



Producción recombinante de un péptido derivado del antígeno Hcp100 de *Histoplasma capsulatum* para su potencial uso en el diagnóstico de la histoplasmosis

Trabajo final de carrera de Licenciatura en ciencias biológicas

Autor: Videla Garrido, Agustin

Directora: Dra. María Luján Cuestas

Co-Directora: Bioq. María Agustina Toscanini

2022

Universidad de Belgrano

A handwritten signature in black ink, appearing to be "AG" with a long horizontal stroke extending to the right.

**Videla Garrido,
Agustin
Autor
DNI: 41.588.604**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "MLC" with a long horizontal stroke extending to the right.

**Dra. María Luján
Cuestas
Directora
DNI: 27691200**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "AToscanini" with a long horizontal stroke extending to the right.

**Bioq. María Agustina
Toscanini
Co-directora
DNI: 36688612**

Resumen:

La histoplasmosis es una micosis sistémica y endémica ampliamente distribuida en las Américas, causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. La infección es usualmente asintomática en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, los pacientes inmunocomprometidos pueden contraer la forma diseminada de la infección, la cual tiene un mal pronóstico y requiere un diagnóstico y tratamiento rápidos de la enfermedad. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de *H. capsulatum* de las muestras clínicas, un proceso que puede demorar hasta 4 semanas. Además, los métodos moleculares son costosos y de baja sensibilidad, mientras que los inmunoensayos pueden presentar una gran cantidad de falsos positivos.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue expresar y purificar un péptido derivado de una proteína específica de 100 kDa de *H. capsulatum* en un sistema de expresión procariota como proteína de fusión a MBP (*Maltose-Binding Protein*), para desarrollar nuevos inmunoensayos para el diagnóstico de la histoplasmosis.

Palabras claves: Histoplasmosis; *Histoplasma capsulatum*; diagnóstico; proteína Hcp100; péptido recombinante; *Escherichia coli* BL21; péptido de fusión a MBP.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Historia	4
1.2 Etiología	5
1.3 Epidemiología	6
1.3.1 Ecología	6
1.3.2 Distribución geográfica	6
1.4 Patogénesis y respuesta inmune	7
1.5 Manifestaciones clínicas	9
1.6 Diagnóstico de laboratorio	12
1.7 Hcp100	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Hipótesis	17
2.2 Objetivos generales	18
2.3 Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Identificación y selección de una región específica de Hcp100	19
3.2 Construcción genética	20
3.3 Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	21
3.3.1 Preparación de bacterias quimiocompetentes	21
3.3.2 Minipreparaciones de DNA (Minipreps) (Sambrook and Russel, D, 2001)	22
3.4 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	23
3.4.1 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) por el método químico	23
3.5 Expresión de frHcp100-MBP en <i>E. coli</i>	23
3.5.1 Evaluación de la expresión de frHcp100	23
3.5.2 Análisis de la solubilidad de frHcp100-MBP	23
3.5.3 Purificación de frHcp100-MBP por cromatografía de afinidad con amilosa	24
3.5.4 Digestión de frHcp100-MBP con la proteasa TEV	24
3.5.5 Purificación de frHcp100 por cromatografía de intercambio catiónico	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Expresión y purificación de un péptido derivado de Hcp100	26
4.1.1 Identificación y selección de una región específica de Hcp100	26
4.1.2. Construcción genética del péptido de Hcp100	30
4.2 Cultivo y expresión del péptido de Hcp100 fusionado a MBP en <i>E. coli</i>	31
4.2.1 Evaluación de la expresión de los distintos clones	31

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



4.2.2 Evaluación de la solubilidad	32
4.3. Purificación del péptido de Hcp100 fusionado a MBP	33
4.3.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad con amilosa	33
4.3.1. Separación del péptido de Hcp100 de la MBP	33
4.3.2. Purificación del péptido de Hcp100 mediante cromatografía de afinidad tras el clivaje con la proteasa TEV	34
5. DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIÓN	40
7. PERSPECTIVAS	41
8. REFERENCIAS	42
9. ANEXO	46



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

1. INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis es una enfermedad granulomatosa endemo-epidémica producida por un hongo geófilo y termodimorfo llamado *Histoplasma capsulatum*. Afecta a los seres humanos y a varias especies animales.

La infección o primoinfección se produce por la inhalación de conidios de la fase saprofítica del hongo. En el 90% de los casos cursa en forma asintomática y se cura espontáneamente. De acuerdo con la cantidad de propágulos inhalados y el estado inmunológico del huésped pueden desarrollarse diferentes formas clínicas, las cuales las más frecuentes son la histoplasmosis pulmonar aguda, la forma pulmonar crónica y la histoplasmosis progresiva diseminada. No existen vacunas preventivas ni terapéuticas para el control de esta infección [1].

1.1 Historia

La histoplasmosis fue descrita por primera vez por S. Darling en 1906 en la zona de construcción del canal de Panamá, al efectuar la autopsia de un paciente muerto con hepatoesplenomegalia y daño pulmonar, signos muy similares a los de la leishmaniasis sistémica. Al año siguiente, observó dos nuevos casos en los que halló histiocitos con microorganismos intracelulares y los consideró a estos un protozooario con cápsula y sin blefaroplasto [2].

El agente etiológico fue considerado un hongo brotante por Henrique Da Rocha Lima en 1912 y su naturaleza fúngica fue confirmada en 1933 por W. De Monbrum en los Estados Unidos al obtener el crecimiento del hongo a partir de materiales clínicos y reproducir la enfermedad en animales, con lo cual corroboró los postulados de Koch. Este autor comprobó la naturaleza dimórfica de *H. capsulatum*. En 1944, A. Christie y J. C. Paterson realizaron pruebas de histoplasmina (HMN) en personas con calcificaciones y reacción negativa a tuberculina, lo que les permitió señalar la amplia distribución de la enfermedad [3].

En 1940, Pablo Negroni diagnosticó el primer caso en Argentina, y en 1948 C. W. Emmons consiguió el aislamiento de este hongo del suelo, con lo cual demostró que esta era la fuente de infección más importante para el ser humano y los animales [3,4]. En 1970, Kwon-Chung aisló la forma teleomorfa o sexuada y la llamó *Emmonsiella capsulata* y posteriormente, M. R. McGinnis y J. B. Katz la transfirieron al género *Ajellomyces* (*A. capsulatus*) [3].

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



1.2 Etiología

Este hongo es una especie geófila que se desarrolla como mohu u hongo filamentoso en los suelos enriquecidos con excretas de aves y murciélagos. En los medios no enriquecidos como agar Sabouraud, el agar papa glucosado y Lactrimel incubados a 28°C, *H. capsulatum* desarrolla al cabo de tres semanas colonias de micelio aéreo algodónoso y blanquecino que luego se vuelve ligeramente pardo (figura 1A). A la observación microscópica las colonias presentan un micelio ramificado hialino y tabicado de 2 a 5 µm de diámetro. Los elementos de reproducción se caracterizan por la presencia de macroconidios esféricos o levemente piriformes de 10 a 20 µm de diámetro con pared gruesa con proyecciones digitiformes (conidios tuberculados) y de microconidios lisos, piriformes, de 2 a 5 µm de diámetro, los cuales se disponen sobre ramificaciones cortas del micelio vegetativo (figura 1B). Esta es la llamada fase filamentosa o saprofitica y constituye la forma infectante para el hospedero susceptible [1].

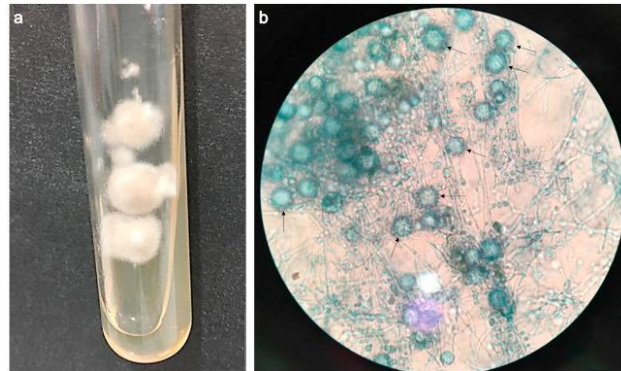
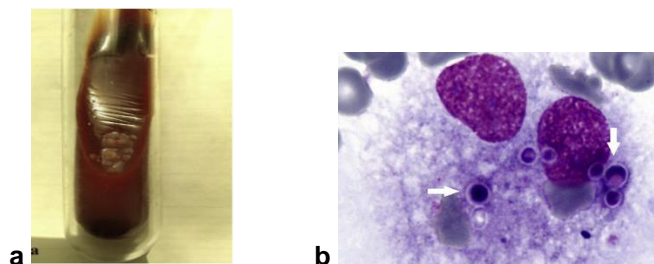


Figura 1. Fase micelial de *H. capsulatum*. **A.** Colonias blancas de aspecto algodónoso en agar Sabouraud luego de 4 semanas de incubación a 28 °C. **B.** Observación microscópica de los macroconidios y microconidios de *H. capsulatum*.

En medios enriquecidos como agar sangre o agar infusión cerebro-corazón (BHI) con 5% de sangre de carnero, incubado a 37°C, desarrolla al cabo de 4-5 días una colonia pastosa, plegada, de color crema (figura 2A). A la observación microscópica presenta elementos levaduriformes brotantes similares a los encontrados en los tejidos del hospedero infectado (figura 2B). Esta es la denominada fase parasitaria o levaduriforme [1], la cual no se transmite entre hospederos infectados.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

Figura 2. Fase levaduriforme de *H. capsulatum*. **A.** Colonias cremosas desarrolladas en medio BHI luego de 4 semanas de incubación a 37 °C. **B.** Observación microscópica de levaduras de *H. capsulatum* obtenidas a partir de material de biopsia de un paciente con histoplasmosis.

1.3 Epidemiología

1.3.1 Ecología

Las zonas endémicas más importantes son las de clima templado o tropical y húmedo. La mayor parte de las áreas endémicas son vecinas de las grandes cuencas fluviales o se encuentran a orillas de los lagos cuya temperatura media anual es de 15 a 20°C y con una pluviometría entre 800 a 1.200 mm anuales [5].

Este microorganismo se desarrolla bien en suelos fértiles, ricos en sustancias orgánicas, con alto contenido de nitrógeno y fósforo, de pH ácido y especialmente con excretas de aves o guano de murciélago [5].

1.3.2 Distribución geográfica

La histoplasmosis ha sido documentada en todos los continentes y se considera endémica del continente americano. Es la micosis respiratoria más frecuente en el mundo, con aproximadamente 40 millones de enfermos y 200.000 casos nuevos por año [6]. Si bien es una patología predominantemente americana, se han encontrado focos endémicos autóctonos en África, Europa, Australia, India y extremo Oriente [7].

En América es una infección que se observa desde Canadá hasta la Argentina. Las áreas más importantes son la cuenca de los ríos Mississippi-Missouri y Ohio en los Estados Unidos, y la cuenca del Río de la Plata en la Argentina. También se observa en el norte de Panamá, Honduras, Guatemala, Venezuela, Colombia y Brasil (figura 3) [8].



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

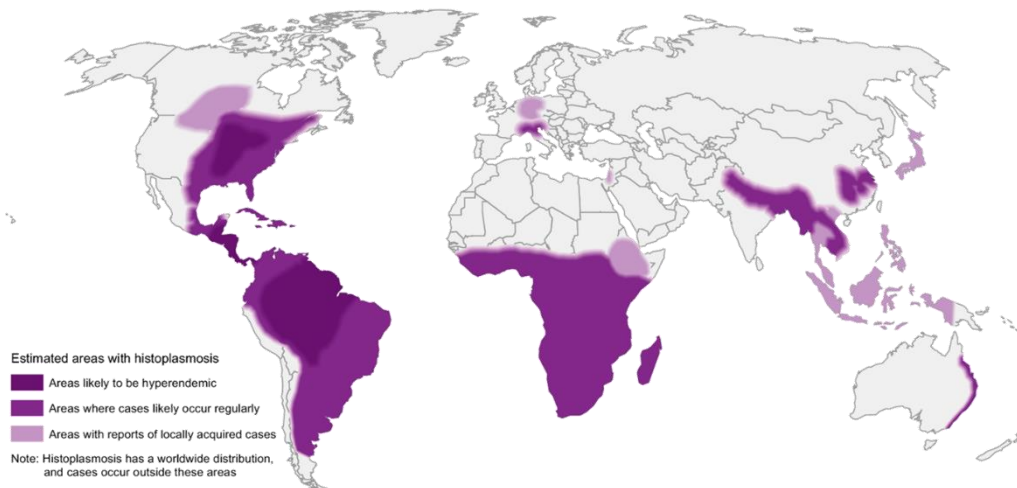


Figura 3. Distribución geográfica de la histoplasmosis en el mundo.

En nuestro país se encuentra ampliamente distribuida y se calcula que existen alrededor de 10 millones de individuos infectados (primoinfección) los cuales poseen un riesgo potencial de desarrollar la enfermedad micótica. La zona endémica comprende la provincia de Buenos Aires, sur de Entre Ríos, sur de Santa Fe, La Pampa y sudeste de Córdoba, que corresponde a las provincias situadas en la pampa húmeda. Otro foco endémico se presenta en la zona del valle de Lerma, en la provincia de Salta. En la cuenca del Río de la Plata se calcula que del 31 al 40% de la población general presenta infecciones asintomáticas detectadas por respuesta cutánea positiva a la HMN [1].

