



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Purificación parcial de la coccidioidina
para su uso en ensayo inmunoenzimático**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SANDRA BERENICE VILLEGAS GARCÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 2016
Cd.Mx.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Villegas
García
Sandra Berenice
56937301
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308208113
2. Datos del tutor
Dra.
Laura Rosio
Castañón
Olivares
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Roberto Alejandro
Arreguín
Espinosa de los Monteros
4. Datos del sinodal 2
Dr.
José Eduardo
Rodríguez
Bustamante
5. Datos del sinodal 3.
Biól.
Elva
Bazán
Mora
6. Datos del sinodal 4
QFB.
Erika
Córdova
Martínez
7. Datos del trabajo escrito
Purificación parcial de la coccidioidina para su uso en ensayo
inmunoenzimático
60 p
2016

Esta tesis fue elaborada en el laboratorio de Micología Médica de la facultad de Medicina, UNAM en colaboración con el laboratorio de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM.

Dedicatoria

A mis padres: Clara y Pedro, el motor de mi vida

A mis hermanas Noraneyda y Loreley

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi *alma máter* que desde mis inicios como universitaria en la prepa 8 y mi paso por la Facultad de Ciencias ha llenado mi vida de conocimiento, calidez, orgullo y una enorme felicidad ¡Goya!

A la Dra. Laura Rosio Castañón Olivares, más allá de una asesora es una maravillosa persona, dispuesta a apoyarte en lo más difícil, muy alegre, llena de innovación y un vasto conocimiento. Al Dr. Roberto Arreguín, por ser una persona muy alegre que siempre está dispuesta a ayudar, gracias por aceptarme como parte de su equipo. A mis sinodales Elva Bazán Mora y Érika Córdova Martínez por el tiempo de revisar este trabajo, sus enseñanzas, sus comentarios y la convivencia en el laboratorio; al Dr. Eduardo Bustamante, por aceptar ser parte de mi jurado, por su amistad y por las alegrísimas pláticas de biología en el instituto de Química.

Gracias a los profesores del taller de Biología de hongos de importancia médica por sus múltiples enseñanzas, aportaciones y valiosos comentarios en cada nivel cursado; al Dr. Antonio Ramírez por su apoyo técnico en el laboratorio de Micología Medica y por los múltiples reactivos y equipos prestados. A la Dra. Carolina Segundo por su amistad y sus aportes y apoyo brindado en mi paso como tesista. Por su apoyo en la realización y explicación de las pruebas estadísticas al Dr. Raúl Ponce de León.

Gracias a todos mis compañeros del instituto de Química: Ariana, Ulises, Abigail, Ivette, que siempre están dispuestos a ayudarte y a platicar contigo aunque estén muy ocupados, particularmente gracias a Miguel Cuevas Cruz, la increíble persona que me apoyó de una manera extraordinaria en la realización de mi trabajo, gracias por todo el tiempo invertido, todas las pláticas, enseñanzas y por tu amistad.

Durante mis estudios de licenciatura y la elaboración de mi tesis, goce de una beca otorgada por la DGAPA, UNAM, dentro del proyecto PAPIME PE202414.

Agradecimientos

A mis padres Clara y Pedro, sin los cuales yo no sería nada de quien soy; gracias por dirigirme de una manera excepcional para elegir los mejores caminos posibles, gracias por enseñarme valores; por todas las desveladas, la diversión, los esfuerzos económicos, la compañía, la comida, pero por sobre todas las cosas, gracias por el amor incondicional y la enorme paciencia que toda la vida me han brindado. A Nora, mi acompañante de vida, quién le da significado a la frase “Te acuerdas cuando”, tu singular alegría y espontaneidad son increíbles; gracias por las muchas tareas con las que me ayudaste, por todo tu amor y apoyo y por supuesto, gracias por darme el mejor regalo que alguna persona ha podido darme: Loreley. LOS AMO. A mis tíos Lilia y Benito y mis primas Esmeralda y Carmen, que siempre han estado acompañándome y dándome ánimos y a toda la familia que alguna vez en su vida me preguntó “¿Y para cuando terminas?”.

A mis amigas de la prepa 8, Dhyana, Margarita y Carmen que vivimos juntas nuestros inicios como universitarias, que aunque ya no nos frecuentamos mucho, cuando nos volvemos a ver, es como si el tiempo no hubiera pasado. A Aketzaly, quien me acompañó de una manera muy especial durante un gran lapso, quién como nadie soporto mi etapa puberta y me ayudó a madurar muchos aspectos de mi vida y además me enseñó el lado poético de la Biología. A Isabel Pérez y Magnolia Natali por su amistad en la facultad; a Luis Eloy, quien de inmediato vivió conmigo este proceso de la tesis y muchos otros divertidos y quien ya forma una parte importante en mí y por sobre todo gracias a Gabriela Morales Flores, quien desde segundo semestre no soltó mi mano y vivió como nadie, a mi lado, esta etapa llamada universidad, quien ha pasado conmigo las situaciones más difíciles, divertidas y tristes; mi mejor amiga, a quien considero de mi familia, te amo Gaby.

ÍNDICE

	Resumen.....	1
I.	Introducción	2
	1.1 Distribución de <i>Coccidioides</i>	
	1.2 Epidemiología	
	1.3 Manifestaciones clínicas y diagnóstico	
	1.4 Respuesta inmune del hospedero	
	1.5 Inmunología	
	1.6 ELISA	
	1.7 Coccidioidina	
II.	Antecedentes.....	11
III.	Planteamiento del problema.....	13
IV.	Justificación.....	14
V.	Hipótesis.....	15
VI.	Objetivos.....	16
VII.	Materiales y métodos.....	17
	7.1 Reactivos biológicos	
	A) Antígenos	
	B) Anticuerpos	
	7.2 Análisis biológico	
	A) Prueba de Inmuno Doble Difusión (IDD)	
	B) Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	
	7.3 Análisis fisicoquímico	
	A) Cuantificación de proteínas	
	B) Electroforesis	
	C) Filtración	
	D) Cromatografía de alta resolución	
	E) Espectrometría de Masas MALDI-TOF MS.	
	F) Confirmación de reactividad biológica	
VIII.	Resultados.....	24
	A) Prueba de Inmuno Doble Difusión (IDD)	
	B) Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	
	C) Cuantificación de proteínas	
	D) Electroforesis	
	E) Filtración	
	F) Cromatografía de alta resolución	
	G) Espectrometría de Masas MALDI-TOF.	
	H) Pruebas de confirmación	
IX.	Discusión.....	44
X.	Conclusiones.....	47
XI.	Perspectivas.....	48
XII.	Bibliografía.....	49
	Anexo 1: Soluciones.....	53

RESUMEN

La coccidioidina es una mezcla de componentes antigénicos de origen glicoproteico, obtenida del filtrado crudo del cultivo del hongo *Coccidioides* spp, en un medio químicamente definido. El antígeno es usado para efectuar pruebas inmunológicas con fines diagnósticos en mamíferos, pero por su naturaleza fisicoquímica puede ser reconocida por anticuerpos específicos, creados en contra de otros hongos, dando reacciones cruzadas (positivas falsas).

El objetivo del trabajo fue caracterizar bioquímicamente tres lotes de coccidioidina y obtener un antígeno puro. Las técnicas utilizadas fueron: cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico, electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, separación de las proteínas por cromatografía líquida de alta presión e intercambio iónico y análisis por espectrometría de masas. Para corroborar la reactividad biológica (reconocimiento antígeno/anticuerpo), las coccidioidinas completas (antígenos crudos) y cada una de las fracciones obtenidas mediante algunos de los métodos de purificación, fueron probadas con diferentes sueros de pacientes mediante el ensayo inmunoenzimático. Como resultado, los tres lotes de antígenos “crudos” reaccionaron ante los sueros de pacientes con anticuerpos anti-*Coccidioides* y anti-*Histoplasma*. Fisicoquímicamente, cada lote de antígeno tuvo una concentración de proteínas diferente, presencia de bandas proteicas con pesos moleculares similares entre sí y bandas únicas en cada uno de ellos y mediante HPLC y MALDI-TOF MS las fracciones mostraron distintas composiciones moleculares. Desafortunadamente, todas las fracciones proteicas obtenidas no fueron reactivas por ELISA. Todos los ensayos llevados a cabo mostraron que el antígeno coccidioidina es un complejo químico, cuya purificación fisicoquímica afecta notablemente la reacción de reconocimiento antígeno/anticuerpo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Distribución de *Coccidioides* spp.

En la actualidad se reconocen genéticamente dos especies del género *Coccidioides*, *C. immitis* y *C. posadasii*, que entre sí son indistinguibles morfológicamente (Fisher, Koenig, White, & Taylor, 2002). Estos agentes etiológicos son importantes, debido a que son causantes de coccidioidomicosis. Son hongos dimórficos, con una fase saprobia y una parasítica, que crecen en el ambiente en forma filamentosa. Presentan una distribución geográfica en el continente americano, restringida a zonas de clima árido o semiárido con tolveneras frecuentes; inviernos cortos y lluviosos y un verano prolongado seco, las temperaturas son altas, la vegetación escasa de tipo espinoso y suelos pobres en nutrientes, con pH alcalino y elevadas concentraciones de sales de boro y sulfato de calcio (Mondragón-González *et al.*, 2005).

Áreas altamente endémicas de *Coccidioides* spp., incluyen, en Estados Unidos (EUA), partes de Arizona y California y áreas metropolitanas con altas tasas de incidencia, como lo son Bakersfield, California, Phoenix y Tucson, Arizona, donde prevalecen las condiciones ecológicas antes mencionadas (Fig 1)(Dicaudo, 2006). En México, los lugares que se suponen hábitat del hongo (supuestamente endémicas) son sitios donde se reporta la mayor parte de los casos humanos de coccidioidomicosis. Entre estos lugares, se encuentran los estados de Baja California, Sonora, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí y Durango (Castañón *et al.* 2004). En esas áreas geográficas hay abundantes roedores silvestres, quienes de manera natural se infectan con éstos hongos (Negrón *et al.*, 2010). La coccidioidomicosis, conocida también como fiebre del Valle, es una micosis sistémica resultante de la inhalación de artroconidios de *Coccidioides* spp., afecta pulmones y puede ser asintomática, benigna, grave o mortal (Arenas, 2011; Galgiani *et al.*, 2005).

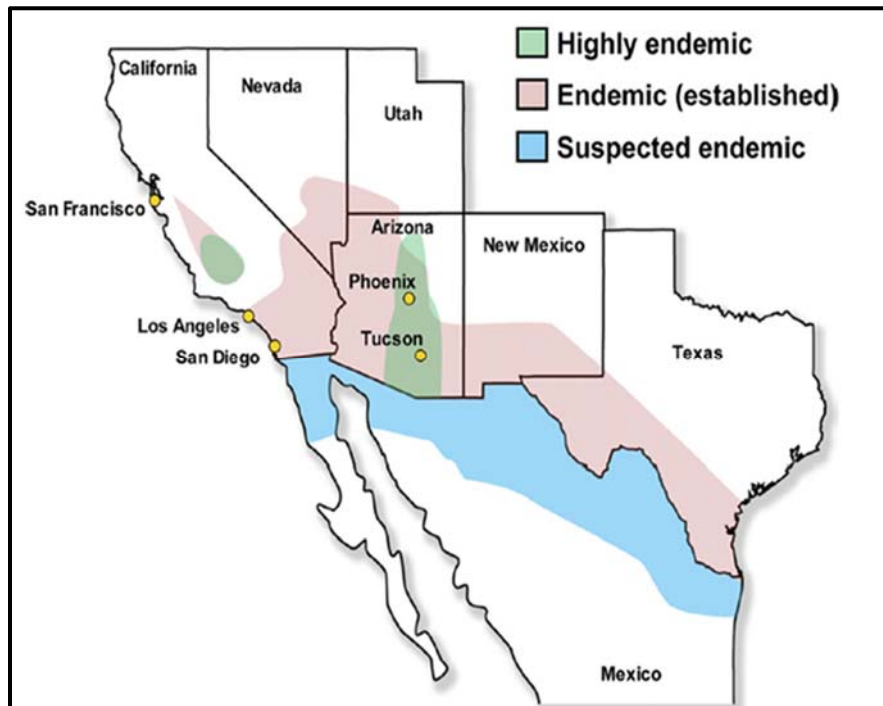


Figura 1. Mapa de distribución de *Coccidioides* spp., (Dicaudo, 2006).

1.2 Epidemiología

En 1932 Cicero y Perrin documentaron en Los Ángeles California, Estados Unidos de América (EUA), el primer caso mexicano de coccidioidomicosis; se trataba de un inmigrante trabajador del campo. Actualmente en EUA se estiman 150,000 casos humanos nuevos por año, pero en nuestro país no hay una estadística confiable de la morbilidad, debido a que la notificación de casos de esta micosis no es obligatoria ante la Secretaría de Salud. En México, las publicaciones sobre estudios epidemiológicos datan desde 1944 y, de acuerdo a la información disponible no oficial, se estiman alrededor de 1,500 casos de coccidioidomicosis primaria y 15 casos de enfermedad diseminada al año. La herramienta más utilizada para investigar la situación epidemiológica de esta micosis ha sido la aplicación intradérmica de esferulina y/o coccidioidina (Baptista & Riquelme, 2007).

La enfermedad puede afectar individuos de cualquier edad, sexo y ocupación; sin embargo, en la mayor parte de los casos reportados se perciben personas adultas de entre 40-49 años, del sexo masculino y con actividades u ocupaciones (arqueólogos, paleontólogos, agricultores) que los expone al polvo contaminado. Asimismo, se ha reportado que las infecciones más graves, diseminadas y de pronóstico desfavorable, generalmente se identifican en personas con inmunosupresión, ancianos donde el riesgo a la diseminación se explica principalmente por la depresión de la inmunidad celular (Brown *et al.*, 2013), y mujeres embarazadas, cuyo riesgo se eleva cuando la infección se adquiere en las últimas etapas del embarazo (Bercovitch *et al.*, 2011), en las que se presentan altas concentraciones de estrógenos que favorecen la reproducción del hongo (Brown *et al.*, 2013; Moroyoqui & Figueroa, 2008); lo cual sugiere que la propensión a diseminación, en este caso, es debida a un componente genético u hormonal (Crum, *et al.*, 2004).

En las últimas décadas, el incremento en la población de personas con compromiso de la inmunidad mediada por células, por el tratamiento de leucemias, linfomas, trasplantes de órganos y la infección por VIH/SIDA, ha aumentado el número de enfermos de coccidioidomicosis diseminada (Negroni *et al.*, 2010).

1.3 Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Los hongos del género *Coccidioides* en su fase saprobia desarrollan su forma micelial caracterizada por la presencia de arthroconidios que se dispersan por el viento y representan las partículas infectantes. Los elementos de propagación penetran en el organismo humano por vía respiratoria y llegan a los pulmones. Después de dos o tres días, cada arthroconidio cambia a su forma parasitaria denominada esférula con endosporas. Por lo general, la infección es asintomática o cursa como una infección respiratoria benigna y auto-limitada, debido a que la inmunidad específica mediada por células origina la formación de granulomas epitelioides compactos con macrófagos activados, que poseen una

gran capacidad fagocitaria y lítica (Castañón *et al.*, 2004; Negroni *et al.*, 2010) (Negroni, *et al.*, 2010) (Castañón *et al.* 2004).

Aproximadamente el 60% de las personas que son infectadas permanecen asintomáticas y la infección sólo es reconocida por la prueba de intradermorreacción positiva (IDR+) a la coccidioidina o esferulina (Castañón *et al.* 2004). El otro 30% por lo general presenta una enfermedad de leve a moderada, tipo influenza o neumonía común, incluyendo síntomas como tos, fiebre con sudores nocturnos y dolor pleurítico, además de artralgias y mialgias. Los casos que requieren atención médica especial son las primo-infecciones sintomáticas, los procesos pulmonares de evolución crónica y las formas progresivas diseminadas (Chiller *et al.*, 2003), que es aproximadamente el 10% de los infectados. Sólo en el 1% o menos de los pacientes se identifica la infección propagada fuera de los pulmones, lo que conduce a lesiones destructivas en la piel, huesos, articulaciones, meninges y prácticamente cualquier otro órgano o tejido en el cuerpo donde la infección se haya esparcido. Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son los ganglios linfáticos, huesos, piel, hígado, bazo y sistema nervioso central (SNC). Estas complicaciones producen una elevada morbilidad crónica (Galgiani, 2015).

