



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

## Trabajo Final de Grado

Mendez, Santiago Fabian

# El rol del bioquímico en el área de Asuntos Regulatorios abordado desde una pasantía profesionalizante en la Industria

*Instituto de Ciencias de la Salud*

2025

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – No comercial – Compartir igual 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Mendez, S. F. (2025). *Evaluación de distintos antígenos como candidatos en el desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de anticuerpos de histoplasmina* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3624>

*Instituto de ciencias de la salud*

*Carrera: Bioquímica*

**“Evaluación de distintos antígenos como candidatos en el desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de anticuerpos de histoplasmina”**

Alumno: Mendez Santiago Fabian (Legajo N°: 29266)

Directora: Bioquímica Alicia Cristina Trovero, Magister en Microbiología molecular. Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbran”.

Co-directora: Andrea Villagra, Docente de Parasitología clínica, Bioquímica, ICS, UNAJ.

Lugar de trabajo: Servicio Antígenos y Antisueros, Departamento Reactivos de Diagnóstico, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbran

fecha de entrega: 27/11/2025

## Agradecimientos

Quiero agradecer primero como un chico creyente a Dios y a Jesus por todo este trayecto que me observaron cursar y por su ayuda a seguir adelante, por todas las cosas que me dieron y las que no, por su sabiduría e inteligencia que me ofrecieron. Una palabra que pusieron para siempre en mi corazón cito Romanos 10:13: “ Porque todo aquel que invocare el nombre del Señor será salvo”. También les agradezco por las personas que pusieron en mi camino, una de ellas es Alicia Trovero, quien no solo me ayudó a realizar el presente trabajo final “Evaluación de distintos antígenos como candidatos en el desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de anticuerpos de histoplasmina” de la carrera Bioquímica UNAJ, sino también por su apoyo ,por saber como tratarme en el transcurso de realización del trabajo final; y también a el equipo del Servicio Antígenos y Antisueros del INSTITUTO NACIONAL DE PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS, ANLIS “Dr Carlos G. Malbran” .También estoy agradecido con Andrea Villagra bioquímica, profesora de UNAJ.

Agradecido me siento con mi familia, quienes me brindaron su apoyo incondicional, a mi papà, a mi mamá, a mis hermanos y hermanas, quienes me aguantaron y ayudaron en este proceso de mi vida, por saber como sostenerme, por cada uno de sus consejos fuertes y sabios, por cada palabra que me dieron de aliento, así que de corazón, gracias papà, mamá, Braian, Hernan, Alma y Abril.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de cursada durante toda la carrera quienes me brindaron sus conocimientos, sabiduría y experiencias, durante todo el trayecto de la carrera.

## Resumen

La histoplasmosis (HP) es una micosis sistémica causada por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum*. Este microorganismo presenta una fase saprofítica filamentosa que habita naturalmente en ambientes enriquecidos con guano de murciélagos, gallinas, palomas y otras aves. La infección primaria o primoinfección puede ser asintomática o manifestarse como un cuadro respiratorio agudo o subagudo. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, la enfermedad puede progresar a formas diseminadas graves, afectando el pulmón y otros órganos, lo que conlleva altas tasas de mortalidad si no se administra un tratamiento oportuno.

El diagnóstico definitivo de histoplasmosis (HP), se logra mediante el diagnóstico directo realizado por observación micro y/o macroscópica de levaduras intracelulares, requiriéndose un observador experimentado. Y el *Histoplasma* por el aislamiento e identificación desde cultivos, lo que requiere entre 7 y 60 días y poseer una CSB (cabina de seguridad biológica) clase 2. Ante la dificultad del diagnóstico definitivo, la evidencia serológica de esta infección fúngica es importante. Se han utilizado una variedad de inmunoensayos para detectar anticuerpos específicos contra *H. capsulatum*. Según la forma clínica la técnica más aplicada para la detección de anticuerpos es la inmunodifusión con una sensibilidad del 70 al 100 % y una especificidad del 100 %. La prueba de fijación del complemento (FC), una metodología ampliamente utilizada en el pasado, es menos específica (60 a 90%) . La detección de antígenos fúngicos mediante inmunoensayos es valiosa en personas inmunocomprometidas, donde tales ensayos logran valores predictivos positivos de 96 a 98%. . Existe un test comercial de aglutinación con látex acoplado a histoplasmina, con valores de sensibilidad variables y algunas reacciones cruzadas con otras micosis. Este test comercial no está disponible en Argentina por lo que no fue evaluado en nuestra población. Por ello proponemos desarrollar un reactivo similar realizado con antígenos optimizados para evaluar su utilidad en el inmunodiagnóstico de HP.

Los test para detección de anticuerpos utilizan la histoplasmina que se obtiene del sobrenadante de cultivo micelial y los componentes inmunodominantes son los antígenos glicoproteicos H y M. Los anticuerpos anti-M son los primeros en aparecer y persisten durante toda la enfermedad.

En el presente trabajo, se estudian distintos antígenos de *Histoplasma capsulatum* como antígenos útiles para la detección de anticuerpos. Se evaluará la utilización de histoplasmina, galactomanano y la proteína M recombinantes como antígenos en diferentes técnicas, como aglutinación de partículas de látex y dot blot. Se evaluará la inmunoreactividad de distintos antígenos con antisuero de conejo, que están inmunizados con antígenos de *Histoplasma capsulatum* y de otras micosis (*Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides* sp, *Aspergillus* sp y *Cryptococcus neoformans-gatti*).

## Índice

Introducción.....	6
Justificación e importancia del tema seleccionado.....	6
Marco teórico.....	7
Manifestaciones clínicas de la histoplasmosis.....	7
Datos epidemiológicos.....	7
Métodos de diagnóstico.....	8
Conceptos de inmunología empleados en el trabajo.....	9
Técnicas inmunoquímicas utilizadas en este trabajo.....	10
Dot blot.....	10
Reacciones de aglutinación.....	11
Ventajas y aplicaciones en el Laboratorio de Inmunología.....	11
Aglutinaciones Directas.....	11
Aglutinaciones Indirectas.....	11
técnica de separación de componentes proteicos.....	13
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	13
Formación y características de los geles de SDS-PAGE.....	13
Técnicas de purificación de proteínas utilizadas en este trabajo.....	14
Cromatografía líquida.....	14
Cromatografía de intercambio iónico (IEC).....	15
Metodología de la cromatografía de intercambio iónico.....	15
Matrices y grupos funcionales en IEC.....	16
Detección.....	17
Flujo del solvente.....	17
Técnicas cromatográficas de alta resolución HPLC y FPLC.....	17
FPLC.....	18
filtración de antígenos.....	18
Cuantificación de proteínas por espectrofotometría UV (280 nm).....	19
Objetivos.....	19
Generales:.....	19
Específicos:.....	19
Materiales y Métodos.....	20

producción de histoplasmina.....	20
Obtención de suero policlonal de conejo.....	20
Materiales:.....	20
Procedimiento:.....	20
Preparación de antígenos.....	21
Histoplasmina.....	21
FPLC de histoplasmina.....	21
Purificación de Histoplasmina por cromatografía de intercambio catiónico:.....	22
1) Cromatografía en columna catiónica CM-FF (carboximetil fast flow).....	22
2) Cromatografía en columna catiónica fuerte de sulfopropyl-sepharosa XL.....	23
Cuantificación y evaluación de antígenos.....	23
Determinación de proteínas por espectrofotometría UV.....	23
SDS-PAGE.....	23
Dot blot.....	24
Sensibilización de las partículas de látex.....	24
Reactivo de látex.....	25
Ensayos de aglutinación.....	25
Materiales:.....	25
Procedimiento general de la reacción de aglutinación:.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Producción de antisuero anti-histoplasmina.....	26
Preparación de antígenos.....	26
Purificación de proteínas por FPLC.....	27
Cromatografía en columna catiónica CM-FF (carboximetil fast flow).....	27
Cromatografía en columna catiónica fuerte SP-XL (sulfopropyl-sepharosa XL).....	28
SDS PAGE.....	28
SDS-PAGE entre el frente y eluido de FPLC.....	29
Dot blot de las muestras de FPLC.....	30
Resultados de los reactivos de látex.....	31
Evaluación de las condiciones óptimas de buffer de pegado de la proteína recombinante M.....	32
Ensayos de aglutinación.....	33
Evaluación de sensibilidad analítica de los distintos antígenos.....	33
Evaluación de reacciones cruzadas de los distintos antígenos.....	34
Conclusiones.....	35
ANEXO.....	37
Referencias bibliográficas.....	38