1.4 Patogénesis y respuesta inmune

La infección se produce por la inhalación de los microconidios. Dado su pequeño tamaño, estos conidios alcanzan el alveolo pulmonar. Allí son fagocitados por los macrófagos y se transforman en elementos levaduriformes que proliferan. Una vez que forman una gran cantidad de levaduras dentro del parénquima pulmonar se diseminan en el interior de las células fagocíticas a los ganglios linfáticos locales (hilios mediastinales) y luego pasan al torrente sanguíneo (fungemia transitoria y asintomática), y quedan acantonados en órganos del sistema retículo endotelial como el hígado, el bazo y la médula ósea (figura 4) [1].

Para el control de la enfermedad se requiere de una efectiva inmunidad mediada por las células T. En la fase inicial de la infección, la reacción inflamatoria está constituida por polimorfonucleares, que son rápidamente reemplazados por macrófagos que fagocitan al hongo. Luego de dos a tres semanas la respuesta inmune mediada por células T controla la enfermedad. La inmunidad adquirida permite la activación de los macrófagos que destruyen a las levaduras y así se limita la infección. Los linfocitos NK

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

son activos contra las formas levaduriformes de *H. capsulatum*. Las citoquinas interferón γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleuquina-12 son importantes en montar una efectiva respuesta Th1 contra este patógeno intracelular [5].

Se forman granulomas epitelioides con células gigantes, con un área central de necrosis caseosa y una cápsula periférica de fibras colágenas que tiende a calcificar. Los granulomas persisten por meses o años e *H. capsulatum* puede quedar en su interior en estado latente y viable con la posibilidad de reactivarse ante procesos que lleven a una inmunosupresión mediada por células T [5].

La inmunidad humoral no confiere protección en la histoplasmosis. En el 90-95% de los casos se origina una enfermedad autolimitada que desaparece dejando calcificaciones en pulmón y bazo. En algunos casos la enfermedad se hace crónica y progresiva, esto ocurre cuando hay una deficiencia de la inmunidad celular o alteraciones anatómicas (como en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tabaquismo y/o alcoholismo crónico, diabetes, corticoterapia prolongada) [6].

El hongo actúa como oportunista particularmente en pacientes HIV/sida, linfomas, leucemias, trasplantes de órganos sólidos y de células progenitoras hematopoyéticas, tratamientos con corticoides, inmunosupresores, biológicos como los antagonistas del TNF- α (infliximab y etanercept) o deficiencias congénitas de células T. Es la tercera micosis en frecuencia en pacientes con sida [1].

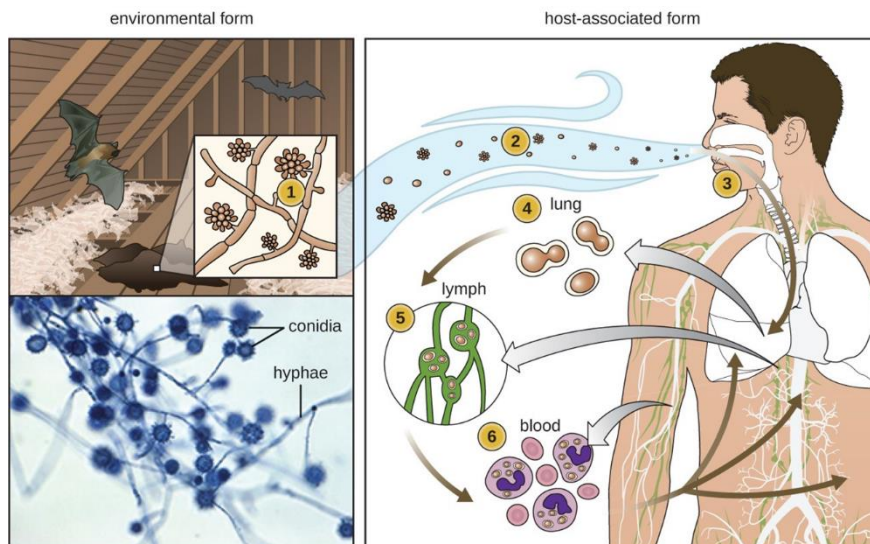


Figura 4. La infección por *H. capsulatum* se produce por la inhalación de microconidias que crecen en suelos ricos en fosfato y nitrógeno, especialmente con defecaciones de aves y murciélagos. Una vez dentro del organismo, las microconidias se transforman en levaduras y pueden afectar los pulmones o diseminarse dentro de las células fagocíticas a otros órganos.

1.5 Manifestaciones clínicas

De acuerdo a la cantidad de propágulos inhalados y al estado inmunológico del huésped, pueden desarrollarse diferentes formas clínicas, entre ellas, las formas meníngeas, pulmonar aguda grave, o diseminadas, las cuales pueden causar una extensa morbilidad, discapacidad y mortalidad en poblaciones humanas vulnerables si no son diagnosticadas precozmente. Las formas diseminadas se caracterizan por la diseminación fúngica por vía hematógena a través de los macrófagos parasitados por el microorganismo, a varios órganos, incluyendo médula ósea, hígado, bazo y glándulas suprarrenales [9-11]. Esta forma clínica posee mal pronóstico por lo que requiere de un rápido diagnóstico y tratamiento. Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de la inmunidad celular, constituye un factor de riesgo para la diseminación de esta enfermedad [9].

A continuación, se describen las formas clínicas más frecuentemente descritas de la histoplasmosis [9].

Primoinfección asintomática. Es una infección asintomática, autolimitada y que en algunos casos puede presentar síntomas similares a cuadros gripales. La evolución a la curación es espontánea y por lo general no se realiza diagnóstico.

Histoplasmosis pulmonar aguda. Se produce por la inhalación de una gran cantidad de microconidios. Es la forma predominante en los casos de micro epidemias (grupos de personas que se internan en cavernas habitadas por murciélagos, limpieza de gallineros, áticos, etc.). Los síntomas pueden ser fiebre, tos con expectoración mucopurulenta y astenia. En los casos de mayor gravedad se puede presentar como una neumonía atípica aguda o subaguda. Pueden desarrollar una hipoxemia importante que requiere ventilación mecánica. La radiografía de tórax y la TAC (tomografía axial computada) muestran un patrón reticulonodulillar bilateral (figura 5). En un 10 a 15% de los casos se puede producir cavitación pulmonar. Esta variación clínica depende de la cantidad de conidios inhalados. Puede evolucionar a la curación espontánea o a la diseminación extrapulmonar lo cual produce una enfermedad diseminada aguda sólo en aquellos que presentan un sistema inmune deficiente.



Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604



Figura 5. Radiografía de tórax de un paciente con histoplasmosis pulmonar aguda. Se observa la presencia de infiltrados bilaterales reticulonodulillares.

Histoplasmosis pulmonar crónica. Esta forma de presentación es clínica y radiológicamente idéntica a la tuberculosis, de ahí que a la histoplasmosis se la considera una tuberculosis fúngica. Con frecuencia se observa en individuos blancos de sexo masculino mayores de 40 años y con antecedentes de EPOC. Es una enfermedad que evoluciona por brotes con síntomas variados como tos con o sin expectoración, con hemoptisis con o sin disnea. El diagnóstico diferencial de una histoplasmosis pulmonar crónica con cavidades es, por excelencia, la tuberculosis. Su evolución es de años (crónica) y generalmente, una vez realizado el diagnóstico, el paciente evoluciona favorablemente, pero con secuelas pulmonares (fibrosis).

Histoplasmosis progresiva diseminada o diseminada aguda. Esta forma clínica corresponde a una enfermedad diseminada grave que puede deberse a la inhalación de una gran cantidad de microconidios y/o a un déficit inmunológico del hospedero. Esto provoca una rápida diseminación hematógena, a través de los macrófagos parasitados por el microorganismo, a todos los tejidos. Se observa en pacientes con linfomas, en aquellos que reciben una terapia inmunosupresora como consecuencia de un trasplante y es la forma observada habitualmente en pacientes con HIV/sida, con un recuento de linfocitos T CD+4 < 200/ μ l. Clínicamente, se presenta con hepatoesplenomegalia, pancitopenia, síndrome febril, lesiones mucocutáneas polimorfas y de distribución variable y pérdida de peso. Puede o no presentar sintomatología respiratoria (tos con expectoración mucopurulenta), dolor abdominal, diarrea y síndrome de mala absorción. Es importante señalar que en la piel no existen lesiones patognomónicas, las cuales se presentan por lo general en cara y cuello, pero hay casos con una distribución mayor, que incluso compromete las palmas de manos, las plantas de los pies, así como las mucosas (genitales, orales y anales). En la mayoría de los casos se observa como exantema, pápulas umbilicadas (lesiones moluscoideas), nódulos, úlceras, y placas

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

10

eritemato-escamosas. Un grupo frecuente de pacientes con alto riesgo de sufrir dicha forma clínica lo constituye los pacientes con HIV/sida, dada la posibilidad de que se produzca una infección no controlada en ellos o la reactivación de los focos latentes, aun fuera del área endémica [12-15] (figura 6).



Figura 6. Lesiones cutáneas presentes en un paciente HIV/sida con histoplasmosis progresiva diseminada.

Cabe destacar que, en los últimos años, se ha observado un incremento en el número de casos asociado a la infección por el HIV [16].

Desde entonces, la histoplasmosis progresiva diseminada se considera una de las micosis más importantes por su relativa frecuencia y gravedad en los pacientes con sida [17,18]. Desafortunadamente y tras décadas de ignorancia en toda Sudamérica debido a la falta de medios diagnósticos, se ha documentado que, en la actualidad, un 20-30% de los pacientes con HIV-sida presentan histoplasmosis diseminada, la cual encabeza la lista de muertes relacionadas al sida [19]. La escasez de investigaciones refleja el hecho trágico de que este problema está evolucionando fuera del radar de los sistemas de asistencia sanitaria y constituye una verdadera enfermedad desatendida, donde los pacientes continúan muriendo por una enfermedad tratable.

En nuestro país, la situación es preocupante. Pues de acuerdo con estudios realizados por Frola *et al* (2013)[20] y Negróni *et al* (2017)[21], más del 80% de los pacientes HIV/sida con HD de Argentina no recibe tratamiento antirretroviral (TARV) o presenta mala adherencia al mismo (ya sea por consumo de drogas y/o por la dificultad económica para acceder a los centros de salud), el 70% presenta histoplasmosis progresiva diseminada como primera enfermedad marcadora de sida, casi el 50% reside en hogares de nivel socioeconómico marginal o está en situación de calle y casi el 40% desconoce su condición serológica reactiva para HIV. En ambos estudios, la mediana de edad fue de 36 años.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AG' or similar initials, written in a cursive style.

Histoplasmosis diseminada crónica. Se produce frecuentemente en individuos de sexo masculino en relación 3:1, mayores de 50 años, con antecedentes de tabaquismo o enolismo y su evolución es crónica. Las manifestaciones clínicas son úlceras bucofaríngeas dolorosas, nódulos en la lengua, encías y compromiso laríngeo (figura 7). En un 50% de los casos hay hepatomegalia, y en un 3%, esplenomegalia. En ocasiones puede manifestarse como meningitis, endocarditis y enfermedad de Addison por afectación de la glándula suprarrenal. También es frecuente el compromiso pulmonar que se manifiesta con tos, expectoración mucopurulenta y disnea. El compromiso al sistema nervioso central (SNC) es raro, y puede formar parte de una infección diseminada o ser primaria. Se caracteriza por cefaleas, alteraciones psiquiátricas y déficit neurológicos o, en casos más graves, como meningitis (figura 8).



Figura 7. Lesiones orales presentes en un paciente con histoplasmosis crónica.

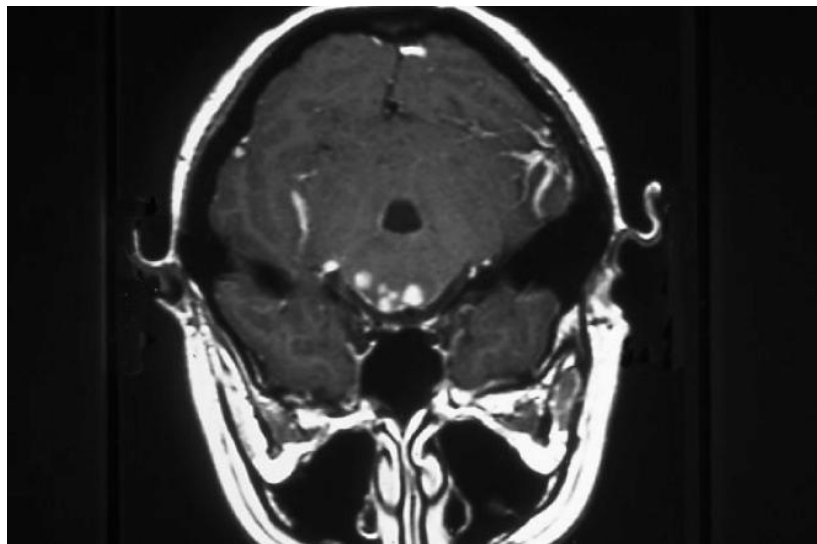


Figura 8. Tomografía axial computada donde se observan múltiples lesiones hiperintensas a nivel central y en las regiones temporo-parietales de un paciente con meningitis por histoplasmosis crónica.

1.6 Diagnóstico de laboratorio

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604



Aunque las manifestaciones clínicas de la histoplasmosis son bien descritas, no es suficiente la información clínica para llegar a un diagnóstico ya que presenta características comunes a otras enfermedades.

El diagnóstico definitivo diagnóstico definitivo de la histoplasmosis –independientemente de la forma clínica- se obtiene por el aislamiento del hongo en medios de cultivo específicos o por histopatología usando tinciones especiales para hongos. Sin embargo, estos procedimientos tienen una sensibilidad limitada y pueden requerir procedimientos médicos invasivos para obtener las muestras.

