A.; Iovanitti, C.; et al.; 1995. Chronic meningoencephalitis due to *Histoplasma capsulatum*. Usefulness of serodiagnostic procedures in diagnosis; *Serodiagn Immunother Infect Disease*; 7; 84-89.
- ❖ Negroni, R.; 1996a. Inmunología de las micosis en *Inmunología e Inmunopatología: fundamentos*; R. Margni; Editorial Médica Panamericana SA; Buenos Aires; Argentina.

- ❖ Negroni, R.; 1996b. Tratamiento actual de las micosis sistémicas endémicas; *Rev Iberoam Micol*; 13; S44-S50.
- ❖ Negroni, R.; Robles, AM.; Arechavala, A.; Bianchi, M.; Helou, S.; 1997. Histoplasmosis relacionada al SIDA: su estado actual en la Argentina; *Pren Med Argent*; 84; 696-700.
- ❖ Negroni, R.; Iovanitti, C.; Arechavala, AI.; Carnovale, S.; Euguchi, K.; 1998. Preparación y estudio de un exoantígeno de la fase lavaduniforme de *Histoplasma capsulatum* para reacciones serológicas; *Rev Iberoam Micol*; 15; 282-285.
- ❖ Negroni, R.; 2000. Clinical spectrum and treatment of classic histoplasmosis; *Rev Iberoam Micol*; 17; 161-169.
- ❖ Newberry, WM.; Tosh, FE.; Doto, IL.; 1967. The complement fixation test in the diagnosis of chronic pulmonary histoplasmosis and blastomycosis; *J Chronic Dis*; 20; 303-309.
- ❖ Newman, SI.; Bucher, C.; Rhodes, J.; Bullock, WE.; 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages; *J Clin Invest*; 85; 223-230.
- ❖ Niño-Vega, G.; Calcagno, AM.; San-Blas, F.; San-Blas, G.; et al.; 2000a. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 38; 437-441.
- ❖ Niño-Vega, GA.; Munro, CA.; San-Blas, G.; Gooday, GW.; Gow, NAR.; 2000b. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transition in *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 38; 31-39.
- ❖ Oliveira, SL.; Silva, MF.; Soares, AMVC.; et al.; 1992. Cell wall fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* induce hypergammaglobulinemia; *Mycopathologia*; 121; 1-5.
- ❖ Oliveira, SJ.; Mamoni, RL.; Mussatti, CC.; Papiadornou, PM.; Blotta, MH.; 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls; *Microbes Infect*; 4; 2; 139-144.
- ❖ Ono, MA.; Itano, EN.; Mizuno, LT.; Mizuno, EH.; Camargo, ZP.; 2002. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil?; *Med Mycol*; 40; 5; 493-499.
- ❖ Ortiz, BL.; García, AM.; Restrepo, A.; McEwen, JG.; 1996. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*; *Clin Diag Lab Immunol*; 3; 2; 239-241.
- ❖ Ortiz, BL.; Diez, S.; Urán, ME.; Rivas, JM.; et al.; 1998. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis; *Clin Diag Lab Immunol*; 5; 6; 826-830.
- ❖ Parise-Forte, MR.; Pereira da Silva, MF.; Sugizaki, MF.; Defaveri, J.; et al.; 2000. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages; *Med Mycol*; 38; 51-60.
- ❖ Patino, MM.; Williams, D.; Ahrens, J.; Graybill, JR.; 1987. Experimental histoplasmosis in the beige mouse; *J Leukocyte Biol*; 41; 228-235.
- ❖ Payan, DG.; Whear, JL.; Brahmi, Z.; Ip S.; et al.; Changes in immunoregulatory lymphocyte populations in patients with histoplasmosis; *J Clin Immunol*; 4; 2; 98-107.
- ❖ . Peraçoli, MTS.; Soares, AMVC.; Mendes, RP.; Marques, SA.; et al.; 1991. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 29; 373.
- ❖ . Peraçoli, MT.; Fortes, MR.; Da Silva, MF.; Montenegro, MR.; 1995. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 37; 2; 129-136.
- ❖ Peraçoli, MTS.; Sugisaki MF. ;Mendes, RP.; Naiff, R.; Montenegro, MR.; 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters; *Mycopathologia*; 148; 123.
- ❖ Pereira, M.; Felipe, MSS.; Brígido, MM.; Soares, CMA.; Azevedo, MO.; 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*; *Yeast*; 16; 451-462.