## **Introducción**

### **Justificación e importancia del tema seleccionado**

La HP (Histoplasmosis) forma parte de las micosis sistémicas clásicas como hongos patógenos primarios, que se inician por la inhalación de esporas del ambiente, afectando al sistema respiratorio, por lo que en general se requiere para su diagnóstico el estudio de muestras representativas de las vías respiratorias (Guillermo Quindós Andrés Elsevier España, 23 may 2015). La muestra más frecuente es el esputo debido a su facilidad de obtención, siendo esta la muestra más representativa. Para su identificación podemos utilizar a la proteína H y M, esta última es una glicoproteína, y hay otra la proteína M recombinante, esta no está glicosilada, refiriéndonos a la búsqueda de antígenos en las muestras biológicas (Alvarado, Pérez-Rojas, Zambrano, Gonzatti, González). La inhalación de los conidios puede generar una primoinfección, esta misma puede pasar inadvertida o provocar un cuadro subagudo. En pacientes inmunocomprometidos puede evolucionar a formas diseminadas graves comprometiendo el pulmón, generando un cuadro respiratorio agudo/subagudo, y pasar a ser multisistémico que puede dar altas tasas de mortalidad si no se media con un tratamiento oportuno. La infección se adquiere por la inhalación de microconidias que se encuentran en el suelo, se depositan en los alvéolos y se convierten rápidamente en una forma de levadura parasitaria en los tejidos. Esta germinación y conversión puede ocurrir antes o después de la ingestión por los macrófagos pulmonares. La histoplasmosis debe ser diferenciada de la tuberculosis, ciertas neumonías bacterianas, virales y otras micosis, además de que por motivos de requerir un observador experimentado y para el aislamiento e identificación de *Histoplasma capsulatum* desde el aislamiento en cultivos, que requiere un tiempo de entre 7 y 60 días, por esta razón creemos importante desarrollar un reactivo de látex, para el inmunodiagnóstico de HP. Utilizamos para este trabajo diferentes métodos como la cromatografía “fast flow” que es una técnica de presión media útil para separar y purificar proteínas y otras moléculas. También realizamos los estudios de Dot blot que es una técnica simple para detección de biomoléculas, detectando ADN, ARN y proteínas, pero esta no nos permite identificar las biomoléculas por su tamaño, solo se detecta la presencia o ausencia del analito de interés. A su vez la técnica de SDS-PAGE útil para separar proteínas por su peso molecular. Por

último la aglutinación de partícula de látex útil para estudiar ciertos antígenos o anticuerpos aglutinándose en presencia del uno o del otro.

## **Marco teórico**

### **Manifestaciones clínicas de la histoplasmosis**

Las manifestaciones clínicas de la histoplasmosis dependen de la magnitud de la exposición, es decir, la cantidad de partículas fúngicas inhaladas, el estado inmunológico del huésped y la virulencia de la cepa infecciosa, indicando que los factores ambientales y genéticos controlan la manifestación de la enfermedad; en contexto con pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo las personas con SIDA, las cepas de *H. capsulatum* que no eran consideradas virulentas pueden causar enfermedades fatales (Azar et al., 2020). Es importante saber que la infección de *H. capsulatum* suele ser asintomática en inmunocompetentes (Guimarães et al., 2006). La histoplasmosis pulmonar sintomática suele ser subaguda, dada a una infección de bajo inóculo, y es una enfermedad leve parecida a una gripe caracterizada por tos seca, fiebre y fatiga presente luego de varias semanas de exposición; en las radiografías, presentan agrandamiento de los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos e infiltrados irregulares, pero pueden ser normales (Wheat et al., 1984). La enfermedad se divide en tres categorías clínicas: la pulmonar aguda (resultado de un inóculo alto, generalmente pulmonar, donde los individuos tienen síntomas diversos e inespecíficos, como por ejemplo cefalea, dolor torácico pleurítico o subesternal y mialgia, cuya gravedad se correlaciona con la magnitud de la exposición; el 90% de los casos cursan la enfermedad de forma asintomática, donde los síntomas aparecen de 3 a 18 días después de la exposición, en muchos casos estos síntomas desaparecen 2 o 3 semanas de forma espontánea); la infección pulmonar crónica (presentada como un cuadro granulomatoso crónico, afectando a los pulmones y a otros órganos del sistema monocítico fagocitario); y la infección diseminada (dada a un foco extrapulmonar), que es una enfermedad progresiva que puede afectar mayormente a personas inmunocomprometidas, como por ejemplo, a pacientes que reciben corticoides, terapia citotóxica e inmunosupresores o personas con VIH.

### **Datos epidemiológicos**

El *Histoplasma capsulatum* requiere de condiciones ambientales de clima moderado con humedad constante. En América del norte las regiones endémicas se encuentran en el medio oeste y sudoeste del país. En Latino America las áreas prevalentes se encuentran en

Brasil (donde las áreas endémicas están ubicadas en las partes del medio oeste y sudoeste del país), Ecuador, Venezuela, Paraguay, Uruguay y Argentina.

La HP compromete más a hombres que a mujeres, con una relación de 6:1, se presenta en todas las edades siendo severa en niños, adultos mayores y en inmunodeficientes. El SIDA ha sido importante en la epidemiología de la HP; esta es una infección oportunista grave frecuente en personas que desconocen que tienen VIH y en aquellos que están sin terapia antirretroviral altamente efectiva.

### **Métodos de diagnóstico**

Aunque están bien descritas las manifestaciones clínicas, el diagnóstico de HP no se basa únicamente de la información clínica, debido a que existe una superposición significativa de la HP con otras enfermedades, por ejemplo la HP aguda leve es similar a diversas infecciones virales del tracto respiratorio. Las manifestaciones pulmonares de enfermedad más agresiva con infiltrados pulmonares y linfadenopatía hiliar se superponen con infecciones por otros hongos dimórficos o *Mycobacterium tuberculosis*. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en medio de cultivos específicos o la visualización de la forma levaduriforme en las muestras clínicas utilizando técnicas de tinción fúngica, pero estos procedimientos requieren mucho tiempo, por lo general un tiempo de 15 días, aunque carece de sensibilidad. Además otros hongos pueden no diferenciarse con *Histoplasma* ya que pueden confundirse con otras estructuras de otros patógenos fúngicos. También, dependiendo del material procesado para estas aplicaciones, algunos contaminantes pueden crecer más que la de HP, lo que complica el diagnóstico.

Se desarrollaron otras técnicas para complementar el cultivo y el examen microscópico que incorporan información clínica y serológica, estas pruebas tienen la ventaja de ser rápidas con una especificidad y sensibilidad razonables (ej: inmunodifusión, reactivo de látex). La detección de antígenos y anticuerpos proporciona información indicativa de la enfermedad actual que ayuda en el manejo de la infección. También se utilizan métodos de detección de antígenos, especialmente cuando la detección de anticuerpos es poco probable, esto ocurre frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos con infección diseminada que a menudo no manifiestan una respuesta inmunitaria. Sin embargo, los ensayos de detección de antígenos no están disponibles universalmente.

La elección de cada prueba a realizar depende de las manifestaciones clínicas y factores del huésped. Los métodos basados en cultivo son más efectivos cuando la carga fúngica es alta, por ejemplo en algunos pacientes con forma diseminada o crónicas de HP. Recientemente se han desarrollado algunas técnicas de biología molecular que pueden mejorar aún más el diagnóstico de HP, especialmente para la detección temprana de la enfermedad, y para mejorar la especificidad del diagnóstico.