Toma de la muestra. Dependiendo del cuadro clínico la muestra puede ser: esputo, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, escarificación de las lesiones cutáneas, materiales de biopsias, punción esternal y aspirado de médula ósea o sangre para hemocultivos, entre otras. Con respecto a la toma de biopsias, ésta debe dividirse de dos porciones: se remite una en un frasco estéril con solución fisiológica o agua destilada estéril para cultivo, y la otra, en un frasco con formol al 10% para realizar la histopatología.

Examen al microscopio directo. Comprende la visualización en fresco (difícil en este hongo por su pequeño tamaño) y las tinciones. Es gram positivo y se tiñe con Wright, May-Grunwald-Giemsa y Giemsa; con estos colorantes la pared celular no se tiñe y aparece un halo claro, en el citoplasma se observa una forma de semiluna que se concentra en un polo y se colorea de azul oscuro-púrpura, y el resto toma un azul celeste. Las levaduras de 2 a 4 micras se encuentran dentro o fuera de los macrófagos (figura 2B).

La forma levaduriforme de *H. capsulatum* es muy similar a otros patógenos y estas características pueden llevar a errores durante su identificación. Deben realizarse diagnósticos diferenciales con *Candida glabrata*, *Talaromyces marneffeii*, *Leishmania* spp., *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis jirovecii*. Es importante estar familiarizado con la morfología de esta especie fúngica y sus características tintoriales para un correcto diagnóstico [22,23].

Cultivo. El diagnóstico definitivo está basado en el aislamiento y la identificación de *H. capsulatum* a partir de las muestras clínicas. Las muestras se siembran en medios de agar Sabouraud, Lactrimel, BHI, y se incuban a 28°C y 37°C tratando de reproducir las dos fases del hongo. Con respecto al hemocultivo, se utiliza la técnica de lisis-centrifugación. Para ello, la sangre se coloca en un tubo cónico con anticoagulante y saponina al 5%, se centrifuga y el sedimento se cultiva utilizando los medios descritos.

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604



Esta metodología en los pacientes con sida e histoplasmosis resulta la más efectiva en la recuperación de este microorganismo que los medios y técnicas convencionales para hemocultivos. Aproximadamente el 60% de los hemocultivos son positivos. Es importante señalar que los cultivos de la forma filamentososa o fase saprofitica de este hongo deben manejarse con las mismas consideraciones de seguridad que *Coccidioides* spp., pues contiene los elementos infectantes de este microorganismo.

Los cultivos se incuban durante cuatro a ocho semanas y requiere de laboratorios con nivel 3 de bioseguridad [22,23]. La identificación se realiza observando las características microscópicas y macroscópicas del cultivo de ambas formas del hongo (saprofitica y parasitaria) ya mencionadas.

Detección de anticuerpos. Las pruebas serológicas han tenido un rol importante en el diagnóstico de la histoplasmosis, pero su sensibilidad depende de la inmunidad del paciente y de la etapa y forma clínica de la enfermedad. Las técnicas estándar de detección de anticuerpos incluyen la fijación de complemento y la doble inmunodifusión en gel, aunque el inmunobloting y los enzaimunoensayos también pueden ser utilizados aunque no se encuentran validados [24-28]. El antígeno más ampliamente utilizado en dichos ensayos es la HMN, la cual se obtiene a partir del filtrado del sobrenadante de cultivo de la fase micelial del hongo y contiene, principalmente, los exoantígenos proteicos H y M y el antígeno polisacárido C (C-Ag). Sin embargo, las desventajas que tiene la realización de estas pruebas diagnósticas que utilizan HMN son múltiples.

Por un lado, los métodos actuales para la producción de dicho exoantígeno resultan problemáticos en términos de reproducibilidad, especificidad, estabilidad y estandarización [29]. Por otro lado, pueden producirse falsos positivos debido a reacciones cruzadas con antígenos similares en pacientes con blastomycosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis, aspergilosis, candidiasis, criptococosis y tuberculosis [30]. Por otro lado, los ensayos de inmunodifusión y fijación de complemento no resultan apropiados para la detección de anticuerpos en pacientes inmunosuprimidos debido a que su capacidad de montar una respuesta humoral se encuentra limitada y la sensibilidad de estas técnicas es baja.

Pruebas moleculares. Los métodos moleculares como la *nested*-PCR del gen *Hc100* constituyen alternativas para su diagnóstico, pero no han sido suficientemente validados, los costos son elevados y no hay disponibles equipos comerciales. Además, la sensibilidad para la identificación de la histoplasmosis progresiva diseminada es baja (10-69%) [31].

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



Detección de antígenos. La detección de antígenos no solo es útil para diagnosticar las formas graves de histoplasmosis sino también para monitorear la eficacia del tratamiento [32]. Otra ventaja adicional, es que pueden ser detectados más rápido que usando el cultivo del hongo, el cual –como se mencionó anteriormente- puede demorar 4-8 semanas, y requiere de laboratorios con nivel 3 de bioseguridad [22,23].

Cabe destacar que a nivel internacional existe la empresa Miravista, en Indianápolis, EE. UU., que si bien no comercializa ningún kit de diagnóstico para la histoplasmosis, acepta derivaciones de distintas partes del mundo para realizar ellos un ELISA *in house* tipo sándwich. El mismo lo desarrollaron a partir de anticuerpos policlonales de conejos obtenidos mediante la inmunización de dichos animales con levaduras muertas de cepas norteamericanas de *H. capsulatum* [33].

Con respecto al ELISA comercial actualmente utilizado en el diagnóstico directo, existe desarrollado solamente un sistema basado en la reactividad de un anticuerpo monoclonal frente al antígeno de pared galactomanano (empresa IMMY, Oklahoma, USA) que no se encuentra disponible comercialmente en la mayoría de los países del mundo, aunque en nuestro país comenzó a comercializarse en 2019 pero a un costo que lo hace inaccesible para la mayoría de los centros de salud. Además de que su costo comercial es elevado, solo se encuentra validado para el análisis de muestras de orina y presenta numerosas reacciones falsas positivas con otros hongos causantes de enfermedades similares a la histoplasmosis [34].

Este nuevo kit de ELISA desarrollado por la empresa IMMY con anticuerpos monoclonales anti-galactomanano, ha mejorado los valores de sensibilidad y especificidad respecto al ELISA anterior que utilizaba los anticuerpos policlonales obtenidos de suero de conejos inmunizados con *H. capsulatum*, similar a Miravista (62% y 79%, respectivamente vs 97% y 98%, respectivamente), y ha sido solo validado en Colombia y Guatemala [35]. De ahí, que uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación en Micología es desarrollar nuevos inmunoensayos de alta sensibilidad y especificidad y de bajo costo para el diagnóstico de la histoplasmosis destinada fundamentalmente a los pacientes con alto riesgo de desarrollar las formas clínicas más graves de la enfermedad como son los pacientes inmunosuprimidos (en donde el diagnóstico mediante la búsqueda de anticuerpos tiene baja sensibilidad y la búsqueda de antígenos constituye la metodología apropiada).

La falta de disponibilidad de kits para el diagnóstico de la histoplasmosis, e incluso el alto costo del único comercialmente disponible en pocos países (IMMY) es un impedimento para que los pacientes reciban un diagnóstico certero y precoz para poder acceder a la terapéutica de esta enfermedad que puede alcanzar una extensa



morbilidad, discapacidad y mortalidad (>80%) en las sociedades más vulnerables y marginadas. En Sudamérica, por ej., debido al desconocimiento y a la FALTA de medios diagnósticos, la histoplasmosis progresiva diseminada encabeza la lista de muertes relacionadas al sida; y los pacientes continúan muriendo por una enfermedad TRATABLE.

Debido a ello, consideramos que nuestro trabajo en el campo de la histoplasmosis tendrá impacto local, regional y global concreto con altas probabilidades de transferencia y aplicación en el corto-mediano plazo. Se espera con nuestros desarrollos a partir de la expresión de diferentes antígenos recombinantes como el de la presente tesis contribuir a la prevención y reducción eficaz de la carga sanitaria, social y económica de esta enfermedad.

1.7 Hcp100

La proteína fúngica de 100 kDa de *H. capsulatum* (Hcp100), un miembro de la familia de proteínas p100 [36], caracterizadas por la presencia de múltiples dominios *Staphylococcal nuclease like* (símil SNasa) dispuestos en tándem y un dominio tudor (figura 9). La Hcp100 es una proteína reguladora que juega un rol esencial en la adaptación y supervivencia del hongo en el interior del macrófago [37,38]. Es considerada una potencial candidata para el desarrollo de nuevos inmunoensayos específicos para el diagnóstico de la histoplasmosis [38] dado que su detección por PCR anidada no presenta reacciones cruzadas con secuencias de proteínas de otras especies fúngicas frecuentemente involucradas en infecciones sistémicas (*Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* y *Blastomyces dermatitidis*), en hongos causantes de micosis oportunistas (géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida* y *T. marneffe*) y de micobacterias (*Mycobacterium* spp.) [39,40].

En relación a la proteína Hc100 de *H. capsulatum*, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un clon de *Pichia pastoris* productor de la proteína Hc100 a escala de los mg con una pureza mayor al 90% [41]. Con dicha proteína recombinante nuestro grupo puso a punto un ELISA indirecto que se lo validó con muestras de sueros de individuos normales y de pacientes con histoplasmosis y otras infecciones, obteniéndose una sensibilidad y especificidad de aproximadamente el 80% y 85%, respectivamente, valores que se podrían mejorar mediante la expresión de un péptido recombinante específico derivado de la Hcp100 que esté solamente presente en *H. capsulatum* y no en otros hongos, tal como se observó para otros agentes de micosis relacionadas.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



Por otro lado, obtuvimos anticuerpos policlonales de ratón anti Hcp100, luego de inmunizar a estos animales con la proteína recombinante Hcp100 pura, los cuales se utilizaron para hacer *dot blot* y determinar las bondades de usar anticuerpos específicos para dicho antígeno en muestras de orina de pacientes con HD con resultados satisfactorios (figura 10) [41]. Dichos anticuerpos se utilizarán para desarrollar un ELISA sándwich de detección de antígeno junto con nanoanticuerpos VHH de camélidos, que serán seleccionados también usando el mismo péptido específico derivado de Hcp100, que se propuso obtener en el presente proyecto de tesina de licenciatura.

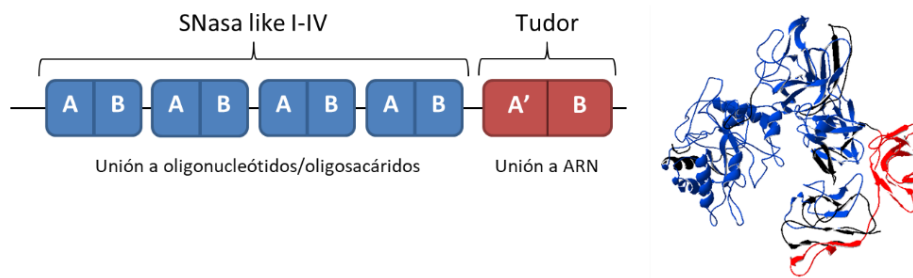


Figura 9. Estructura de la proteína Hcp100.

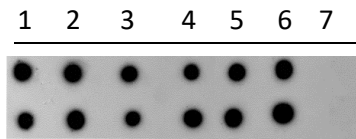


Figura 10. Detección de Hcp100 en orina de 6 pacientes con HD (1-6) en comparación con el control negativo (pool de 20 orinas de pacientes sanos (7)). Los resultados están por duplicado.

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La proteína Hcp100 posee regiones conservadas específicas para diferentes especies fúngicas patógenas para el ser humano, lo que permite obtener antígenos y anticuerpos específicos para el desarrollo de métodos de diagnóstico para las diferentes micosis. Basado en ello es que el presente proyecto examina la hipótesis de que la producción de un péptido recombinante de la proteína Hcp100 específico para *H. capsulatum* constituye una herramienta biotecnológica válida, eficaz y sustentable para el diseño y desarrollo de nuevos inmunoensayos para el diagnóstico de la histoplasmosis con alta sensibilidad y especificidad. Otra hipótesis del presente proyecto es que la bacteria *Escherichia coli* BL21 constituye una herramienta biotecnológica válida para la producción de dicho antígeno como proteína de fusión a MBP (*Maltose Binding Protein*) que se obtendrá con alto grado de pureza y rendimiento para ser utilizado en el

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

desarrollo de nuevos inmunoensayos para el diagnóstico de las distintas formas clínicas de histoplasmosis.

2.2 Objetivos generales

Producir un péptido recombinante a partir de la proteína Hcp100 de *H. capsulatum* para ser utilizado como herramienta para el desarrollo de nuevos inmunoensayos de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico temprano de la histoplasmosis, fundamentalmente en pacientes inmunosuprimidos susceptibles a desarrollar las formas diseminadas de la enfermedad. Se utilizará como plataforma de expresión la bacteria *E. coli* BL21 y como antígeno una región específica de Hcp100 de *H. capsulatum* que será seleccionada mediante análisis bioinformático.

2.3 Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar una región específica de Hcp100 de *H. capsulatum* mediante análisis bioinformático.
- Expresar el fragmento seleccionado de la Hcp100 en la bacteria *E. coli* BL21 como proteína de fusión a maltosa (fHcp100-MBP).
- Purificar el péptido recombinante obtenido fHcp100-MBP mediante cromatografía de afinidad con amilosa.
- Eliminar el dominio MBP del fragmento fHcp100-MBP utilizando una proteasa específica.
- Purificar el péptido obtenido fHcp100 mediante cromatografía de intercambio catiónico.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

3. MATERIALES Y MÉTODOS

NOTA: la composición cuali y cuantitativa de los medios de cultivo y soluciones empleados en los ensayos experimentales desarrollados durante el transcurso de la presente Tesina se encuentran en la sección “Anexo”.