- ❖ Pimenta, MA.; Almeida-Paes, R.; Monteiro, PCF.; Valle, ACF.; et al.; 2002. Evaluation of clinical specimens for diagnosis of different clinical forms of paracoccidioidomycosis; *Annual Review of Biomedical Sciences*; special issue 2002; VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis; pp69.
- ❖ Pinto, AR.; Puccia, R.; Diniz, SN.; Franoc, MF.; Travassos, LR.; 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*; *Vaccine*; 18; 3050-3058.
- ❖ Pizzini, CV.; Zancopé-Oliveira, RM.; Reiss, E.; Hajjeh, R. et al.; 1999. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis; *Clin Diag Lab Immunol*; 6; 1; 20-23.
- ❖ Puccia, R.; Scheckman, S.; Gorín, PA.; Travassos, LR.; 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen; *Infect Immun*; 53; 199.

- ❖ Puccia, R.; Travassos, LR.; 1991. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease; *J Clin Microbiol*; 29; 8; 1610-1615.
- ❖ Puccia, R.; Carmona, AK.; Gesztesi, JL.; Juliano, L.; Travassos, LR.; 1998. Exocellular proteolytic of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane; *Med Mycol*; 36; 5; 345-348.
- ❖ Queiroz-Telles, F.; 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings in *Paracoccidioidomycosis*; cap.3; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Raman, C.; Khardori, N.; Von Behren LA.; Wheat, LJ.; Tewari, RP.; 1990. Evaluation of an ELISA for the detection of anti-*Histoplasma* ribosomal and antihistoplasmin antibodies in histoplasmosis; *J Clin Lab Anal*; 4; 3; 199-207.
- ❖ Ratnoff, WD.; Pepple, JM.; Winkelstein, JA.; 1980. Activation of alternate complement pathway by *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 30; 147-149.
- ❖ Reiss, E.; Knowles, JB.; Bragg, SL.; Kaufman, L.; 1986. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method; *Infect Immun*; 53; 3; 540-546.
- ❖ Restrepo, A.; 1966. La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis; *Sabouraudia*; 4; 223.
- ❖ Restrepo, A.; Moncada, LH.; 1972. Indirect immunofluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis; *Appl Microbiol*; 28; 138.
- ❖ Restrepo, A.; Moncada, LH.; 1974. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis; *Appl Microbiol*; 28; 138.
- ❖ Restrepo, MA.; Robledo, M.; Giraldo, R.; Hernandez, H. et al.; 1977. The gamut of paracoccidioidomycosis; *Am J Med*; 61; 33.
- ❖ Restrepo, A.; Moncada, LH.; 1978. Una prueba de latex en lámina para el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis; *Bol Ofic Sanit Panamer*; 84; 520.
- ❖ Restrepo, A.; Bedout, C.; Cano, LE.; Arango, MD.; Bedoya, V.; 1981. Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node by microaerophilic incubation of liquid media; *Sabouraudia*; 19; 295.
- ❖ Restrepo, A.; Salazar, ME.; Cano, LE.; Stover, EP.; Feldman, D.; Stevens, DA.; 1984a. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis; *Infect. Immun.*; 46; 346.
- ❖ Restrepo, A.; Tabares, CBA.; 1984b. *In vitro* susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents; *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 26; 322.
- ❖ Restrepo, A.; 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved; *J. Med. Vet. Mycol*; 23; 323.
- ❖ Restrepo, BL; McEwen, JG.; Salazar, ME.; Restrepo, A.; 1986. A morphological development of the conidia by *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Med Vet Mycol*; 24; 337.
- ❖ Restrepo, A.; 1996. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis; *ISHAM Myc Newsletter*; 59; 4.
- ❖ Restrepo, A.; McEwen, JG.; Castañeda, E.; 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving riddle?; *Med. Mycol.*; 39; 233.
- ❖ Restrepo-Moreno, A. and Greer, D.; 1983. Paracoccidioidomycosis, in *Occupational Mycoses*; Di Salvo, AF.; Ed. Lea & Febiger; Philadelphia; cap 4.
- ❖ Restrepo-Moreno, A.; 1993. Paracoccidioidomycosis, in *Fungal infections and immune response*; New York; Murphy, JW.; Friedman, H.; Bendinelli, M.; eds.; Plenum Press; 251-276.
- ❖ Retallack, DM.; Woods, JP.; 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Microb Infect*; 1; 817-825.
- ❖ Rezakallah-Iwasso, MT.; Soares, AMVC.; Santana, J.; Sartori, A.; 1992. Interleukin-2 in paracoccidioidomycosis; *Rev Arg Micol*; 15; 59.