Los métodos de detección de anticuerpos son las principales herramientas actualmente utilizados para el diagnóstico sin cultivo de HP dada su disponibilidad general y su rápido tiempo de respuesta.

Los principales antígenos de diagnóstico de *Histoplasma capsulatum* son los antígenos H y M, estas glicoproteínas provocan respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células T. El antígeno M se considera inmunodominante porque los anticuerpos contra él son las primeras precipitinas que surgen en la histoplasmosis aguda y pueden estar presentes durante toda la infección. Se propuso que la glicoproteína M es una catalasa, con actividad que podría proteger las formas de levadura de los mecanismos fungicidas oxidativos, sin embargo se espera evidencia definitiva que respalde aquella hipótesis. El antígeno M contiene epítopes proteicos y glicosídicos específicos de cada especie ya sea *H.capsulatum var.capsulatum* y *H.capsulatum var.duboisii*. El serodiagnóstico tiene limitaciones, inclusive resultados positivos engañosos en pacientes con otras enfermedades causados por microbios que reaccionan en forma cruzada con *H.capsulatum*. La mayoría de esta reactividad cruzada se debe a determinantes de carbohidratos, epítopes del antígeno M, la reactividad cruzada se da con determinantes similares de carbohidratos en otras clases de hongos dimórficos y en algunas bacterias.

La detección de anticuerpos contra epítopes peptídicos dentro de antígenos M nativo o recombinante podría mejorar la especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas y así proporcionar un diagnóstico temprano y específico de histoplasmosis aguda.

### **Conceptos de inmunología empleados en el trabajo**

**Antígeno:** Antígeno se considera toda molécula capaz de unirse a receptores antigénicos de linfocitos B y T, que pueden ser proteínas, polisacáridos, lípidos o nucleótidos que se unen a anticuerpos. Los antígenos pueden estar en bacterias, hongos, virus, parásitos o células tumorales.

**Anticuerpo:** componentes esenciales de la inmunidad adaptativa, generada por las células B como inmunoglobulinas, combaten patógenos que se replican en el espacio extracelular, que presentan un estadio extracelular o que se diseminan a través del espacio extracelular.

**Anticuerpos policlonales:** obtenidos por extracción de un suero de un animal previamente inmunizado con el antígeno que se quiere estudiar. El antígeno se inyecta al animal, el cual produce inmunoglobulina contra diferentes epítopes del mismo. El suero extraído tendrá una mezcla de anticuerpos de distintas especificidades, sintetizados por distintos clones de células plasmáticas.

**Interacción antígeno-anticuerpo:** la unión antígeno-anticuerpo es una interacción reversible producidos por enlaces no covalentes. En la interacción in vitro de un antígeno con su

anticuerpo específico hay dos etapas, la interacción primaria no visualizable y la interacción secundaria que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación o la precipitación.

Reactividad cruzada: se debe a que un anticuerpo producido contra un antígeno específico tiene una afinidad contra otro antígeno que no es el de interés. Esto ocurre si dos antígenos diferentes comparten un epítopo similar o parecido.

## **Técnicas inmunoquímicas utilizadas en este trabajo**

### **Dot blot**

Es una técnica sencilla que se utiliza para identificar la presencia de proteínas, ADN o ARN en una muestra. El principio fundamental es que la solución de proteínas preparadas se siembra directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección se realiza directamente sobre la membrana después de la aplicación de la muestra. Esta no permite separar o diferenciar las moléculas por su tamaño.

Después de la inmovilización, las proteínas se pueden analizar utilizando anticuerpos para visualizar los patrones de los antígenos micóticos, no hay ningún paso para la separación involucrada. Esta es una técnica sencilla y rápida. Un dot blot es una forma más simple de inmunoensayo. Las transferencias de puntos se utilizan a menudo como métodos de detección o inmunodetección de anticuerpos para poder identificar reacciones cruzadas con otras proteínas relacionadas. Este método también se utiliza como herramienta para la producción de anticuerpos, para evaluar la calidad y especificidad de los reactivos de anticuerpos en el reconocimiento de antígenos, para probar la concentración de anticuerpos y para observar si el anticuerpo sufrió algún cambio en la calidad, ya sea en términos de especificidad, afinidad o concentración.

El principio fundamental involucrado en la transferencia puntual es que la solución de proteína preparada se transfiere directamente sobre la membrana de nitrocelulosa.

Después de la inmovilización, las proteínas se pueden analizar usando una sonda de anticuerpos para visualizar los patrones. Hay que recordar que la membrana de nitrocelulosa es sensible a las proteínas, por lo que hay que usar guantes y una pinza para manipular los bordes de la membrana para no transferir proteínas involuntariamente a la membrana.

## **Reacciones de aglutinación**

La prueba de aglutinación de látex se fundamenta en reacciones de aglutinación entre anticuerpos y antígenos adheridos a partículas o células, lo que permite una visualización directa de la interacción inmunológica. Estas reacciones son particularmente útiles para la detección de anticuerpos mediante el empleo de antígenos particulados, y también resultan efectivas para identificar antígenos en muestras biológicas. En esencia, los principios subyacentes son similares a los de las reacciones de precipitación, ya que ambas involucran la formación de complejos antígeno-anticuerpo que generan agregados visibles. Sin embargo, las aglutinaciones destacan por su mayor sensibilidad en comparación con las precipitaciones, lo que las hace ideales para detectar concentraciones bajas de analitos.

## **Ventajas y aplicaciones en el Laboratorio de Inmunología**

Una de las principales ventajas de las técnicas de aglutinación radica en su rapidez, ya que los resultados se obtienen en minutos, requiriendo un mínimo de material reactivo y siendo económicamente accesibles. Estas características las convierten en herramientas indispensables en el laboratorio de inmunología, facilitando la detección y el diagnóstico de diversas patologías infecciosas, autoinmunes y otras condiciones relacionadas con respuestas inmunes específicas. Su simplicidad y eficiencia las posicionan como métodos de primera línea para screening inicial, complementando técnicas más complejas cuando sea necesario.

## **Aglutinaciones Directas**

En las aglutinaciones directas, el antígeno se presenta en forma particulada, como bacterias o células intactas, sin necesidad de fijación a soportes inertes. Aquí, los anticuerpos se unen directamente al antígeno, provocando una aglutinación visible de las partículas. Estas reacciones pueden realizarse de manera rápida en placas, donde la agitación facilita la observación inmediata de la agregación, o de forma lenta en tubos o microplacas, permitiendo una incubación más prolongada para mayor precisión en muestras con baja concentración de reactivos.

## **Aglutinaciones Indirectas**

Por el contrario, las aglutinaciones indirectas se utilizan para antígenos solubles, que se fijan previamente a soportes como glóbulos rojos o partículas inertes de poliestireno mediante enlaces covalentes (ver figura 1A). Alternativamente, se pueden emplear bacterias

como *Micrococcus lysodeikticus* como soporte para la adsorción del antígeno. Una vez preparados estos complejos, los anticuerpos en la muestra inducen la aglutinación de las partículas cargadas. Al igual que en el método directo, estas pruebas son rápidas cuando se realizan en placas y más lentas en tubos o microplacas, ofreciendo flexibilidad según las necesidades del análisis diagnóstico.