3.1 Identificación y selección de una región específica de Hcp100

Para identificar un fragmento de Hcp100 específico de *H. capsulatum* se tuvo en cuenta la similitud de la secuencia proteica de Hcp100 con proteínas ortólogas. Para ello, se realizó un BLAST de la secuencia de Hcp100 (Código de acceso UniProt: O60040) contra la base de datos *UniprotKB Reference Proteomes* y *Swiss-Prot* utilizando un E-Threshold de 10. De las secuencias encontradas se seleccionaron ortólogos de las diferentes especies fúngicas frecuentemente involucradas en infecciones sistémicas (*P. brasiliensis*, *C. immitis*, *B. dermatitidis*), de hongos causantes de micosis oportunistas (géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*, y *T. marneffe*), de hongos que infectan insectos y plantas y de la ortóloga humana. Para evaluar la diversidad intraespecie se utilizaron las secuencias proteicas de Hcp100 de otros clados de *H. capsulatum*. Mediante la herramienta *tblastn* se obtuvieron las secuencias proteicas predichas a partir de los genomas de *H. capsulatum* disponibles en las bases de datos *RefSeq Genome Database* y *Whole-genome Shotgun Contigs* del NCBI. Además, se utilizaron las secuencias proteicas obtenidas en estudios de transcriptomas de diferentes clados de *H. capsulatum* [52].

El alineamiento múltiple de las secuencias proteicas se realizó utilizando la herramienta *Clustal Omega* [42] y se visualizaron en el programa *UGENE* [43]. Las matrices de identidad porcentual se obtuvieron mediante el programa *MEGA 11* [44] con *MatGat* utilizando de parámetros una matrix *BLOSUM50*, *First Gap 12*, *Extending gap 2*.

Además de la especificidad, para seleccionar la secuencia candidata se tuvo en cuenta la predicción de las estructuras secundaria y terciaria y la predicción de péptidos antigénicos derivados de Hcp100. Para la predecir la estructura secundaria de la Hcp100 se utilizaron las herramientas *PSIPRED v3.3*, *JPred* y *Pfam* [45,46] mientras que para predecir la estructura terciaria de la proteína se utilizó el servidor *I-TASSER* [47]. Para evaluar la antiginecidad se utilizó el paquete de herramientas ofrecidas en el *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas del *National Institute of Health* (NIAID, USA). Específicamente, para predecir epítopes lineales de células B se utilizó la herramienta *Antibody Epitope Prediction* con el método *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*. Para predecir epítopes discontinuos teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



proteína se utilizó la herramienta DiscoTope y ElliPro (predice epítopes basado en la protrusión de estructuras). Las regiones antigénicas putativas se seleccionaron utilizando el programa PROMALS3D (alineamiento de estructuras).

3.2 Construcción genética

El gen correspondiente al fragmento de Hcp100 junto con una etiqueta de afinidad por poliestireno [48] fue sintetizado utilizando el algoritmo *OptimunGene™* (GenScript, USA) para optimizar la frecuencia del uso de codones para su posterior expresión en la bacteria *E. coli*. Dicha secuencia se clonó entre los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* del vector de expresión en bacterias pMAL-c5E (New England BioLabs Inc.) (figura 11. A.), río abajo del gen *malE*, el cual codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), resultando en la expresión de la MBP fusionada al fragmento de Hcp100.

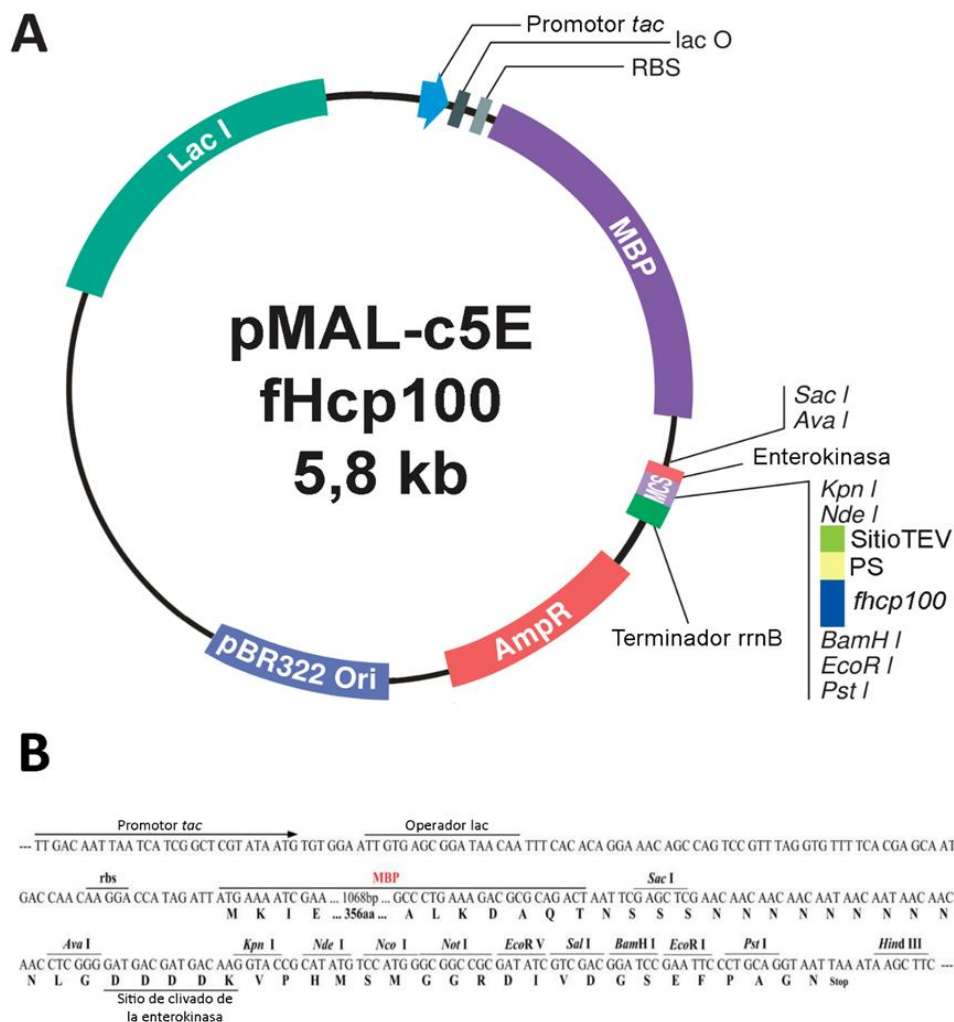


Figura 11. A. Esquema del vector pMAL-c5E_fHcp100. Puede identificarse el gen que codifica para el represor Lac (Lac I), el promotor del gen *tac*, el operador Lac (*lac O*), el sitio de unión del ribosoma (RBS), el gen que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), un sitio de clonado múltiple (MCS), flanqueado por un sitio de corte de la enteroquinasa y el terminador de la transcripción *rrnB*, la construcción genética del fragmento de Hcp100 (*fhcp100*), la etiqueta de afinidad a poliestireno (PS) y el sitio de corte

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604

para la proteasa TEV (TEV), un gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*) y un origen de replicación en bacterias (pBR322 Ori). B. Sitio múltiple de clonado del vector pMAL-c5E.

3.3 Transformación de bacterias *E. coli*

El plásmido pMAL-c5E que contiene a la secuencia nucleotídica del fragmento seleccionado de Hcp100 mediante análisis bioinformático (pMAL-c5E_frHcp100) se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. Posteriormente, una vez aislados los plásmidos, el pMAL-c5E_frHcp100 se lo utilizó para transformar la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3).

3.3.1 Preparación de bacterias quimiocompetentes

1. A partir de un cultivo líquido de *E. coli* DH5 α se inoculó 1 ml en 100 ml de medio Luria-Bertani (LB) sin antibiótico con baja concentración salina.
2. Se incubó a 37 °C con una velocidad de agitación de 250 rpm hasta obtener valores de DO600 comprendidos entre 0,250-0,300.
3. Se fraccionó el contenido en tubos Falcon de 50 ml y se incubó por 15 min en hielo.
4. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C.
5. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el *pellet* en 15-20 ml de solución de CaCl₂ 0,1 M fría.
6. Se incubó en hielo 30 min.
7. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C.
8. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el *pellet* en 3 ml de solución de CaCl₂ 0,1 M con glicerol 15% p/v.
9. Se fraccionó todo el contenido anterior en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles en alícuotas de 50 μ l. Se almacenaron a -20 °C durante 16 h y luego a -80 °C.

Transformación de bacterias:

1. Se adicionó 1 μ l del plásmido del plásmido pMAL-c5E_frHcp100 en 50 μ l de las bacterias *E. coli* quimiocompetentes obtenidas en el ítem anterior y se homogeneizó.
2. Se incubó durante 40 min en hielo.
3. Se procedió a realizar el shock térmico incubando 45 s a 42 °C y luego 5 min en hielo.
4. Se añadieron 900 μ l de medio SOC.
5. Se incubó 1 h a 37 °C en agitación constante.
6. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
7. Se descartaron 850 μ l de sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con los 50 μ l restantes de medio de cultivo.
8. Se sembraron las bacterias transformadas en placas conteniendo medio LB agarizado con ampicilina 100 μ g/ml, y se incubaron durante 16 h a 37 °C.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



3.3.2 Minipreparaciones de DNA (Minipreps) (Sambrook and Russel, D, 2001) [49]

Las minipreparaciones de DNA constituyen un método de extracción y purificación de plásmidos recombinantes a partir de un cultivo de bacterias transformadas.

Preparación de células:

1. Se inoculó una colonia simple de bacterias transformadas en 5 ml de medio LB de baja concentración salina con ampicilina 100 µg/ml, y se incubó con agitación vigorosa durante toda la noche a 37 °C.
2. Se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml del cultivo y se centrifugaron a máxima velocidad por 30 s a 4 °C.
3. Se descartó el sobrenadante y se dejó a secar el *pellet* bacteriano a temperatura ambiente.

Lisis celular:

4. Se resuspendió el *pellet* bacteriano obtenido en el ítem anterior en 100 µL de solución de lisis alcalina fría y se agitó vigorosamente con vórtex.
5. Se añadieron 200 µl de solución II de lisis alcalina preparada en el momento y se mezcló el contenido rápidamente por inversión varias veces.
6. Se incubó durante 5 min en hielo.
7. Se añadieron 150 µl de solución III de lisis alcalina y se mezcló el contenido por inversión varias veces.
8. Se incubó nuevamente durante 5 min en hielo.
9. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga.

Recuperación del DNA plasmídico:

10. Se precipitó el ácido nucleico por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4 °C.
11. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* obtenido a temperatura ambiente.
12. Se resuspendió el *pellet* con 1 ml de etanol al 70% se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min a 4 °C.
13. Se removió al sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente.
14. Se resuspendió el *pellet* en 50 µl de *buffer* Tris-EDTA pH 8,0 con 20 µg/mL de RNAsa A libre de DNAsa (RNAsa pancreática) y se almacenó a -20 °C.
15. Se cuantificó el DNA plasmídico obtenido mediante el espectrofotómetro de microvolúmenes UV-Visible NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



3.4 Transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3)

3.4.1 Transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) por el método químico

Se procedió de acuerdo a lo descrito anteriormente con las bacterias *E. coli* DH5 α .

3.5 Expresión de frHcp100-MBP en *E. coli*

3.5.1 Evaluación de la expresión de frHcp100

1. Se inoculó una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) del clon de interés en 3 ml de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C con agitación vigorosa durante 16 h. Como control negativo se utilizó un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar.
2. A partir del precultivo obtenido en 1) se largó un cultivo de 3 ml de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial = 0,15 y se incubó a 37°C con agitación vigorosa.
3. Cuando el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ = 0,400-0,800 se agregó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 0,5 mM. El IPTG es un análogo de la lactosa, utilizado para inducir la expresión génica en *E. coli*, al eliminar un represor del operón *lac*.
4. Se incubó a 37 °C con agitación vigorosa durante 4 h. Como control negativo de inducción se utilizó un cultivo del clon de interés sin inducir.
5. Para evaluar la expresión de la frHcp100 se tomó una alícuota de 35 μl cultivo, se centrifugó al máximo por 1 minuto, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el *pellet* en 15 μl de *buffer* de carga (compuesto de una solución de DTT 0,1M, tris HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10% p/v, azul de bromofenol y glicerol).
6. Luego de calentar a 95 °C durante 5 min, las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) junto con un marcador de peso molecular preteñido (ProteinRuler® II, Transgenbiotech). Se procedió al fraccionamiento electroforético en *buffer* de corrida a 100 V durante 90 min y se tiñó con Coomassie-blue R-250.

3.5.2 Análisis de la solubilidad de frHcp100-MBP

1. Siguiendo el protocolo descrito en el ítem anterior se indujeron cultivos de 40 ml de los clones productores a dos temperaturas, 28°C y 37°C, durante 16 o 4 horas, respectivamente.
2. Finalizada la inducción, se centrifugaron los cultivos a 10 000 x g por 10 min.
3. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 20 Mm, pH=8,0 frío.
4. Se agregaron 4 μl de cocktail de inhibidores de proteasas 1000 X (Sigma).
5. Se procedió a la lisis celular mediante sonicación (tip de 3,2 mm, potencia 14) durante 10 min con pulsos de 10 s seguido de 20 s de descanso en hielo.