- ❖ Ribeiro, DO.; 1940. Nova terapêutica para a blastomicose; *Publ Méd (São Paulo)*; 12; 36.
- ❖ Ricci, G.; Silva, IDCC.; Mota, FT.; Wakamatsu, A.; Franco, MF.; 2002. Canine paracoccidioidomycosis: report of the first case of the literature; *Annual Review of Biomedical Sciences*; special issue 2002; VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis; pp80.
- ❖ Rippon, JW.; 1968. Monitored environment system to control cell growth, morphology and metabolic rate in fungi by oxidation-reduction potentials; *Appl Microbiol*; 16; 114-121.
- ❖ Rippon, JW.; 1988. *Medical Mycology*; chapters 14 and 15; WB Saunders Company; Philadelphia.

- ❖ Rodrigues, EG.; Travassos, LR.; 1994. Nature of reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen; *J Med Vet Mycol*; 32; 77-81.
- ❖ Romano, CC.; Mendes-Giannini, MJ.; Duarte, AJ.; Benard, G.; 2002. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients; *Cytokine*; 18; 3; 149-157.
- ❖ Salem-Izacc, SM.; Jesuino, RSA.; Brito, WA.; Felipe, MSS.; Soares, CMA.; 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation; *J Med Vet Mycol*; 35; 205-211.
- ❖ Salem-Izacc, Sm.; Gomez, FJ.; Jesuino, RSA.; Fonseca, Ca.; et al.; 2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*; *Med Mycol*; 39; 445-455.
- ❖ Salina, MA.; Shikanai-Yasuda, MA.; Mendes, RP.; Barraviera, B.; Mendes Giannini, MJS.; 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment; *J Clin Microbiol*; 36; 6; 1723-1728.
- ❖ San-Blas G.; San-Blas, F.; 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence; *Mycopathologia*; 62; 77.
- ❖ San-Blas, G.; 1991. Molecular aspects of dimorphism in *Handbook of Applied Mycology*; Aprora, DA.; Ajello, A. and Mukerji, KG.; Eds.; Marcel Dekker; New York; 459.
- ❖ San-Blas, G. and San-Blas, F.; 1994. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*: Dimorphism in *Paracoccidioidomycosis*; cap.4; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Sandhu, GS.; Aleff, RA.; Kline, BC.; Da Silva Lacaz, C.; 1997. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Clin Microbiol*; 35; 7; 1894-1896.
- ❖ Sano, A.; Tanaka, R.; Yokoyama, K. et al.; 1999. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis; *Mycopathologia*; 143; 165.
- ❖ Saraiva, ECO.; Altamari, A.; Franco, MF.; Unterkircher, CS.; Camargo, ZP.; 1996. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin; *J Med Vet Mycol*; 34; 155-161.
- ❖ Schnur, RA.; Newman, SL.; 1990. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion; *J Immunol*; 144; 4765.
- ❖ Schwarz, J.; 1971. Histoplasmosis, in *Human infections with fungi, actinomycetes, and algae* (RD. Baker, ed.), Springer-Verlag, New York, pp 67-130.
- ❖ Sekhon, AS.; Kaufman, L.; Kobayashi, GS.; Moledina, N.; et al.; 1994. Comparative evaluation of hte Premier™ enzyme immunoassay, micro-immunodiffusion and complement fixation tests for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antibodies; *Mycoses*; 37; 313-316.
- ❖ Semighini, CP.; de Camargo, ZP.; Puccia, R.; Goldman, MH.; Goldman, G.; 2002. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay; *Diagn Microbiol Infect Dis*; 44; 4; 383-386.
- ❖ Shearer, G.; Birge, C.; Yuckenberg, PD.; Kobayashi, GS.; Medoff, G.; 1987. Heat shock proteins induced during the mycelial to yeast transitions of strains of *Histoplasma capsulatum*; *J Gen Microbiol*; 133; 3375-3382.
- ❖ Shome, SK.; Batista, AC.; 1963. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil; *Rev. Fac. Med. Fed. Ceará*; 3; 90.
- ❖ Silva, CL.; Silva, MF.; Faccioli, LH.; Pietro, RCL.; et al.; 1995a. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis; *Clin Exp Immunol*; 101; 314-320.
- ❖ Silva, MF.; Silva, L.; 1995b. The role of somatic structure of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis; *Clin Exp Immunol*; 101; 321-327.