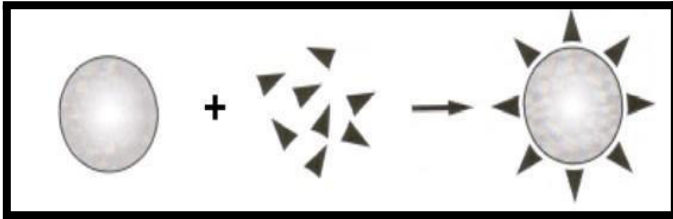


Figura 1A: Esquema de sensibilización con partículas de látex. El círculo representa una partícula de látex y los triángulos los antígenos. (<https://slideplayer.es/slide/7580300/tecnicas-de-aglutinacion>)

En las técnicas de aglutinación con partículas de látex, la interacción entre el anticuerpo anti-x presente en un suero y el antígeno "x" particulado —unido de manera covalente o no covalente a una partícula de látex— genera un agrupamiento visible conocido como aglutinación (ver figura 1B). Este fenómeno se manifiesta típicamente como una malla de precipitación observable (ver figura 2), lo que permite una detección rápida y cualitativa de la presencia de anticuerpos o antígenos específicos en la muestra. Las aglutininas, que son los anticuerpos responsables de inducir estas reacciones, juegan un rol central en este proceso, facilitando la unión y la formación de complejos inmunes estables. Las reacciones de aglutinación exhiben una notable similitud con las reacciones de precipitación, ya que ambas dependen de la formación de redes de anticuerpos y antígenos para producir un agregado visible. Sin embargo, al igual que en la precipitación, un exceso de anticuerpos puede interferir en el proceso, inhibiendo la aglutinación en lugar de promoverla. Este fenómeno se denomina efecto prozona y ocurre cuando la concentración elevada de anticuerpos satura los sitios antigénicos sin permitir la formación adecuada de la malla reticular. Para detectar la presencia de este efecto, es esencial diluir la muestra y comparar los resultados: si se observa aglutinación en la dilución (donde la concentración de anticuerpos es menor), pero no en la muestra original no diluida (más concentrada), se confirma la existencia del efecto prozona. Esta precaución es crucial en ensayos diagnósticos para evitar falsos negativos y garantizar la precisión de los resultados.

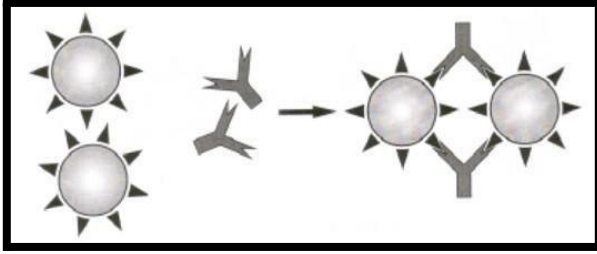


Figura 1B: Esquema de aglutinación con partículas de latex. (<https://slideplayer.es/slide/7580300/tecnicas-de-aglutinacion>)



Figura 2: Anillo negro izquierdo representa una aglutinación en partículas de látex positiva para proteína C reactiva (PCR) y el anillo negro derecho representa una aglutinación negativa. (<https://www.clikisalud.net/salud-general-prueba-aglutinacion-latex>).

### **técnica de separación de componentes proteicos**

#### **Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

La electroforesis es una herramienta analítica simple, rápida y muy sensible, lo que la convierte en una técnica de gran utilidad para la separación y el estudio de moléculas cargadas tales como proteínas y ácidos nucleicos.

La polimerización de los geles de SDS-PAGE requiere de cámaras verticales, formadas por dos placas de vidrio selladas, porque el oxígeno produce que la polimerización no se realice adecuadamente.

#### **Formación y características de los geles de SDS-PAGE**

El principio de la electroforesis consiste en la migración de moléculas, por acción de un campo eléctrico, a través de una matriz de naturaleza porosa, en la cual serán separadas

de acuerdo a su peso molecular o tamaño, esta es una herramienta útil para la separación, identificación y purificación de proteínas (César Menor-Salván). La reacción de la poliacrilamida se forman a partir de esta y la bis-acrilamida, produciéndose una matriz de gel reticulada. Las proteínas tienen una carga negativa o global positiva, esto permite el movimiento de una molécula de proteína hacia el punto isoeléctrico en el cual la proteína no tiene carga neta. Al desnaturalizar las proteínas y darles una carga negativa uniforme, se pueden separar en función de su masa a medida que migran al polo positivo. La velocidad de migración es proporcional a aquella masa.

Las placas del gel de poliacrilamida se forman por copolimerización de la acrilamida para lo que se utiliza un agente entrecruzador como la N-N metileno bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N-tetrametil endiamida). La polimerización depende de la temperatura, se recomienda temperaturas mayores a los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. La polimerización debe realizarse en una atmósfera inerte, ya que el oxígeno actúa como inhibidor de los radicales libres generados por el ión persulfato. Por ello, se emplean cámaras verticales equipadas con dos placas de vidrio selladas, lo que reduce la absorción de oxígeno por los geles.

La electroforesis desnaturalizante, como el SDS-PAGE dado que utiliza dodecil sulfato sódico o SDS, esto asegura la desnaturalización total de la proteína por pérdida de la estructura tridimensional. La cadena hidrocarbonada hidrófoba del SDS rodea a las cadenas polipeptídicas, ya separadas, orientando el ion sulfato, hidrofílico, con carga negativa hacia el medio acuoso. Así todas las cadenas polipeptídicas adquieren carga negativa y todas las cadenas polipeptídicas quedan desnaturalizadas.

## **Técnicas de purificación de proteínas utilizadas en este trabajo**

### **Cromatografía líquida**

Es una técnica que se basa en la separación de moléculas a través de su distribución entre dos fases, estacionaria y móvil. Las propiedades de cada molécula determinarán su tiempo de permanencia (se retenga) en la fase estacionaria (tiempo de retención). La fase estacionaria (polímero) es empaquetada dentro de un cilindro, y en la parte superior se coloca la muestra. Las moléculas se desplazan a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil (amortiguador) con un flujo a velocidad controlada.

Para detectar las proteínas que salen de la columna, la fase móvil pasará por un detector UV (280 nm), generando una señal hacia un software, que finalmente se representará como una gráfica (cromatograma), donde los picos o montañas representan la presencia de proteínas, y los valles la ausencia de éstas.

### **Cromatografía de intercambio iónico (IEC)**

La cromatografía de intercambio iónico es la técnica que separa a las proteínas en función de su carga (R M Zancopé-Oliveira, S L Bragg, S F Hurst, J M Peralta, E Reiss). La carga de cada proteína varía por su composición de aminoácidos cargados, distribución y densidad de carga de la molécula, y el ambiente químico en el que se encuentran. Los grupos ionizables de los residuos de aminoácidos cambian su carga de manera gradual al variar el pH del medio. Si la proteína alcanza un pH en el que su carga neta es igual a cero, pH conocido como punto isoeléctrico (pI), la proteína no migra en un campo eléctrico, ya que no interactúa con cargas externas, lo que puede favorecer su precipitación. Si el pH del medio en el que se encuentra la proteína está por arriba de su pI, la proteína adquiere carga negativa; de manera contraria, si el pH del medio es menor a su pI, la proteína adquiere carga positiva.

La fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico puede ser aniónica o catiónica, y se unirán moléculas de carga opuesta. La manera de separar y eluir a las proteínas de la fase estacionaria se basa en modificar la fuerza iónica de la fase móvil, por cambios graduales de pH o concentraciones de un intercambiador iónico (por lo general es una sal).

### **Metodología de la cromatografía de intercambio iónico**

En la cromatografía de intercambio iónico, el proceso comienza equilibrando la columna con un amortiguador específico, donde el pH del amortiguador influye directamente en las cargas de la fase estacionaria y las proteínas presentes en la fase móvil. Una vez preparada, se aplica la muestra a la columna, seguida de un lavado que permite que las moléculas no unidas, es decir, aquellas con la misma carga que la columna, salgan de ella al pasar varios volúmenes de la fase móvil. Finalmente, las proteínas que se han unido de manera diferencial a la columna se desplazan mediante un gradiente de fuerza iónica, incrementando gradualmente esta fuerza para eluir completamente las proteínas retenidas y regenerar las cargas de la columna.

En esta técnica, las proteínas se adsorben en resinas de poliestireno entrecruzadas con divinil benceno, las cuales están derivadas con grupos funcionales como dietilaminoetil (DEAE), carboximetil (CM), sulfopropil (SP) o amonio cuaternario (Q), entre otros.