Si hay síntomas respiratorios, se realizan estudios micológicos de laboratorio entre los que destacan el examen directo con hidróxido de potasio (KOH) o lugol, de muestras de pacientes como son esputo, líquido de lavado broncoalveolar, exudados cutáneos o líquido cefalorraquídeo; puestos al microscopio se observarán esférulas con endosporas, es decir, las formas parasitarias del hongo. Para la observación de las esférulas es más recomendable teñir los frotos de tejido con PAS, tinción de Gomori-Grocott o Papanicolaou (Arenas, 2011; Johnson *et al.*, 2014). También el diagnóstico se puede realizar cultivando las muestras patológicas en agar Mycosel® o Mycobiotic® y en agar dextrosa Sabouraud, en los cuales en aproximadamente 1 semana se observa el crecimiento de colonias blancas filamentosas que, a la observación microscópica, muestran predominantemente hifas largas septadas y artroconidios (Johnson *et al.*, 2014). Otra alternativa diagnóstica para esta micosis sistémica, es el uso de técnicas inmunológicas que consisten en el estudio de la reacción

antígeno/anticuerpo para observar el grado de contacto que el hospedero a tenido con el hongo.

1.4 Respuesta inmune del hospedero

La inmunidad celular es protectora en el hospedero. Los mecanismos de defensa contra el hongo actúan de manera coordinada para inhibir su proliferación o eliminarlo. Esos procesos se realizan entre los fagocitos polimorfonucleares que constituyen la primera línea de defensa y la inmunidad celular, la cual libera sustancias que potencian la acción de las células encargadas de los procesos de fagocitosis y eliminación del microorganismo (Borchers & Gershwin, 2010). Por lo anterior, la coccidioidomicosis genera hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) que puede evidenciarse con la inoculación intradérmica de coccidioidina y/o esferulina en pacientes que se sospeche infección por *Coccidioides* spp., lo que hace a la prueba una herramienta sumamente valiosa en el terreno epidemiológico. La intradermorreacción a coccidioidina es muy útil en encuestas epidemiológicas y con fines pronósticos de la enfermedad, pero su valor diagnóstico es pobre debido a que un resultado positivo sólo implica contacto con el hongo, reciente o pasado. Consecuentemente, no puede indicar con certeza la enfermedad activa en el paciente, además de que un resultado negativo puede estar influido por una situación de inmunosupresión en el sujeto estudiado.

La presencia de anticuerpos humorales no protege contra *Coccidioides* spp., sino que refleja el nivel de actividad en el organismo anfitrión infectado. Estos anticuerpos son utilizados para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. La sincronización y la magnitud de la respuesta del anticuerpo se relacionan directamente con la integridad del sistema inmunitario del paciente y con la presentación clínica de la infección. Para reflejar el nivel de actividad en el organismo anfitrión infectado por el hongo, se utiliza la medición de los títulos séricos de inmunoglobulina M (IgM), que se conoce como respuesta temprana. La respuesta tardía se observa mediante la medición de las inmunoglobulinas G (IgG). La IgM (anticuerpos precipitantes (TP) o aglutininas) llegan a ser medibles dentro de una a 3 semanas del inicio del cuadro (Yeo & Wong, 2002). Los anticuerpos IgG fijadores del complemento (FC) aparecen desde la segunda

semana, hasta la semana 28 del inicio y pueden permanecer durante meses, su título es usualmente relacionado con el grado de infección.

Los estudios serológicos pueden verse comprometidos en pacientes con disminución de la respuesta inmune, por ejemplo, los pacientes con trasplante o con infección del virus de la inmunodeficiencia humana (Saubolle *et al.*, 2007).

1.5 Inmunología

Las técnicas serológicas son excelentemente útiles, pero en especial cuando el microorganismo causal crece lentamente o no crece en los medios de cultivo *in vitro*, además, la toma de muestra para el uso de esta técnica es poco invasiva (Arango, 2012). En nuestro caso, la detección de anticuerpos anti-*Coccidioides* es importante para establecer el diagnóstico de coccidioidomicosis, pero los resultados deberán de ser interpretados tomando en cuenta la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada.

Rutinariamente, el “estándar de oro” para medir el nivel de la respuesta IgG, sobre todo en las formas diseminadas y en el método de elección para diagnosticar meningoencefalitis por *Coccidioides* spp., fue la Reacción de Fijación del Complemento (FC) con una sensibilidad de 56% (Carrada-Bravo, 2014). En la actualidad, se ha optado por técnicas menos laboriosas y de mayor sensibilidad y especificidad, como la Inmuno Doble Difusión de Ouchterlony (IDD) (Ouchterlony, 1965) en placa de agar, método con una sensibilidad de 71% para la identificación de IgG y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) con sensibilidad de 96% para titular IgM o IgG. Dada la importancia que la técnica de ELISA tuvo en el desarrollo de este trabajo, es propicio hacer una explicación detallada al respecto.

1.6 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA por sus siglas en inglés: *Enzyme Linked Immuno Assay*), permite la detección de antígenos o anticuerpos mediante la combinación de principios inmunológicos y enzimáticos. La técnica tiene numerosas ventajas, entre las que destacan: simplicidad, fácil lectura, rapidez, alta sensibilidad, adaptabilidad, bajo costo, seguridad,

disponibilidad comercial y múltiples aplicaciones en diagnóstico y otras áreas de la ciencia (Mercadillo & Yuil, 2012).

La prueba de ELISA es un método de análisis cuantitativo, en el cuál un antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac) está marcado con una enzima covalentemente unida. Si en la muestra estudiada el antígeno o el anticuerpo de interés están presentes, el antígeno o anticuerpo marcado con la enzima, se unirá a ellos (principio inmunológico) y la enzima catalizará la reacción convirtiendo un sustrato incoloro en un producto detectable (principio enzimático). De este modo, sólo se generará un producto detectable si el antígeno o el anticuerpo de interés están presentes en la muestra estudiada (Portnoy, 2004).

Existen diferentes tipos de ELISA, pero todas comparten entre sí los siguientes componentes (Mercadillo & Yuil, 2012):

1. El conjugado, que es el antígeno o anticuerpo marcado con una enzima. Las enzimas más estudiadas son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa.
2. Un medio de soporte, por lo general es una placa de microtitulación de poliestireno con 96 pozos, que esté recubierto con el antígeno o anticuerpo correspondiente al antígeno o anticuerpo diana.
3. Un sustrato que al ser catalizado por la enzima genere una reacción colorimétrica, fluorescente y/o luminiscente, que será medida en medidas de absorbancia en un espectrofotómetro.

Según la literatura, existen tres versiones básicas de la técnica ELISA:

1. ELISA directo. Permite la detección de antígenos específicos en una muestra. En esta prueba, se añade la muestra con el antígeno para que se adsorba al soporte. Se adiciona el anticuerpo específico conjugado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble (Fig. 2-A) (Calderón, 2007).
2. ELISA indirecto. Se diferencia de la anterior porque ésta favorece la detección de anticuerpos. En ésta, el soporte tiene unido el antígeno específico contra el que va dirigido el anticuerpo que se está buscando en la muestra, si el anticuerpo está presente, se unirá al antígeno.

Posteriormente, se agrega un anticuerpo (secundario) anti-inmunoglobulina conjugado con una enzima, el cual se unirá al anticuerpo primario sólo si está presente en la muestra del paciente. Por último, si el conjugado está presente y se agrega el sustrato incoloro, éste será transformado en un producto detectable (Fig. 2-B) (Mercadillo & Yuil, 2012).

3. ELISA de sándwich. Es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-Ag. Después se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno y si está presente se unirá al anticuerpo que estaba adherido al soporte. Posteriormente, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno conjugado con una enzima que se une al Ag de interés, pero en un epítipo distinto al que se unió el Ac que estuvo unido al soporte. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Por último, se agrega el sustrato incoloro y éste se transforma en un producto detectable (Fig. 2-C) (Calderón, 2007; Mercadillo & Yuil, 2012).

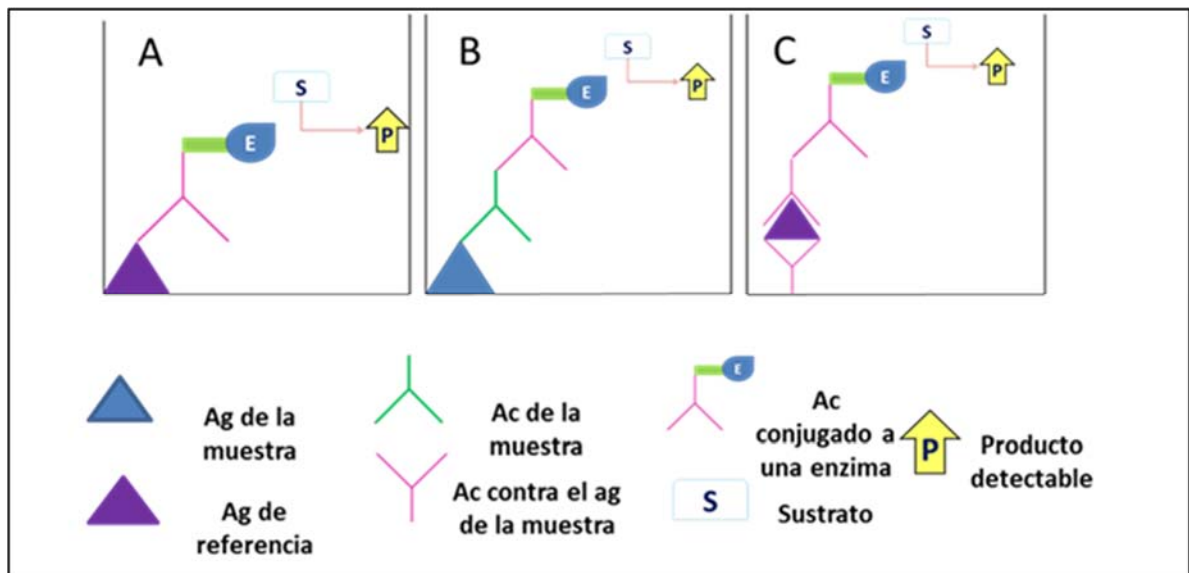


Figura 2. A) ELISA Directo; B) ELISA Indirecto y C) ELISA de Sándwich

1.7 Coccidioidina

Desde la década de 1940, los extractos coccidioidales se han utilizado como antígenos tanto para estudiar la epidemiología de la coccidioidomicosis, como para ayudar en el diagnóstico y manejo clínico de los pacientes (Wack *et al.*, 2015). Hay dos principales antígenos extraídos de *Coccidioides* spp.: esferulina y coccidioidina. La esferulina, poco usada, es una formulación de la preparación de antígeno derivado de esférulas de *Coccidioides* spp. y su uso está aprobado en EUA por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para pruebas de inmunidad celular.

La coccidioidina es un antígeno metabólico producto del filtrado del crecimiento micelial del hongo (Wack *et al.*, 2015), este tipo de antígeno, también denominado “crudo”, es de uso amplio y sin aprobación clara de la FDA, ya que aún no se definen las normas de bioseguridad que debe seguir el proceso. En México, la elaboración de la coccidioidina está permitida tanto para uso de pruebas cutáneas, como para diagnóstico serológico.

Inicialmente, la coccidioidina fue un antígeno derivado de múltiples aislamientos de especies de *Coccidioides* de pacientes en California, Arizona, Texas y en otros lugares en las regiones endémicas de los Estados Unidos. Es una mezcla de componentes antigénicos de origen glicoprotéico, obtenida del filtrado crudo de *Coccidioides* spp., crecido en un medio químicamente definido (Castañón *et al.*, 2010; Wack *et al.*, 2015).

Como fue mencionado, este antígeno es ampliamente usado en pruebas diagnósticas, estudios de seroprevalencia y encuestas con intradermorreacción. Por su naturaleza fisicoquímica, es común que en pruebas serológicas se presenten reacciones cruzadas con la presencia de anticuerpos formados contra otros hongos como *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*, organismos que también pueden producir una quitinasa con un dominio conservado similar a *Coccidioides* spp., lo que conlleva a resultados positivos falsos (Rodr *et al.*, 2008; Yeo & Wong, 2002).

Las técnicas inmunológicas en las que se utiliza la coccidioidina para medir la respuesta inmune son muy variadas, pero la sensibilidad y especificidad

proporcionada y su evaluación como herramienta epidemiológica o diagnóstica, dependerán en gran medida de la naturaleza del antígeno utilizado.

II. Antecedentes

Las pruebas serológicas convencionales utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, como las micosis, tienen limitaciones que incluyen: (i) reacciones cruzadas entre diferentes especies, (ii) la presencia de anticuerpos que el paciente genera frente a los hongos del medio ambiente o comensales (iii) la falta de normalización de antígenos (desconocimiento de su naturaleza fisicoquímica) y métodos para detectar anticuerpos que cuantifican (Yeo & Wong, 2002).

Huppert *et al.*, en 1978, debido a que las interpretaciones clínicas de entonces se complicaban por la evidencia de reactividad cruzada entre muestras de pacientes con diferentes micosis, decidieron analizar los antígenos coccidioidina y esferulina por medio de inmunolectroforesis en dos dimensiones. Los autores encontraron 26 antígenos en la coccidioidina y 12 en la esferulina, de los cuales 10 eran comunes en ambos antígenos. Concluyeron que ambos reactivos eran igualmente sensibles en las pruebas serológicas, pero la esferulina fue significativamente menos específica que la coccidioidina.

En un estudio similar, Toriello *et al.*, 1993, utilizando histoplasmina purificada derivada de *H. capsulatum*, destacan en sus resultados la observación de tres arcos con reactividad cruzada con coccidioidina.

Cole *et al.*, en 1985 analizaron por cromatografía de líquidos y gases, un producto retenido de un filtrado micelial de *Coccidioides* spp. e identificaron 3-O-metilmanosa, manosa, galactosa y glucosa. En sus objetivos, estuvo remover la proteína del azúcar, pero los intentos resultaron en la pérdida de la hipersensibilidad cutánea de tipo retardado, lo que sugirió que la porción proteica de la coccidioidina es la encargada de la respuesta inmune celular que se desarrolla.

Cox (1989) argumenta que los extractos de paredes celulares de *C. immitis* han dado antígenos que son reactivos con los anticuerpos IgM identificados por

precipitación en tubo capilar e IgG en reacción de fijación del complemento, antígenos que provocan *in vivo* e *in vitro* respuestas de las células T y antígenos que aumentan o suprimen la respuesta del huésped. Encontró un antígeno polimérico llamado Ag2, también conocido como antígeno rico en prolina (PRA), el que, según sus estudios, se encuentra compuesto por una mananoproteína, resultado obtenido al tratar el Ag2 con manosidasa y proteasa, aunque otros componentes, derivados de la pared del hongo, podían estar también presentes.

Hernández-Navarez (2009) desarrolló un método para obtener un antígeno (coccidioidina-UNAM) con un buen grado de reactividad, sensibilidad y especificidad, estandarizada en microgramos de proteína. Probó la reactividad inmunológica del antígeno por medio de IDD y fisicoquímicamente caracterizó al antígeno en una electroforesis (SDS-PAGE). Evidenció la presencia de 9 fracciones del antígeno, con peso molecular de 19, 27, 33, 40, 45, 54, 62, 79 y 100 kDa. Su trabajo concluye que de los filtrados crudos se obtienen coccidioidinas con diferente reactividad biológica.

Castañón *et al.*, (2010) realizaron un estudio comparativo de la reactividad y seguridad a dos coccidioidinas (la comercial vendida por BIRMEX y la producida en la UNAM) cuando fueron aplicadas por intradermorreacción en humanos. Sus datos apoyaron la conclusión de que la coccidioidina-UNAM es un antígeno seguro y fiable que se puede utilizar para inferir infección pasada o reciente en mamíferos.

