

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE GRADUADOS



ANALISIS ANTIGENICOS DE PITYROSPORUM ORBICULARE Y PITYROSPORUM OVALE

TRABAJO QUE CON EL CARACTER DE
T E S I S
P R E S E N T A :

LA C. Q.F.B. ANGELICA LEAL DELGADILLO

PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN

CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

GUADALAJARA, JALISCO 1990

ANALISIS ANTIGENICO DE PITYROSPORUM ORBICULARE Y

PITYROSPORUM OVALE

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA DIVISION
DE PATOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTI
GACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL IMSS
BAJO LA DIRECCION DEL DR. AMADO GONZA
LEZ MENDOZA. A QUIEN AGRADEZCO SU VA
LIOSA ENSEÑANZA Y APOYO INCONDICIONAL.

MI AGRADECIMIENTO AL M. en C. RODOLFO
RAMOS ZEPEDA, JEFE DEL LABORATORIO DE
INMUNOPATOLOGIA DE LA DIVISION DE PATO
LOGIA, GRACIAS POR SU ENSEÑANZA Y
COLABORACION.

AGRADEZCO AL DR. ALFREDO FERIA VELASCO,
JEFE DE LA DIVISION DE PATOLOGIA Y
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN BIOLOGIA
CELULAR, SU COLABORACION, GRACIAS POR
SU ENSEÑANZA Y AYUDA.

AGRADEZCO A TODO EL PERSONAL DE LA DIVI
SION DE PATOLOGIA, SU COLABORACION.

AGRADEZCO EN GENERAL A TODO EL PERSONAL
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA
Y ESPECIALMENTE A BETY IBARRA Y GERARDO
VACA DE LA DIVISION DE GENETICA, POR SU
ENSEÑANZA Y AYUDA EN LA REALIZACION DE
ESTA TESIS.

AGRADEZCO A MIS PADRES, HERMANOS, AMI
GOS Y PARIENTES SU INCONDICIONAL AYUDA
APOYO Y ENSEÑANZA QUE HE RECIBIDO EN
EL TRANCURSO DE MI VIDA.



BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADEZCO A MI AMIGA ANA MARIA SU GRAN
AMISTAD Y APOYO.

DEDICO MI TESIS CON MUCHO CARIÑO A MIS
PADRES Y HERMANOS.

INTRODUCCION.

Entre los hongos patógenos para el hombre se encuentran algunos del género Pityrosporum que incluye a las levaduras lipofílicas P. orbiculare y P. ovale. La primera es el agente causal de pitiriasis versicolor [1-11] y a la segunda se le relaciona con la dermatitis seborreica [12, 13]. Aunque ambos microorganismos participan en diferentes entidades clínicas, algunos investigadores [14-19] consideran que se trata de la misma especie de levadura, que difiere morfológicamente debido al estadio del ciclo celular en que se encuentra y que por factores no precisados cambia su morfología de levadura oval o esférica [P. ovale] a racimos de levaduras redondas y fragmentos cortos de hifas [P. orbiculare]. En cambio otros autores señalan que son dos especies diferentes [20-24].

Por la controversia que existe respecto a si es una o son dos especies de levaduras. En este trabajo se estudiaron las características antigénicas de P. orbiculare y P. ovale para saber si a nivel inmunológico existen similitudes o diferencias entre ambas. Para ello se obtuvieron extractos de P. orbiculare y P. ovale los cuales se fraccionaron por cromatografía de filtración y se analizaron por

electroforesis e inmunodifusión. Además con los extractos se realizaron pruebas intradérmicas de hipersensibilidad retardada en pacientes con pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y en individuos clínicamente sanos.

ANTECEDENTES.

El género Pityrosporum comprende tres especies de levaduras: P. orbiculare, P. ovale y P. pachydermatis, las dos primeras son lipofílicas y saprófitas de la piel humana normal, en tanto que P. pachydermatis no requiere de ácidos grasos para su crecimiento, pero también forma parte de la flora cutánea normal [23,25,26,38].

En 1891 Unna [12] observó microscópicamente a P. ovale, como levadura en forma de botella en las descamaciones del cuero cabelludo [Figura 1]. En la actualidad se le relaciona con dermatitis seborreica [Figura 2]. Este es un padecimiento inflamatorio crónico de la piel que frecuentemente tiene su origen en el cuero cabelludo, de ahí se propaga a las regiones supraorbitarias, párpados, surco nasolabial, labios, orejas, área esternal, axilas, ingle y pliegues interglúteos. La enfermedad se caracteriza por presentar escamas secas o húmedas que aparecen como placas costrosas, eritematosas, amarillentas, de diversas formas y tamaños; con cierto grado de prurito. Pueden presentarse remisiones o exacerbaciones. Es frecuente que la erupción se mantenga localizada en zonas específicas como el cuero cabelludo, orejas o región esternal [7,12,13,21].



Figura 1. Pityrosporum ovale en células epiteliales aisladas de pacientes con dermatitis seborreica y teñidas con el ácido peryódico de Schiff [APS].

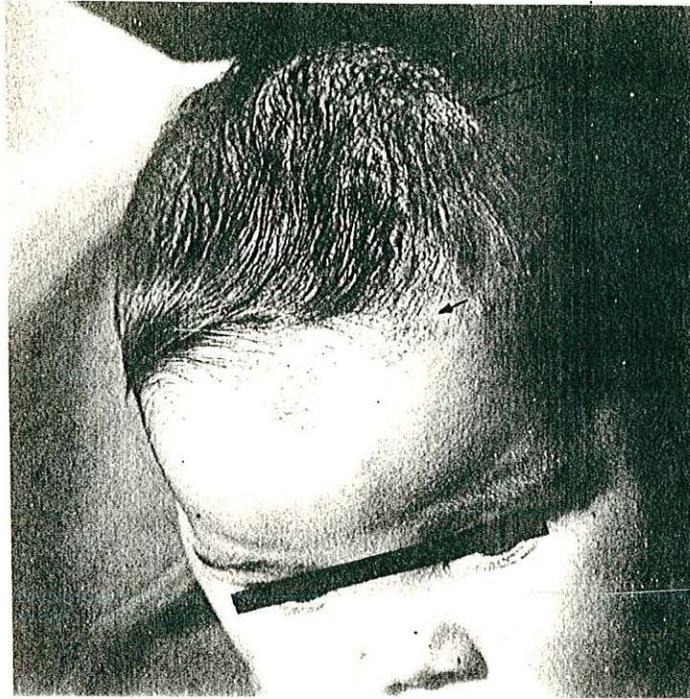


Figura 2. Dermatitis seborreica. Cos
tra láctea en la que se observan las
placas costrosas que recubren el cue
ro cabelludo del lactante.

No obstante lo anterior, algunos autores no están de acuerdo en que P. ovale tenga un papel patógeno y la consideran como un hongo exclusivamente saprófito [13,23,27,35].

La otra levadura lipofílica P. orbiculare [Figura 3], es el agente etiológico de pitiriasis versicolor. Microscópicamente se observa en forma de racimos de levaduras esféricas y fragmentos cortos de hifas [1-11]. Esta micosis superficial fué descrita por Eickstedt en 1846 y Sluyter en 1847, quienes la denominaron pitiriasis versicolor. Estos autores sugirieron que la etiología de las lesiones era de origen micótico [1,3,5,7,10,21].

En 1853 Robin [3] nombró al agente etiológico de pitiriasis versicolor como Microsporum furfur por la textura furfurácea de las células epiteliales en descamación. Esta denominación dejó de emplearse debido a que el nombre Microsporum ya había sido designado 10 años antes por Gruby [7] para el Microsporum audouini que es el agente etiológico de la tiña más común de Francia, por lo que en 1889 Baillon [5] denominó a Microsporum furfur como Malassezia furfur [1,21].