- ❖ Silva, SHM.; Colombo, Al.; Blotta, MHS.; Camargo, ZP.; 2002a. Detectoin of circulating antigen (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in cerebrospinal fluid of patients with neuroparacoccidioidomycosis and in bronchoalveolar lavage by inhibition ELISA; *Annual Review of Biomedical Sciences*; special issue 2002; VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis; pp69.
- ❖ Silva, SHM.; Colombo, Al.; Blotta, MHS.; Camargo, ZP.; 2002b. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis*-GP43 circulating antigen in sera from patients with paracoccidioidomycosis (PCM) by inhibition ELISA. Comparison with antibody detection immunodiffusion test; *Annual Review of Biomedical Sciences*; special issue 2002; VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis; pp70.
- ❖ Silva-Vergara, ML.; Martinez, R.; Chadu, A.; 1998. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffe plantation in Ibiá, State of Mina Gerais, Brazil; *Med. Mycol.*; 36; 37.

- ❖ Singer-Vermes, LM.; Burguer, E.; Franco, MF.; 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice; *J Med Vet Mycol*; 27; 71-82.
- ❖ Singer-Vermes, LM.; Caldeira, CB.; Burguer, E.; Calich, VLG.; 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular responses; *Clin Exp Immunol*; 94; 75-79.
- ❖ Singer-Vermes, LM.; Burguer, E.; Calich, VLG.; Modesto-Xavier, LH.; et al.; 1994. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model; *Clin Exp Immunol*; 97; 113-119.
- ❖ Smith, CD.; Goodman, NL.; 1975. Improved culture method for the isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* from contaminated specimens; *Am J Clin Pathol*; 63; 276-280.
- ❖ Soares, CMA.; Molinari-Madlum, EEWI.; da Silva, SP.; Pereira, M.; Felipe, MSS.; 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis; *J Clin Microbiol*; 33; 2; 505-507.
- ❖ Souto, JT.; Figueredo, F.; Fumaleto, A.; Pfeffer, K.; et al.; 2000. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice; *Am J Pathol*; 156; 5; 1811-1820.
- ❖ Souza, MC.; Gesztezi, JL.; Souza, AR.; Moraes, JZ.; 1997. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms; *J Med Vet Mycol*; 35; 13-18.
- ❖ Souza, AR.; Gesztezi, JL.; Moraes, JZ.; Cruz, CRB.; et al.; 1998. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans; *Clin Exp Immunol*; 114; 40-48.
- ❖ Souza, MC.; Gesztezi, JL.; Del Negro, GMB.; Benard, G.; et al.; 2000. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis; *Clin Diag Lab Immunol*; 7; 2; 175-181.
- ❖ Souza, MC.; Correa, M.; Almeida, SP.; Lopes, JD.; Camargo, ZP.; 2001. Immunomodulatory DNA from *Paracoccidioides brasiliensis* acts as T-helper 1 promoter in susceptible mice; *Scand J Immunol*; 54; 348-356.
- ❖ Steele, PE.; Carle, GF.; Kobayashi, GS.; Medoff, G.; 1989. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA; *Mol Cell Biol*; 9; 983-987.
- ❖ Sugzaki, MF.; Peraçoli, MTS.; Mendes-Giannini, MJ.; Soares, AMVC et al.; 1999. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis; *Med Mycol*; 37; 277-284.
- ❖ Tabora, CP.; Camargo, ZP.; 1994. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43; *J Clin Microbiol*; 32; 2; 554-556.
- ❖ Tabora, CP.; Juliano, MA.; Puccia, R.; Franco, M.; Travassos, LR.; 1998. Mapping of the T cell epitope in the major 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1 response protective against fungal infection in BALB/c mice; *Infect Immun*; 66; 2; 786-793.
- ❖ Taylor, ML.; Reyes Montes, MR.; Lachica, A.; Eslava Campos C.; et al.; 1980. Immunology of histoplasmosis: humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice; *Mycopathologia*; 71; 3; 159-166.
- ❖ Taylor, ML.; Reyes-Montes, MR.; Garcia-Gonzalez, R.; Casasola, J.; Hernández-Ramírez, A.; 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection, in *Proceedings VIII Congress ISHAM*; Massey University; M. Baxter, eds; Palmerston North; New Zealand; 260-264.
- ❖ Taylor, ML.; Duarte-Escalante, E.; Reyes-Montes, MR.; Elizondo, N.; Maldonado, G.; 1998. Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*; *Clin Exp Immunol*; 113; 423-428.