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604



6. El lisado se centrifugó 10 min a 10 000 x g a 4-10°C en una centrifuga Sorvall con un rotor SS-34.
7. Se separó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble y el *pellet* correspondiente a la fracción insoluble se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 20 mM.
8. De ambas fracciones se tomó una muestra de 5 µl, se le adicionó 4 µl de *buffer* de carga 4X, 1,6 µl de DTT 1M y 4,4 µl de agua destilada, se calentó 5 min a 95°C y se analizó mediante electroforesis en SDS-PAGE 12% coloreado con Coomassie-blue R-250.

3.5.3 Purificación de frHcp100-MBP por cromatografía de afinidad con amilosa

La proteína de fusión frHcp100-MBP se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa. Para ello:

1. Se equilibraron 35 ml (1 V) de resina con 5 V de *buffer* columna (Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 150 mM), y se pasó la fracción soluble del cultivo inducido.
2. La columna se lavó con *buffer* columna hasta que se dejó de detectar proteínas en el *flow-through* (aproximadamente 12 V).
3. Se realizó la elución con 50 ml de *buffer* columna conteniendo maltosa 20 mM.
4. Se lavó la resina con 100 ml de *buffer* columna.
5. Se pasó por la columna el *flow-through* de la fracción soluble y se repitió el lavado y la elución.
6. La resina se regeneró con 3 V de agua, 3 V de SDS 0,1%, 3 V de SDS 1% y 3 V de etanol 20%.
7. Se tomaron muestras de todas las fracciones de la purificación y se analizaron mediante fraccionamiento electroforético en SDS-PAGE al 12% coloreado con Coomassie-blue R-250.

3.5.4 Digestión de frHcp100-MBP con la proteasa TEV

Se realizó la digestión proteica sobre la proteína frHcp100-MBP purificada, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. La proteína frHcp100-MBP se dializó durante la noche a 4°C frente a Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM y SDS al 0,1%.
2. Se añadió la proteasa TEV recombinante (27 kDa) y se incubó durante 16 h a 20°C.

Como control de la reacción de digestión, se analizó una fracción sin digerir con la proteasa TEV.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



La eficiencia del corte se analizó mediante fraccionamiento electroforético en SDS-PAGE 12% coloreado con Coomassie-blue R-250.

3.5.5 Purificación de frHcp100 por cromatografía de intercambio catiónico

La purificación de frHcp100 se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando la columna catiónica MiniChrom Fractogel COO(M) de 1 ml (Merck). Para ello:

1. La columna se lavó con 10 ml de agua desionizada y se equilibró con 10 ml de *Buffer A* (Tris-HCl 20 mM pH 7,5).
2. Luego de equilibrar la columna, se añadió MBP-fHcp100 digerida con la proteasa TEV.
3. Se lavó con 10 ml de *Buffer A* y con 5 ml de *Buffer A* adicionado con NaCl 50mM.
4. Se procedió a eluir con 3 ml de *Buffer A* adicionado con NaCl 1 M.
5. La columna se lavó con 10 ml de *Buffer A* adicionado con NaCl 2M y con 10 ml de agua destilada y se guardó en etanol 20%.
6. Las muestras de las distintas fracciones de la purificación se analizaron por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con una columna de fase reversa C18.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

4. RESULTADOS

4.1 Expresión y purificación de un péptido derivado de Hcp100

4.1.1 Identificación y selección de una región específica de Hcp100

Para identificar las regiones de Hcp100 específicas de *H. capsulatum* se obtuvieron de diferentes bases de datos las secuencias aminoacídicas de proteínas homólogas presentes en diferentes especies fúngicas frecuentemente involucradas en infecciones sistémicas (*P. brasiliensis*, *C. immitis*, *B. dermatitidis*), en hongos causantes de micosis oportunistas (*A. fumigatus*, *C. neoformans*, y *T. marneffe*) y en otros hongos causantes de enfermedades en humanos. Además, se obtuvo la secuencia homóloga de Hcp100 en humanos.

Tabla 1. Comparación de las proteínas homólogas a Hcp100.

Código de acceso	Especie	Nombre	Longitud (residuos)	Identidad (%)	Similitud (%)
O60040	<i>Histoplasma capsulatum</i>	p100	840	100	100
A0A2B7ZSJ2	<i>Emmonsia crescens</i>	Proteína no caracterizada	883	89,4	96,7
C5GHK6	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Factor de transcripción	883	88,6	96,3
A0A1J9PSF7	<i>Emergomyces pasteurianus</i>	Proteína no caracterizada	883	87,8	96,4
C1GJI0	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Proteína no caracterizada	848	77,7	89,7
A0A178F4Y8	<i>Trichophyton rubrum</i>	Factor de transcripción	883	71,9	90,3
V5FDN4	<i>Paecilomyces variotii</i>	Snd1/p100	885	71,5	90,8
E9DBP2	<i>Coccidioides posadasii</i>	Factor de transcripción	880	70,9	91,1

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

A0A0F4Z0E6	<i>Rasamsonia emersonii</i>	Snd1/p100	887	70,1	91,3
Q4WUQ0	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Snd1/p100	980	67,1	89,1
H6BXN7	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Proteína no caracterizada	880	66,4	89,3
B6QEB4	<i>Penicillium marneffeii</i>	Snd1/p100	882	65,6	89,0
A0A1C1D2N1	<i>Cladophialophora carrionii</i>	Proteína no caracterizada	880	64,9	89,4
Q5KMA4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Factor de transcripción	880	62,1	86,6
A0A0C2IX88	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Proteína no caracterizada	884	54,9	80,3
Q7KZF4	<i>Homo sapiens</i>	Snd1	910	36,8	65,4

También se analizaron las secuencias Hcp100 de distintas cepas (G217B, G186AR, H88, H143, Tmu) y clados de *H. capsulatum* (NAm1, NAm2, Panamá, África), teniendo en cuenta los genomas y transcriptomas [50] disponibles (Tabla 2), para asegurarnos que la región de Hcp100 específica de *H. capsulatum* que se seleccionara, esté presente en todas las cepas y clados de dicha especie fúngica.

Tabla 2. Matriz de identidad porcentual de las secuencias aminoacídicas de Hcp100 de las distintas cepas de *H. capsulatum* analizadas con el programa MEGA 11.

	G186A R	G186AR_ tr	H88	H143	WU24	G217B	G217B_ tr	Tmu
G186AR	100,0							
G186AR_ tr	100,0	100,0						

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



H88	99,0	99,0	100,0					
H143	98,6	98,6	99,4	100,0				
WU24	98,4	98,4	98,3	98,0	100,0			
G217B	92,7	92,7	93,0	92,7	92,5	100,0		
G217B_tr	99,0	99,0	98,9	98,5	98,6	92,2	100,0	
Tmu	93,8	93,8	93,8	93,5	93,3	95,7	93,7	100,0

Una vez realizado el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Hcp100 de distintas especies fúngicas y distintas cepas/clados de *H. capsulatum* con el algoritmo Clustal Omega (UGENE) se observó que las zonas correspondientes a los dominios SNasa-símil y al dominio SNasa-tudor tenían alta conservación entre todas las especies. Por el contrario, la región entre ambos dominios mostraba una mayor variabilidad interespecie a la vez que se mantenían conservadas en los distintos clados/especies filogenéticas de *H. capsulatum*. Debido a ello es que dicha región fue seleccionada como candidata para la expresión de un péptido específico de *H. capsulatum* (figura 12).

Posteriormente, al utilizar la herramienta de predicción de epitopes B del IEDB en la secuencia aminoacídica de Hcp100 se evidenció que el péptido seleccionado contiene al menos un epítipo lineal (figura 13). Asimismo, de acuerdo al análisis cuantitativo del grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad de los aminoácidos del péptido, (ProteScale, Hphob. / Kyte & Doolittle), se mostró que el mismo posee alta hidrofiliidad, lo cual sugiere que ese péptido antigénico podría ser a su vez potencialmente reconocido por anticuerpos específicos. encuentra en una zona de (figura 14).



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

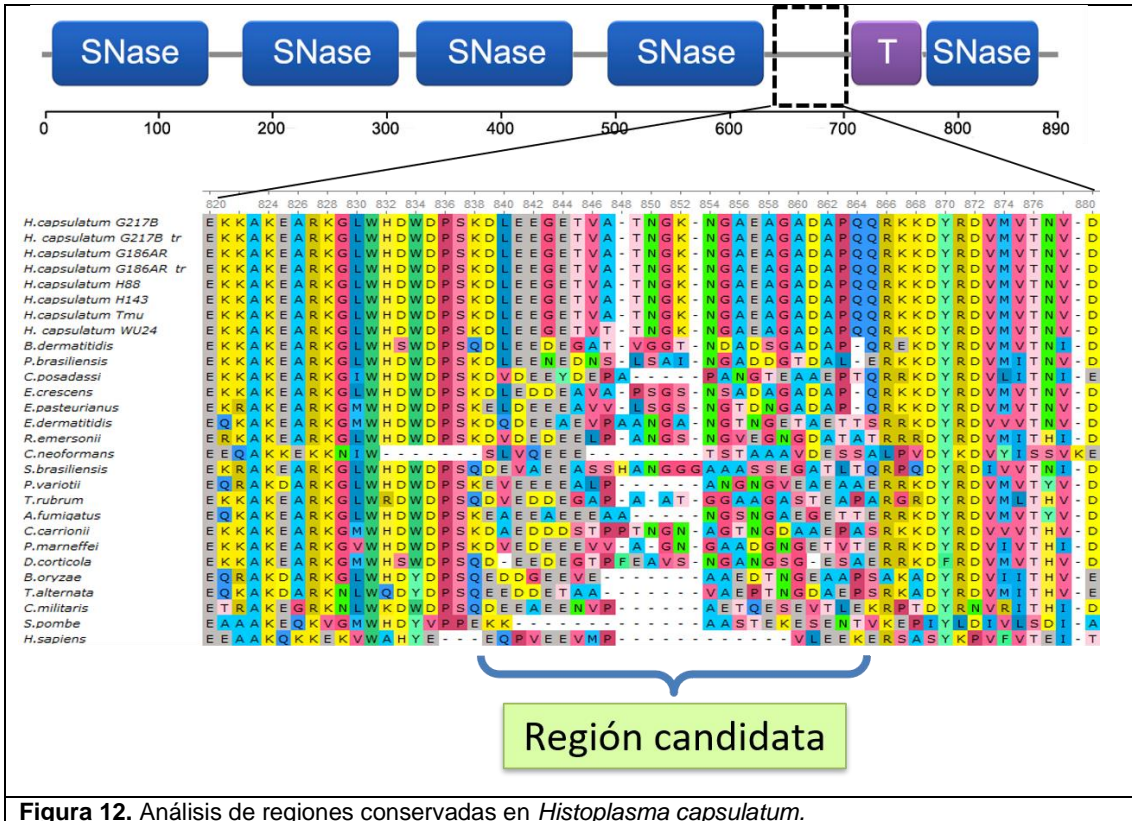


Figura 12. Análisis de regiones conservadas en *Histoplasma capsulatum*.

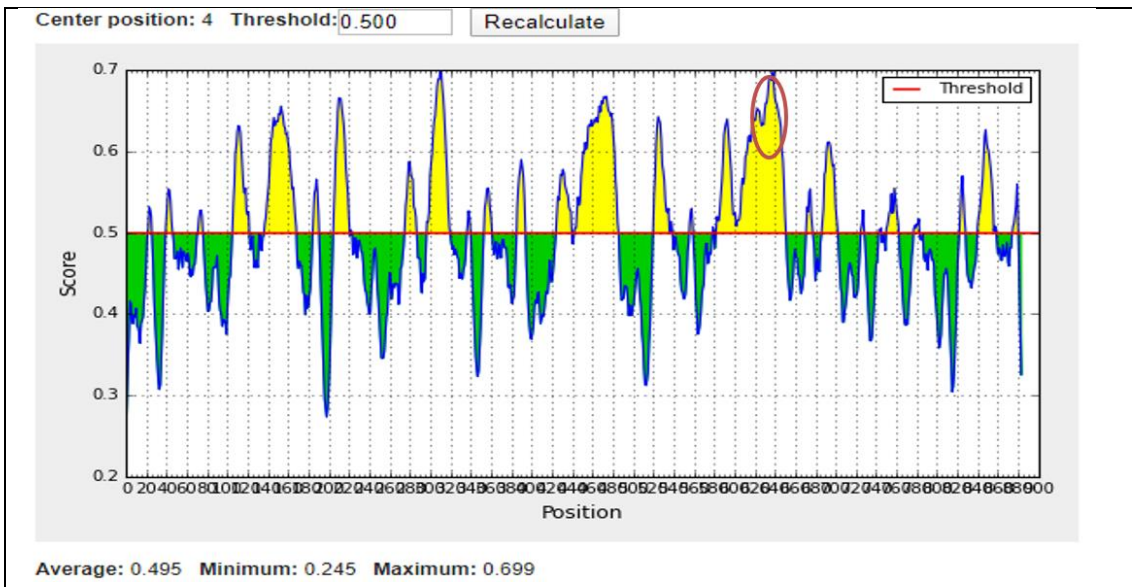


Figura 13. Predicción de epítopos B lineales de Hcp100 utilizando las herramientas del (IEDB - BepiPred Linear Epitope Prediction) DE Hcp100.