En 1951 Gordon [3] fué el primero en aislar por cultivo



Figura 3. P. orbiculare en células epiteliales aisladas de pacientes con pitiriasis versicolor. Teñidas con el ácido peryódico de Schiff [APS].

microbiológico un microorganismo esférico y gemante de las lesiones de pacientes con pitiriasis versicolor y de células epiteliales en descamación de sujetos clínicamente sanos, al cual llamó Pityrosporum orbiculare y que previamente se le conocía como Malassezia furfur [3-5,7,10,20,21].

En los sujetos sanos P. orbiculare se aísla de las regiones retroauricular y deltoidea, mediante un raspado de las células epiteliales. Al microscopio [Figura 4] se observan escasas levaduras, aisladas, redondas, de 3 a 6 micras de diámetro [9,11,14,19,20,31]. Por condiciones aún desconocidas P. orbiculare se agrupa en racimos de levaduras y fragmentos cortos de hifas [dimorfismo], que es la forma patógena que produce pitiriasis versicolor [tiña versicolor]. Esta enfermedad es una micosis superficial crónica del estrato córneo de la epidermis, [Figura 5]. Su distribución es cosmopolita, se observa más frecuentemente en climas tropicales y subtropicales. Clínicamente se manifiesta como placas irregulares, aisladas o agrupadas, descamativas, eritematosas o hipopigmentadas de ahí su nombre de versicolor [Figura 6]. En ocasiones presenta inflamación o prurito. Se localiza principalmente en el tórax, cuello o brazos [1-8,10,20,27,28].



Figura 4. Pityrosporum orbiculare en células epiteliales de sujetos clínicamente sanos. Teñidas con el ácido peryódico de Schiff [APS].



Figura 5. P. orbiculare en el estrato corneo de la epidermis. Tinción del ácido per yódico de Schiff [APS].

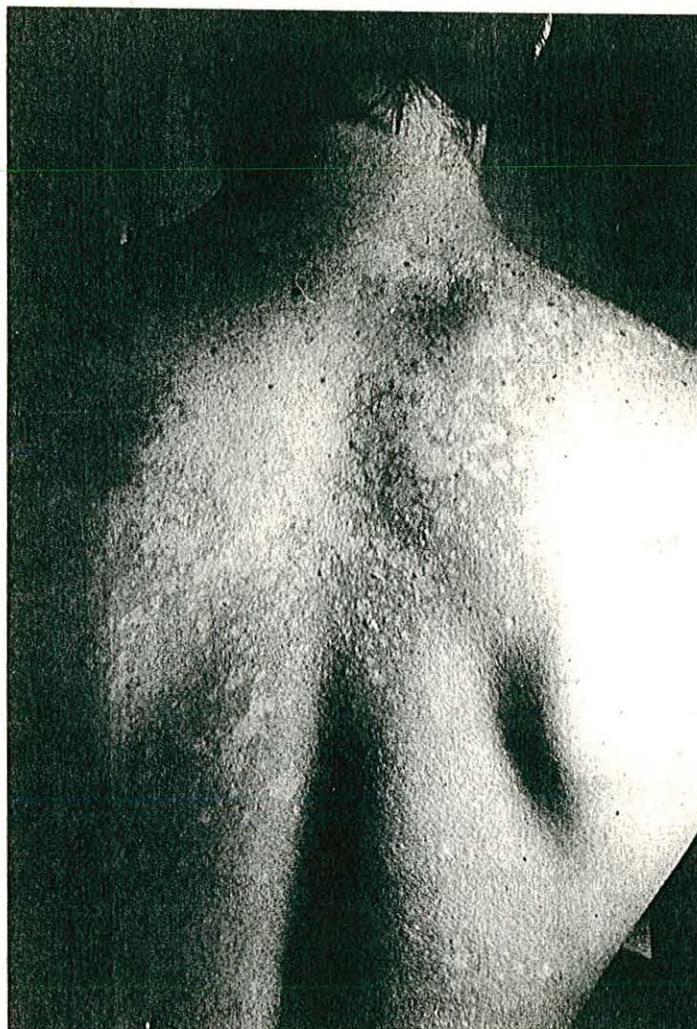


Figura 6. Pitiriasis versicolor. Placas furfuraceas irregulares, hipopigmentadas, aisladas y agrupadas.

P. orbiculare suele afectar a los adultos jóvenes, en la pubertad y edad media. Al parecer esta distribución de edades se correlaciona con la excreción de grasa y con la cantidad de los lípidos de la piel, ya que estas sustancias aumentan marcadamente en la pubertad y alcanzan su máximo entre los 16 y 40 años. Otras características que influyen en el establecimiento de la enfermedad son la transpiración abundante y el no bañarse con frecuencia [4,9,19,20,30-32].

Los factores que predisponen a los sujetos a esta micosis son: acumulación de glucógeno extracelular, infecciones crónicas, embarazo, obesidad, leucemia, arterioesclerosis administración excesiva de antibióticos y/o esteroides, desnutrición y susceptibilidad genética [14,31,33,34].

Algunos investigadores consideran a P. orbiculare y P. ovale como una sola especie, en diferente estadio de su ciclo celular y que por factores desconocidos la levadura cambia de saprófita [P. ovale] a su fase patógena [P. orbiculare] [14-19]. Además, cuando se siembran células epiteliales de pacientes con pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica en medios de cultivo adicionados de ácidos grasos de 12 a 24 carbonos y se incuban a 37°C,

producen colonias cremosas similares macroscópicamente [3-8,20,32].

Entre las investigaciones que apoyan la idea de que P. orbiculare y P. ovale es la misma especie de levadura se encuentran las siguientes:

Faergemann y Torsten, mediante infecciones experimentales en conejos y humanos, con P. orbiculare y P. ovale, obtuvieron lesiones similares a las establecidas clínicamente en pitiriasis versicolor [10,27].

Nazzaro-Porro y colaboradores, obtuvieron in vitro hifas idénticas de P. orbiculare y P. ovale en medio de cultivo enriquecido con una mezcla de colesterol y ésteres de colesterol [16].

Faergemann también logró obtener in vitro hifas idénticas de ambas levaduras incubándolas en estrato córneo de células, epiteliales, en ambiente de CO₂ elevado [18,36].

Sin embargo, también existen estudios que sugieren que son dos especies de levaduras diferentes [1,3,12,20,21,32 37]. Entre ellos se menciona que mediante microscopía óp-

tica y electrónica, se observó a P. orbiculare en forma de fragmentos cortos de hifas y racimos de levaduras esféricas, de 3 a 6 micras de diámetro [1,3], que se reproducía por gemación sobre una base estrecha, y en ocasiones se observaron de 2-4 levaduras en forma de collarete [37]. En cambio P. ovale, se observó como una levadura oval en forma de botella o cilíndrica de 2-3 x 4-5 micras, que se reproducía también por gemación, pero sobre una base ancha [12]. Además se ha observado que P. orbiculare tiene 3 mitocondrias, en tanto que P. ovale presenta 23 mitocondrias por célula [21,32,37].

Dorn y Roehner [22] cultivaron levaduras de P. orbiculare y P. ovale en medio de cultivo enriquecido con glicina y observaron que sólo P. orbiculare producía hifas.

Tanaka e Imamura [15], utilizaron anticuerpos contra P. orbiculare y los probaron con las tres especies de Pityrosporum. Encontraron que P. orbiculare y P. ovale compartían dos antígenos, en tanto que P. orbiculare y P. pachydermatis sólo tenían similitud en un antígeno.

Ante la controversia de si es una o son dos levaduras diferentes P. orbiculare y P. ovale, el presente trabajo con

sistió en analizar las características antigénicas de P. orbiculare y P. ovale. Para ello, se obtuvieron extractos de P. orbiculare y P. ovale, los cuales se fraccionaron por cromatografía de filtración y se analizaron por electroforesis e inmunodifusión. Además con los extractos se realizaron pruebas intradérmicas de hipersensibilidad retardada en pacientes con pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y en individuos clínicamente sanos.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

BIBLIOTECA CENTRAL

P. orbiculare es el agente etiológico de pitiriasis versi
color y P. ovale está relacionado con la dermatitis sebo
reica, pero no se ha determinado con precisión si real
mente son dos especies de levaduras diferentes o se trata
de una sola en diferente estadio de su ciclo celular.