- ❖ Taylor, ML.; Chávez-Tapia, CB.; Reyes-Montes, MR.; 2000. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico; *Fungal Gen Biol*; 30; 207-212.
- ❖ Terry, PB.; Rosenow, EC.; Roberts, GD.; 1978. False-positive complement fixation serology in histoplasmosis; *JAMA*; 239; 2453-2456.
- ❖ Tobón, AM.; Orozco, B.; Estrada, S.; Jaramillo, E.; et al.; 1998. Paracoccidioidomycosis and AIDS: report of the first two Colombian cases; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 40; 6; 377-281.
- ❖ Towbin, H.; Staehelin, T.; 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; *Proc Natl Acad Sci*; 85; 4350-4354.
- ❖ Travassos, LR.; Puccia, R.; Cisalpino, P.; Tabora, C.; et al.; 1995. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*; *Arch Med Res*; 26; 3; 297-304.

- ❖ Unterkircher, CS.; Yazaki, SC.; Shimizu, MT.; Jorge, AOC.; Camargo, ZP.; 1996. Specific componentes found in circulating immune complexes (CIC) in paracoccidioidomycosis; *J Med Vet Mycol*; 34; 273-277.
- ❖ Vail, GM.; Mocherla, S.; Wheat, JL.; Goldberg, J.; et al.; 2002. Cellular immune response in HIV-infected patients with histoplasmosis; *Acquir Immune Defic Syndr*; 29; 1; 49-53.
- ❖ Valle, ACF.; Wanke, B.; Wanke, NCF.; Peixoto, TC. and Perez, M.; 1992. Tratamento da paracoccidioidomycose, estudo retrospectivo de 500 casos. Análise clínica, laboratorial e epidemiológica; *An. Bras. Dermatol.*; 67; 251.
- ❖ Vaz, CAC.; Mackenzie, DWR.; Hearn, VM.; Camargo, ZP.; et al.; 1992. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis; *Clin Exp Immunol*; 88; 119-123.
- ❖ Vaz, CAC.; Mackenzie, DWR.; Hearn, V.; Camargo, ZP, et al.; 1994. Gelatinase activity of exoantigens from virulent and non-virulent isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*; *J Med Vet Mycol*; 32; 65-69.
- ❖ Vaz, CA.; Singer-Vermes, LM.; Calich, VLG.; 1998. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates; *Am J Trop Med Hyg*; 59; 6; 971-977.
- ❖ Venancio, EJ.; Kyaw, CM.; Mello, CV.; et al.; 2002. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display; *Med Mycol*; 40; 1; 45-51.
- ❖ Vicentini, AP.; Gesztesi, JL.; Franco, MF.; de Souza, W.; et al.; 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis; *Infect Immun*; 62; 1465-1469.
- ❖ Vincent, RD.; Goewert, R.; Goldman, WE.; Kobayashi, GS et al.; 1986. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms; *J. Bacteriol*; 165; 813-818.
- ❖ Von Behren, LA.; Chaudhary, S.; Khardori, N.; Rabinovich, S.; et al.; 1983. Effect of silica on the susceptibility of mice to experimental histoplasmosis; *RES J Reticuloendothel Soc*; 34; 99-111.
- ❖ von Gelderen de Komai, A.; Duran, E.; Borges de Kestelman, I.; 1999. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vicos, La Toma, and Choromoro-Trancas, Tucumán, Argentina; *Eur J Epidemiol*; 15; 4; 383-388.
- ❖ Wanke, B.; Londero, AT.; 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection in *Paracoccidioidomycosis*; cap.7; Franco-Lacaz-Restrepo-Del Negro, Eds.; Boca Raton; CRC Press.
- ❖ Wheat, J.; French, MLV.; Kohler, RB.; Zimmerman, SE.; et al.; 1982. The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis. Analysis of experience in a large urban outbreak; *Ann Intern Med*; 97; 68-685.
- ❖ Wheat, LJ.; Kohler, RB.; French, ML.; Garten, M.; et al.; 1983. Immunoglobulin M and G histoplasmal antibody response in histoplasmosis; *Am Rev Respir Dis*; 128; 1; 65-70.
- ❖ Wheat, JL.; Slama, TG.; Zeckel, ML.; 1985. Histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome; *Am J Med*; 78; 203-210.
- ❖ Wheat, LJ.; Kohler, RB.; Tewari, RP.; 1986. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens; *N Engl J Med*; 14; 2; 83-88.
- ❖ Wheat, LJ.; Kohler, RB.; Tewari, RP.; Garten, M.; French, ML.; 1989a. Significance of *Histoplasma* antigen in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis; *Arch Intern Med*; 149; 2; 302-304.