Álvarez-Gómez (2013) en su trabajo para detectar anticuerpos anti-*Coccidioides* spp., en sueros de perros de una zona endémica (Torreón, Coah.) y una zona no endémica (Distrito Federal) de coccidioidomicosis, realizó dos pruebas serológicas: IDD y contra inmuno electroforesis, usando coccidioidina-UNAM. Demostró que no hay diferencia en cuanto a seropositividad entre los perros de una zona considerada endémica de otra no endémica, por lo que concluyó necesario confirmar los resultados con técnicas serológicas más sensibles y probar con un antígeno purificado que muestre más especificidad.

III. Planteamiento del problema

Las técnicas de identificación de anticuerpos que se han utilizado para los estudios de coccidioidomicosis en México son muy variadas. La técnica de ELISA tiene la sensibilidad de identificar anticuerpos en una concentración de hasta 1 µg/ml, pero puede presentar reacciones cruzadas con anticuerpos de otros hongos. La baja especificidad de las pruebas depende en gran parte del tipo de antígeno utilizado, particularmente si se trata de un extracto crudo. Por lo anterior, se purificará la coccidioidina para obtener un antígeno específico que, usado en una prueba sensible como ELISA, brinde un mejor reconocimiento antígeno/anticuerpo a la técnica.

IV. Justificación

Se sabe que la coccidioidina es una glicoproteína, pero poco se conoce acerca de las propiedades biológicas, físicas y químicas del antígeno como extracto crudo, por lo que se hace evidente la necesidad de contar con una coccidioidina con buena reactividad y especificidad para las pruebas inmunológicas aplicadas en el diagnóstico y pronóstico de la coccidioidomicosis. El estudio de los componentes antigénicos y la purificación parcial para conseguir una fracción más específica de la coccidioidina ayudarán a lograr esa meta. Asimismo, al considerarse la ELISA como una técnica sensible, de rápida realización y manejada con muestras de paciente poco invasivas (suero), este trabajo se centra en el análisis de los antígenos mediante su utilización.

V. Hipótesis

Si se purifica la coccidioidina se obtendrá una o varias fracciones antigénicas que en un ensayo inmunoenzimático serán reconocidas específicamente por anticuerpos anti-*Coccidioides*, obtenidos de pacientes con coccidioidomicosis confirmada. Asimismo, la purificación parcial del antígeno evitará que se presente reacción cruzada, ya que la coccidioidina reconocerá únicamente a los anticuerpos anti-*Coccidioides* y no de otros hongos, particularmente de *Histoplasma capsulatum*.

VI. Objetivos

General

Purificar parcialmente la coccidioidina para obtener un antígeno específico que sea utilizado como diagnóstico en ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Particulares

- ❖ Purificar la coccidioidina por métodos fisicoquímicos.
- ❖ Caracterizar bioquímicamente las fracciones antigénicas, a través de la cuantificación de proteínas, electroforesis y espectrometría de las mismas.
- ❖ Investigar la reactividad biológica de las fracciones obtenidas en un sistema de ELISA.

VII. Materiales y Métodos

7.1 Reactivos biológicos

A) Antígenos

Se utilizaron tres lotes de coccidioidina proporcionados por el Laboratorio de Micología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Ésos antígenos o extractos crudos estaban registrados como: Cocci 38-56-58-53, Cocci-12 y Cocci-09, los cuales, para un manejo de nomenclatura más sencillo, fueron re-identificados como A, B y C respectivamente. Los tres antígenos fueron obtenidos de la misma cepa de *Coccidioides* sp., pero elaborados en años diferentes.

B) Anticuerpos

Como controles positivos, se contó con tres sueros de pacientes con diagnóstico de coccidioidomicosis (PC1, PC2 y PC3). El grupo de controles negativos estuvo integrado por un suero de paciente con diagnóstico de histoplasmosis (PH) y un suero de personas sin micosis de ningún tipo (PS). Todos los sueros utilizados en este estudio fueron proporcionados por la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

6.2 Análisis biológico

Para comprobar la reactividad de las coccidioidinas proporcionadas por el InDRE se realizaron las siguientes técnicas biológicas:

A) Prueba de Inmuno Doble Difusión (IDD).

Se usó el sistema de Ouchterlony, probando el suero de paciente positivo a coccidioidomicosis y los tres antígenos crudos A, B, C y D.

Sobre un portaobjetos se colocaron 10 ml de agarosa al 10%, se dejó polimerizar y se hicieron perforaciones, como se observa en la figura 3, colocando 100 μ L del suero positivo a coccidioidomicosis (PC) en el pozo del centro y los antígenos A, B, C y D en los pozos periféricos, utilizando 100 μ L de antígeno por pozo. El sistema fue colocado en cámara húmeda a temperatura ambiente, se revisó a las 24 horas y se llenaron nuevamente todos los pozos con 30 μ L más de suero y antígeno, para posteriormente leerse a las 48 horas. Además, como control positivo del sistema se utilizó un antígeno del helminto *Toxocara canis* y dos sueros de pacientes positivos a dicho parásito. Las proteínas, anticuerpos y antígenos pueden difundir en medios porosos como los geles; en IDD, al difundir tanto el suero con anticuerpos específicos, como el antígeno, al encontrarse en concentraciones equivalentes, se insolubilizan formando líneas de precipitación entre los reactivos.

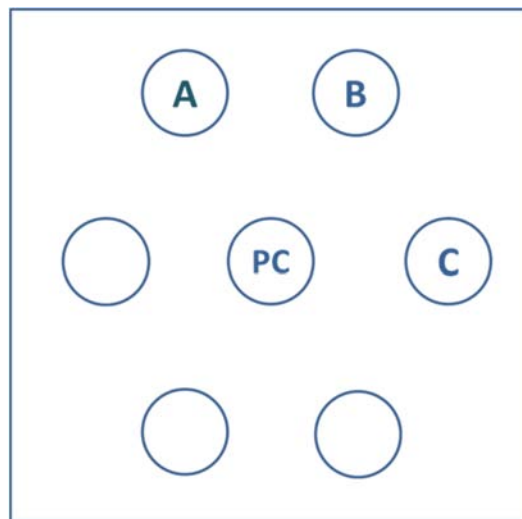


Figura 3. Esquema del sistema de prueba de IDD. A, B y C= coccidioidina, PC=Suero de paciente positivo a coccidioidomicosis.

B) Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

La ELISA se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano, diluyendo los antígenos A, B y C, en amortiguador de carbonatos pH 9.6 (solución 1 del anexo 1) y quedando cada antígeno a una concentración final de 100 ng/mL.

Se sensibilizaron las placas con 100 µL de cada antígeno y se incubaron durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se eliminó de las placas el excedente del antígeno y se procedió al bloqueo utilizando una solución al 3% de gelatina de pez (Sigma™®) en PBS 1X (solución 2 del anexo), incubando 30 min a 37°C. Se eliminó el excedente por decantación de la placa y se realizaron tres lavados, cada uno de tres minutos, con PBS Tween 20 (0.05%) (solución 3 del anexo) y uno con PBS 1X. Posterior al lavado, se agregaron los sueros con anticuerpos anti-*Coccidioides* (PC1, PC2 y PC3) y los que funcionaron como controles negativos (PS y PH). Se procedió a la dilución escalonada de los sueros según el protocolo (Modificado de Voller, 1980) y se incubaron las placas toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados como fue mencionado anteriormente y se colocó un segundo anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa (A0170®Sigma) diluyéndolo 1:3000 en PBS Tween 20/gelatina de pez 0.03% colocando 100 µl por pozo e incubando 1 h a 37°C. Se realizaron nuevamente los lavados y se reveló la placa con 50 µL de sustrato 1-2 feniledeniamina preparado en amortiguador fosfatos-citratos pH 5.0 (solución 4, anexo), dejando desarrollar el color durante 5 a 20 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2.5 N. La lectura de las reacciones se efectuó en el Multiskan 352MS™ Microplate Reader (Thermo/LabSystems) a 492 nm. Cada prueba se realizó por triplicado y se promediaron los datos de absorbancia.

Para conocer si hay diferencia significativa entre las reacciones producidas por los diferentes antígenos (crudos y fracciones), se utilizaron las pruebas de *t* de Student $p < 0.05$ (cuando los datos se distribuían normalmente) y U de Mann-Whitney (*z*) $p < 0.05$ (cuando los datos no se distribuían normalmente).

6.3 Análisis físico-químicos

Comprendieron las siguientes técnicas:

A) Cuantificación de proteínas

El método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce™) fue utilizado para conocer la cantidad de proteínas presentes en los antígenos crudos y posteriormente, en las fracciones obtenidas (Bollag & Edelstein, 1991).

Se hizo una curva de calibración con albúmina sérica bovina a concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5 y 2.0 mg/mL, como lo recomienda el fabricante (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA).

Con posterioridad, se realizaron los cálculos para preparar la solución del BCA con las siguientes fórmulas:

$$A. \text{No. de muestras} * \text{No de repeticiones} * 200\mu\text{L} = X$$

$$B. \frac{X}{51} = \text{Reactivo B}$$

$$C. 50 * \text{mL de Reactivo B} = \text{mL de Reactivo A}$$

$$D. \text{mL de Reactivo A} + \text{mL de Reactivo B} = \text{Mezcla A + B}$$

Mezclando los mL necesarios de A y B (Kit Pierce BCA Protein Assay Kit™ 7321), se tomaron 200 μL de la mezcla A y B y se colocaron en los pozos necesarios en una microplaca. A cada uno de estos pozos se les colocó también 25 μL de muestra en una dilución 1:50 y 1:100, y en el caso del blanco 25 μL de H_2O MiliQ® o buffer de fosfatos A (solución 9, ver anexo) y se dejó reaccionar durante 2 horas a 37°C. Se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (Epoch™) y enseguida se realizaron los cálculos para conocer la concentración proteica de las muestras.

B) Electroforesis (SDS-PAGE)

Para conocer el intervalo de peso molecular de las proteínas que componen las coccidioidinas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los tres antígenos. La electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es un método rápido y sensible para separar y caracterizar proteínas por la velocidad de migración, asociada al tamaño y forma, de moléculas hacia el polo positivo de una celda (Pérez, 2000).

Debido a que los antígenos están en solución, se utilizaron 10 μL de cada uno (A, B y C) y se disolvieron 1:10 y 1:20 en agua destilada. De cada una de las diluciones se tomaron 20 μL y se re-suspendieron 1:2 en amortiguador de carga (solución 5, anexo). Las muestras se prepararon en tubos Eppendorf de 0.5 mL, se sellaron con Parafilm® y se calentaron en baño de agua a 96°C por 5 minutos. Se colocaron 15 μL de cada muestra en el gel (solución 6, anexo) y 4 μL de estándar. Se usó como estándar Bis-Tris 12% MOPS buffer, con un marcador de peso molecular a intervalo de 9 a 180 kDa. Las muestras se corrieron a 100 volts por 1 hora 30 minutos aproximadamente en amortiguador de corrida (solución 7, anexo). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (solución 8, anexo) (Bollag & Edelstein, 1991) o plata (Merril *et al*, 1981)..

C) Concentración de proteínas por filtración.

Se utilizaron membranas Centricon™ con punto de corte en 3,000 Da, las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL. 2 mL de cada una de las coccidioidinas A, B y C, las cuales se fueron colocando parcialmente en los filtros y se centrifugaron por 1 hora para obtener dos fracciones del antígeno, uno con proteínas de bajo peso molecular (≤ 3000 Da) y otro con proteínas de mayor peso molecular (> 3000 Da).

D) Purificación parcial de las proteínas por cromatografía de alta resolución (HPLC)

Los antígenos crudos A, B y C se concentraron por ultra centrifugación al vacío, colocando cuatro tubos con 2 mL de cada antígeno en la centrifuga durante 1 hora 30 min aproximadamente, disminuyendo a un volumen de 0.5 mL por tubo. Este volumen se filtró con una membrana Millipore™ de 0.45 mm para su posterior inyección al equipo de HPLC (Shimadzu®).

Para llevar a cabo la cromatografía, se utilizó una columna de intercambio catiónico TSK SP-S-PW (Sulfopropil), un amortiguador de fosfatos “A” 0.1 M, pH=7.65 y un amortiguador de fosfatos “B” 0.1M, pH 7.65 + NaCl 1M. Se inyectaron 50 µL de antígeno y se eluyó a un flujo de 0.5 mL/min, con una duración de 110 minutos por corrida realizada (Cuevas-Cruz, 2015). Las fracciones se colectaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron en congelación hasta su utilización

E) Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS

La masa molecular de componentes, así como el grado de pureza de cada antígeno y de las fracciones obtenidas se determinó por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Se probaron 10 µL de la muestra con tres diferentes matrices: Ácido sinapínico, THA y 2,5 ácido dihidroxibenzoico (DHB), solas y combinadas a concentraciones de: 1:1, 1:5 y 1:10. 1 µL de la mezcla antígeno-matriz, se depositó en una placa para MALDI y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. La placa con el cristalizado se colocó en el equipo registrando el espectro a un intervalo de 1 a 100 kDa.

F) Pruebas de confirmación reactividad biológica

Para conocer el punto de corte de la reacción en ELISA, los antígenos A, B y C fueron concentrados por ultra centrifugación al vacío y probados con todos los sueros positivos y negativos a *Coccidioides*. La medida del punto de corte se

obtuvo mediante el promedio de las lecturas de absorbancia de los sueros negativos (normales y vs. anticuerpos anti-*Histoplasma*) sumándole una desviación estándar (Durkin *et al.*, 2008; Mondragón-González *et al.*, 2005)

Una vez establecido el punto de corte y con el objetivo de conocer el comportamiento biológico de los antígenos fraccionados, se efectuó nuevamente ELISA pero ahora exclusivamente con sueros positivos a *Coccidioides* de las fracciones de alto y bajo peso molecular obtenidas por filtración con Centricon™ y las obtenidas por HPLC. Asimismo, se elaboró una mezcla por separado de cada antígeno, uniendo las dos fracciones obtenidas por HPLC del antígeno A (MIX A) y las cuatro fracciones obtenidas del antígeno B (MIX B), y éstas también fueron probadas en ELISA.

VIII. Resultados

A) Inmuno Doble Difusión

La prueba de IDD no presentó ninguna banda de identidad antígeno/anticuerpo en ninguno de los antígenos A, B, C (Figura 4). La prueba positiva al antígeno de *Toxocara canis*, confirmó la confiabilidad del sistema, por lo que se supuso que los antígenos estaban muy diluidos.

En la figura 5, observamos la IDD de los antígenos concentrados. Se probaron por separado fracciones de alto y bajo peso molecular, obtenidas por filtración en Centricon™, de los antígenos A, B y C, sin observar bandas de reacción antígeno/anticuerpo en ningún caso.

B) Resultados de prueba de ELISA

A diferencia de los ensayos con IDD, los antígenos sí mostraron reactividad al ser probados con ELISA. Respecto a los antígenos A y C (gráficas 1 y 3), observamos valores mayores de absorbancia en los sueros positivos a *Coccidioides*, al hacer la comparación estadística entre estos sueros y los positivos a *Histoplasma*, con el suero de paciente sin ningún tipo de micosis, se obtuvieron diferencias significativas; sin embargo, con el antígeno B (Gráfica 2), los resultados mostraron mayor especificidad, puesto que existieron diferencias estadísticamente significativas tanto con el suero de paciente sano como con el suero del paciente con histoplasmosis.