### **Matrices y grupos funcionales en IEC**

Una proteína con punto isoeléctrico menor a 7 o un ácido nucleico estarán cargados negativamente a pH 7.0. De esa manera, si se tiene una matriz con sustituyentes cargados positivamente, por ejemplo una amina cuaternaria, las macromoléculas se unirán a los sustituyentes con una fuerza proporcional a la carga que detecten al pH al que se realiza la corrida y al número y naturaleza de los sustituyentes presentes en la matriz. Dado que las proteínas son iones multivalentes, las resinas pueden ser de intercambio aniónico o catiónico, de acuerdo a la carga neta que posean. Dependiendo de la macromolécula en estudio se usará una u otra. Los más comunes son:

- dietil aminoetil (DEAE)  $-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2$  (débil)  $pK > 11$
- trimetil aminoetil (TMAE)  $-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$  (fuerte)  $pK > 13$
- dimetilaminoetil (DMAE)  $-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_2$  (débil)  $pK \sim 10$
- sulfometil  $-O-CH_2-SO_3^-$  -  $pK < 1$  (fuerte)
- sulfopropil  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$  -  $pK < 1$  (fuerte)
- carboximetil  $-O-CH_2-COO^-$  -  $pK \sim 4.5$

Nosotros usaremos la matriz fuerte sulfopropil y carboximetil.

Una característica importante de los medios de intercambio iónico es su capacidad, es decir la cantidad de macromoléculas que pueden unir por unidad de volumen de fase estacionaria, la capacidad se expresa en mg proteína/ml gel o meq/ml. La capacidad es mayor cuanto más sustituida esté la matriz, más fuerte sea la interacción con la macromolécula y mayor sea el tamaño de poro de la matriz. La elución puede realizarse de dos formas diferentes. La más usual consiste en aumentar progresivamente la concentración de un contraión, de modo de desplazar el equilibrio de unión de la macromolécula hacia la forma libre. El contraión es normalmente una sal (NaCl, KCl, etc.) disuelta en el eluyente.

Las macromoléculas de una mezcla se irán desplazando en forma secuencial de acuerdo con la fuerza de la unión (las que posean menor densidad de carga eluirán antes, mientras que para las de mayor carga neta el tiempo de retención será mayor).

### **Detección**

Las macromoléculas eluidas pueden detectarse por varios métodos: absorción en el UV o a la longitud de onda de absorción máxima si fueran coloreadas, por variaciones en el índice de refracción, la conductividad, etc. Los ácidos nucleicos pueden detectarse por absorción a 260 nm y las proteínas también a 254 nm (enlace peptídico). Los hidratos de carbono pueden detectarse haciendo uso de cambios en el índice de refracción. También pueden tomarse alícuotas de los tubos recogidos y hacer allí la determinación de la concentración de la macromolécula en cuestión ya sea por sus propiedades ópticas, por su actividad biológica (actividad enzimática) o por alguna reacción específica (p.ej. por Coomassie en caso de proteínas).

### **Flujo del solvente**

Con respecto a este parámetro, la administración del solvente se puede realizar por gravedad o con bombas. El primer caso es posible sólo cuando el soporte es suficientemente laxo como para permitir el flujo sin necesidad de presión adicional. En el segundo caso, pueden usarse equipos totalmente automatizados que permiten variar el flujo en forma muy controlada y realizar automáticamente los gradientes. La velocidad de flujo está en estrecha relación con la resolución de la técnica.

### **Técnicas cromatográficas de alta resolución HPLC y FPLC**

En general, se pretende que las corridas duren el menor tiempo posible para minimizar la pérdida de actividad biológica, pero sin sacrificar la resolución del método.

La distribución de las macromoléculas en una columna durante la elución hace que se detecten a su salida de la columna como picos, caracterizados por su altura y su anchura. Lo ideal es que cada pico sea tan angosto como sea posible, para separarlo de sustancias que eluyan en la vecindad.

Dos procesos causan el ensanchamiento del pico: la difusión y la turbulencia. La difusión es el proceso por el cual la macromolécula, que se concentra en una banda a medida que se separa de los otros componentes, tiende a difundir hacia atrás y adelante hacia zonas en que su concentración es menor. La difusión depende del tiempo, por lo tanto puede controlarse con corridas cortas, aumentando la velocidad de flujo. Sin embargo, esto causará que el flujo alrededor de las partículas no sea laminar, formándose turbulencias en el lado de la partícula cercano a la salida que ensancharán el pico. Por otra parte, muchos soportes no aceptan velocidades muy altas debido a que al aumentar el flujo aumenta la resistencia al avance y en consecuencia la presión. Con ello la fase inmóvil tiende a comprimirse, dificultando aún más el flujo y aumentando más la presión.

La turbulencia puede controlarse haciendo la partícula cada vez más chica. A su vez, al achicar la partícula se aumenta la superficie, aumenta el rozamiento con el solvente y esto hace que se requiera más presión para poder lograr un flujo determinado. Para esto se usa un equipo especializado llamado “HPLC”.

La técnica de “FPLC” es un intermedio entre los sistemas de baja presión y el HPLC. En este caso también es posible controlar muy exactamente el flujo mediante un sistema de bombas de precisión, pero el sistema está limitado a presiones medias, hasta un máximo de 5 MPa (megapascal). Se pueden acoplar columnas de diverso tamaño y con una variedad de soportes más amplia que en el caso del HPLC, aunque no se alcanza la misma resolución. Su uso se inclina más a la parte preparativa (purificación de proteínas, péptidos y ac. nucleicos) que a la analítica.

## **FPLC**

La cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza para purificar proteínas y otras biomoléculas (ácidos nucleicos y/o polisacáridos) a partir de mezclas complejas contenidas en un extracto, mediante el uso de columnas cromatográficas de diversos tipos como son: filtración en gel, interacción hidrofóbica, intercambio iónico y afinidad las cuales se conectan a un equipo automatizado equipado con un detector de luz UV-visible (190-700 nm) en línea con hasta tres longitudes de onda simultáneas (e.g. 280/214/254 nm), un medidor de conductividad (0.001-999.9 mS/cm), un mezclador de gradientes y un monitor de pH en línea.

## **filtración de antígenos**

Los dispositivos de filtrado Amicon ultra-15 de millipore proporcionan una centrifugación rápida, con una capacidad para factores de concentración altos y una fácil recuperación de

concentrado a partir de matrices de muestras complejas y diluidas. Este es un método de diafiltración fácil y sencillo de utilizar en este caso para obtener un ultrafiltrado de histoplasmina y proteína recombinante M.

## **Cuantificación de proteínas por espectrofotometría UV (280 nm)**

La cuantificación de proteínas es la medición de la concentración de proteína total en una muestra. Los aminoácidos aromáticos son responsables de la absorción ultravioleta de la mayoría de las proteínas, que presentan un máximo de absorción a unos 280 nm. La medición de la concentración de proteínas es necesaria para procesos que abarcan desde la purificación y marcaje de proteínas hasta la preparación de muestras para electroforesis.

### **Objetivos**

#### **Generales:**

- Capacitar y entrenarme en el diseño y desarrollo de técnicas microbiológicas, bioquímicas e inmunoquímicas básicas.
- Capacitarme en la obtención de antisueros policlonales de conejo.
- Evaluar la reactividad con anticuerpo de conejo de los distintos antígenos obtenidos.

#### **Específicos:**

- Optimizar, caracterizar y obtener preparaciones antigénicas nativas y recombinantes de *Histoplasma capsulatum* para utilizar en la detección de anticuerpos
- Obtención de anticuerpos policlonales en conejo
- Evaluación de la inmunoreactividad de los distintos antígenos con los distintos antisueros obtenidos por técnicas de inmunodifusión
- Optimizar la absorción a partículas de látex de 0,8  $\mu\text{m}$  de los distintos antígenos.

## **Materiales y Métodos**

### **producción de histoplasmina**

La producción del antígeno de *Histoplasma capsulatum* (histoplasmina) se realizó en el Servicio de Micosis Profundas del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

### **Obtención de suero policlonal de conejo**

Para la obtención de anticuerpos policlonales se inmunizaron conejos con exoantígenos de *H.capsulatum*, se inoculó una única dosis de inmunógeno y en caso de no hallarse anticuerpos se inoculó un refuerzo, pero con un adyuvante incompleto de Freund (compuesto por emulsión de aceite en agua, donde se genera la liberación tardía del antígeno, lo que permite ser captados por los macrofagos).