HIPOTESIS.

P. orbiculare y P. ovale difieren antigénicamente.

OBJETIVOS.

- 1) Obtener extractos de P. orbiculare y P. ovale.
- 2) Determinar su antigenicidad.
- 3) Fraccionar los extractos, mediante cromatografía de filtración en Sephadex G-100.
- 4) Determinar antigenicidad a las fracciones.
- 5) Analizar electroforéticamente los extractos y sus respectivas fracciones.
- 6) Realizar pruebas de hipersensibilidad retardada con los extractos de P. orbiculare y P. ovale en pacientes con pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y en individuos clínicamente sanos.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES.

Se estudiaron 20 pacientes con pitiriasis versicolor [PV] 20 pacientes con dermatitis seborreica [DS] y como testigos 20 sujetos clínicamente sanos [SS]. El 50% de cada grupo fueron mujeres y el 50% hombres con edades promedio de 21 ± 4 años. Pertenecientes a diversos estratos sociales.

Los pacientes fueron diagnosticados en el Servicio de Consulta Externa del Instituto Dermatológico de Guadalajara, Jalisco y no presentaron alguna patología asociada, ni estaban bajo tratamiento.

En las Tablas 1, 2 y 3 se describen las características generales de los pacientes con PV, DS y SS. Las lesiones de la mayoría de los pacientes con PV se localizaron en tórax en tanto que las lesiones de los pacientes con DS se observaron en cabeza, nariz y orejas.

TABLA 1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES
CON PITIRIASIS VERSICOLOR

PACIENTE	EDAD	SEXO	OCUPACION	LOCALIZACION DE LAS LESIONES	TIEMPO DE EVOLUCION
1	22	F	Estudiante	Tórax	5 años
2	13	F	Estudiante	Tórax, cuello	2 años
3	25	M	Comerciante	Tórax, cuello	6 años
4	20	M	Mecánico	Tórax	7 meses
5	21	M	Estudiante	Tórax	1 año
6	21	M	Repartidor	Abdomen, cuello	4 meses
7	18	F	Estudiante	Tórax, brazos	8 meses
8	24	F	Empleado	Tórax	2 años
9	19	M	Chofer	Tórax	6 meses
10	20	F	Estudiante	Tórax	8 meses
11	23	F	Hogar	Tórax	2 años
12	21	F	Estudiante	Cuello	6 años
13	24	M	Estudiante	Tórax	2 años
14	14	F	Hogar	Tórax	1 año
15	25	F	Obrera	Tórax, brazos	20 años
16	17	M	Empleado	Tórax	1 año
17	28	M	Joyero	Tórax	20 años
18	22	M	Estudiante	Tórax	9 meses
19	19	M	Estudiante	Tórax	8 meses
20	17	F	Obrera	Tórax, brazos	4 años

TABLA 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES
CON DERMATITIS SEBORREICA

PACIENTE	EDAD	SEXO	OCUPACION	LOCALIZACION DE LAS LESIONES	TIEMPO DE EVOLUCION
1	20	F	Hogar	Cabeza, orejas	7 años
2	20	M	Estudiante	Nariz, orejas	1 año
3	22	M	Comerciante	Nariz, orejas	3 años
4	13	F	Estudiante	Cabeza, cara	6 meses
5	21	F	Maestra	Nariz	4 meses
6	13	F	Estudiante	Cabeza, orejas	3 años
7	25	M	Campesino	Cabeza	6 meses
8	28	M	Médico	Nariz, orejas	2 meses
9	22	M	Comerciante	Cabeza	3 años
10	17	M	Comerciante	Cabeza	1 mes
11	25	F	Modista	Nariz, orejas	2 años
12	16	F	Estudiante	Cabeza	2 meses
13	14	M	Estudiante	Cara	6 meses
14	27	F	Enfermera	Cabeza	1 año
15	28	M	Zapatero	Cara	14 años
16	29	F	Obrera	Nariz, orejas	3 años
17	28	M	Ing. Agrónomo	Cabeza	2 años
18	18	F	Estudiante	Nariz, orejas	8 meses
19	15	F	Estudiante	Cara, orejas	2 meses
20	23	M	Empleado	Nariz, orejas	2 años

TABLA 3. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS
CLINICAMENTE SANOS

SUJETO	EDAD	SEXO	OCUPACION
1	22	F	Estudiante
2	22	F	Estudiante
3	25	M	Estudiante
4	25	F	Químico
5	23	M	Estudiante
6	17	F	Estudiante
7	22	M	Estudiante
8	18	M	Empleado
9	21	M	Empleado
10	20	F	Estudiante
11	20	M	Estudiante
12	24	F	Estudiante
13	25	M	Empleado
14	23	F	Secretaria
15	19	F	Estudiante
16	26	M	Empleado
17	25	M	Ing. Mec.
18	23	F	Estudiante
19	22	M	Estudiante
20	23	F	Estudiante

OBTENCION DE LAS LEVADURAS.

Con objeto de obtener células epiteliales en descamación, a todos los sujetos estudiados se les practicó raspado de la piel con 2 portaobjetos estériles. A los pacientes, de las lesiones cutáneas y a los testigos de las regiones retroauricular y deltoidea.

DIAGNOSTICO MICOLOGICO.

Para el diagnóstico micológico, se depositó entre porta y cubreobjetos una porción de la muestra y se le agregaron 20 mcl de KOH al 10%. Esta preparación se calentó por 5 seg en la flama del mechero. Los microorganismos se observaron al microscopio de luz, con el objetivo 40X.

Además, se realizó la tinción del ácido peryódico de Schiff [APS] [3]. Que consistió en fijar otra parte de la muestra con albúmina de Meyer en un portaobjetos y se lavó con agua de la llave. Se colocó en ácido peryódico al 1% durante 5 min y se lavó. Se pasó al reactivo de Schiff [fucsina básica al 0.5%] por 20 min y se lavó. Se pasó por tres baños de alcohol [50,70 y 100%] y uno de xilol. Se cubrieron con resina sintética y con cubreobjetos para ob

servarse en microscopio de luz, con el objetivo 100X.

Por ambos procedimientos se observaron las formas características de P. orbiculare y P. ovale.

CULTIVO DE LEVADURAS.

Una vez observados y caracterizados los hongos P. orbiculare y P. ovale, se procedió a sembrarlos en tubos para cultivo que contenían 12 ml de Agar Mycobiotic [Difco]. Sobre el agar se depositaron 0.5 ml de aceite de oliva estéril, ya aplicadas las muestras. Los tubos se incubaron con una inclinación de 30° durante 8 días a 37°C.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.

Las levaduras de cada individuo fueron resembradas en 10 cajas de Petri en Agar Mycobiotic y aceite de oliva, se incubaron por 72 h a 37°C. Al cabo de este tiempo las levaduras de las 200 cajas correspondientes a los 20 integrantes de cada grupo, se juntaron en un pool. Así se obtuvieron 50 ml de levaduras concentradas y se procedió a la extracción antigénica. Para ello se tomó como referencia el método de Sohnle y Collins-Lech [24]; que consistió

en lavar las levaduras tres veces con 100 ml de solución salina estéril al 0.85%. A continuación se extrajo el exceso de aceite, con acetona.