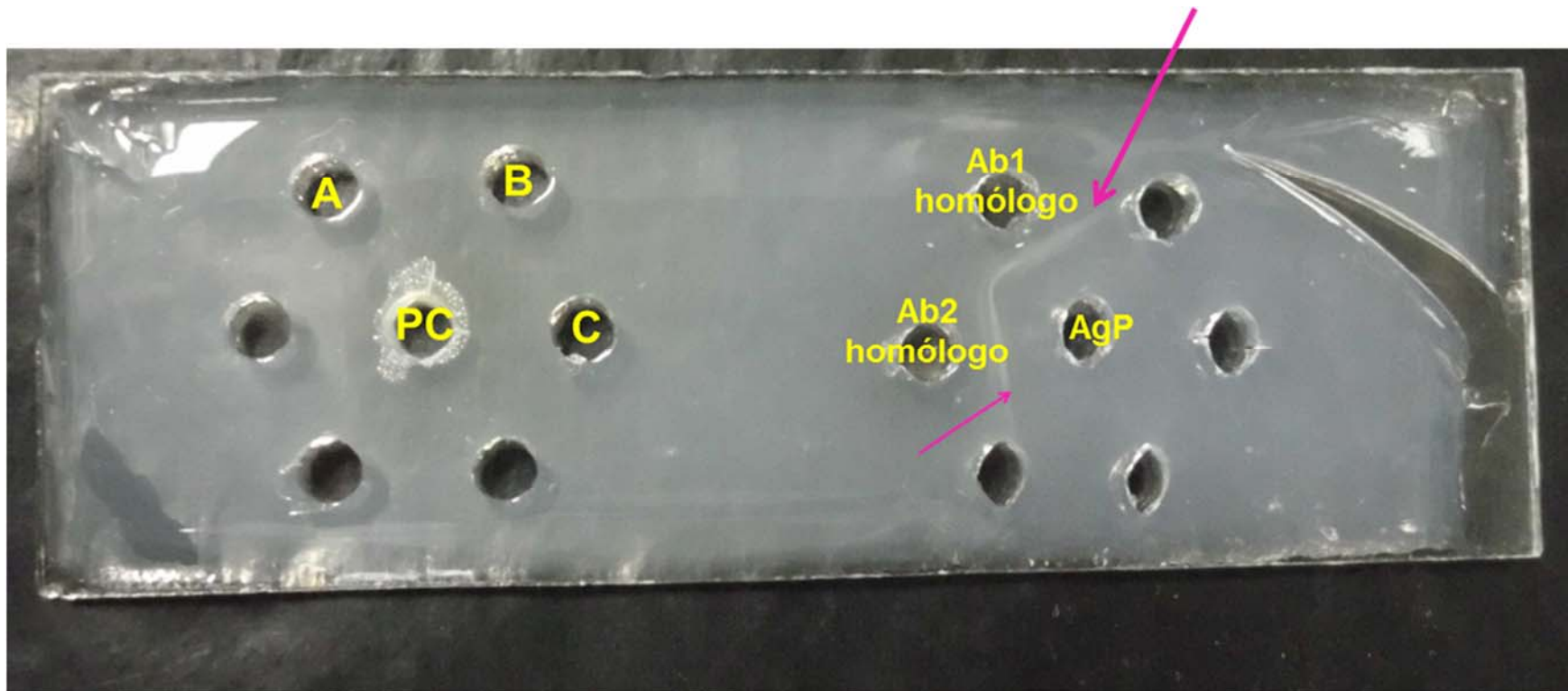


Figura 4. IDD de coccidioidinas crudas (A, B y C); PC= Suero positivo a coccidioidomicosis; AgP= Antígeno de *Toxocara canis*; Ab1 y Ab2=Sueros homólogos al AgP. Flecha rosa= Banda de identidad antígeno/ anticuerpo.

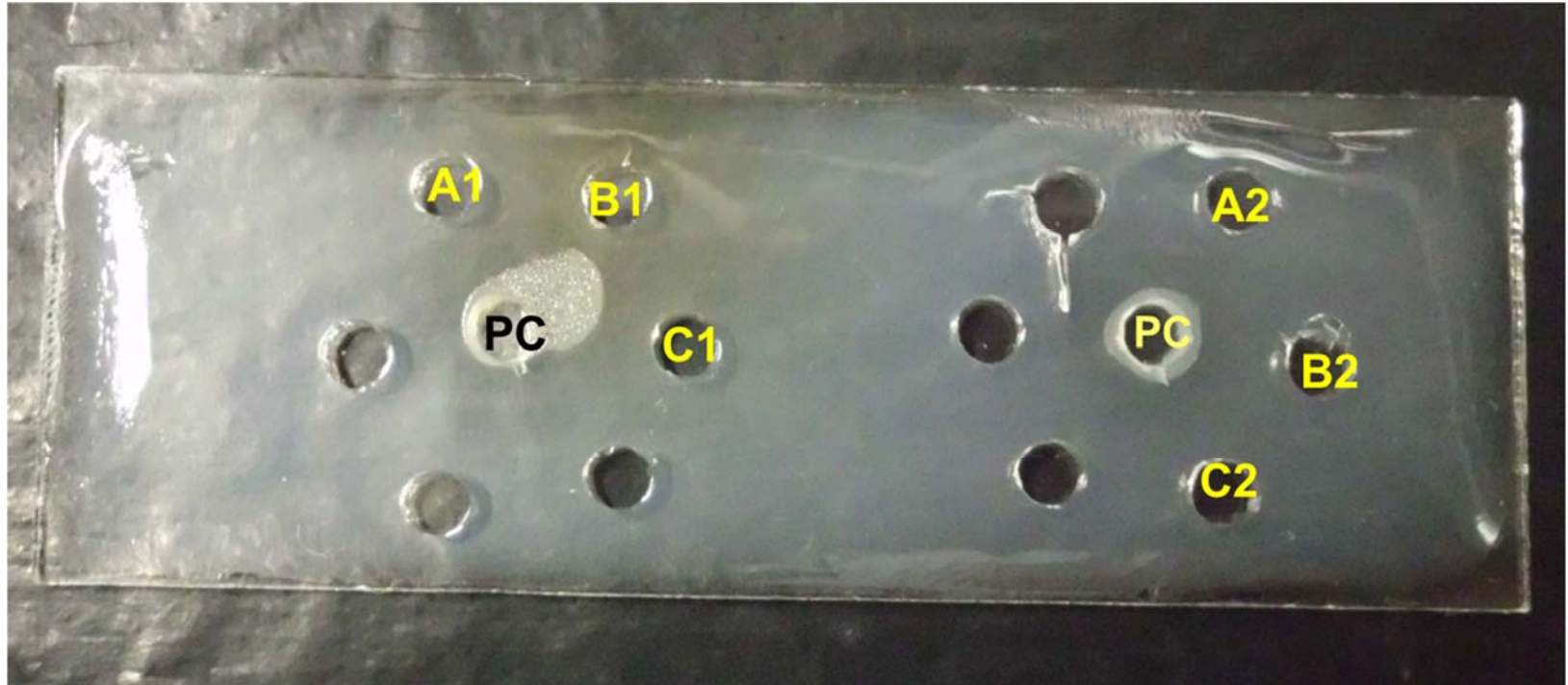
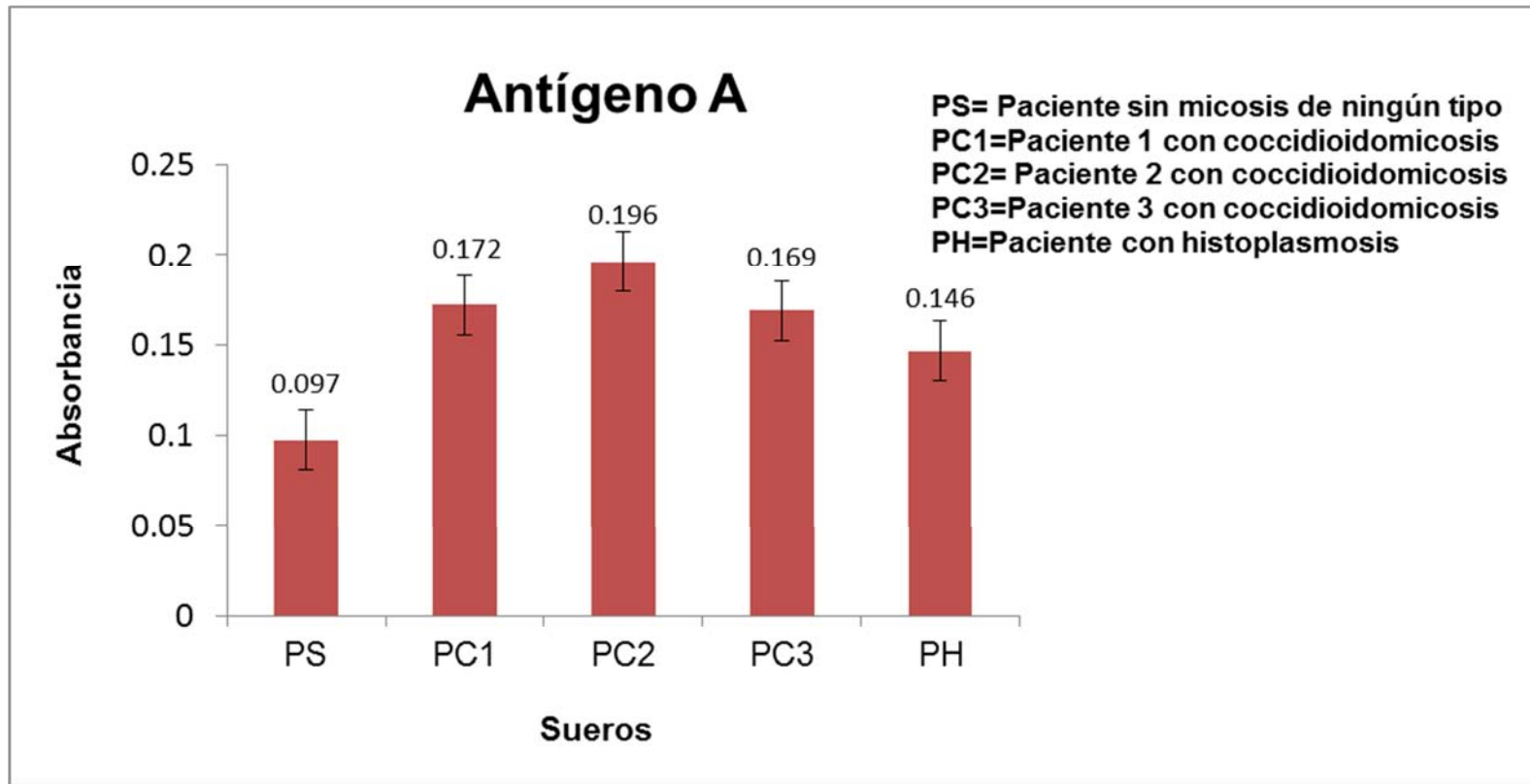
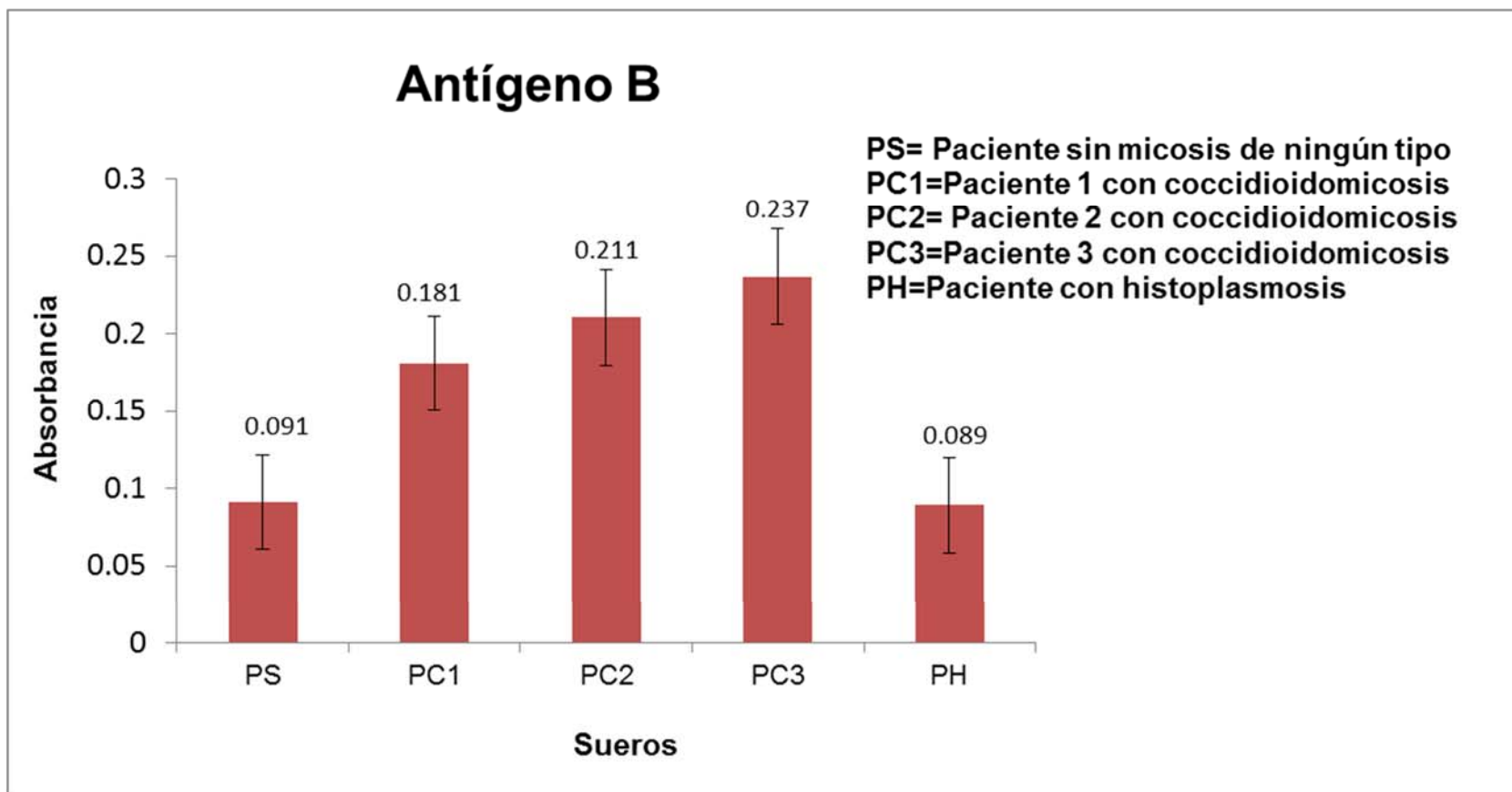


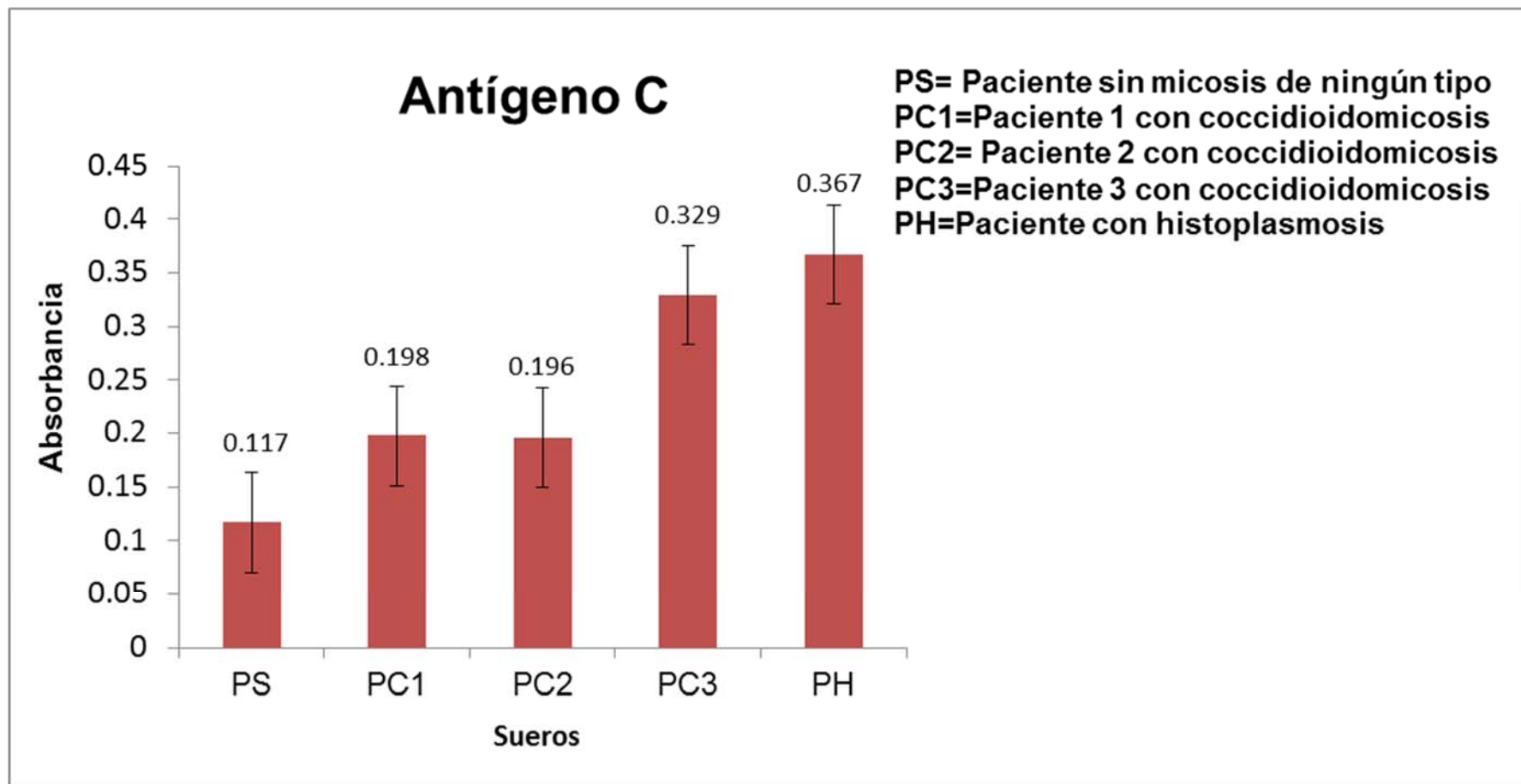
Figura 5. IDD con fracciones de la coccidioidina; A1, B1 y C1= Fracciones de alto peso molecular; A2, B2 y C2= Fracciones de bajo peso molecular, PC= Suero.