- ❖ Wheat, LJ.; Connolly-Stringfield, P.; Kohler, RB.; Frame, PT.; Gupta, MR.; 1989b. *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen detection in diagnosis and management of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome; *Am J Med*; 87; 4; 396-400.
- ❖ Wheat, LJ.; Connolly-Stringfield, P.; Williams, B.; Connolly, K.; Blair, R.; et al.; 1992. Diagnosis of histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome by detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen in bronchoalveolar lavage fluid; *Am Rev Respir Dis*; 145; 6; 1421-1424.
- ❖ Wheat, LJ.; Wheat H.; Connolly, P.; Kleiman, M.; et al.; 1997. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses; *Clin Infect Dis*; 24; 1169-1171.
- ❖ Wheat, LJ.; Connolly, P.; Haddad, N.; Le Monte, A.; et al.; 2002. Antigen clearance during treatment of disseminated histoplasmosis with itraconazole versus fluconazole in patients with AIDS; *Antimicrob Agents Chem*; 46; 1; 248-250.
- ❖ Wheat, LJ.; Letter, *Histoplasma capsulatum* antigen detection: comparison of the performance characteristics of a new inhibition immunoassay to those of an established antibody sandwich immunoassay; *J Clin Microbiol*; 37; 7; 2387.
- ❖ Williams, DM.; Graybill, JR.; Drutz, DJ.; 1978. *Histoplasma capsulatum* infection in the nude mouse; *Infect Immun*; 21; 973.

- ❖ Williams, B.; Fojtasck, M.; Connolly-Stringfield, P.; Wheat, L.J.; 1994. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis, Ind.; *Arch Pathol Lab Med*; 118; 12: 1205-1208.
- ❖ Woods, J.P.; 2002. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment; *Fungal Genet Biol*; 35; 81-97.
- ❖ Wu-Hsieh, BA.; Chen, W.; Lee, HJ.; 1998. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness; *Infect Immun*; 66; 11; 5520-5526.
- ❖ Yarzabal, LA.; 1971. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis; *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 13; 320.
- ❖ Yarzabal, LA.; Bout, D.; Naquira, F.; Fruit, J. Andrieu, S.; 1977. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoresis band E; *Sabouraudia*; 15; 79.
- ❖ Zancopé-Oliveira, RM.; Bragg, SL.; Hurst, SF.; Peralta, JM.; Reiss, E.; 1993. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin; *J Med Vet Mycol*; 31; 29-41.
- ❖ Zancopé-Oliveira, RM.; Bragg, SL.; Reiss, E.; Wanke, B.; Peralta, JM.; 1994. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosilation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method; *Clin Diag Lab Immunol*; 1; 4; 39-393.
- ❖ Zancopé-Oliveira, RM.; Reiss, E.; Lott, T.J.; Mayer, LW.; Deepe, GS.; 1999. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 67; 4; 1947-1953.
- ❖ Zhou, P.; Sieve, MC.; Bennett, J.; Kwong-Chung, KJ.; et al.; 1995. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN- γ ; *J Immunol*; 155; 785-795.
- ❖ Zhou, P.; Sieve, MC.; Tewari, RP.; Seder, RA.; 1997. Interleukin-12 modulates the protective response in SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*; *Infect Immun*; 65; 3; 936-942.
- ❖ Zhou, P.; Miller, G.; Seder, RA.; 1998. Factors involved in regulating primary and secondary immunity to infection with *Histoplasma capsulatum*: TNF- α plays a critical role in maintaining secondary immunity in the absence of IFN- γ ; *J Immunol*; 160; 1359-1368.
- ❖ Zhou, P.; Freidag, BL.; Caldwell, CC.; Seder, RA.; 2001. Perforin is required for primary immunity to *Histoplasma capsulatum*; *J Immunol*; 166; 1968-1974.
- ❖ Zimmerman, SE.; Stringfield, PC.; Wheat, L.J.; French, ML.; Kohler, RB.; 1989. Comparison of sandwich solid-phase radioimmunoassay and two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen; *J Infect Dis*; 160; 4; 678-685.
- ❖ Zimmerman, SE.; French, ML.; Kleiman, MB.; Wheat, L.J.; 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses ferrous metal beads determination of antihistoplasmal immunoglobulins G and M; *J Clin Microbiol*; 28; 1; 59-64.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

DONACION.....
▲.....
Fecha.....
Inv. N. Inv. B. 57044