En condiciones de esterilidad los paquetes de las levaduras P. orbiculare, P. ovale de pacientes, y P. orbiculare de los testigos, se trituraron en un mortero de porcelana con fragmentos de vidrio. El triturado se resuspendió en 100 ml de buffer salina fosfatos, 0.1 M pH 7.4 estéril [BSF] y se puso en agitación constante durante 24 h a 4^o C. Se centrifugó a 600 g durante 30 min. El sobrenadante fue centrifugado dos veces a 3000 g durante 50 min. El sobrenadante se dializó a 4^oC contra BSF durante 24 h. Esta operación se repitió en tres ocasiones. El dializado se concentró por filtración en Amicón, con presión de nitrógeno, hasta un volumen de 5 ml. El concentrado se esterilizó por filtración en Millipore de 0.22 micras y la confirmación de la esterilidad se hizo por cultivos microbiológicos en Caldo-Cerebro-Corazón [Bioxón], Agar-Dextrosa-Sabouraud [Bioxón] y Agar Mycobiotic [Difco]. Los cultivos se hicieron por duplicado y se incubaron a 28 y 37^oC respectivamente por 10 días. Se determinaron además los contenidos de proteínas por el método de Lowry [41] y carbohidratos por el método de Morris [42]. Los extractos se

almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

PRUEBAS DE INMUNOGENICIDAD.

Se inmunizaron intramuscularmente tres conejos Nueva Zelanda de 2.5 K de peso, con 0.5 ml de BSF que contenía 1 mg de proteínas y 0.9 mg de carbohidratos. Los antígenos se mezclaron con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund [Sigma]. A los conejos se les aplicaron 4 dosis, una por semana, del extracto correspondiente.

A la quinta semana de iniciada la inmunización, se obtuvo suero de cada conejo y se probó la presencia de anticuerpos. Para ello se utilizó la prueba de doble difusión de Ouchterlony [43,44], que consistió en preparar tres cajas de Petri de 60 mm de diámetro, con 5 ml de agarosa al 1% y 0.2% de azida de sodio. Se dejaron gelificar y se hicieron 7 perforaciones con sacabocados, una central y 6 periféricas. En el centro se depositaron 20 mcl del antisuero de conejo correspondiente y en la periferia 20 mcl de cada extracto. Las cajas se incubaron en cámara húmeda por 24 h a temperatura ambiente. Al cabo de éste tiempo se observaron las bandas de precipitación respectivas.

CROMATOGRAFIA.

Los tres extractos antigénicos se fraccionaron por cromatografía de filtración. Se utilizó una columna de 25 x 200 mm. Como soporte se empleó Sephadex G-100 [Pharmacia Chemical UB Uppsala Sweden] y se eluyó con BSF. Las muestras de cada extracto contenían 3 mg de proteínas y 2.7 mg de carbohidratos disueltos en 2 ml de BSF. Se colocaron en la parte superior de la columna y de inmediato se eluyeron con BSF. Los eluentes se obtuvieron en volúmenes de 2 ml por tubo, con un flujo de 3 gotas por min en un colector automático LKB Ultrorac 7000 y fueron leídas a 280 nm en un espectrofotómetro [PMQ 3 Carl Zeiss] [45,46]. Los valores de las lecturas fueron graficados y se determinó el número de fracciones de cada extracto de levaduras. A cada fracción de los 3 extractos se le determinó su actividad antigénica por la prueba de doble difusión con los antisueros de los conejos correspondientes.

ELECTROFORESIS.

Para determinar el comportamiento electroforético y los pesos moleculares [PM] de los componentes de los extractos y de sus fracciones, se hizo electroforesis en gel de

poliacrilamida a la que se agregó detergente aniónico do decyl sulfato de sodio [DSS] [47-51]. La cámara para electroforesis que se utilizó fue similar a la descrita por Ornstein y Davis [47]. Con el gel de poliacrilamida-SDS se prepararon columnas en tubos de vidrio de 12 cm de largo por 0.5 cm de diámetro, en los que se depositaron sucesivamente los gradientes de poliacrilamida al 13,10 y 7%. La concentración del 13% se preparó mezclando 8.7 ml de suspensión de poliacrilamida, [9 g de acrilamida y 0.45 g de bisacrilamida en 30 ml de buffer trizma base 1.5 M pH 8.8]; 5 ml de buffer trizma base, 0.2 ml de DSS [Sigma] al 10%; 0.03 ml de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina [TEMED-Sigma]; 0.03 ml de persulfato de amonio [Sigma] al 10% y 6 ml de agua destilada. Para las suspensiones al 10 y 7% se tomaron 6.7 y 4.7 ml de la suspensión de poliacrilamida y 8 y 10 ml de agua respectivamente. Después de colocar la suspensión al 7%, se llenaron los tubos con agua destilada y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Los tubos con los geles se colocaron en la cámara de electroforesis [Haake Buchler]. En los recipientes superior e inferior de la cámara electroforética se colocaron 500 ml de buffer de corrimiento pH 8.3, el cual se preparó mezclando 3 g de trizma base, 14.4 g de glicina [Sigma G-71-26], 1 g de DSS y se aforó a 1000 ml de agua destilada.

Los extractos antigénicos conteniendo 0.4 mg de proteínas y 0.36 mg de carbohidratos en 0.2 ml de BSF, se mezclaron con 0.2 ml de buffer de muestra, que se preparó de la siguiente manera: 1 ml de buffer trizma pH 6.8, 0.8 ml de glicerina [Merck]; 1.6 ml de DSS al 10%; 0.4 ml de 2-mercaptoetanol [Sigma]; 0.2 ml de rojo de fenol al 0.05% [Sigma] y 4 ml de agua destilada.

Como marcadores de PM se utilizaron las siguientes proteínas: Lisozima con PM de 14 000, Anhidrasa carbónica de PM 29 000, Albúmina de huevo de PM 45 000 y Albúmina bovina de PM 66 000 daltons. Se emplearon 0.02 ml de una solución que contenía 0.02 mg/ml de cada proteína, disuelta en buffer de muestra.

En la parte superior de los geles, se colocaron 0.2 ml de los extractos y 0.02 ml de los marcadores de PM, tratados con buffer de muestra. El corrimiento de la electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante 5 h con un voltaje de 100 volts y 200 mA. Finalmente los geles se removieron de los tubos de vidrio para realizar el revelado de las bandas por tinción con el colorante negro amido [Merck] al 0.5%, durante 5 min. A continuación se pasaron a una solución decolorante que contenía 10 partes de ácido

acético glacial, 25 partes de etanol absoluto y 65 partes de agua destilada. Esta solución se cambió diariamente, durante 8 días.

PRUEBAS INTRADERMICAS.

A los pacientes con PV, DS y a los SS se les aplicaron intradermicamente en la cara anterior del antebrazo, los tres extractos antigénicos, en un volumen de 0.1 ml con una concentración de 10 mcg de proteínas cada uno. La lectura de las pruebas se realizó a las 24, 48 y 72 h. Se consideró una prueba positiva cuando había 5 mm o más de eritema e induración [24].

RESULTADOS.

OBSERVACION MICROSCOPICA DE LEVADURAS EN CELULAS EPITELIALES Y CULTIVOS MICOLOGICOS.

En las preparaciones de células epiteliales en descamación teñidas con APS, se observaron abundantes hifas y levaduras de P. orbiculare en los casos de PV. En tanto que en los pacientes con DS y en los SS se observaron escasas levaduras de P. ovale y P. orbiculare, respectivamente. Los cultivos de las células epiteliales de los tres grupos estudiados mostraron crecimiento de las respectivas levaduras [Tabla 4].

La morfología macroscópica de las colonias fue idéntica sin importar que las muestras hubieran sido aisladas de pacientes con PV, DS o SS [Figura 7]. Microscópicamente tampoco se observaron diferencias.

DETERMINACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS.

En la Tabla 5 se observa que la concentración de proteínas y carbohidratos del extracto de levaduras de pacientes con PV fue mayor que en los pacientes con DS y SS.

TABLA 4. OBSERVACION DE LEVADURAS POR MICROSCOPIA DE LUZ EN PREPARACIONES DE CELULAS EPITELIALES Y CULTIVOS MICOLOGICOS EN PACIENTES CON PV Y DS.

PROCEDIMIENTO	PACIENTES PV		PACIENTES DS		TESTIGOS SS	
	*	%	*	%	*	%
TINCION DE APS	20/20	100	20/20	100	20/20	100
CULTIVO	20/20	100	20/20	100	20/20	100

* El numerador de los quebrados indica el número de casos positivos y el denominador los casos estudiados.