Gráfica 1. Resultados de la reacción de la coccidioidina A con los sueros controles positivos y negativos. La diferencia significativa en tres mediciones, sólo se observó con el suero del paciente sano (negativo). Se infiere reacción cruzada con el suero del paciente con histoplasmosis (PH).



Gráfica 2. Resultados de la reacción de la coccidioidina B con los sueros controles positivos y negativos. La diferencia significativa en tres mediciones, sólo se observó con el suero del paciente sano (negativo). No se observó reacción cruzada con el suero del paciente con histoplasmosis (PH).



Gráfica 3. Resultados de la reacción de la coccidioidina C con los sueros controles positivos y negativos. La diferencia significativa en tres mediciones, sólo se observó con el suero del paciente sano (negativo). Se infiere reacción cruzada con el suero del paciente con histoplasmosis (PH).

Métodos físicoquímicos

A) Cuantificación de Proteínas por BCA

Las concentraciones de proteínas se encuentran anotadas en el cuadro 1.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La tinción de Coomassie no reveló la migración proteica, pero en la figura 6 se muestra el SDS-PAGE realizado para separar e identificar los componentes de los antígenos con la tinción de plata. Se observaron bandas que comparten el mismo peso molecular entre los tres diferentes antígenos y bandas únicas con pesos moleculares particulares (Tabla 2).

B) Cromatografía de Alta presión HPLC

Al finalizar la purificación por HPLC, se colectaron dos fracciones (Fr) para el antígeno A (Fig. 7), cuatro fracciones para el antígeno B (Fig. 8) y ninguna fracción para el antígeno C (Fig. 9). Debido a que no se definió fracción alguna con el antígeno C (ni por intercambio catiónico, ni por exclusión molecular), se continuó el trabajo sólo con las seis fracciones obtenidas.

C) MALDI-TOF

Respecto al análisis por MALDI-TOF, únicamente se pudieron analizar con esta técnica los antígenos iniciales A y B concentrados, observándose que muestran una diversa presencia de componentes, (figuras 10 y 11). Las fracciones obtenidas de la purificación no pudieron ser analizadas con la técnica, a pesar de ser probadas con diferentes matrices a diferentes concentraciones.

CUADRO 1. Concentración de proteínas medida por el método de BCA en los antígenos estudiados.

IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO	CLAVE ORIGINAL	Concentración de proteínas µg/mL
A	INDRE (Cocci 3856-5853)	4,526
B	INDRE (Cocci-12)	5,392
C	INDRE (Cocci-09)	7,627

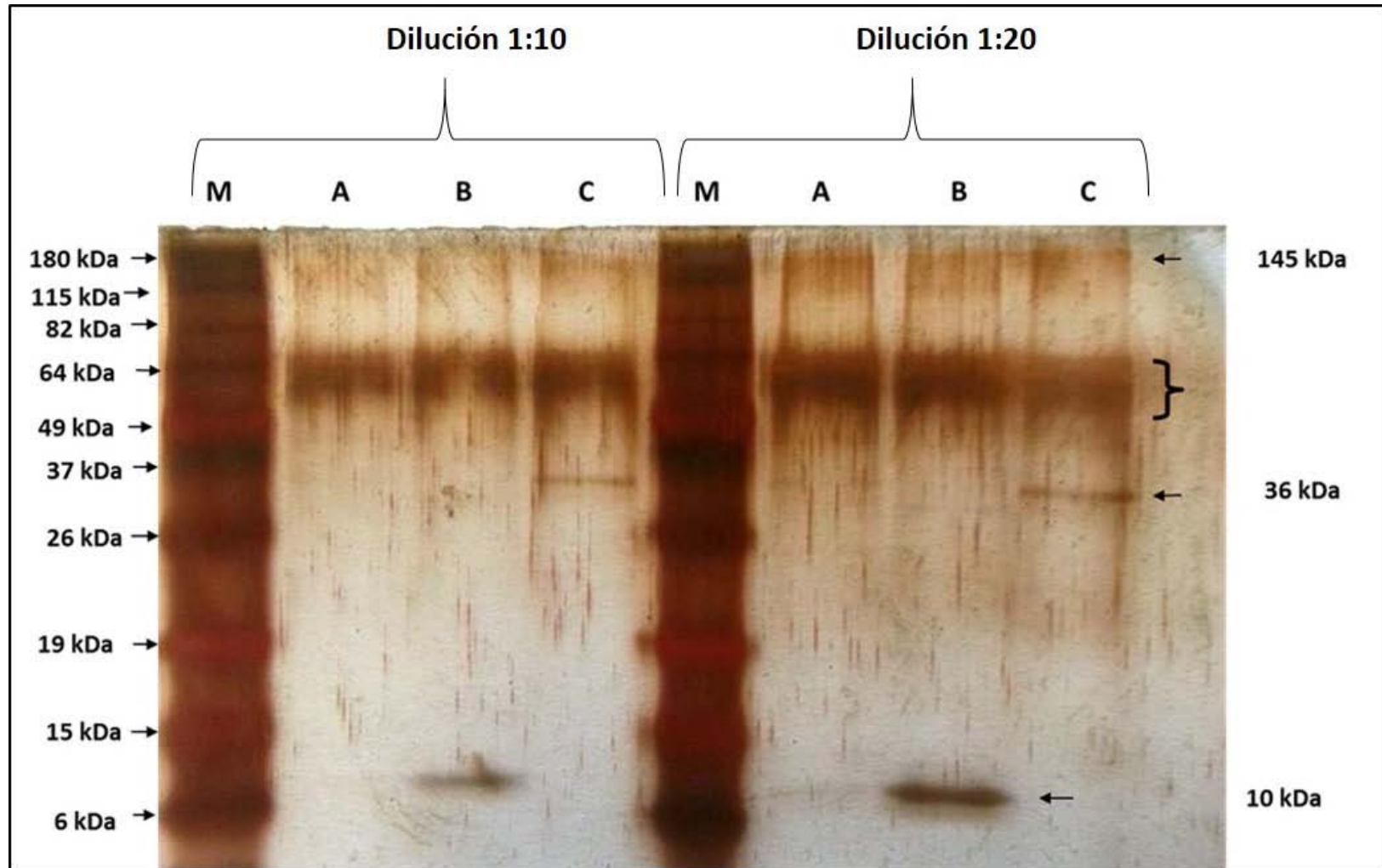


Figura 6. Gel SDS-PAGE 12%. M=Marcador de PM, A= Coccidioidina A; B = Coccidioidina B; C= Coccidioidina C.

Cuadro 2. Valor de peso molecular del total de bandas observadas por antígeno.

Antígeno A		Antígeno B		Antígeno C	
Distancia de la Banda (mm)	Peso Molecular (kDa)	Distancia de la Banda (mm)	Peso Molecular (kDa)	Distancia de la Banda (mm)	Peso Molecular (kDa)
3	144	3	144	3	144
14	96	16	89	16	89
17	85	19	79	19	79
19	79	21	73	22	70
		73	10	39	37

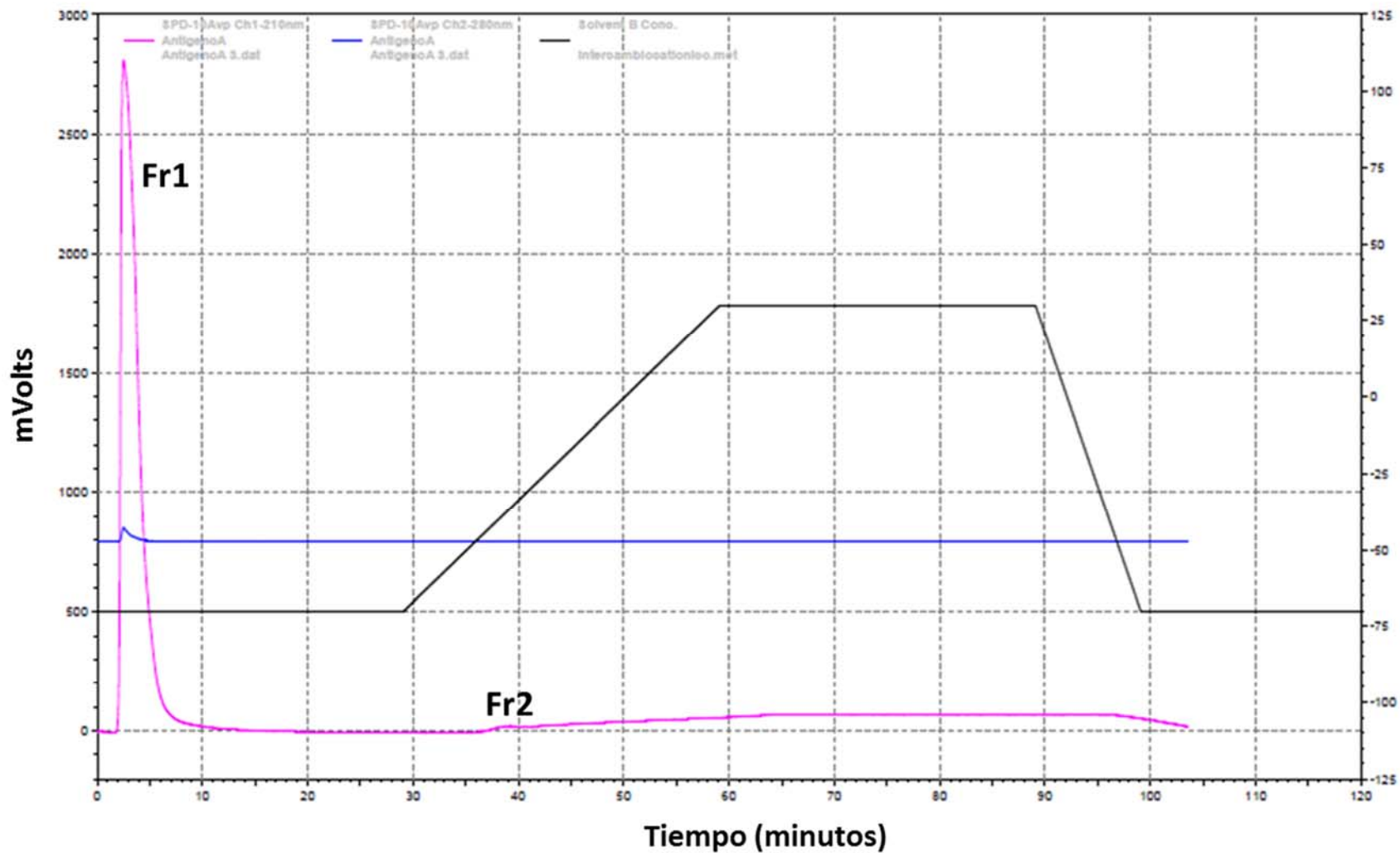


Figura 7. Cromatograma de intercambio catiónico del antígeno A. Fr=Fracciones observadas. Línea negra representa el método cromatográfico utilizado. Línea rosa señala la absorbancia a 210 nm y línea azul a 280 nm.

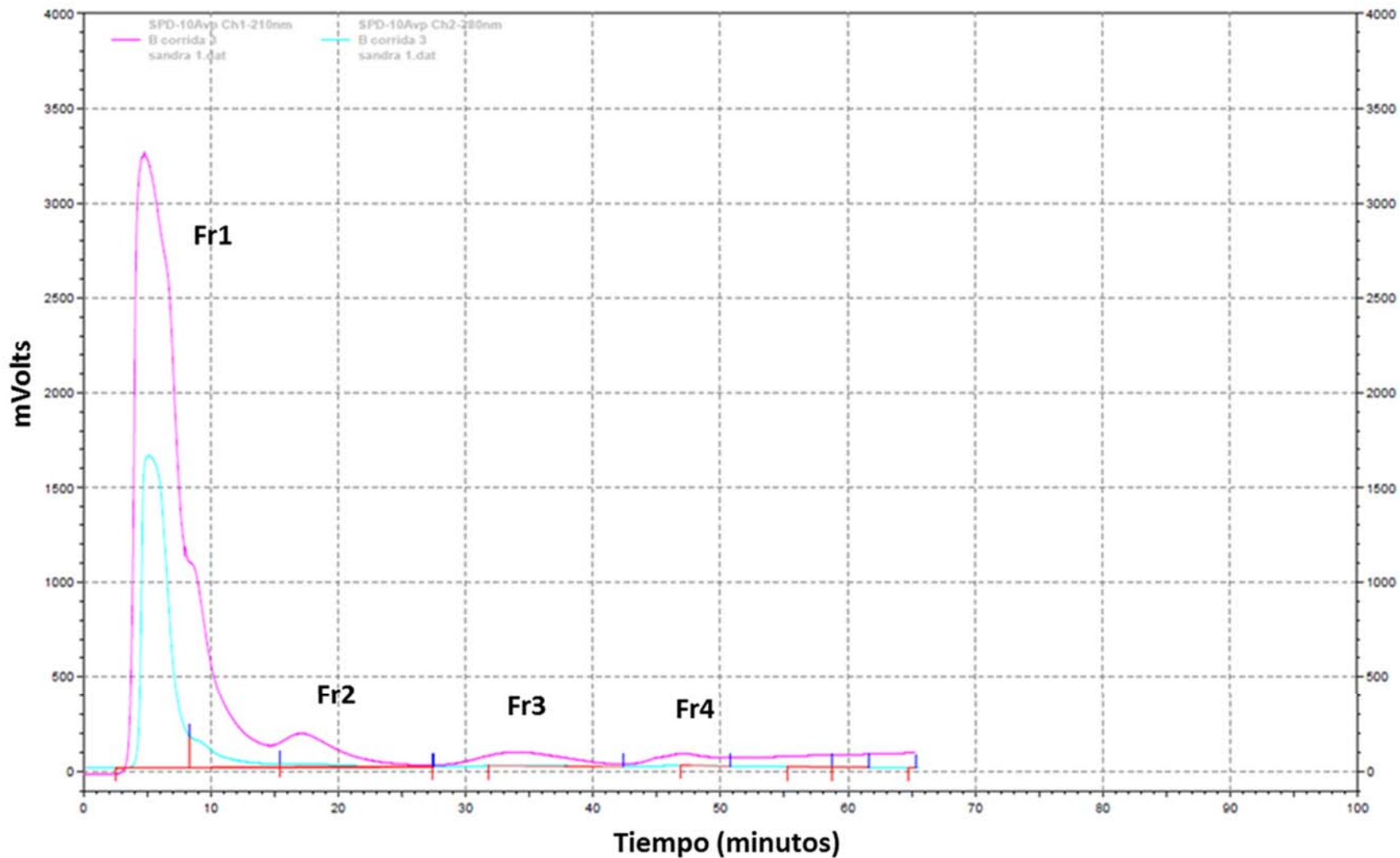


Figura 8. Cromatograma de intercambio catiónico del antígeno B. Fr=Fracciones observadas. Línea rosa señala la absorbancia a 210 nm y línea azul a 280 nm.