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604

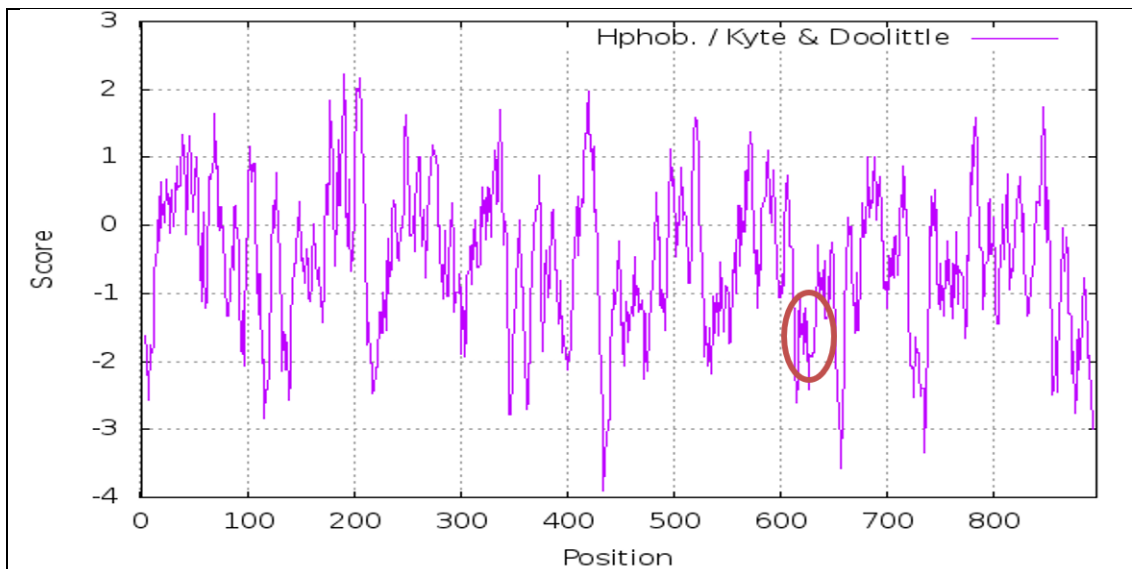


Figura 14. Perfil de hidrofiliadad de Hcp100 obtenido mediante la aplicación del método Kyte & Doolittle. El círculo rojo muestra la región candidata para expresar como péptido de fusión a MBP. En el perfil de hidrofiliadad se graficó la hidrofiliadad en función de la posición aminoacídica.

4.1.2. Construcción genética del péptido de Hcp100

El gen correspondiente al péptido de Hcp100 (frHcp100) de *H. capsulatum* clado NAm2 (UniprotKB ID: O60040) optimizado para la expresión en *E. coli* fue sintetizado por la empresa GenScript utilizando el algoritmo *OptimunGene™* (GenScript). En el extremo 5' de la secuencia se agregó una secuencia que codifica para un péptido de unión a poliestireno (PS-tag) [41] seguido de un *linker* de 4 glicinas. Para su posterior clonado en dicho vector se agregaron los sitios de corte *NdeI* y *BamHI* en sus extremos 5' y 3', respectivamente. En la Figura 15 se muestran las secuencias aminoacídica y nucleotídica de la construcción sintetizada. En la figura 16, se muestra el resultado de la digestión enzimática obtenida con la endonucleasa de restricción *BamHI* de 3 clones positivos. El tamaño del plásmido digerido, que posee una conformación lineal, es de 5,8 kb y la del plásmido sin digerir (conformación superenrollada) es inferior, tal como es de esperar por su conformación.

Una vez obtenida la construcción pMAL_c5e_frHcp100, la misma se utilizó para transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes. Luego de obtener los clones transformantes, los plásmidos se purificaron mediante minipreparaciones y se utilizaron para transformar la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3).

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

>PS-Hcp100_pep (aa)
HMENLYFQSRAFIASRRIRRPGGGGGETVATNGK*

>PS-Hcp100_pep (nt)
CATATG GAGAACCTGTACTTCCAGAGCCGTGCGTTTATCGCGAGCCGTCGTATTTCGTCGTCGCGGGTGGCGGTGGCGGTGAAAC
CGTGGCGACCAACGGCAAGTAA GGATCC

Figura 15. Secuencia aminoacídica (superior) del péptido Hcp100 fusionada al PS-tag mediante un *linker* de 4 glicinas a partir de la cual se obtuvo la secuencia nucleotídica (inferior) optimizada para su expresión en *E. coli*. En azul se muestra el sitio de corte *NdeI* y en rojo el sitio de corte *BamHI*.

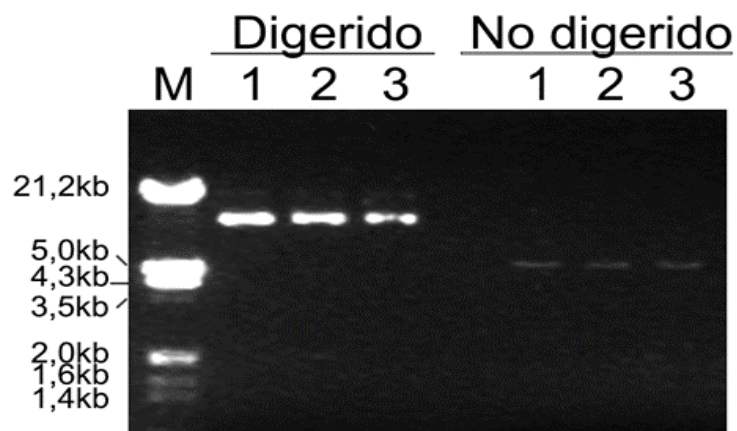


Figura 16. Digestión del plásmido pMAL-c5e_PS-Hcp100_pep con la enzima de restricción *BamHI* obtenido a partir de 3 clones de *E. coli* DH5alfa transformadas con el plásmido. M: marcador de tamaño molecular de 1 kb.

4.2 Cultivo y expresión del péptido de Hcp100 fusionado a MBP en *E. coli*

4.2.1 Evaluación de la expresión de los distintos clones

Se realizó una inducción en medio LB de los tres clones para corroborar su expresión en distintas condiciones. Las fracciones totales de estos cultivos de pMAL_pepHcp100 fueron recolectadas luego de 4 o 16 h de inducción y analizadas por electroforesis en SDS-PAGE 12%. En la figura 17, se observan las distintas fracciones proteicas obtenidas en los distintos clones de *E. coli* BL21 tras inducir la expresión del péptido luego de ser sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con *Coomassie blue* R-250. Es de destacar la presencia de una banda intensa de 46 kDa en los clones de *E. coli* BL21 a las 4 h como a las 16 h post-inducción, el cual coincide con el peso esperado para el péptido de Hcp100 fusionado a MBP.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

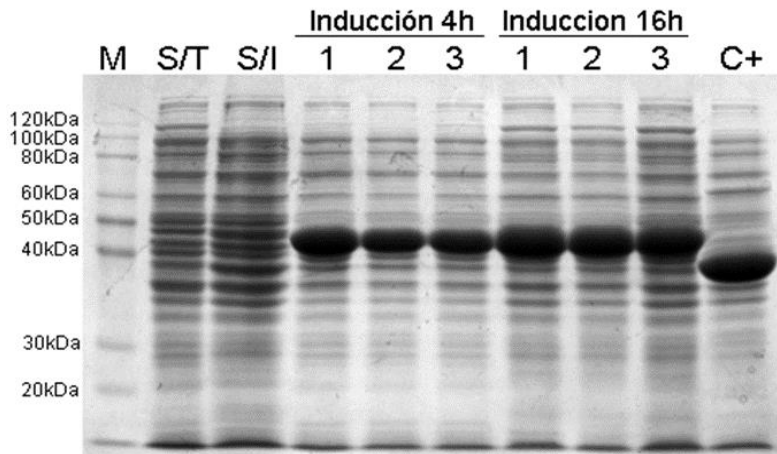


Figura 17. Gel de SDS-PAGE al 12% con tinción con *Coomassie Blue* R-250 donde se muestra la expresión de MBP-pepHcp100 en *E. coli* BL21. M: marcador de peso molecular; S/T: *E. coli* BL21 sin transformar (salvaje); S/I: *E. coli* BL21 MBP-pepHcp100 clon 1 sin inducir; 1-3: clones 1-3 de *E. coli* BL21 MBP-pepHcp100; C+: Control positivo de inducción, BL21-pMAL-c5e.

4.2.2 Evaluación de la solubilidad

Posteriormente, se procedió a estudiar si el péptido de interés se encuentra presente en la fracción soluble o insoluble del lisado celular, mediante un ensayo de evaluación de la solubilidad de los clones recombinantes en dos condiciones distintas: 4 horas a 37°C y 16 horas a 28°C. En la figura 18, se observan las distintas fracciones proteicas obtenidas en las distintas condiciones de inducción (4 h a 37 °C vs 16 h a 28 °C) tras ser sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con *Coomassie blue* R-250. Es de destacar la presencia nuevamente de una banda intensa de 46 kDa en todas las fracciones analizadas (fracción total o FT, fracción soluble o FS y fracción insoluble o FI), la cual se corresponde con el peso esperado del péptido de Hcp100 fusionado a MBP. El hecho de que el péptido se encuentre en altas cantidades en la fracción FS es una ventaja para el proceso posterior de purificación del mismo en altos rendimientos.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

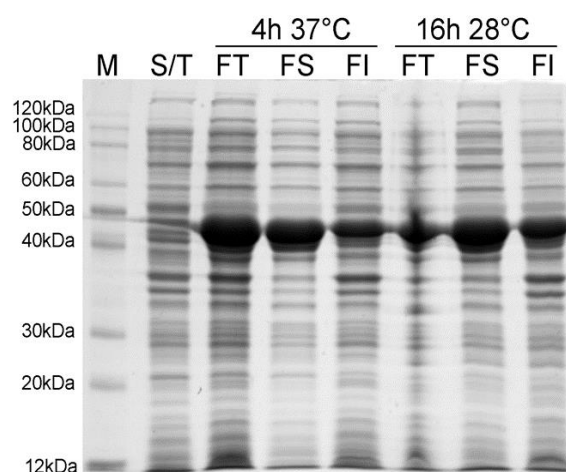


Figura 18. Análisis de la expresión de MBP-pepHcp100 en *E. coli* BL21 en dos condiciones de inducción. A partir de cultivos inducidos 4 h a 37°C y 16 h a 28°C se obtuvieron las fracciones totales (FT), solubles (FS) e insolubles (FI) de ambos cultivos y se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% seguido de tinción con *Coomassie-blue* R-250. M: marcador de peso molecular; S/T: *E. coli* BL21 sin transformar (salvaje).

4.3. Purificación del péptido de Hcp100 fusionado a MBP

4.3.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad con amilosa

Tras el proceso de purificación del péptido de Hcp100 fusionado a MBP se pudo determinar que se obtuvieron 402 mg de péptido recombinante por litro de cultivo con una pureza mayor al 98%. En la figura 19, se observan las distintas fracciones proteicas obtenidas en las distintas etapas del proceso de purificación tras ser sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con *Coomassie blue*-R250. Es de destacar la presencia de una banda intensa de 46 kDa, la cual corresponde al péptido de interés de Hcp100 fusionado a MBP en todos los eluatos, lo cual muestra que su pérdida fue mínima durante los lavados y los pasos de *flow-through*.

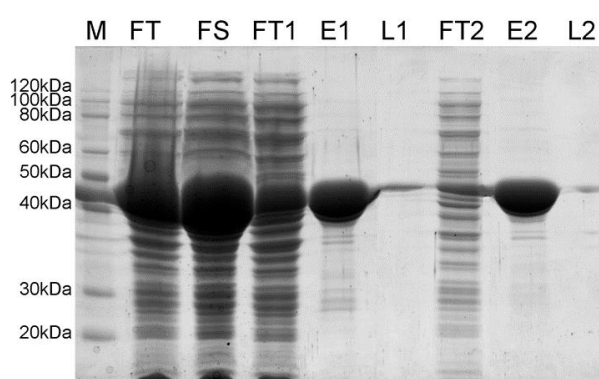


Figura 19. Fracciones del proceso de purificación de MBP-pepHcp100 por cromatografía de afinidad por amilosa corridas en un SDS-PAGE al 12% seguido de tinción con *Coomassie-blue* R-250. M: marcador de peso molecular; FT: fracción total; FS: fracción soluble; FT1: *flow-through* 1; E1: eluato 1; L1: lavado 1; FT2: *flow-through* 2; E2: eluato 2; L2: lavado 2.

4.3.1. Separación del péptido de Hcp100 de la MBP

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604

Mediante el clivaje con la proteasa TEV se procedió a separar MBP del péptido de interés para que no interfiriera en el desarrollo de los inmunoensayos posteriores [51].

Para ello, luego de dialisar para desalar el eluato obtenido de la purificación del péptido de Hcp100 fusionado a MBP mediante cromatografía de afinidad por amilosa, se procedió a clivar MBP del péptido con la proteasa TEV, en distintas condiciones, variando la proporción de TEV:MBP-péptido (1:20, 1:100 y 1:200) y la cantidad de MBP-péptido (0,2; 0,5 y 1 μ g), a pequeña escala con la intención de obtener la condición de corte óptima.

Tras incubar las muestras a 37°C durante 16 h se analizaron posteriormente por SDS-PAGE al 8% seguido de tinción con *Coomasie-blue* R-250. Como se observa en la figura 20, se logró separar MBP del péptido de Hcp100 con la proteasa TEV, y la condición óptima en la que se obtuvo un alto porcentaje de corte resultó ser aquella en la cual se utilizaron 0,2 μ g de proteína en la mezcla de reacción y en la relación 1:20 TEV:MBP-pepHcp100.

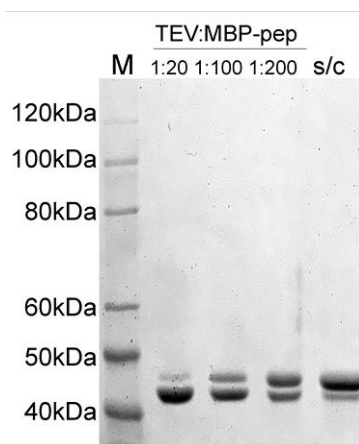


Figura 20. Clivaje de MBP-pepHcp100 con la proteasa TEV. Distintas relaciones de TEV:MBP-pepHcp100 (1:20; 1:100; 1:200) fueron incubadas a 37°C durante 16 h y luego 0,2 μ g de proteína de la mezcla de reacción (0,2; 0,5 y 1 μ g) fueron analizadas por SDS-PAGE al 8% seguido de tinción con *Coomasie-blue* R-250. M: marcador de peso molecular; s/c: MBP-Hcp100 sin cortar.