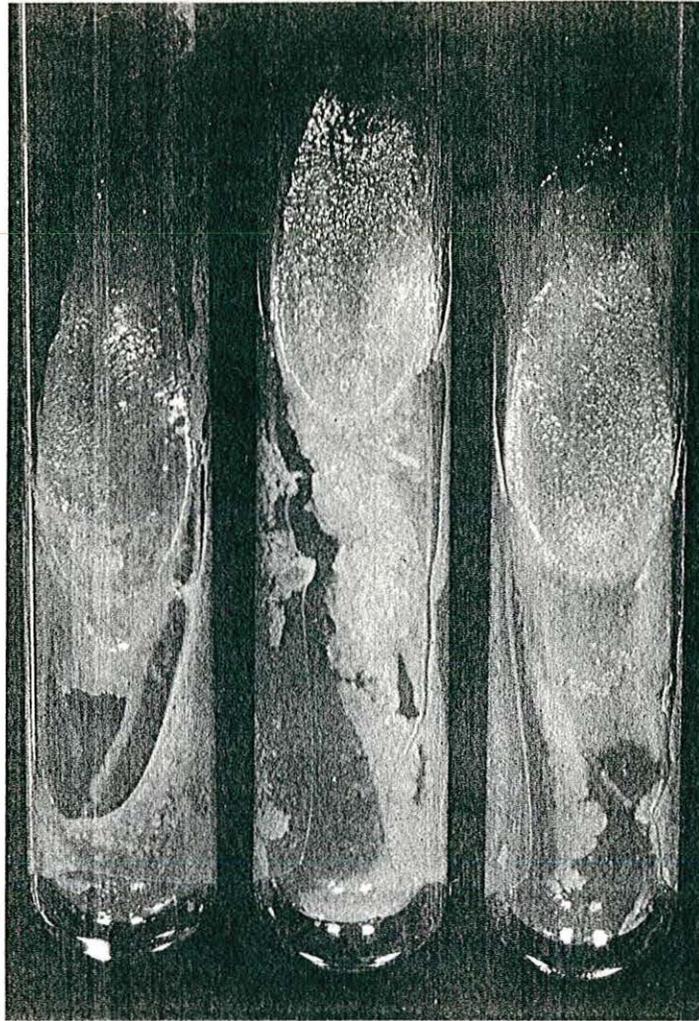


Figura 7. Cultivos de P. orbiculare y P. ovale, obtenidos de células epiteliales aisladas de pacientes con PV, DS y SS, de izquierda a derecha respectivamente.

TABLA 5. DETERMINACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS EN LOS EXTRACTOS DE LEVADURAS DE P. orbiculare Y P. ovale, AISLADAS DE PACIENTES CON PV, DS Y SS.

EXTRACTOS	PROTEINAS mg/ml	CARBOHIDRATOS mg/ml
PV	2.0	1.8
DS	1.5	0.5
SS	1.3	0.9



DOBLE DIFUSION DE OUCHTERLONY DE LOS EXTRACTOS DE PV, DS Y SS.

En la Figura 8 se muestran las bandas de precipitación, formadas al reaccionar los extractos antigénicos con los correspondientes antisueros.

En A se observa que el extracto de PV(3) en presencia de su antisuero presentó 4 bandas de precipitación. Dos de ellas las comparte por identidad con los extractos de DS(4) y SS(2). Además el anti-PV dió una banda adicional de precipitación con DS(4) y SS(2) que no son idénticas entre si.

En B el extracto de DS(4) en presencia de su antisuero presentó 4 bandas de precipitación. Una de ellas dió iden tidad con los extractos de PV(3) y SS(2). El anti-DS dió una banda de precipitación adicional con PV(3).

En C el extracto de SS(2) reaccionó con su antisuero y presentó 3 bandas de precipitación. Dos de ellas tuvieron identidad con las de PV(3) y sólo una tuvo identidad con DS(4).

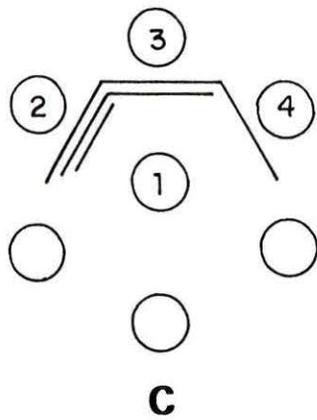
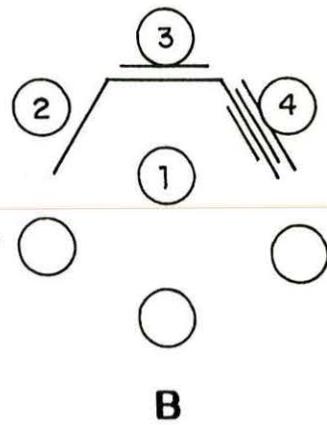
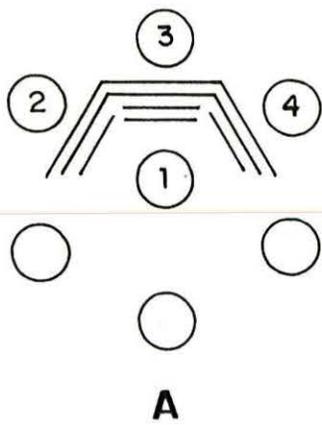


Figura 8. Inmunodifusión de los extractos de PV (3), DS (4) y SS (2), contra sus respectivos antisueros obtenidos de conejos. En el pozo 1 de A, B y C se colocó anti-PV, anti-DS y anti-SS respectivamente.

CROMATOGRAFIA.

En la Figura 9 se muestra el fraccionamiento cromatográfico en Sephadex G-100, de los extractos de levaduras de PV DS y SS. Se observó una fracción en cada uno de ellos. La concentración de proteínas y carbohidratos de las fracciones, de mayor a menor fue DS, SS y PV [Tabla 6].

DOBLE DIFUSION DE OUCHTERLONY DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS DE LOS EXTRACTOS PV, DS Y SS.

En la Figura 10 se muestran las bandas de precipitación por doble difusión de los sueros de conejos anti-PV, anti-DS y anti-SS, contra las fracciones cromatográficas y sus extractos correspondientes.

En A se observa que el suero anti-PV dió una banda de precipitación con la fracción PV(3), que tuvo identidad con su extracto(2), con la fracción SS(7), con el extracto SS (6) y con el extracto DS(4). Con la fracción de DS(5), este antisuero no reaccionó.

En B el suero anti-DS no reaccionó con la fracción DS(5), en cambio con el extracto DS(4) dió 4 bandas de precipita