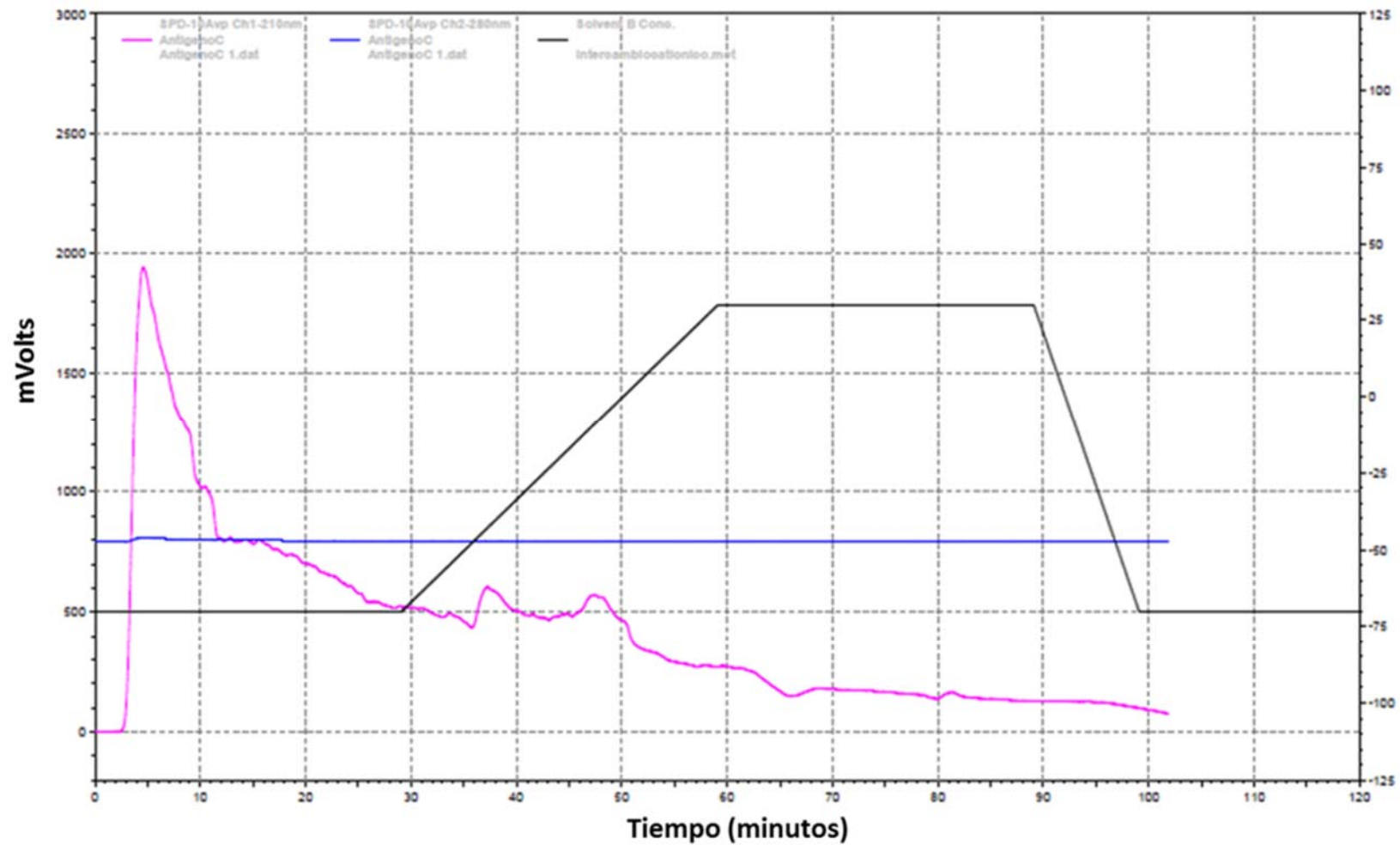


Figura 9. Cromatograma de intercambio catiónico del antígeno C. No se evidencia la homogeneidad para alguna fracción. Línea negra método cromatográfico utilizado. Línea rosa señala la absorbancia a 210 nm y línea azul a 280 nm

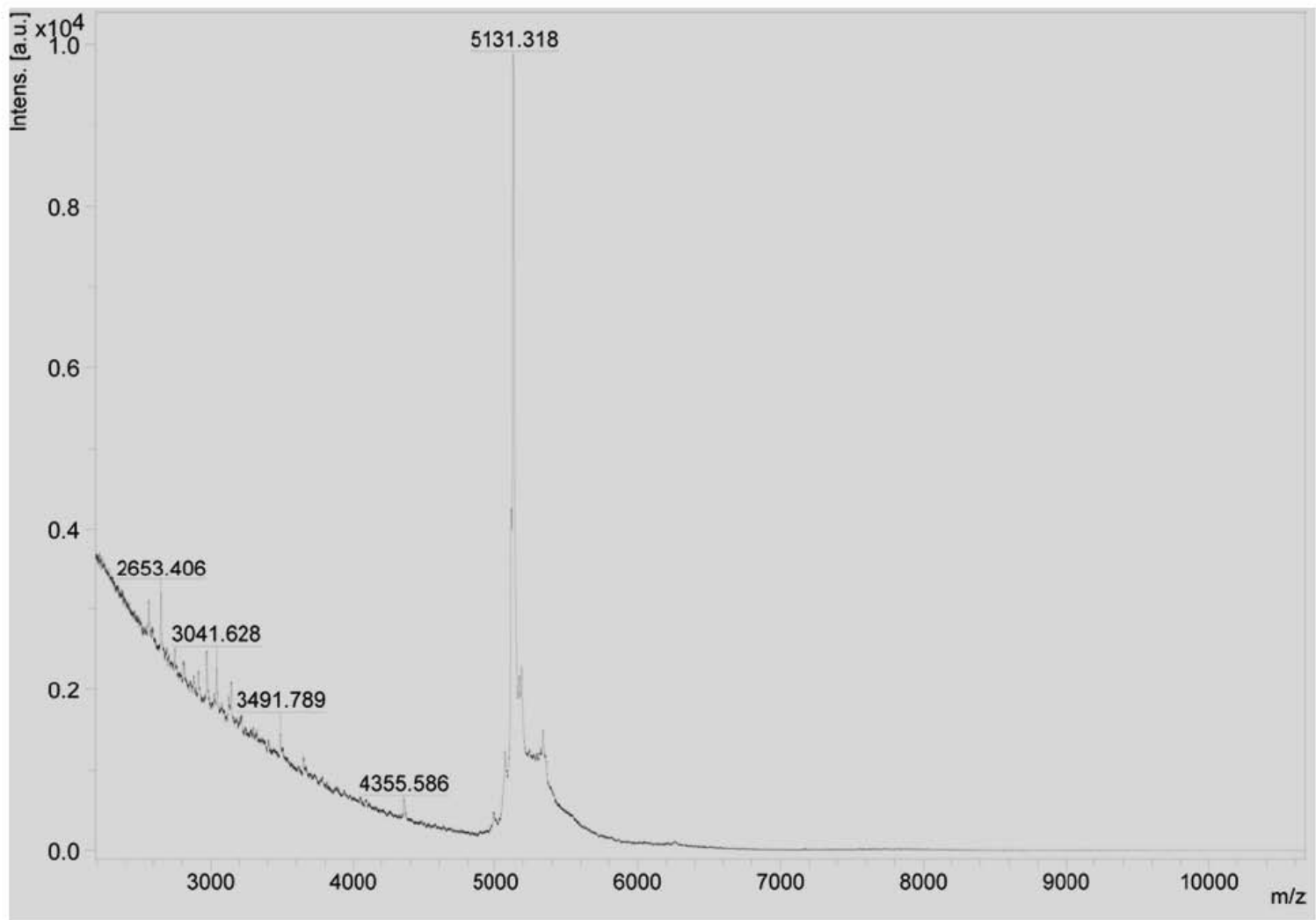


Figura 10. Espectrograma de masas del antígeno crudo A con matriz SA+ THA 1:5.

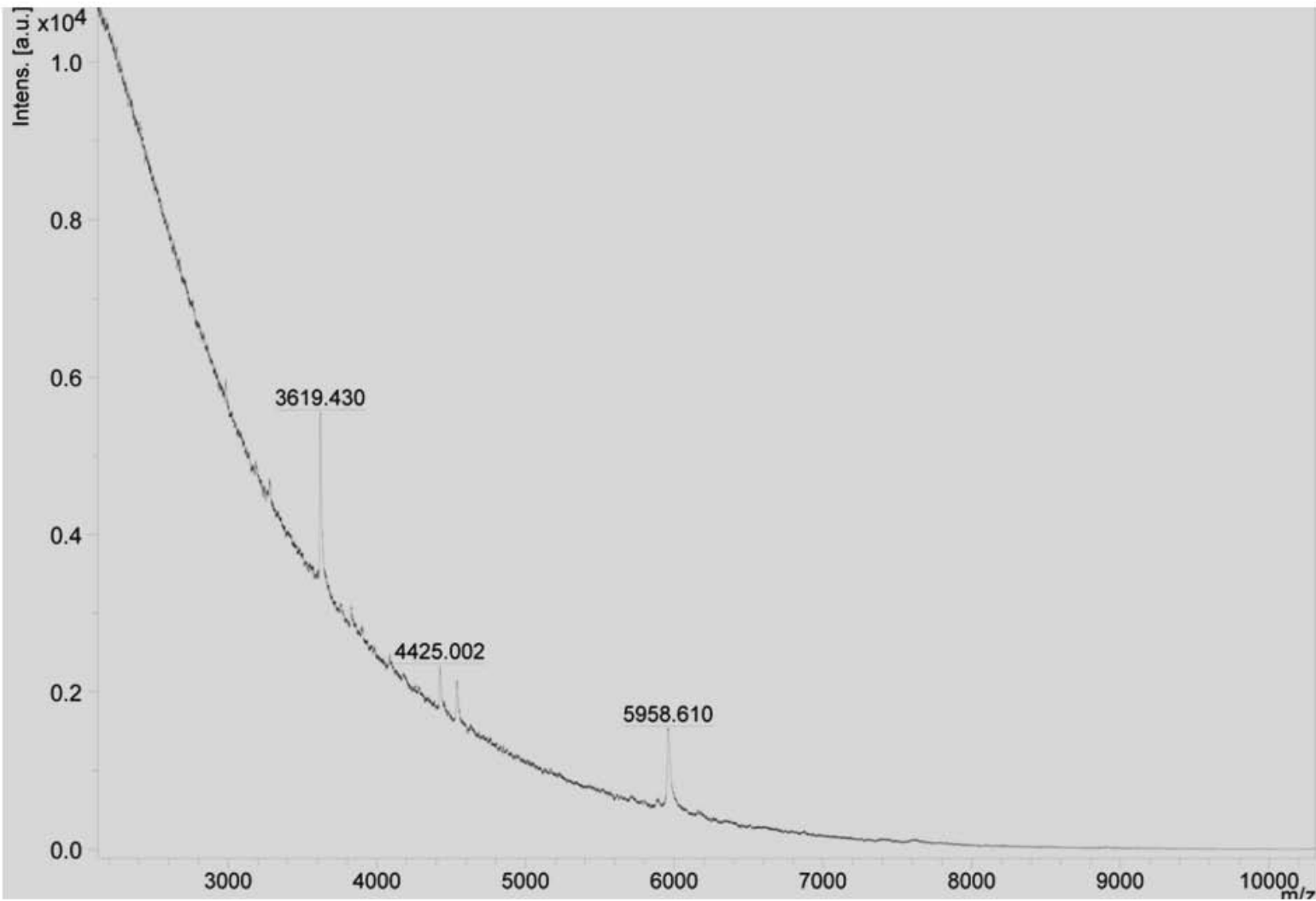


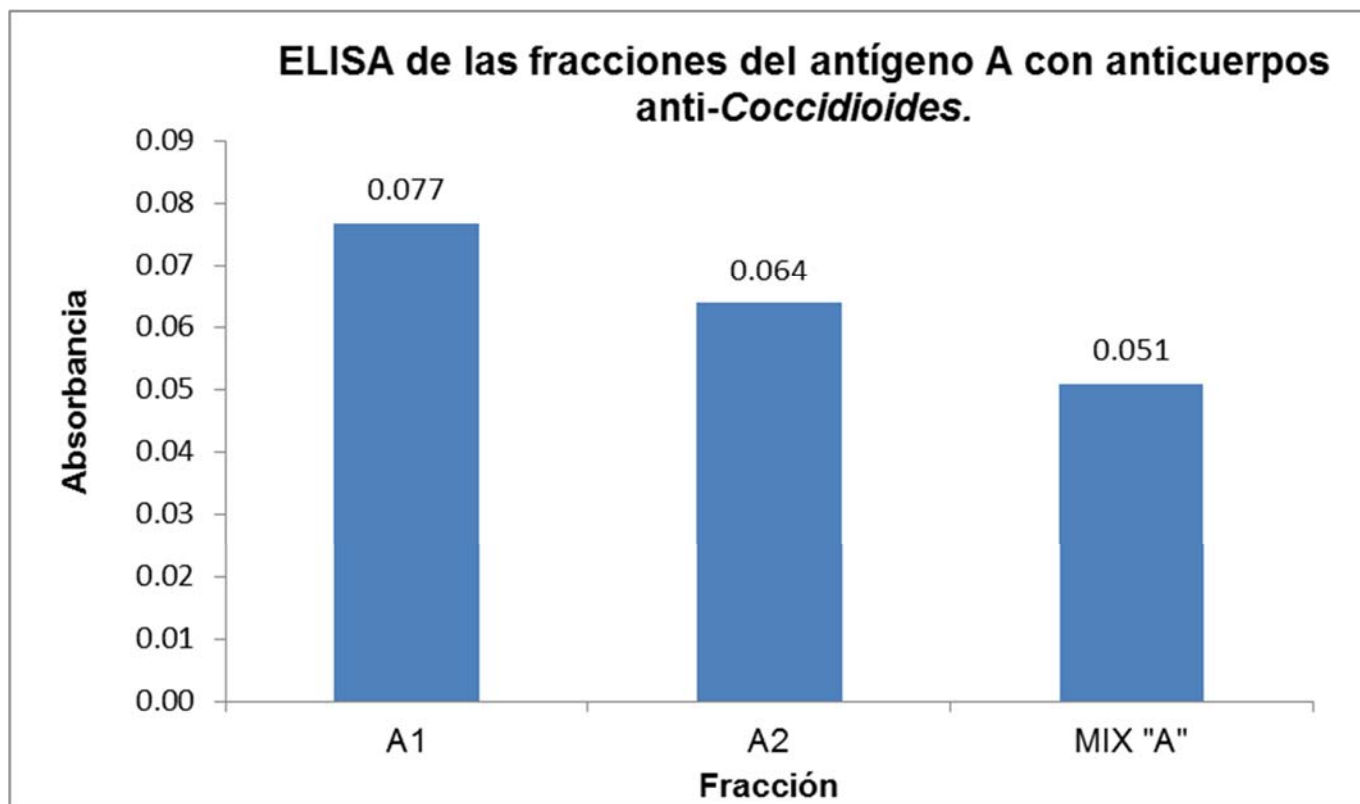
Figura 11. Espectrograma de masas del antígeno crudo B con matriz SA+DHB+THA 1:10.