#### **Materiales:**

- Jeringas estériles. Aguja 25G, 21G Y 16G
- Probetas de vidrio de 100 ml estériles
- Tubos tipo Eppendorf
- Drogas anestésicas (Ketamina HCl 100mg/ml)
- Cepo de inmovilización y de sangría
- Microcentrifuga (7000 rpm)
- Conejos New Zeland, son conejos sanos, libre de zoonosis y de patógenos específicos, que deben pesar entre 2,5 y 3,5 kg

#### **Procedimiento:**

Primero se preparó el inmunógeno (emulsión de 2 ml formado por 1ml de antígeno de cultivo líquido micelial de *H.capsulatum* filtrado, concentrado y estandarizado y 1 ml de adyuvante completo de Freund). Después se inocularon los 2 ml vía intradérmica con agujas de 25G en 10 puntos del lomo resultado del animal, previamente desinfectada la zona con alcohol 96%, luego de la inoculación, se inyectó vía intradérmica 0,5 ml de vacuna de *Bordetella pertussis* con jeringa de 1ml y aguja de 25G en el muslo del animal, para estimular al sistema inmune, luego de un mes, se realizó la primer exploratriz en la que se extrajo 2 ml de sangre de la vena central de la oreja del animal con aguja 21G. Se transfirieron los 2 ml a un tubo eppendorf esteril, se centrifugó a 10.000 rpm en

microcentrífuga por 10 minutos, separándose el suero del coágulo, obteniéndose así el sobrenadante.

El sangrado a blanco del animal se llevó a cabo por punción cardíaca, previa anestesia con ketamina HCl 35-50 mg/kg por vía intramuscular empleando aguja 25G. El animal fue sujetado a un cepo de sangría a través de sus extremidades. Con aguja 16G conectada a un prolongador (vía de suero) que finaliza en una probeta de 100 ml estéril con tapón de algodón y gasa, se procedió a la punción cardíaca colectando la sangre en la probeta hasta que la presión sanguínea decaiga. Se procedió a colocar la probeta con la sangre obtenida en estufa a 37°C durante 2 horas. Luego se separó el coágulo y se recuperó el sobrenadante (suero) en un tubo de vidrio con tapa a rosca estéril de 50 ml. Se realizó el control de esterilidad del suero en el que no se observó crecimiento de ningún organismo, por lo que se continuó con el proceso. Se procedió a centrifugar el suero durante 40 minutos a 10.000 rpm en centrífuga refrigerada, se recuperó el sobrenadante y se filtró con membrana de 0,22 µm recolectando el filtrado en un frasco schott estéril de 50ml. Aproximadamente se obtuvo 40ml de suero del conejo. Se agregó glicerina fenicada como conservante (5 gotitas) y se guardó a 4°C.

## **Preparación de antígenos**

### **Histoplasmina**

Se trabajó con histoplasmina obtenida previamente en el servicio. Se realizó la diafiltración y concentración de la misma con dispositivos de filtrado Amicon ultra-15 de millipore membrana de 30 KDA centrifugando con un G de 4000 y un tiempo estimado de 30 min en buffer PBS.

### **FPLC de histoplasmina**

Se purificó la histoplasmina por FPLC para ello se utilizaron 2 columnas de intercambio catiónico de carboximetil-sepharosa FF(CM-FF) y sulfopropyl-sepharosa XL (SP-XL)

Se procesó la histoplasmina como se describe a continuación: Se tomaron 2 ml de la muestra de Histoplasmina y se llevó a 10 ml con Buffer citrato 25 mM, pH 3,50 (Buffer A). Se procedió a precipitar componentes no deseados del exoantígeno total mediante dilución en 5 volúmenes de una solución 25 mM de citrato de Sodio de pH 3,2, incubando 30 minutos a temperatura ambiente. El precipitado formado se separó mediante

centrifugación y el sobrenadante se concentró cinco veces mediante ultrafiltración (muestra S1). El precipitado se lavó con 10 ml de solución de citrato 25 mM de pH 3,2, el precipitado se separó por centrifugación igual que el paso anterior y el sobrenadante (S2) se juntó con la muestra S1. El precipitado fue lavado luego con 10 ml de una solución de citrato 25 mM de pH 3,2 con 1 M de NaCl durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó, descartando el precipitado. Este último sobrenadante (muestra S3) se combinó con las muestras S1 y S2, el volumen de la combinación de estas muestras se concentró por ultrafiltración a 2 ml y luego se diafiltró a volumen constante con 5 diavolumenes (500 ml) de citrato 25 mM de pH 3,2.

### **Purificación de Histoplasmina por cromatografía de intercambio catiónico:**

Se realizaron 2 cromatografías:

#### **1) Cromatografía en columna catiónica CM-FF (carboximetil fast flow)**

Columna: Medio CM-Sefarosa Fast Flow, formato de columna: HiTrap de 1 ml de volumen.

Buffer A: Citrato 25 mM, pH 3.5

Buffer B: Citrato 25 mM, pH 3.5, 1 M NaCl

Equipo: Äkta explorer 100

Condiciones de corrida:

Se equilibró la columna con buffer A a flujo (F) de 1 ml/min, durante 10 volúmenes de columna (VC). Se inyectaron 2 VC de muestra a F=0.5 ml/min. Se lavó la columna con buffer A por 10 VC y se eluyó en step a 50% de buffer B hasta observar pico de retenido. Las fracciones se colectan automáticamente en el carrusel del equipo AKTA explorer, en fracciones de 1 ml pero luego se juntaron las fracciones correspondientes al pico y al eluido, y retorno de señal UV a 280 nm de longitud de onda hasta línea de base. Por último se limpió la columna con 10 VC de 100 % buffer B.

## **2) Cromatografía en columna catiónica fuerte de sulfopropyl-sepharosa XL**

Columna: Medio SP-Sefarosa XL

formato de columna: HiTrap de 1 ml de volumen.

Buffer A: Citrato 25 mM, pH 3.5

Buffer B: Citrato 25 mM, pH 3.5, 1 M NaCl

Equipo: Äkta explorer 100

Condiciones de corrida:

Se equilibró la columna con buffer A a flujo (F) de 1 ml/min, durante 10 volúmenes de columna (VC). Se inyectaron 2 VC de muestra a F=0.5 ml/min y se lavó la columna con buffer A por 10 VC. Se eluyó en pasos a 50% de buffer B hasta observarse pico de retenido, donde las fracciones se colectan automáticamente en el carrusel del equipo AKTA explorer, en fracciones de 1 ml pero luego se juntaron las fracciones correspondientes al pico y al eluido, y retorno de señal UV a 280 nm de longitud de onda hasta línea de base. Se limpió la columna con 10 VC de 100 % buffer B.

### **Cuantificación y evaluación de antígenos**

#### **Determinación de proteínas por espectrofotometría UV**

Para la espectrofotometría se utilizó el **espectrofotómetro/fluorómetro DeNovix serie DS-11** (este es un espectrofotómetro UV-vis de microvolumen, útil para medir la pureza y cantidad de ADN, ARN y proteínas de una muestra de 1-2 microlitos). Para medir las proteínas se utilizó a 280 nm.

#### **SDS-PAGE**

Para realizar la corrida electroforética de los antígenos por SDS-page, primero se prepararon los geles de separación y los geles de apilamiento (stacking). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida de 7.5% para el gel separador y 4% para el gel apilador (*ver anexo 1*). Se colocaron las preparaciones entre 2 vidrios, siguiendo las

instrucciones de manejo de CUBA DE ELECTROFORESIS Biorad Mini Protean II, en el SDS-PAGE las muestras se diluyen en buffer muestra (12 ul de muestra +4 ul de Buffer muestra). Buffer muestra, donde en un tubo de 15 ml se pesó 4 mg de azul de bromofenol. En otro tubo se añadió 1ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 1.6ml de solución de SDS 10% p/v, 4.6 ml de agua purificada y 0.8 ml de glicerina. Se homogeneizó y luego se agregó esta solución al tubo que contiene el azul de bromofenol. Se mezcló por inversión y se conservó hasta su uso). Se sembró 15 ul por calle y se dejaron gelificar durante 40 min.