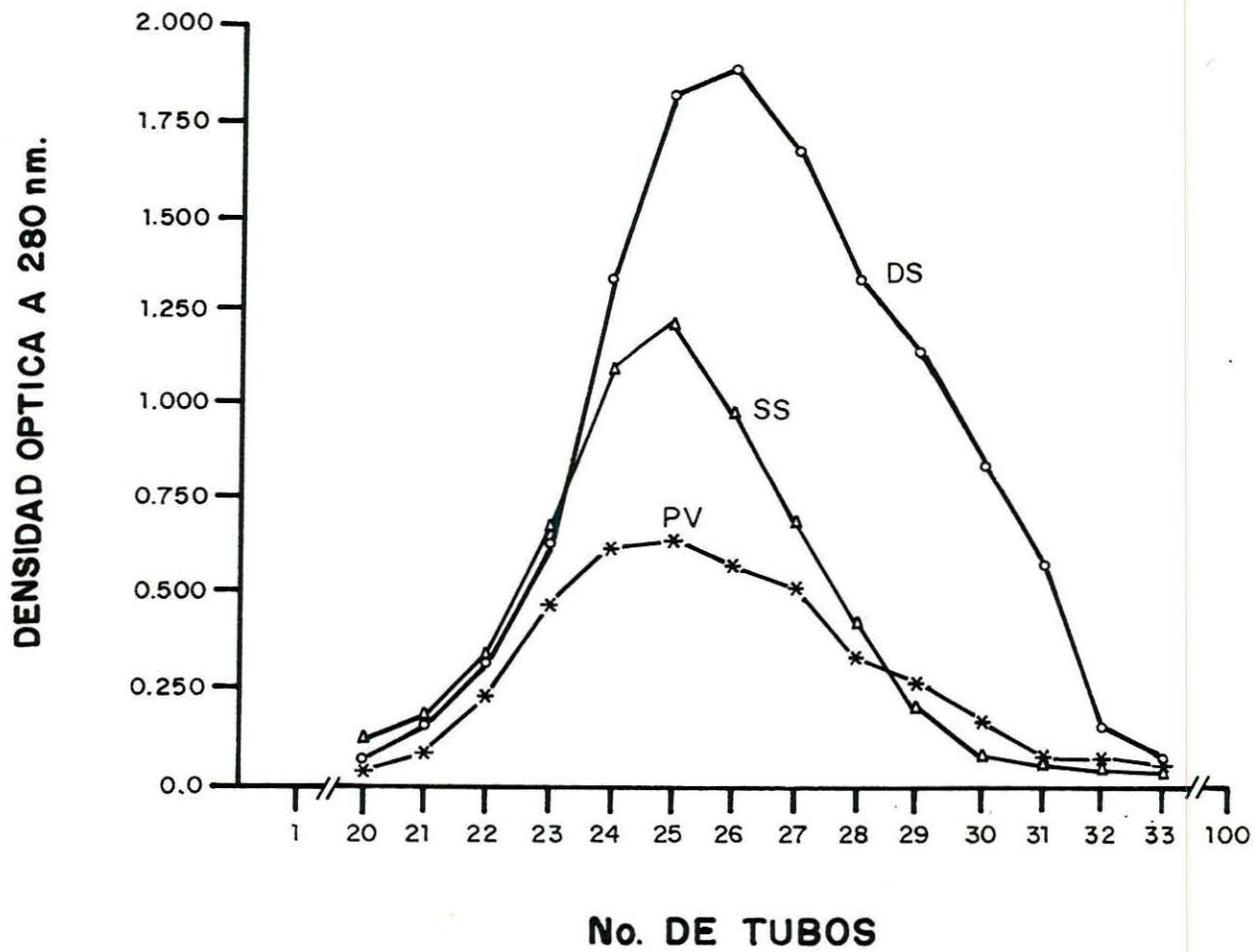


Figura 9.- Fraccionamiento por Cromatografía en Sephadex G-100 de los extractos de levaduras.

TABLA 6. DETERMINACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS EN LAS FRACCIONES DE LOS EXTRACTOS DE LAS LEVADURAS DE P. ORBICULARE Y P. OVALE, AISLADAS DE PACIENTES CON PV, DS Y SS.

FRACCIONES	PROTEINAS mg/ml	CARBOHIDRATOS mg/ml
PV	1.0	0.6
DS	2.1	0.4
SS	1.5	0.7

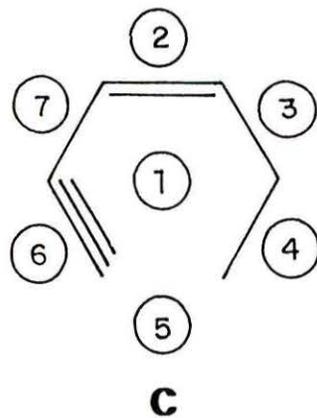
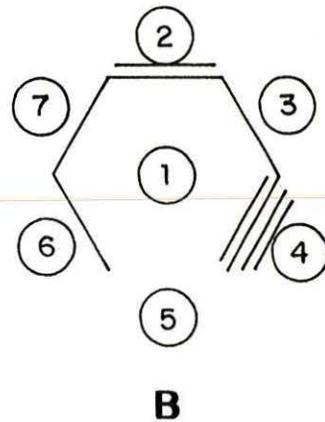
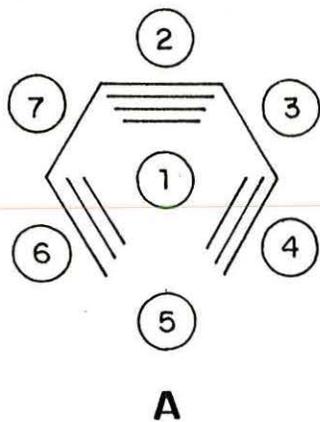


Figura 10. Inmunodifusión de las fracciones cromatográficas de PV, DS y SS contra sus respectivos antisueros obtenidos en conejos. En los pozos 1 de A, B y C se colocó el anti-PV, anti-DS y anti-SS, respectivamente. En los pozos restantes de A, B y C se colocaron extractos de PV(2), fracción de PV(3), extracto de DS(4), fracción de DS(5), extracto de SS(6) y fracción de SS(7).

ción, una de ellas tuvo identidad con los extractos PV(2), SS(6) y con sus respectivas fracciones (3) y (7).

En C el suero anti-SS dió una banda de precipitación con la fracción SS(7). Esta tuvo identidad con la banda de la fracción PV(3) y con una banda de los extractos SS(6), PV(2) y DS(4). El anti-SS no reaccionó con la fracción DS (5).

ELECTROFORESIS.

En la Figura 11 se observa la distribución electroforética de los componentes de los extractos PV, DS, SS y de sus fracciones correspondientes, así como sus PM aproximados, en relación con las proteínas que se utilizaron como referencia.

El extracto de PV presentó 10 bandas de precipitación a las que les corresponden los PM de 27,28,30,31,43,44,47 66 Kd y dos bandas de PM mayor de 66 Kd. La fracción cromatográfica del extracto PV mostró 4 bandas con PM de 26, 27,28 y 30 Kd.

El extracto de DS presentó 4 bandas de precipitación con los siguientes PM 16,42,63 y 64 Kd. Su fracción cromato

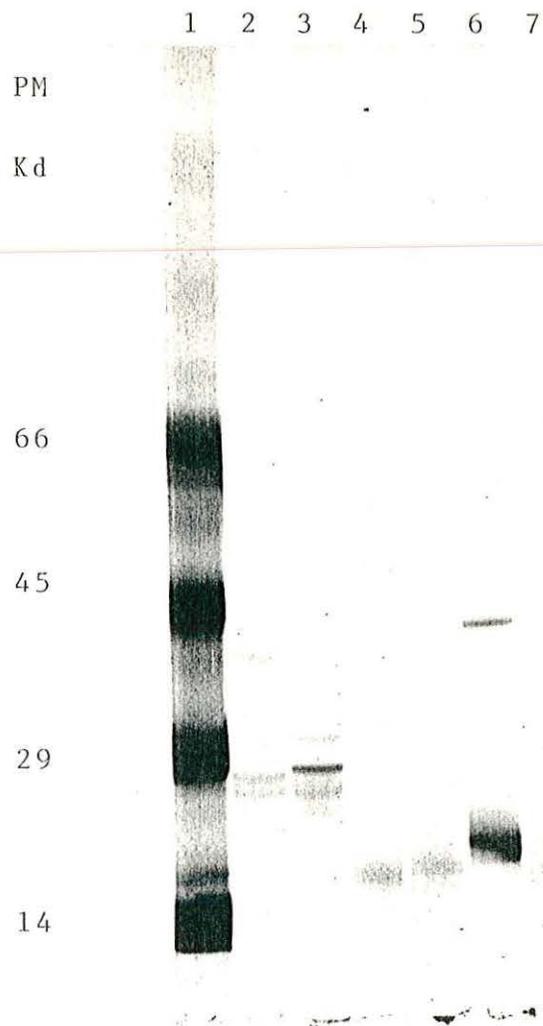


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida. 1) Marcadores de PM [Albúmina bovina 66 Kd, albúmina de huevo 45 Kd, anhidrasa carbonica 29 Kd y lisozima 14 Kd. 2) Extracto de PV. 3) Fracción de PV 4) Extracto de DS. 5) Fracción de DS. 6) Extracto de SS y 7) Fracción de SS. Teñidos con negro amido al 0.5%.

gráfica tuvo 2 bandas con PM de 16 y 42 Kd.