D) Corroboración de reactividad

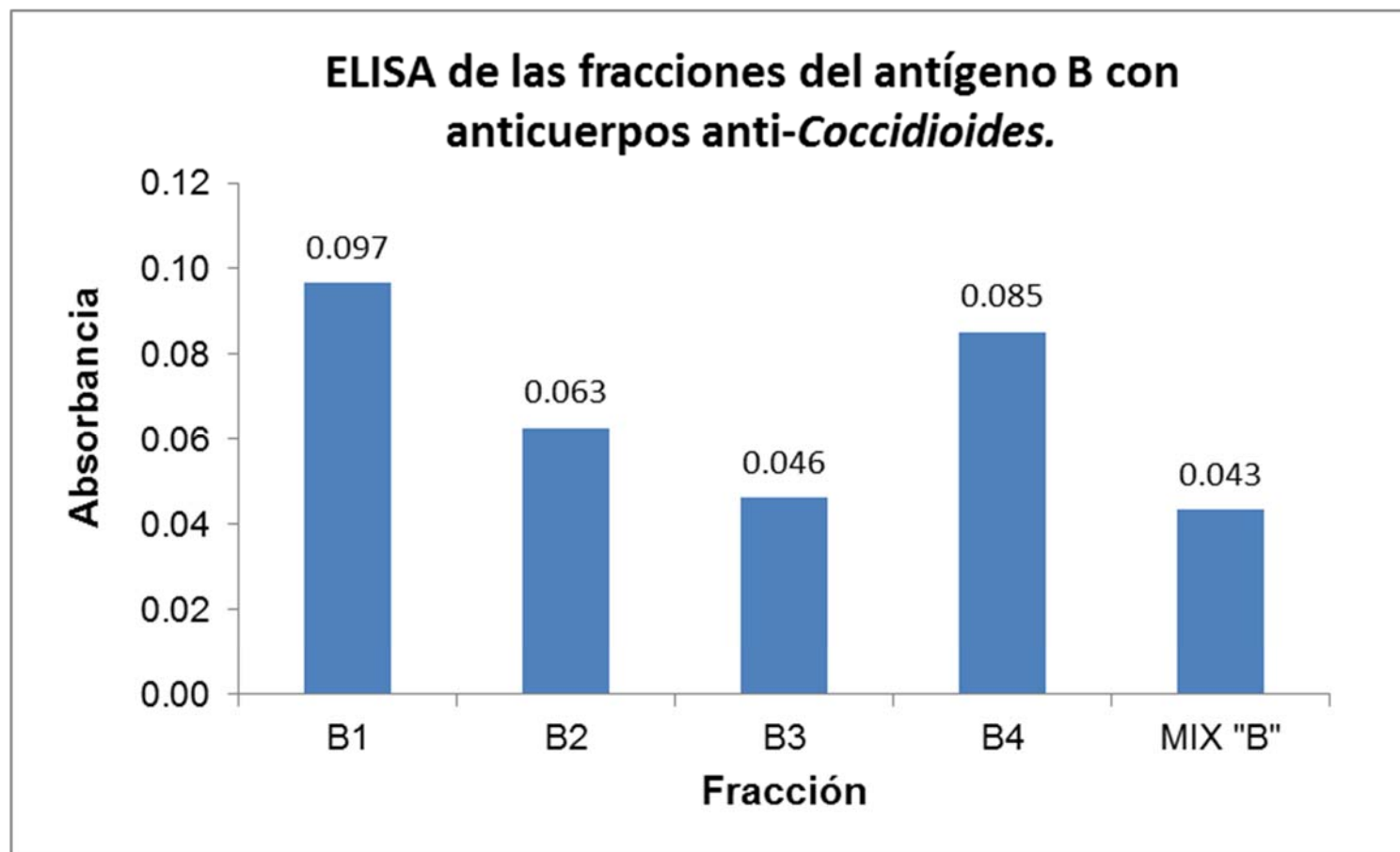
Los resultados con ELISA de los antígenos A y B con todos los sueros experimentales, arrojaron un punto de corte igual a 0.138 de absorbancia para el antígeno A y 0.147 para el antígeno B.

Las pruebas de ELISA elaboradas exclusivamente con los sueros de pacientes diagnosticados con coccidioidomicosis demostraron que todos los demás antígenos, completos y fraccionados, tienen lecturas de absorbancia por debajo de los puntos de corte establecidos (Gráficas 4 y 5).

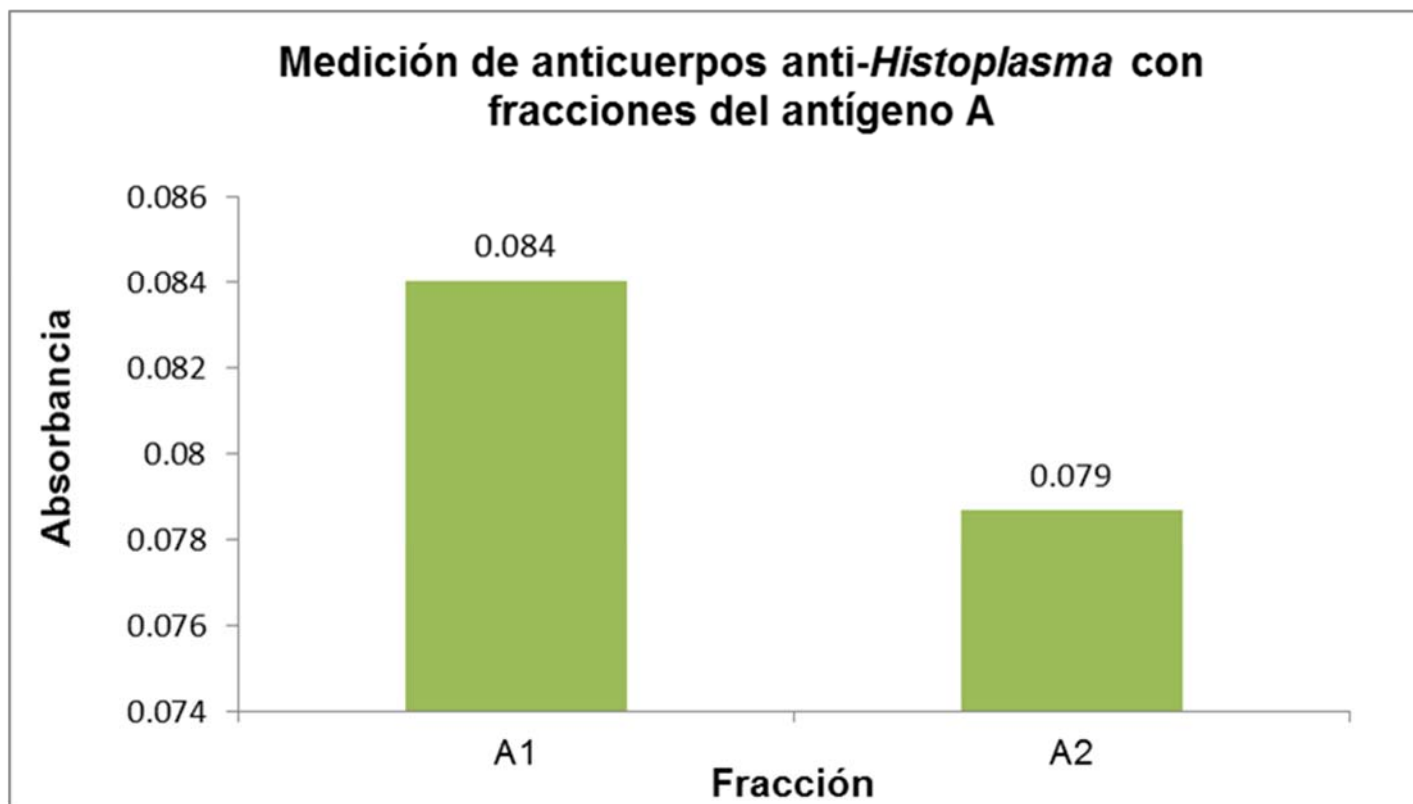
En cuanto a las pruebas con los anticuerpos anti-*Histoplasma*, solamente la fracción B4, mostró una alta sensibilidad al reconocimiento de dichos anticuerpos mientras que las otras fracciones resultaron negativas (gráficas 6 y 7).



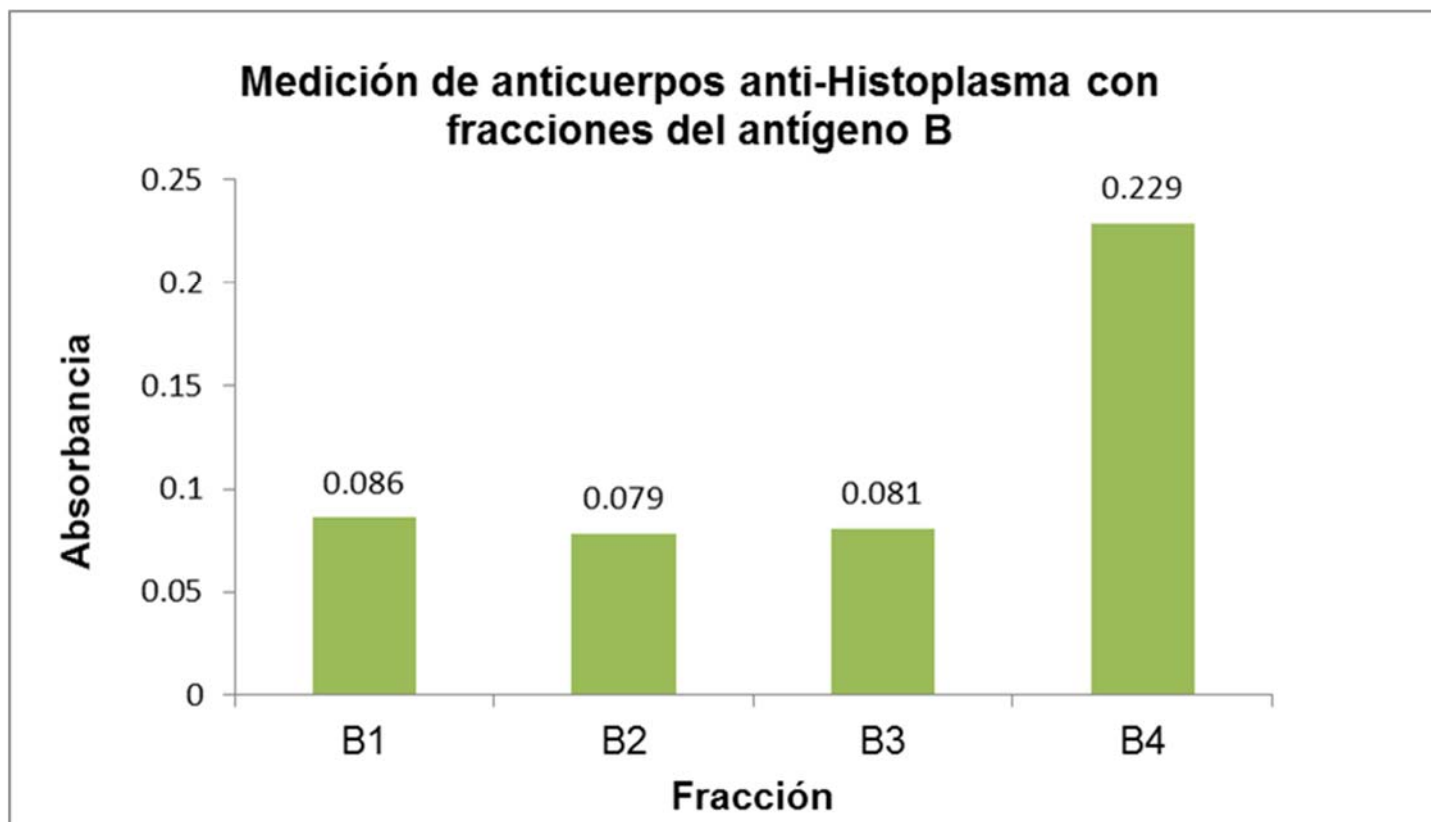
Gráfica 4. ELISA de las fracciones obtenidas por HPLC del antígeno A y un MIX. Los valores de absorbancia caen debajo del punto de corte, por lo tanto son negativos y se infiere que no hay reacción antígeno/ anticuerpo.



Gráfica 5. ELISA de las fracciones obtenidas por HPLC del antígeno B y un MIX. Los valores de absorbancia caen debajo del punto de corte, por lo tanto son negativos y se infiere que no hay reacción antígeno/ anticuerpo.



Gráfica 6. ELISA de suero de paciente positivo a histoplasmosis probado con las fracciones obtenidas por HPLC del antígeno A. No hay reconocimiento antígeno/anticuerpo debido a que los valores caen por debajo del punto de corte.



Gráfica 7. ELISA de suero de paciente positivo a histoplasmosis probado con las fracciones obtenidas por HPLC del antígeno B. Solamente se observa un valor encima del punto de corte de la fracción B4, la única que muestra reacción antígeno/anticuerpo y que infiere una reacción cruzada.

IX. Discusión

Las pruebas iniciales de reactividad biológica con los antígenos proporcionados demostraron que la prueba de IDD, en la que no hubo reacción antígeno/anticuerpo (Ag/Ac), es menos sensible que ELISA.

En ELISA con los antígenos iniciales (Gráficas 1, 2 y 3), las pruebas estadísticas (Anexo 2) aplicadas apoyan la reacción Ag/Ac, pues aunque también se obtuvieron lecturas de absorbancia en los sueros de pacientes sanos, la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa.

Asimismo, con el suero del paciente positivo a histoplasmosis, se observó reacción Ag/Ac con los antígenos A y C, lo que demostró reacción cruzada, mientras que con el antígeno B se obtuvo mayor especificidad (t de Student = .617 $p > 0.05$).

La literatura explica que las reacciones cruzadas son frecuentes, especialmente en los antígenos metabólicos denominados crudos, entre otras cosas, porque esos antígenos son el resultando de muy diversas moléculas secretadas, a través de la pared celular, al ambiente externo del hongo. Los anticuerpos reconocen a las moléculas mencionadas anteriormente, mas no son anticuerpos específicos que discrimen el género o la especie del hongo involucrado. En nuestro caso, los resultados obtenidos demuestran que el antígeno A y C, comparten moléculas entre *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides* spp. (Filho et al., 2012; Rodr et al., 2008), lo que es un hecho comúnmente referido.

La concentración proteica, medida por BCA en los tres lotes de antígenos, indica que, a pesar de ser un mismo antígeno, elaborado bajo las mismas condiciones, los lotes muestran una concentración proteica distinta, lo que puede estar asociado con la composición. Las diferencias entre nuestras coccidioidinas únicamente radicaban en su fecha de fabricación, puesto que fueron elaboradas de una misma cepa y bajo las mismas condiciones, diferencias que han sido observadas por otros autores (Hernández-Nevarez, 2009).

El gel SDS-PAGE mostró que el perfil de bandeo es muy similar entre las tres coccidioidinas (Fig 6). Inicialmente los tres antígenos compartieron bandas de peso molecular ubicadas entre los 70-96 y 144 kDa (Tabla 2), además el Ag B

mostró una banda aislada de 10 kDa y el C una de 37 kDa, resultados similares han sido encontrados por otros autores (Hernández-Navarez, 2009; Anderson, *et.al.*, 1971; Cole *et.al.*, 1991; Filho *et al.*, 2012). Es muy probable que la composición antigénica sea variable aun cuando el proceso del antígeno sea efectuado bajo las mismas condiciones. Los extractos fúngicos son muy variables en cuanto a su actividad biológica, lo que puede estar explicado por la actividad metabólica intrínseca de cada microorganismo, por consiguiente, esto ha representado uno de los problemas más grandes que existen para el estudio de la estandarización de las pruebas serológicas.