### **Dot blot**

Procedimiento dot blot: En papel de nitrocelulosa se cortaron 6 cuadraditos o se dividieron en 6 cuadros. Se sembraron 2 ul de Antígeno (1<sup>o</sup> histoplasmina ¼, luego las muestras obtenidas del FPLC), una vez seco se bloqueó con PBS/ Leche 5% 1 HORA a 37 grados (60 RPM). Se Lavó con PBS 6 veces por 1 minuto. Se incubó con antisuero de conejo (1:50) en PBS-Leche 5% ON a 4°C o durante 1 hora a 37°C. Se lavó con PBS 6 veces por un minuto en cada lavado. Se incubó con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo diluido 1/2.000 PBS-LECHE 5% 1 hora a 37 °C o 2 horas a 25 °C. Otra vez lavamos con PBS 6 veces por minuto. Se incubó con la solución de revelado de cloronaftol con 0,01% v/v final de agua oxigenada. Se lo dejó el tiempo que fue necesario, en un área sin luz directa, cortamos con agua (ver imagen n°4).

### **Sensibilización de las partículas de látex**

Para producir el reactivo, se procedió a la sensibilización de las partículas de látex con la histoplasmina mediante adsorción pasiva. Los siguientes procedimientos fueron clave en este proceso inicial:

La histoplasmina obtenida se colocó en un tubo de ultrafiltración Amicon Millipore de 30 kDa junto con PBS y se centrifugó a 3000 rpm durante 45 minutos. Este procedimiento se realizó dos veces con el fin de purificar las proteínas mayores a 30 kDa, eliminando las proteínas menores a 30 kDa y el medio de cultivo que contiene asparagina.

Se probaron 3 concentraciones de histoplasmina, 0.05; 0.02; 0.01 mg de histoplasmina/mg de látex. La reacción de adsorción se realizó con una concentración final de partículas de látex (diámetro 0.8 µm) de 5 mg/ml, teniendo en cuenta la concentración de histoplasmina obtenida (0.53mg/ml).

Una vez determinadas las cantidades y volúmenes de histoplasmina, buffer y látex, se procedió a preparar los reactivos. Para ello, se tomaron seis tubos Eppendorf: tres para el buffer glicina y tres para el buffer acetato. Se agregaron los volúmenes correspondientes de histoplasmina y buffer, se homogeneizó inmediatamente con vortex y se añadieron 50 µl de

látex. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación durante 2 horas, invirtiendo cada uno cada 30 minutos para evitar la sedimentación del látex.

### **Reactivo de látex**

Para producir el reactivo se procedió a la sensibilización de las partículas de látex con la histoplasmina, histoplasmina purificada por FPLC y Proteína M recombinante, por adsorción pasiva, para ello se mezcló: 1-Antígenos (la histoplasmina, antígeno purificado por FPLC y el antígeno recombinante M), 2-Partículas de Latex y 3-Buffer (acetato pH: 4,8 o PBS pH:7,4l)

Los antígenos fueron previamente cuantificados y se evaluó la relación mg de proteínas/mg de latex (Valor J) entre 0.025 y 0.065. En el caso de histoplasmina e histoplasmina purificada por FPLC se utilizó el buffer acetato que fue elegido según estudios previos. En el caso de la Proteína M recombinante se evaluaron dos buffer, el buffer acetato y el buffer PBS.

---

### **Ensayos de aglutinación**

Ya listos los reactivos de látex, se procedió a realizar los primeros ensayos de aglutinación con el antisuero anti-histoplasmina que elaboramos, para poner a prueba dicho reactivo. En base a estos ensayos, se evaluaron diferentes antígenos y se realizaron los ensayos de sensibilidad analítica y evaluación de reacciones cruzadas.

### **Materiales:**

- Láminas de fondo oscuro.
- Micropipeta p100
- Palillos o punta de tips para homogeneizar
- Agitador orbital, rango de trabajo: 100 rpm

### **Procedimiento general de la reacción de aglutinación:**

En cada cuadrado de la lámina de fondo oscuro, con micropipeta, se colocaron 25 µl de antisuero (muestra) y 25 µl de reactivo de látex, y usando palillos se homogeneizó. Se colocó la lámina dentro de un agitador orbital a 100 rpm y se dejó durante 5 min, o hasta

ver aglutinación (máximo 10 min). También se pueden hacer los movimientos rotativos de manera manual (ver imagen 6).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Producción de antisuero anti-histoplasmina**

Luego realizado todo el proceso de obtención de antisuero y realizada su estandarización, como se observa en la figura n°3, se distribuyeron equitativamente los 40 ml obtenidos de antisuero en tubos eppendorf y se utilizó para las pruebas de DOT BLOT y aglutinación en látex.

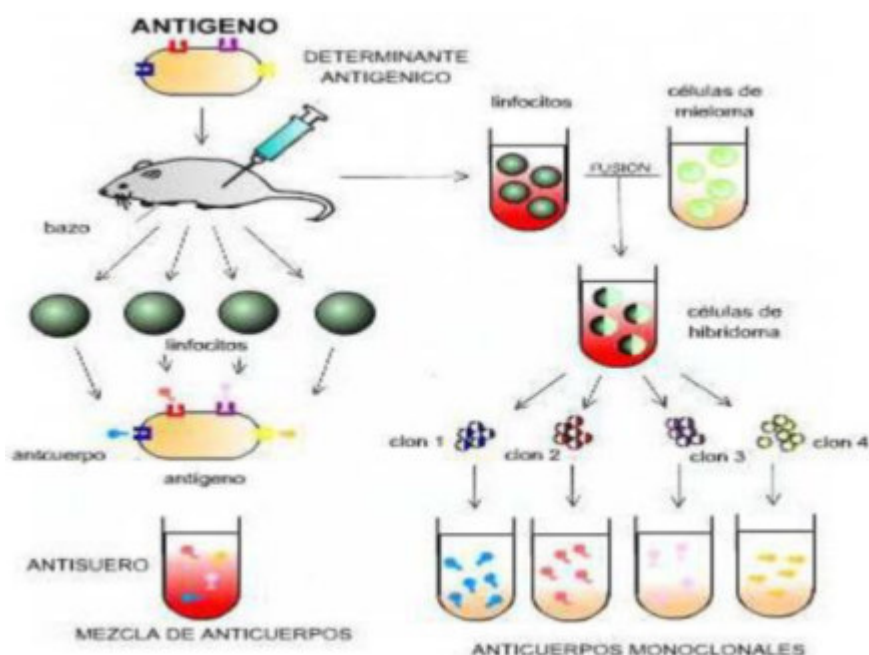


Figura n°3. Inmunización de ratón con antígeno, tanto para anticuerpos monoclonales y policlonales.

### **Preparación de antígenos**

A partir de la histoplasmina ya obtenida, se purificó por FPLC, para evaluar las distintas fracciones obtenidas como candidatos de antígeno para la sensibilización de partículas de látex.

Por otro lado se evaluó un antígeno recombinante de proteína M desarrollado por el equipo de María Lujan Cuestas en el Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, CONICET-UBA). Esta proteína recombinante es una proteína de fusión

con la proteína de unión a maltosa (MBP) y la proteína M. La MBP se usa para mejorar la solubilidad de las proteínas recombinantes. Se fusionó con la proteína diana para que pueda purificarse en un solo paso. Los antígenos fueron cuantificados, en otro trabajo previo por método de Lowry (basado en la utilización de una mezcla que tiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico, que sufre una reducción cuando reacciona con proteínas, en presencia de un catalizador cobre (II), que produce un compuesto con absorción a 750 nm), y se caracterizó por SDS PAGE, DOT BLOT.

## Purificación de proteínas por FPLC

### Cromatografía en columna catiónica CM-FF (carboximetil fast flow)

Como podemos observar en el gráfico N°1 al eluir con NaCl (marcado con línea punteada en el gráfico) se obtiene la fracción unida en un único pico.