4.3.2. Purificación del péptido de Hcp100 mediante cromatografía de afinidad tras el clivaje con la proteasa TEV

El péptido fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico, y las fracciones obtenidas fueron evaluadas posteriormente mediante HPLC con una columna de C-18.

Como se observa en la figura 21, en el análisis del *flow through* total se detectó un pico a los 22 minutos, correspondiente a la MBP. También se detectó otro pico a los 4 minutos de elución, el cual correspondería al péptido de Hcp100. Este último pico puede observarse a su vez en el análisis realizado en la fracción del eluato.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

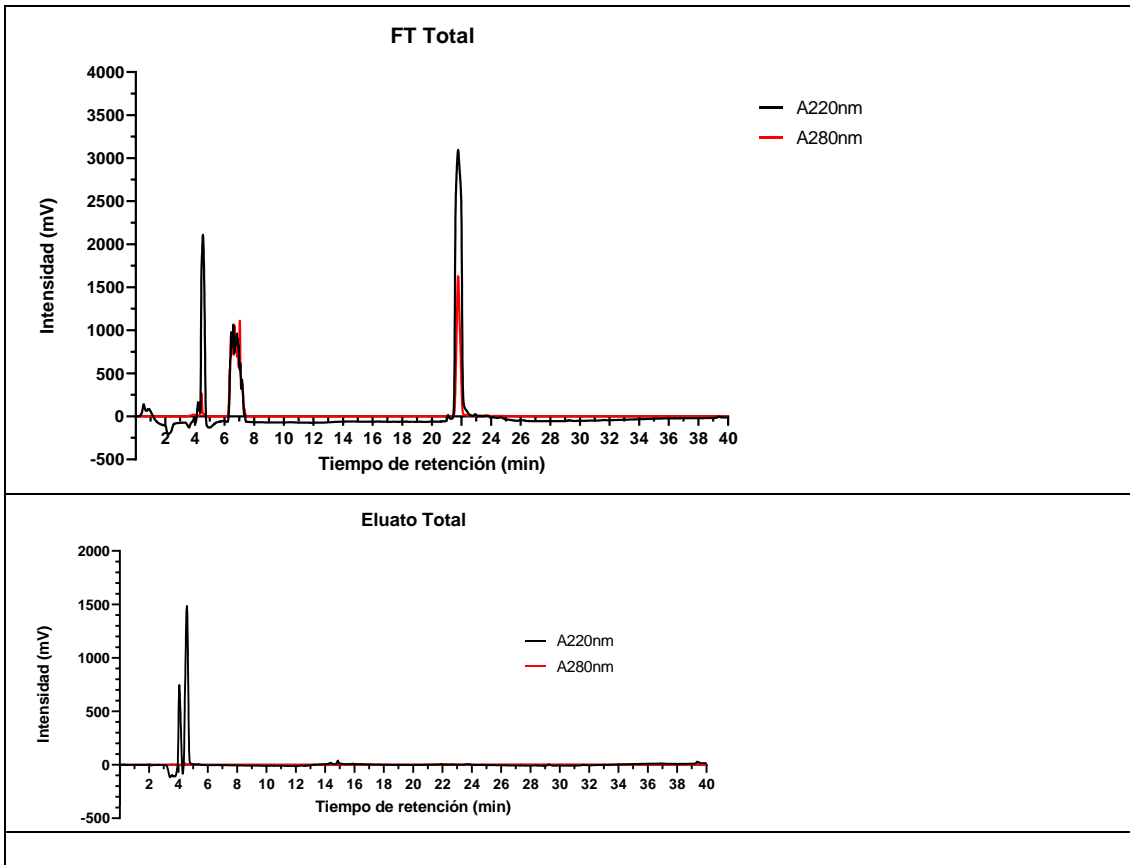


Figura 21. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) tras la purificación de Hcp100 tras el clivaje con TEV para separarla de MBP

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

5. DISCUSIÓN

El notable incremento en la incidencia de las infecciones fúngicas, como consecuencia de la aparición de la pandemia del sida y el aumento de la frecuencia de otras causas de inmunosupresión grave, ha generado un gran interés por el diagnóstico de las micosis, tanto superficiales, como invasoras y diseminadas.

Más de 300 millones de personas padecen enfermedades fúngicas graves en todo el mundo, de las cuales más de 1,6 millones mueren anualmente debido a ellas, cifra significativamente superior al del número de muertes por malaria (405.000 muertes/año), al del número de muertes por HIV/sida (1,1 millones de muertes/año) y similar al número de muertes por tuberculosis (1,3 millones de muertes/año), según la OMS [53]. Los individuos inmunosuprimidos, entre los cuales se incluyen los HIV/sida, oncohematológicos, trasplantados, y pacientes graves internados en la unidad de cuidados intensivos por COVID-19 o influenza, entre otros, son los que padecen los mayores riesgos de padecer estas enfermedades fúngicas graves, entre ellas la histoplasmosis.

Una de las principales causas asociadas a esta triste realidad es la falta de medios de diagnóstico y principalmente la falta de medios de financiación para combatir a estas enfermedades fúngicas emergentes y ampliamente olvidadas que deberían comenzar a ser prioritarias. En efecto, la OMS no tiene programas financiados específicamente para enfermedades fúngicas, menos de 10 países tienen programas nacionales de vigilancia de infecciones fúngicas, y menos de 20 tienen laboratorios de diagnóstico de referencia de hongos. Muchas de las pruebas de diagnóstico que existen (que son escasas) no están disponibles en la mayoría de los países en desarrollo. A raíz de esta situación se ha hecho indispensable extender las posibilidades del diagnóstico micológico a la mayor parte de los centros asistenciales, descentralizando así esta actividad otrora restringida a unos pocos lugares.

Debido a ello, es que con nuestro grupo de investigación del LiDeMi (Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Micología) nos dedicamos a producir antígenos recombinantes y anticuerpos mono y policlonales para el desarrollo de equipos comerciales de diagnóstico que permitan detectar distintas enfermedades fúngicas graves, comenzando con la histoplasmosis, que es una enfermedad desatendida en nuestro país y en la región.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



Una de las medidas sugeridas para afrontar este tipo de enfermedades desatendidas es mediante la disponibilidad de equipos comerciales de diagnóstico que sean eficaces, asequibles y fáciles de usar. Sin embargo, estos son insuficientes y, en otros casos, casi ausentes o económicamente muy costosos como sucede con la histoplasmosis, en donde existe a nivel mundial solamente un método desarrollado para el diagnóstico directo en orina (IMMY formato ELISA; Oklahoma, USA y MIRAVISTA formato *lateral flow assay*, LFA, IN, USA) que no se encuentra disponible comercialmente en la mayoría de los países del mundo, y en nuestro país muy pocos hospitales lo tienen debido a su elevado costo (sólo se comercializa el IMMY, cuyo costo es de aproximadamente U\$D 1.100 cada placa de 96 pocillos). Además, este sistema de detección no permite diferenciar entre distintas especies fúngicas ya que se basa en la reactividad frente a un componente polisacárido universal presente en la pared fúngica de la mayoría de los hongos, y solo se encuentra validado para muestras de orina, lo que limita también su uso para la detección de formas clínicas fundamentalmente diseminadas de la histoplasmosis.

Pese a que la ciencia y la tecnología han avanzado lo suficiente como para proporcionar métodos diagnósticos para numerosas enfermedades, son muy pocos los disponibles para diagnosticar la histoplasmosis. Para lograr revertir esta situación, nuestro grupo de investigación multi e interdisciplinario ha comenzado a transitar desde hace más de 10 años un camino de transferencia tecnológica para la producción local de antígenos recombinantes y de nanoanticuerpos VHH para el desarrollo de nuevos inmunoensayos eficaces y de bajo costo para la detección de uno de los agentes infecciosos asociados a enfermedades graves, endémicas, desatendidas y que afecta a contextos sociales vulnerables de nuestro país: *H. capsulatum*. Con ello se espera cubrir una demanda sanitaria urgente

En la presente Tesina se describe la obtención de un candidato antigénico para el desarrollo de nuevos inmunoensayos más sensibles y específicos para el diagnóstico de la histoplasmosis. Por un lado, se utilizará dicho candidato antigénico para poner a punto un ELISA indirecto que detecte la presencia de anticuerpos específicos en el suero de pacientes con distintas formas clínicas de la enfermedad. Por otro lado, se utilizará para la selección de nanoanticuerpos VHHs que se produjeron en nuestro laboratorio en colaboración con el INCUINTA, para el desarrollo de un ELISA directo que permita detectar antígeno de *H. capsulatum* a partir distintas muestras clínicas de pacientes, sobre todo de aquellos que cursan con las formas clínicas diseminadas de la enfermedad.

Dicho candidato antigénico fue seleccionado a partir de realizar un análisis bioinformático, de la secuencia de la proteína Hcp100 de *H. capsulatum*, con la cual
Videla Garrido, Agustín.



hemos tenido previamente resultados prometedores para su uso como reactivo de diagnóstico de la histoplasmosis [40]. Los análisis bioinformáticos llevados a cabo en la presente tesina, demostraron que las zonas correspondientes a los dominios SN-Tudor estaban altamente conservadas entre todas las especies y que la que conecta el dominio SN4 y el SN5-tudor es la que presenta mayor conservación dentro de *H. capsulatum* y la mayor diferencia con las otras especies (figura 12). Para saber si esa región candidata reunía las mínimas condiciones para ser consideradas un potencial candidato antigénico [53], se analizó la presencia de epítopes y su hidrofiliidad, demostrando que esa pequeña región contenía al menos un epítipo lineal y que podía potencialmente ser reconocido por anticuerpos.

De esta manera se decidió expresar dicho péptido como proteína de fusión a MBP en *E. coli* BL21, dadas las ventajas que tiene dicho sistema de expresión procariota tanto a nivel de investigación básica como en la producción industrial (la existencia de numerosos vectores, cepas y sistemas de expresión comerciales; su elevada tasa de crecimiento logrando cultivos a muy altas densidades celulares; su fácil manipulación genética; su elevado rendimiento en la expresión de proteínas heterólogas y a bajos costos, dado que se utilizan con este fin medios de cultivo económicos y libres de suero; su capacidad de ser escalable a biorreactores de 1000 L o más; su clasificación como un organismo de nivel de bioseguridad 1 o GRAS). Mediante su fusión a MBP se busca que dicho péptido recombinante se obtenga en forma soluble facilitando su proceso de purificación, el cual a su vez se realiza por un método simple como es el de cromatografía de afinidad por amilosa. Por otro lado, dado el pequeño tamaño del péptido seleccionado, al expresarlo fusionado a MBP se logra protegerlo de la degradación por parte de las proteasas celulares. Es de destacar que el péptido recombinante obtenido contiene una etiqueta de afinidad por poliestireno, para lograr un “*coating*” eficiente en las placas de poliestireno usadas en los ensayos de ELISA.

En la presente Tesina se logró expresar en *E. coli* BL21 el péptido de Hcp100 fusionado a MBP en forma soluble y en la escala de los mg/l con alta pureza (> 98%). Asimismo, se logró purificar al péptido de Hcp100 luego del clivaje con la proteasa TEV, y la fracción del HPLC que contiene ese eluato se ha enviado a secuenciar para corroborar su identidad. La identificación del péptido recombinante obtenido puro se lleva a cabo actualmente mediante cromatografía líquida y análisis por espectrometría de masa (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa, IQUIBICEN, CONICET-UBA.

Como se mencionara anteriormente, con dicho antígeno recombinante obtenido en la presente Tesina, se pondrá a punto un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos a partir de muestras de suero de pacientes con histoplasmosis confirmada por cultivo y/o histopatología.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



Asimismo, los clones de nanoanticuerpos específicos anti-*H. capsulatum* se seleccionarán mediante rondas de biopaneos utilizando la metodología de *display en fago* utilizando dicho antígeno recombinante. Con los nanoanticuerpos VHHs que se seleccionen se pondrá a punto un ELISA directo que detecte con la mayor sensibilidad y especificidad al hongo *H. capsulatum*.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

6. CONCLUSIÓN

Las principales conclusiones a las que se han arribado a lo largo de la presente Tesina de Licenciatura se enumeran a continuación, a saber:

- Se logró expresar un candidato antigénico para el desarrollo de nuevos inmunoensayos de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la histoplasmosis.
- Se logró obtener un péptido recombinante de Hcp100 con una etiqueta de unión a poliestireno en la bacteria *E. coli* BL21 como proteína de fusión a MBP en forma soluble con una pureza mayor al 98% y en la escala de los mg/l.
- Se logró mediante el clivaje con la proteasa TEV separar el péptido de MBP para poder utilizarlo puro en los inmunoensayos y selección de nanoanticuerpos VHHs.

De esta manera, se dispone de al menos uno de los principales elementos necesarios para el potencial desarrollo de nuevos equipos comerciales para el diagnóstico de la histoplasmosis. Para finalizar se puede plantear que los resultados obtenidos sustentan tanto los objetivos planteados como la hipótesis de obtener el péptido derivado de Hcp100, expresarlo, inducirlo y purificarlo como un medio para desarrollar un sistema de diagnóstico para la histoplasmosis.



Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604

7. PERSPECTIVAS

Cabe destacar que la histoplasmosis (junto con otras micosis emergentes) continuará siendo una micosis de gran interés médico y social en los próximos años, particularmente vinculada al incremento de la población de individuos inmunosuprimidos (individuos con HIV/sida, individuos trasplantados, individuos con enfermedades autoinmunes que reciben tratamiento inmunosupresor, como ser pacientes con inhibidores de TNF- α 6). Los métodos de diagnóstico - tanto convencionales como moleculares- aún presentan limitaciones, por lo que deben ser optimizados y asequibles a la mayoría de los laboratorios después de una correcta validación en diferentes grupos poblacionales y en todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por otra parte, urge encontrar métodos de detección de *H. capsulatum* en el medio ambiente, lo que incidiría de manera directa en la aplicación de medidas de control en las posibles fuentes de infección.

Los resultados obtenidos en la presente Tesina de Licenciatura pueden significar un aporte a la al diagnóstico de la histoplasmosis.

Se espera en el corto-mediano plazo poder poner a punto un ELISA indirecto utilizando el antígeno recombinante derivado de Hcp100, y que sus valores de sensibilidad y especificidad sean superiores a los obtenidos con Hcp100 entera.

Asimismo, nos proponemos la producción de nanoanticuerpos o fragmentos VHH-derivados de los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos contra *H. capsulatum*, seleccionando algunos clones con este péptido recombinante derivado de Hcp100 para desarrollo de nuevos kits de ELISA directo, para finalmente detectar con mayor sensibilidad y especificidad al *H. capsulatum* en diferentes muestras clínicas. Para ello se propone le diseño de nano-anticuerpos VHH monovalentes y multivalentes dirigidos contra el antígeno recombinante derivado de Hcp100 y también contra otros antígenos recombinantes obtenidos en nuestro laboratorio.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

8. REFERENCIAS

- 1- Libro Micología Médica: Una visión actual. Ma. Fernanda Landaburu & Ma. Teresa Mujica. 1° Edición. Editorial Eudeba. 2016. ISBN 978-950-23-2542-2.
- 2- Darling ST. the morphology of the parasite (histoplasma capsulatum) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical america. J Exp Med. 1909 Jul 17;11(4):515-31. doi: 10.1084/jem.11.4.515.
- 3- Carnovale S. Micólogos argentinos pioneros en el estudio de la histoplasmosis [Pioneer Argentine mycologists in the study of histoplasmosis]. Rev Argent Microbiol. 2013 Jan-Mar;45(1):1-2.
- 4- Filós-Díaz JA. Histoplasmosis en panamá. Revisión histórica y nota de actualización [Histoplasmosis in Panama. Historical review and update]. Rev Med Panama. 1984 Jan;9(1):8-21.
- 5- Fundamentos de las micosis humanas. Editor ámgel González. CiB Fondo Editorial. 1° Edición.
- 6- Arenas R. Histoplasmosis. In: McGraw-Hill Interamericana (eds). Micología Médica Ilustrada. Tercera Edición. 2008: 190-199.
- 7- Hage CA, Azar MM, Bahr N, Loyd J, Wheat LJ. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. Semin Respir Crit Care Med. 2015 Oct;36(5):729-45. doi: 10.1055/s-0035-1562899.
- 8- Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med Mycol. 2011;49(8):785-98. doi: 10.3109/13693786.2011.577821.
- 9- Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:115-32.
- 10- Rippon JW. Micología Médica. Hongos y actinomicetos patógenos. México DF: Ed. Interamericana McGraw. 1990. p. 411-56.
- 11- Vail GM, et al. Cellular immune response in HIV-infected patients with histoplasmosis. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002; 29:49-53
- 12- Negróni, R. Manifestaciones cutáneo-mucosas de la histoplasmosis diseminada. Dermatología Argentina 2008; XIV: 104-10.
- 13- Ascioğlu S, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis. 2002; 34:7-14.
- 14- Martín-Iguacil R, et al. Progressive disseminated histoplasmosis in the HIV population in Europe in the HAART era. Case report and literature review. Infection. 2014; 42(4): 611-20.
- 15- Reiss E, et al. Fundamental Medical Mycology. Wiley J & Sons, Inc. Wiley-Blackwell. New Jersey. 2012.
- 16- Rodríguez-Cerdeira C, et al. Systemic fungal infections with human immunodeficiency virus. Actas Dermosifiliogr. 2014; 105(1):5-17.
- 17- Fernández Andreu CM, et al. Histoplasmosis updating. Rev Cubana Med Trop. 2011; 63(3).

Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604



- 18- Arteaga Hernández E, et al. Opportunistic invasive mycoses in AIDS. An autopsy study of 211 cases. *Rev Iberoam Micol.* 1998; 15(1):33-5.
- 19- Adenis, A., Nacher, M., Hanf, M., Vantilcke, V., Boukhari, R., Blachet, D., ... & Couppie, P. (2014). HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: from neglect to priority. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8), e3100.
- 20- Frola C, et al. Impacto de la histoplasmosis diseminada en pacientes HIV positivos. *Actualizaciones en sida e infectología.* 2013; 21(89): 37-41.
- 21- Negroni R, et al. Eficacia del tratamiento y de la profilaxis antifúngica secundaria en la histoplasmosis asociada al sida. Experiencia del Hospital de Infecciosas Francisco J. Muñiz, de la ciudad de Buenos Aires. *Rev Iberoam Micol.* 2017.
- 22- Falci DR, Hoffmann ER, Paskulin DD, Pasqualotto AC. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21(1):7-11. doi:10.1016/j.bjid.2016.09.012
- 23- de Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(1):27-31. doi:10.1016/j.riam.2017.04.004
- 24- Kauffman CA. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):115-132. doi:10.1128/CMR.00027-06
- 25- de Freitas RS, Carvalho-Vivi JO, Zamboni IM, Assis CM, Costa-Martins JE, Vicentini Moreira AP. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009;15(2):278-288. doi:10.1590/S1678-91992009000200010
- 26- Dantas KC, de Freitas RS, Garcia RSP, et al. Importance of the association of molecular and immunological diagnosis in immunocompetent patient with *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* infection: A case report. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20(1):1-5. doi:10.1186/1678-9199-20-36
- 27- Richer SM, Smedema ML, Durkin MM, et al. Improved diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by combining antigen and antibody detection. *Clin Infect Dis.* 2016;62(7):896-902. doi:10.1093/cid/ciw007
- 28- Bloch KC, Myint T, Raymond-Guillen L, et al. Improvement in diagnosis of *Histoplasma meningitis* by combined testing for *Histoplasma* antigen and immunoglobulin G and immunoglobulin M anti-*Histoplasma* antibody in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 2018;66(1):89-94. doi:10.1093/cid/cix706
- 29- de Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(1):27-31. doi:10.1016/j.riam.2017.04.004
- 30- Guimaraes AJ, et al. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol* 2006, 37(1): 1-13.
- 31- Bialek R, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1644-7.
- 32- Fandiño-Devia E, et al. Antigen detection in the diagnosis of histoplasmosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *Mycopathologia.* 2016; 181(3-4):197-205.
- 33- Wheat L. U.S. Patent Application No. 11/491,647. 2006.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



- 34- Theel ES, Jespersen DJ, Haring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3555-3559. doi:10.1128/JCM.01868-13
- 35- Cáceres DH, Samayoa BE, Medina NG, et al. Multicenter validation of commercial antigenuria reagents to diagnose progressive disseminated histoplasmosis in people living with HIV/AIDS in two Latin American countries. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6). doi:10.1128/JCM.01959-17
- 36- Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, et al. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(3):605-613. doi:10.1006/bbrc.1998.9894
- 37- Colonna-Romano S, Porta A, Franco A, Kobayashi GS, Maresca B. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophages infection. *Microb Pathog.* 1998;25(2):55-66. doi:10.1006/mpat.1998.0209
- 38- Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernández N, et al. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev Argent Microbiol.* 2009;41(1):20-26.
- 39- Elías NA, Cuestas ML, Sandoval M, et al. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia.* 2012;174(5-6):451-456. doi:10.1007/s11046-012-9567-2
- 40- Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(1):62-67. doi:10.1128/CVI.00332-09
- 41- Toscanini MA, Maglio DG, Capece P, Posse G, Iovannitti CA, Nusblat AD, Cuestas ML. *Histoplasma capsulatum* 100-kilodalton antigen: recombinant production, characterization, and evaluation of its possible application in the diagnosis of histoplasmosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Jul;104(13):5861-5872. doi: 10.1007/s00253-020-10570-7.
- 42- Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research.* 2019 Jul;47(W1):W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268. PMID: 30976793; PMCID: PMC6602479.
- 43- Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Konstantin Okonechnikov, Olga Golosova, Mikhail Fursov, the UGENE team. *Bioinformatics* 2012 28: 1166-1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
- 44- MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) *Molecular Biology and Evolution* (<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>)
- 45- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J & Barton GJ. *Nucl. Acids Res.* (first published online April 16, 2015) doi: 10.1093/nar/gkv332
- 46- J. Mistry, S. Chuguransky, L. Williams, M. Qureshi, G.A. Salazar, E.L.L. Sonnhammer, S.C.E. Tosatto, L. Paladin, S. Raj, L.J. Richardson, R.D. Finn, A. Bateman *Nucleic Acids Research* (2020) doi: 10.1093/nar/gkaa913
- 47- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8.
- 48- Kogot, J. M., Sarkes, D. A., Val-Addo, I., Pellegrino, P. M., & Stratis-Cullum, D. N. Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene-binding peptide tag. *Biotechniques.* 2012. 52(2), 95-102.
Videla Garrido, Agustin.

- 49- Russell, D. W., & Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 1, p. 112). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001
- 50- Edwards, J. A., Chen, C., Kemski, M. M., Hu, J., Mitchell, T. K., & Rappleye, C. A. Histoplasma yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC genomics*. 2013. *14*(1), 1-19.
- 51- Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:405-412. doi:10.1093/nar/gku938
- 52- Berglund L, Andrade J, Odeberg J, Uhlén M. The epitope space of the human proteome. *Protein Sci*. 2008 Apr;17(4):606-13. doi: 10.1110/ps.073347208.
- 53- WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 3rd February 2021).



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

9. ANEXO

MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio LuBe bajo en concentración salina (pH= 7,5)

La concentración baja en sal se necesita debido a que se utiliza para la selección de transformantes con el antibiótico zeocina o ampicilina.

Triptona_____	1%
Extracto de levadura_____	0,5%
NaCl_____	0,5%
Agar_____	1,5%

1. Para 1 litro, se disolvieron en 900 mL de agua destilada 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar (en el caso de preparar medio semisólido).
2. Se ajustó el pH de la solución a 7,5 con NaOH 1 N y se llevó a volumen final de 1 litro.
3. Se esterilizó mediante autoclave.
4. Se añadió zeocina a 25 µg/mL de concentración final y se conservó en la oscuridad protegido de la luz o se añadió ampicilina a 100 µg/mL de concentración final según qué plásmido que se haya utilizado en la transformación.

Soluciones para minipreparación de DNA

Tris-HCl 1 M (pH= 8,0): para 100 mL se disolvieron 12,114 g de Tris-base en 80 mL de agua ultra pura, se ajustó el pH a temperatura ambiente con HCl 6 N y se llevó a volumen final con agua ultra pura.

EDTA 0,5 M (pH= 8,0): para 100 mL se disolvieron 18,61 g de Na₂EDTA·2H₂O en 80 mL de agua ultra pura con ayuda de un agitador magnético, se ajustó el pH con NaOH 1 N y se llevó a volumen final con agua ultra pura.

Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604



Buffer Tris-EDTA (pH= 8,0): contiene Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM. Para 100 mL se mezcló 1 mL de Tris-HCl 1 M (pH= 8,0) con 0,2 mL de EDTA 0,5 M (pH= 8,0) y se añadió RNase A libre de DNase a concentración final de 20 µg/mL, se ajustó el pH con HCl 6 N y se llevó a volumen final con agua ultra pura.

Solución I de lisis alcalina:

Glucosa_____	50 mM
Tris-HCl (pH= 8,0)_____	25 mM
EDTA (pH= 8,0)_____	10 mM

Para 100 mL se pesaron 0,9008 g de glucosa, se añadieron 2,5 mL del *stock* Tris-HCl 1 M (pH= 8,0) y 2 mL del *stock* EDTA 0,5 M (pH= 8,0) y se llevó a volumen final con agua ultra pura. Se autoclavó la solución y se conservó a 4 °C.

Solución II de lisis alcalina:

NaOH_____	0,2 N
SDS_____	1% (p/v)

Se preparó en el mismo momento mezclando partes iguales de una solución *stock* de NaOH 0,4 N y una solución *stock* de SDS 2% (p/v).

Solución III de lisis alcalina:

Acetato de Potasio_____	3 M
Ácido acético glacial _____	12,1% (p/v)

Para 100 mL se mezclaron 60 mL de una solución *stock* de Acetato de Potasio 5 M con 11,5 mL de ácido acético glacial. Se llevó a volumen final con agua ultra pura y se conservó a 4 °C.



Videla Garrido, Agustin.

DNI: 41.588.604

Buffer fosfato salino (PBS) 0,15 M (pH= 7,4)

NaCl _____	137,0 mM
KCl _____	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ _____	10,0 mM
KH ₂ PO ₄ _____	2,0 mM

1. Se disolvieron 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl, 8,0 g de NaCl y 0,24 g de KH₂PO₄ en 600 mL de agua destilada.
2. Se ajustó a pH= 7,4 con NaOH 5 N o HCl 6 N según el caso y se llevó a volumen final de 1000 mL con agua destilada.
3. Se autoclavó durante 15 min a 121 °C.
4. Se conservó a temperatura ambiente.



Videla Garrido, Agustín.

DNI: 41.588.604