De las fracciones por HPLC seleccionadas, la fracción 1 obtenida en los antígenos A y B (Fig 7 y 8) es similar a una obtenida en el estudio de Cole (1991), que la clasificó como una glicoproteína. En los cromatogramas, se observa que las absorbancias son más evidentes cuando se leen a 210 nm que a 280 nm; esto es debido a que las moléculas de interés biológico tienen una variedad de cromóforos UV intrínsecos, además de los que están asociados con otros cromóforos UV y visible en la forma de cofactores, grupos prostéticos y sustratos. El grupo de péptidos de la cadena principal de una proteína absorbe la luz en un rango de 180 a 230 nm. Las cadenas que tienen residuos aromáticos (región aromática) sólo absorben la luz en un rango de 240 a 300 nm (Arenas & López, 2004). Lo anterior implicaría que solamente en la fracción 1 de ambos antígenos hay presencia de péptidos aromáticos debido a que es donde se aprecia una mayor intensidad en la línea de absorbancia a 280 nm (línea azul de figuras 7 y 8).

Respecto a la sensibilidad y especificidad de las diferentes fracciones probadas en ELISA, los resultados nos muestran que las proteínas incluidas en cada fracción no son reconocidas por los anticuerpos anti-*Coccidioides*. Con los antígenos crudos concentrados, la prueba enzimática demostró la unión Ag/Ac, pero contrariamente a lo esperado, con las fracciones no se detectó reacción alguna (Gráficas 4 y 5). Este resultado puede interpretarse como que es posible que el antígeno solamente funcione en tándem y, al ser parcialmente purificado, pierda su actividad, puesto que las fracciones individuales no son reconocidas por los anticuerpos anti-*Coccidioides*. Otra posibilidad es que las proteínas que contienen los antígenos se desnaturalicen por diversas causas, como el método

de purificación utilizado, en el que los extractos se someten a cierta presión y alto contenido de sales que modifican la constitución y/o la conformación de la proteína, lo cual puede conducir a la pérdida de la actividad biológica (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012); es decir, en el no reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos. Lo anterior explica también lo observado con las mezclas, pues al ser integradas las fracciones, se deduce que la mezcla cuenta con las mismas proteínas y componentes del antígeno crudo completo y por lo tanto con un reconocimiento similar por parte de los anticuerpos; sin embargo, no sucedió así (gráficas 4 y 5).

Aun cuando los ensayos con sueros anti-*Coccidioides* dieron resultados negativos, se investigó si las fracciones antigénicas obtenidas por HPLC eran reconocidas por anticuerpos anti-*Histoplasma* y de las cinco fracciones obtenidas, sólo aquella identificada como B4 resultó positiva (gráficas 6 y 7), resultado que no se esperaba ya que en el inicio el antígeno crudo B, fue el único de los tres antígenos que no presentó reacción cruzada con el suero anti-*Histoplasma*. Una posible explicación de ese hecho, se basa en el reconocimiento de epítopes específicos contenidos inicialmente en el antígeno crudo. Por impedimento estéreo-químico, muy posiblemente no estaban lo suficientemente expuestos para ser reconocidos; sin embargo, por las modificaciones resultantes de los tratamientos de fraccionamiento, los epítopes fueron expuestos haciendo efectivo su reconocimiento por los anticuerpos anti-*Histoplasma*.

En el intento del análisis proteómico con las diferentes fracciones, no fue exitoso. Aun cuando fueron probadas cuatro diferentes matrices, sólo obtuvimos resultados en dos de ellas (ácido sinapínico y THA) pero con los antígenos crudos y en cuyos espectrogramas resultantes se deduce la presencia de múltiples componentes proteínicos muy heterogéneos, sin definición alguna. Las muestras de las fracciones no pudieron analizarse muy probablemente a que por su composición, la vaporización e ionización de las mismas no fue efectiva con diferentes matrices y a diferentes concentraciones, consecuentemente no pudieron ser detectadas por el sistema.

X. Conclusiones

Purificar la coccidioidina es un proceso complejo debido a la naturaleza metabólica del antígeno, además su purificación dilucida los elementos que la componen, mas no necesariamente refleja una función biológica en pruebas inmunológicas como la ELISA.

Los tratamientos fisicoquímicos empleados para la purificación del antígeno, alteraron los epítopes, de tal forma que los anticuerpos anti-*Coccidioides*, no pudieron reconocerlos. Para los estudios serológicos, es importante la normalización, en cuanto a su composición, de los antígenos usados para disponer de extractos de características biológicas similares en cualquier lugar del mundo.

Los problemas de reacciones inmunológicas cruzadas, e inclusive el análisis fisicoquímico de la coccidioidina, muy probablemente sean abatidos con el uso de un antígeno somático y no metabólico.

La elaboración de los antígenos metabólicos, como la coccidioidina en este estudio, tiene numerosas bondades como que son económicos, inocuos y de fácil manejo; sin embargo, por la experiencia obtenida es procedente que con las normas de bioseguridad vigentes y con el objetivo de obtener pruebas diagnósticas confiables y eficientes, se intente la fabricación de un antígeno somático, cuya caracterización sea mucho más exitosa.

XI. Perspectivas

Para observar una reacción antígeno/anticuerpo en la prueba de ELISA con las fracciones obtenidas, evaluar éstas, probando la técnica a diferentes condiciones, es decir, modificando la cantidad óptima de suero y examinar diluciones diferentes a 1:3000 de conjugado. Asimismo realizar las pruebas con una n mayor de sueros para obtener datos significativos al momento de la búsqueda de un punto de corte y la normalización de los datos.

Caracterizar la coccidioidina y las fracciones purificadas mediante técnicas; que evalúen otro tipo de compuestos, como carbohidratos, lípidos, metabolitos secundarios, que son extraídos de la filtración del hongo para la obtención del antígeno y que pueden ser identificados por los anticuerpos anti- *Coccidioides*.

Obtener información de la reactividad de la fracción B4, probando un pool de sueros con anticuerpos anti-*Histoplasma* mayor al que se trabajó en este estudio, para considerar la posibilidad de que , a partir de esta fracción, se obtenga un antígeno que reconozca dichos anticuerpos y caracterizarlo.

Probar la cromatografía por HPLC con un pH distinto (uno menor) en los amortiguadores de corrida, para modificar la retención de los iones de la coccidioidina por la columna y así observar si hay un cambio en el número de fracciones y el tiempo en el que éstas son colectadas.

XII. Bibliografía

- Álvarez-Gómez, A. L. (2013). *Seroprevalencia de Coccidioides spp. en perros habitantes de Torreón, Coahuila*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, pp 1-66.
- Anderson, K. L., Wheat, R. W., & Conant, N. F. (1971). Fractionation and composition studies of skin test-active components of sensitins from *Coccidioides immitis*. *Applied Microbiology*, 22(3), 294–299.
- Arango, A. (2012). Diagnóstico micológico : del examen directo a los métodos moleculares Resumen. *Asoc Colomb Dermatol*, 20(1), 76–82.
- Arenas, R. (2011). *Micología médica ilustrada* (4th ed.).
- Arenas-Sosa, I., & López-Sánchez, J. L. (2004). *Métodos de laboratorio: Espectrofotometría de absorción*. Cuernavaca, Morelos.
- Baptista Rosas, R. C., & Riquelme, M. (2007). Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(2), 100–105.
- Bercovitch, R. S., Catanzaro, A., Schwartz, B. S., Pappagianis, D., Watts, D. H., & Ampel, N. M. (2011). Coccidioidomycosis During Pregnancy : A Review and Recommendations for Management, 53.
- Bollag, D. M., & Edelstein, S. T. (1991). *Protein methods*. (Wiley-Liss, Ed.). United States of America.
- Borchers, A. T., & Gershwin, M. E. (2010). Autoimmunity Reviews The immune response in Coccidioidomycosis. *Autoimmunity Reviews*, 10(2), 94–102.
- Brown, J., Benedict, K., Park, B. J., & Iii, G. R. T. (2013). Coccidioidomycosis : Epidemiology. *Clinical Epidemiology*, (5), 185–197.
- Calderón, R. V. (2007). *Curso de inlunología: Inmunoquímica*. Cuernavaca, Morelos.
- Carrada-bravo, T. (2014). Los métodos de laboratorio en el diagnóstico de la coccidioidomicosis. *Revista Chilena de Infectología*, 31(3), 293–297.
- Castañón Olivares, L. R., Aroch Calderón, A., Bazán Mora, E., & Córdova

- Martínez, E. (2004). Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Rev Fac Med UNAM*, 47, 145–148.
- Castañón-Olivares, L. R., Laniado-Laborín, R., Concepcion, T., Muñoz-Hernández, B., Aroch-Calderón, A., Aranda-Urbe, I. S., ... Pérez-Mejía, A. (2010). Clinical Comparison of Two Mexican Coccidioidins. *Mycopathologia*, 169(6), 427–430.
- Chiller, T. M., Galgiani, J. N., & Stevens, D. a. (2003). Coccidioidomycosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17(1), 41–57.
- Cole, G. T., Kruse, D., & Seshan, K. R. (1991). Antigen complex of *Coccidioides immitis* which elicits a precipitin antibody response in patients. *Infection and Immunity*, 59(7), 2434–2446.
- Crum, N. F., Lederman, E. R., Stafford, C. M., Parrish, J. S., & Wallace, M. R. (2004). A Descriptive Survey of a Reemerging Disease. Clinical Characteristics and Current Controversies. *Medicine*, 83(3), 149–175.
- Cuevas Cruz, M. (2015). *Aislamiento, purificación y caracterización de una fosfolipasa en Palythoa caribaeroum*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, pp 1-53.
- Dicaudo, D. J. (2006). Coccidioidomycosis: A review and update. *American Academy of Dermatology*, 55, 929–942.
- Durkin, M., Connolly, P., Kuberski, T., Myers, R., Kubak, B. M., Bruckner, D., ... Wheat, L. J. (2008). Diagnosis of Coccidioidomycosis with Use of the *Coccidioides* Antigen Enzyme Immunoassay, 47, 69–73.
- Filho, R. E., Bandeira, S. P., Brillhante, R. S., Rocha, M. F., Vasconcelos, I. M., Pereira, M. L., ... Sidrim, J. J. (2012). Biochemical characterization of an in-house *Coccidioides* antigen: perspectives for the immunodiagnosis of coccidioidomycosis. *Molecules*, 17(7), 7854–7863.
- Fisher, M. C., Koenig, G. L., White, T. J., & Taylor, J. W. (2002). Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*, 94(1), 73–84.
- Galgiani John N. (2015). Valley Fever (Coccidioidomycosis) Tutorial for Primary Care Professionals. *Southwest Journal of Pulmonary and Critical Care*, 10, 265–288.

- Galgiani, J. N., Ampel, N. M., Blair, J. E., Catanzaro, A., Johnson, R. H., Stevens, D. A., & Williams, P. L. (2005). Coccidioidomycosis, 85723, 1217–1223.
- Hernández-Navarez, A. (2009). *Caracterización del antígeno coccidioidina para intradermorreacción*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. pp 1- 74.
- Huppert, M., Spratt, N. S., Vukovich, K. R., Sun, S. H., & Rice, E. H. (1978). Antigenic analysis of coccidioidin and spherulin determined by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infection and Immunity*, 20(2), 541–551.
- Johnson, L., Gaab, E. M., Sanchez, J., Bui, P. Q., Nobile, C. J., Hoyer, K. K., ... Ojcius, D. M. (2014). Valley fever: danger lurking in a dust cloud. *Microbes and Infection*, pp. 591–600. Elsevier Masson SAS.
- Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L. ., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23–43.
- Mercadillo, P., & Yuil, E. (2012). ELISA and its applications in Dermatology. *Dermatología Cosmética, Médica Y Quirúrgica*, 10(3), 212–222.
- Mondragón-González, R., Méndez-Tovar, L. J., Bernal-Vázquez, E., Hernández-Hernández, F., López-Martínez, R., Manzano-Gayosso, P., ... Anides-Fonseca, A. E. (2005). Detección de infección por Coccidioides immitis en zonas del estado de Coahuila , México, 135–138.
- Moroyoqui, L., & Figueroa, S. (2008). Coccidioidomycosis. *Med Int Mex*, 24(2), 125–142.
- Negróni, R., Arechavala, A., & Maiolo, E. (2010). Coccidioidomycosis. *Med Cutan Iber Lat Am*, 38(5), 179–188.
- Ouchterlony, Ö. (1965). *Gel-Diffusion techniques*. *Immunochemie* (Vol. 15).
- Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1(2), 31–41.
- Portnoy, J. (2004). *Color Atlas of Immunology*. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* (Vol. 93).
- Rodr, M., Liz, C., & Cruz, J. S. (2008). Intradermorreacciones en dermatología. *Dermatología Rev Mex*, 52(4), 160–174.

- Saubolle, M. a., McKellar, P. P., & Sussland, D. (2007). Epidemiologic, Clinical, and Diagnostic Aspects of Coccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 26–30.
- Toriello, C., Jimnez-Montiel, J. a., Reyes-Montes, M. R., & Taylor, M. L. (1993). Two-dimensional immunoelectrophoresis of histoplasmin and a purified polysaccharide-protein antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia*, 122(1), 7–13.
- Voller, A., Bidwell, D., & A, B. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay. In N. . Rose & H. Friedman (Eds.), *Manual of Clinical Immunology* (pp. 359–371). Washington DC.
- Wack, E. E., Ampel, N. M., Sunenshine, R. H., & Galgiani, J. N. (2015). The Return of Delayed-Type Hypersensitivity Skin Testing for Coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 61(5), 787–791.
- Yeo, S. F., & Wong, B. (2002). Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 465–84.

ANEXO 1: SOLUCIONES

<p>Solución 1: Amortiguador de carbonatos pH 9.6.</p> <p>1.59g de Na₂CO₃ 2.93g de NaHCO₃</p> <p>Aforar a 1L con agua destilada.</p>	<p>Solución 2: PBS 1x</p> <p>8.0g de NaCl 0.2g de KH₂PO₄ 2.9g de Na₂HPO₄·12 H₂O 0.2g de KCl,</p> <p>Aforar 1L de agua destilada, pH 7.4.</p>	<p>Solución 3: PBS 1x Tween 20 0.05%</p> <p>8.0g de NaCl 0.2g de KH₂PO₄ 2.9g de Na₂HPO₄·12 H₂O 0.2g de KCl, 0.5 ml de Tween 20</p> <p>Aforar 1L de agua destilada, pH 7.4.</p>	
<p>Solución 4: Amortiguador fosfatos/citratos pH 5.0</p> <p>A) 19.2g de ácido cítrico aforado a 1L de agua B) 25.4g de Na₂PO₄ aforado a 1L de agua. Tomar 24.3 mL de A y 25.7 de B y aforar a 100 mL</p>	<p>Solución 5: Amortiguador de carga 1x</p> <p>1 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.8 mL de Glicerol 1.6 mL de SDS al 10% 0.4 mL de 2-mercaptoetanol 0.4 ml de H₂O destilada 0.4 de azul de bromofenol</p>	<p>Solución 6: Gel</p>	
		<p>Concentrador 5%</p> <p>250 uL de Tris pH 6.8 330 uL de Bisacrilamida 1.4 mL de H₂O destilada 20 uL de SDS al 10% 20 uL de Persulfato de amonio 2 uL de TEMED</p>	<p>Separador 12%</p> <p>1.3 mL de Tris pH 8.8 2 mL de Bisacrilamida 1.7 mL de H₂O destilada 50 uL de SDS al 10% 50 uL de Persulfato de amonio 2 uL de TEMED</p>
<p>Solución 7: Amortiguador de corrida 1X</p> <p>3 g de Tris base 1.44g de glicina 1g de SDS Aforar a 1L de agua destilada</p>	<p>Solución 8: Azul de Coomassie</p> <p>24 g de azul de Coomassie 600 mL de metanol 120 mL de CH₃COOH</p>		