En el extracto de SS se observaron 7 bandas de precipitación con PM de 17,41,43,44,48,65 y 66 Kd. En su fracción cromatográfica se observaron 7 bandas de precipitación con PM de 16,28,29,31,32,41 y 42 Kd.

PRUEBAS INTRADERMICAS.

La Tabla 7 muestra los resultados de las pruebas de hipersensibilidad retardada practicadas a los pacientes con PV DS y a SS. El 85% de los pacientes con PV fue positivo al Ag PV, 20% al Ag DS y un 5% al Ag SS.

En el grupo de los pacientes con DS, el 10% fue positivo al Ag PV, 85% al Ag DS y un 10% al Ag SS. En el grupo testigo SS, el 5% fue positivo al Ag PV, 15% al Ag DS y un 20% al Ag SS.

TABLA 7. PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA
EN PACIENTES CON PV, DS Y SS.

PACIENTES	PV ANTIGENOS			DS ANTIGENOS			SS ANTIGENOS		
	PV	DS	SS	PV	DS	SS	PV	DS	SS
	16/20	4/20	1/20	2/20	17/20	2/20	1/20	3/20	3/20

* El numerador de los quebrados indica el número de casos positivos y el denominador los casos estudiados.

DISCUSION.

La levadura P. orbiculare fue aislada y clasificada por Gordon en 1951, como una nueva especie del género Pityrosporum [3]. A partir de entonces se ha discutido la relación que tiene P. orbiculare con P. ovale [20]. El problema se ha enfocado para precisar las similitudes y/o diferencias entre ambas levaduras y determinar si son dos especies o se trata de la misma en distinto estadio de maduración. Los resultados hasta el momento son contradictorios, mientras algunos autores señalan que se trata de la misma levadura [14-19], otros indican que son dos levaduras diferentes [20-24].

En el presente estudio se analizaron las levaduras de P. orbiculare y P. ovale en relación con el contenido antigénico de sus extractos y fracciones, obtenidas por cromatografía de filtración. Tanto a los extractos como a sus fracciones se les determinó su actividad antigénica in vitro contra el suero de conejos inmunizados con los extractos PV, DS y SS, por el método de doble difusión de Ouchterlony. Asimismo, los extractos se aplicaron intradérmicamente en humanos, para valorar in vivo su antigenicidad por reacciones de hipersensibilidad retardada.



BIBLIOTECA CENTRAL

Los resultados de este trabajo indican que a nivel de extractos las tres cepas comparten algunas proteínas y difieren en otras. Los anticuerpos anti-PV identificaron dos antígenos presentes en los extractos PV, DS y SS. Por su parte los anticuerpos anti-DS revelaron un antígeno en los tres extractos. Con los anticuerpos anti-SS se detectaron dos antígenos idénticos en los extractos PV y SS y sólo uno con identidad en los tres extractos. Estos resultados en parte concuerdan con los obtenidos por Tanaka e Imamura [15] quienes obtuvieron suero de conejo con anticuerpos contra P. orbiculare, lo probaron con antígenos de P. orbiculare y P. ovale y observaron que P. orbiculare presentó tres bandas de precipitación de las cuales dos eran idénticas a las dos bandas de precipitación que dió P. ovale. Tanto estos resultados como los del presente trabajo no son de extrañarse, si se tiene en cuenta que los extractos antigénicos se prepararon de levaduras que pertenecen al mismo género y que comunmente existen considerables similitudes antigénicas entre especies del mismo género de hongos [52], debido a que en su pared celular tienen estructuras químicas en común que les permiten compartir algunas características [53]. Sin embargo, también poseen estructuras que les confieren especificidad antigénica como son las cadenas laterales de carbohidratos, las cuales

varían considerablemente en número, longitud y unión con otros residuos [53].

En relación con la actividad antigénica de las fracciones cromatográficas de los extractos PV, DS y SS, se obtuvo una fracción de cada uno. Por doble difusión con los antisueros correspondientes, se encontró que las fracciones PV y SS mostraron una banda de identidad entre si y con una de las bandas de los extractos PV, DS y SS. En cambio la fracción DS no dió bandas de precipitación con su proprio antisuero ni con los de PV y SS. Es probable que al realizar el fraccionamiento cromatográfico del extracto DS, los componentes antigénicos quedaron retenidos en la columna y las proteínas eluidas no tuvieron actividad antigénica.

Respecto a las pruebas de hipersensibilidad retardada, al aplicar intradérmicamente los extractos PV, DS y SS a cada uno de los pacientes de los grupos PV, DS y SS; se obtuvo una respuesta específica hacia su respectivo extracto. Sólo se observó reacción cruzada en un paciente de cada grupo que reaccionó a los tres extractos antigénicos. Tres pacientes de PV reaccionaron positivamente con su propio antígeno y con el de DS. Dos pacientes con DS fue

ron positivos además de su propio antígeno, uno a PV y el otro a SS. Estas reacciones cruzadas se pueden relacionar con el contacto previo que pudieron haber tenido los pacientes que reaccionaron de esta manera, con los antígenos de levaduras diferentes a la asociada con la enfermedad que presentaron. Aparentemente cuando las levaduras no están produciendo enfermedad, tampoco sensibilizan al individuo, puesto que de 20 sujetos clínicamente sanos de los cuales se aislaron las levaduras de las que se extrajo el extracto SS que se les aplicó intradérmicamente, sólo 4 dieron respuesta positiva a la prueba de hipersensibilidad retardada con dicho antígeno.

Los resultados de las pruebas cutáneas reafirman la postura de que P. orbiculare y P. ovale son dos levaduras de especie diferente puesto que los hongos que producen micosis, característicamente originan hipersensibilidad retardada específica en los individuos infectados [54].

CONCLUSION.

Las levaduras P. orbiculare y P. ovale pertenecen a dos especies diferentes puesto que morfológicamente presentan diferencias, se relacionan independientemente con pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica respectivamente. También se observaron diferencias en el corrimiento electroforético y en las pruebas de doble difusión tanto de los extractos de PV y DS como de sus fracciones cromatográficas. Asimismo se encontró especificidad in vivo mediante las respuestas de hipersensibilidad retardada hacia los extractos antigénicos PV y DS.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Ajello, L., George, L.K., Kaplan, W., Kaufman, L.: Mycoses superficial. In: Laboratory Manual for Medical Mycology, edited by, Public Health Service Publication No. 994. Government Printing Office, Washington, pp. A-C, 1963.
2. Sigurd, F.: Fungi of particular interest in medical micology. In: Practical Mycology. Manual for identification of fungi, 5a. Ed. Edited by, Hafner Publishing Company, Inc. New York, N.Y. 10003, U.S.A. pp. 77-81, 1968.
3. Roberts, S.O.B.: Pityriasis: A clinical and mycolögical investigation. Br. J. Dermatol. 81:315-326, 1969.
4. Gordon, M.A.: The lipophilic mycoflora of the skin.I. In vitro culture of Pityrosporum orbiculare, n.sp. Mycologia. 43:524, 1951.
5. Zapater, R.C.: Micetos ecto-parásitos. In: Introducción a la micología médica, 2a. Ed. Edited by, El Ateneo. Buenos Aires. pp. 33-40, 1981.

6. Gordon, M.A.: Lipophilic yeast-like organisms associated with tinea versicolor. J. Invest. Dermatol. 17:267-272, 1951.
7. Mc Ginley, K.J., Lantis, L.R., Marples, R.R.: Microbiology of tinea versicolor. Arch. Dermatol. 102:168-171, 1970.
8. Bojanowsky, A., Lischka, G.: Pityrosporum orbiculare bei acneiformen eruption. Hautarzt. 28:409-411, 1977
9. Tosti, A., Vilaridita, S., Fazzini, L.M.: The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. J. Invest. Dermatol. 59:233-237, 1972.
10. Faergemann, J.: Experimental tinea versicolor in rabbits and humans with Pityrosporum orbiculare. J. Invest. Dermatol. 72:326-329, 1979.
11. Faergemann, J., Bernander, S.: Tinea versicolor and Pityrosporum orbiculare: a mycological investigation Sabouraudia. 17:171-179, 1979.
12. Weary, P.E.: Pityrosporum ovale. Arch. Derm. 98:408-

422, 1968.

13. Civila, E.S., Vignale, R.A., Conti-Díaz, I.A.: Malassezia ovalis: Mycologic and probable pathogenic role. 5ta. International conference on the mycoses: Pan American Health Organization. Scientific Publication. 396:44-54, 1980.
14. Faergemann, J., Fredriksson, T.: Tinea versicolor with regard to seborrheic dermatitis. Arch. Dermatol. 115:966-968, 1979.
15. Tanaka, M., Imamura, D.: Immunological studies on Pityrosporum genus and Malassezia furfur. J. Invest. Dermatol. 73:321-324, 1979.
16. Porro, M.N., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.: Induction of hyphae in cultures of Pityrosporum by cholesterol and cholesterol esteres. J. Invest. Dermatol. 69:531-534, 1977.
17. Faergemann, J., Fredriksson, T.: Experimental infections in rabbits and humans with Pityrosporum orbiculare and P. ovale. J. Invest. Dermatol. 77:314-318,

1981.

18. Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Growth and filament production of Pityrosporum orbiculare and P. ovale on human stratum corneum in vitro. Acta. Derm. Venereol. [Stockh]. 63:388-389, 1983.
19. Faergemann, J., Aly., Maibach, H.I.: Quantitative variations in distribution of Pityrosporum orbiculare on clinically normal skin. Acta. Derm. Venereol. [Stockh]. 63:346-348, 1983.
20. Faergeman, J.: Lipophilic yeasts in skin disease. Sem. Dermatol. 4:173-184, 1985.
21. Silva-Hunter, M.: Malassezia furfur as pathogen and in culture: A review. 5th International conference - on the mycoses: Pan American Health Organization. Scientific Publication. 396:29-37, 1978.
22. Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of Pityrosporum orbiculare in a defined culture medium. J. Invest. Dermatol. 69:244-248, 1977.

23. Faergemann, J., Tjernlund, U., Scheynius, A., Bernander, S.: Antigenic similarities and differences in genus Pityrosporum. J. Invest. Dermatol. 78:28-31, 1982.
24. Sohnle, P.G., Collins-Lech, C.: Cell-mediated immunity to Pityrosporum orbiculare in tinea versicolor. J. Clin. Invest. 62:45-53, 1978.
25. Faergemann, J., Maibach, H.I.: The Pityrosporum yeasts their role as pathogens. Int. Dermatol. 23: 463-465, 1984.
26. Labows, J.N., McGinley., Leyden, J.J., Webster, G.F.: Characteristic γ -lactone odor production of the genus Pityrosporum. Appl. Env. Microbiol. 38[3]:412-415, 1979.
27. Boiron, G., Surleve-Bazeille., Gauthier, Y.: Etude ultrastructurale de divers stades evolutifs de pitiriasis versicolor. Ann. Dermatol. Venereol. [Paris]. 105:141-149, 1978.
28. Karaousi, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S., Mouse,

- A.: Tinea versicolor: Ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica*. 162:69-85, 1981.
29. Porro, M.N., Passi, S.: Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of Pityrosporum. *J. Invest. Dermatol.* 71:205-208, 1978.
30. Catterall, M.D., Ward, M.E., Jacobs, P.: A reappraisal of the role of Pityrosporum orbiculare in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. *J. Invest. Dermatol.* 71:398-401, 1978.
31. Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of Pityrosporum orbiculare on human skin. *Acta. Dermatoven.* 531-533, 1980.
32. Salcedo, N.: Cultures and physiologic properties of the fungus producing tinea versicolor. 5th. International Conference on the Mycoses: Pan American Health Organization. *Sc. Pub.* 396:44-54, 1980.
33. Gloor, M., Kümpel, D., Frederich, H.C.: Predisposing factors on the surface of the skin in persons with

- pityriasis versicolor. Arch. Derm. 254:281-286, 1975.
34. Hafez, M., El-Shamy, S.: Genetic susceptibility in pityriasis versicolor. Dermatologica. 171:86-88, 1985.
35. Porro, M.N., Passi, S., Caprilli, M.D., Nazzaro, P., Morpurgo, G.: Growth requirements and lipid metabolism of Pityrosporum orbiculare. J. Invest. Dermatol. 66:178-182, 1976.
36. Faergemann, J.: A new model for growth and filament production of Pityrosporum ovale [orbiculare] on human stratum corneum in vitro. J. Invest. Dermatol. 92[1]:117-119, 1989.
37. Barnes, W.G., Saver., G.C., Arnol, J. D.: Scanning electron microscopy of tinea versicolor organisms. Arch. Dermatol. 107:392-394, 1973.
38. Faergemann, J.: Tinea versicolor and Pityrosporum orbiculare. Mycological investigations, experimental infections and epidemiological surveys. Acta. Dermatol.-Vener. [Sweden]. Suppl. 86:5-23, 1979.

39. Gordon, M.A.: How superficial is Malassezia furfur?
Scientific Publication. 396:44-54, 1980.
40. Sohnle, P.G., Collins-Lech.: Analysis of the lymphocyte transformations response to Pityrosporum orbiculare in patients with tinea versicolor. Clin. Exp. Immunol. 49:559-564, 1982.
41. Lowry, O.H., Sebrough, N.J., Farr, A., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
42. Morris, D.L.: Quantitative determinations of carbohydrates with dreywoods anthrone reagent. Science. 107: 254, 1984.
43. Ajello, L., Chick, E.W., Furcolow, M.L.: Preparation and standarization of Histoplasmin. In: Histoplasmosis. Proceedings of the Second National Conference. Charles Thomas Publishers. Springfield, Illinois U. S.A. pp. 284-293, 1971.
44. Kaufman, L., Huppert, M., Natto, C.F., Pollak, L., Restrepo, A.: Manual de procedimientos estandariza

dos para el serodiagnóstico de las micosis sistémicas. Parte 1. Pruebas de inmunodifusión en agar. Organización Panamericana de la Salud, Scientific Publication No. 205. pp. 3-9, 1970.

45. Fischer, L.: Introducción a la cromatografía en gel en: Técnicas de Laboratorio en Biología Molecular y Bioquímica, editado por, Ed. El Manual Moderno. México, D.F. pp. 1-25, 1975.
46. Georgia, B., Leo, O., Michael, W., Wayne, M.: Purification, composition, and serological characterization of histoplasmina H and M antigens. Infection and Immunity. 9[5]:870-880, 1974.
47. Harris, H., Hopkinson, D.A.: Electrophoretic methods of Handbook of Enzyme Electrophoresis en Human Genetics. Amsterdam. New York-Oxford. pp. 1-17, 1977.
48. Gordon, H.: Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida y de Almidon, editado por, Ed. El Manual Moderno. México, D.F. pp. 1-58, 1975.
49. Hedrick, L.J., Smith, J.A.: Size and charge isomer

separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126:155-164, 1968.

50. LKB Application Note 306.: SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis with LKB 2117 multiphor, editado por, Ed. LKB. Bromma Sweden. pp. 1-15, 1977.
51. Sigma Chemical Company. SDS. Molecular weight markers editado por, Technical Bulletin No-MWS. 877:1-8, 1982.
52. Jones, G.R., Stewart-Tullides.: Antigenic analysis of yeast cell-walls. J. Med. and Vet. Microbiol. 13:94-109, 1975.
53. Sentandreu, R., Ruíz, H.J., Elorza, M.V.: La pared celular de los hongos. Investigación y Ciencia. 76: 92-104, 1983.
54. Lee, Wei-Li., Lloyd, K.O.: Immunological studies on a yeast peptido-galactomannan. Arch. Biochem. Biophys. 171:624-630, 1975.