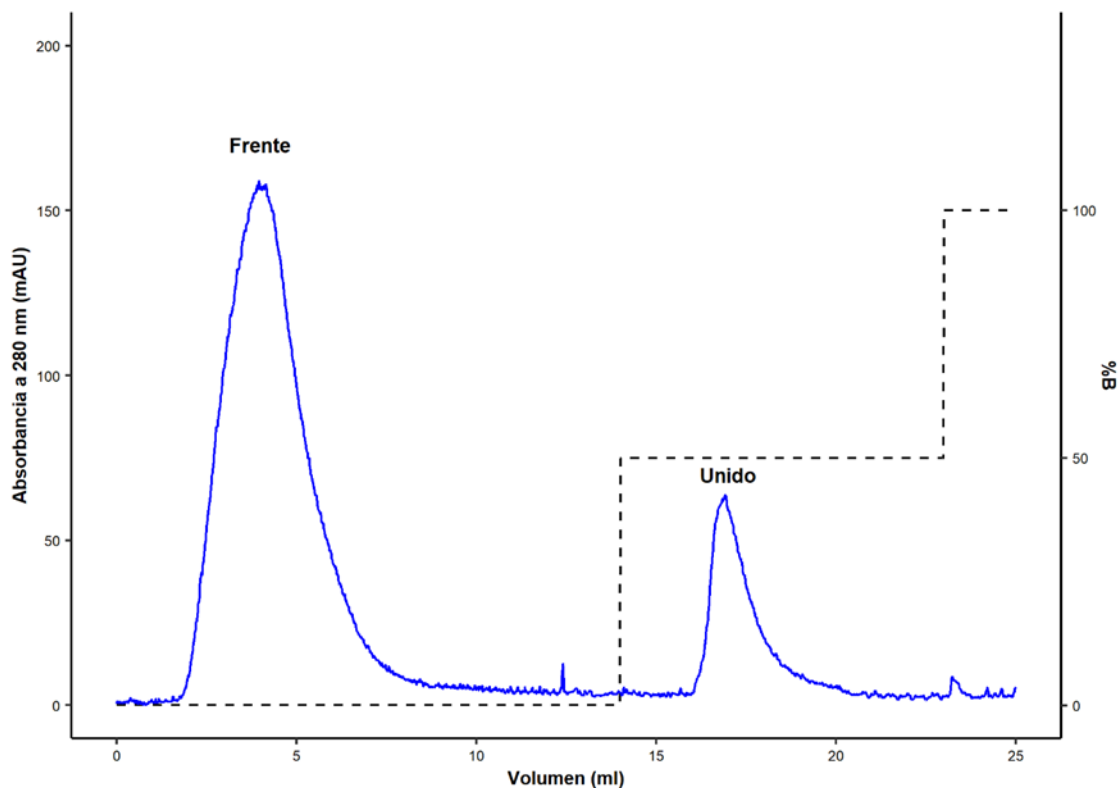
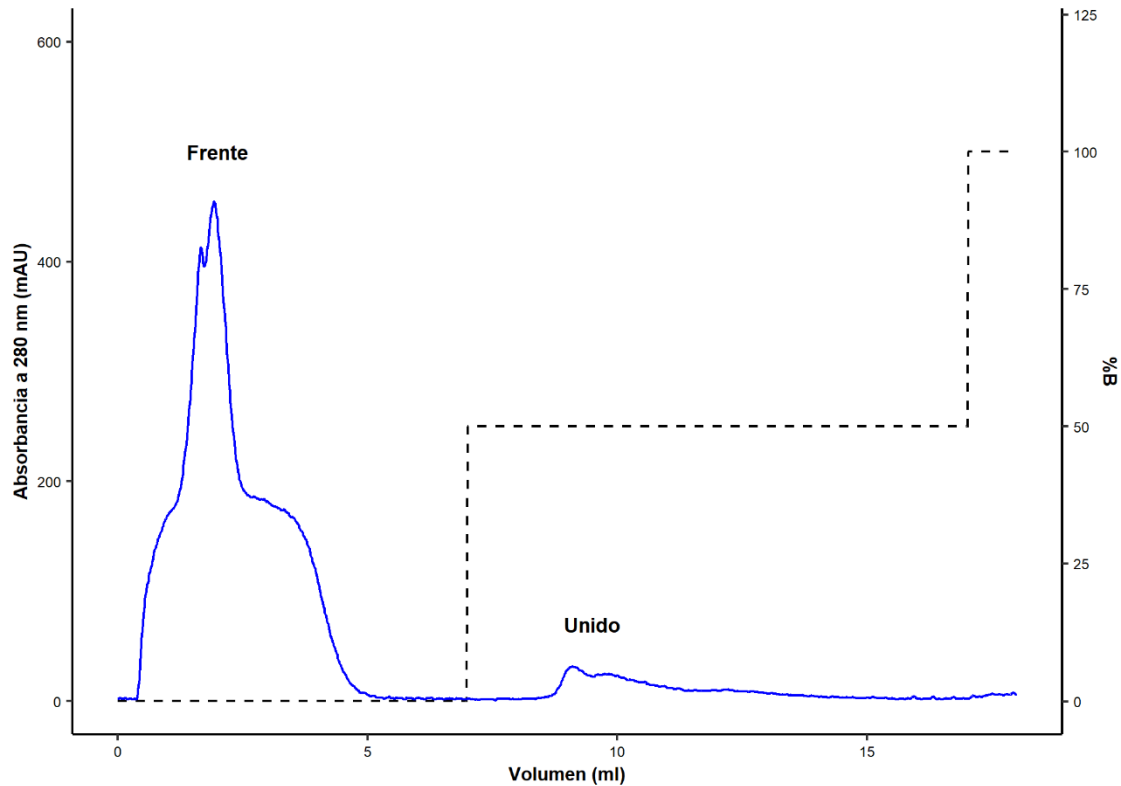


Gráfico N°1-Imagen de barrido espectrofotométrico de la Cromatografía en columna catiónica CM-FF

## Cromatografía en columna catiónica fuerte SP-XL (sulfopropyl-sepharosa XL)

Como podemos observar en el gráfico N° 2, no se obtiene un pico definido de elución porque lo que se elige por rendimiento y definición de picos es la cromatografía de CM-FFs. Se utilizó la muestra denominada unido para preparar el reactivo de látex.



Gráfica N°2. Imagen de barrido espectrofotométrico de la cromatografía en columna catiónica, utilizando para el frente de corrida una condición tal que eluyan la primer fracción y luego se utiliza otra condición (NaCl-1M) donde se eluye la fracción unida.

## SDS PAGE

En la imagen N° 4 al analizar los distintos antígenos a través de la electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En la calle 1 se observa una banda muy tenue perteneciente a la histoplasmina, entre el peso molecular de 130 y 95 Kda, correspondientes a las proteínas H y M, donde se ve débilmente debido a que no hubo una gran concentración del conjunto de proteínas que existen en la histoplasmina. En la calle 2 no se observan bandas ya que hay una baja concentración de proteínas de histoplasmina. En la calle 3 se ve que hay gran cantidad de proteína, debido a que se observan bandas, estas son pertenecientes a la histoplasmina y sus fracciones.

En la calle número 4 no se observan bandas, posiblemente por insuficiente cantidad de proteínas, por ello se repitió el gel con la muestra concentrada como se muestra en la

imagen n°5. En la calle número 5 se observan bandas pertenecientes al eluido de FPLC de histoplasmina. En la calle 6, se sembró la alícuota de proteína recombinante la banda perteneciente a la proteína M recombinante es la de aproximadamente 130 Kda (proteína M unida a MBP). Sin embargo se observan otras bandas que pueden ser producto de degradación o de síntesis incompleta de la proteína. Se puede observar otra banda saturada entre 37 y 52 KDa que corresponde a MBP (que es de 42 KDa). Estas observaciones se concluyen junto a la información oral brindada por los productores de la proteína recombinante. Ambas bandas son marcadas en rojo por el equipo de detección debido a que se está saturando el sistema es decir hay mucha cantidad de proteína en esa banda.

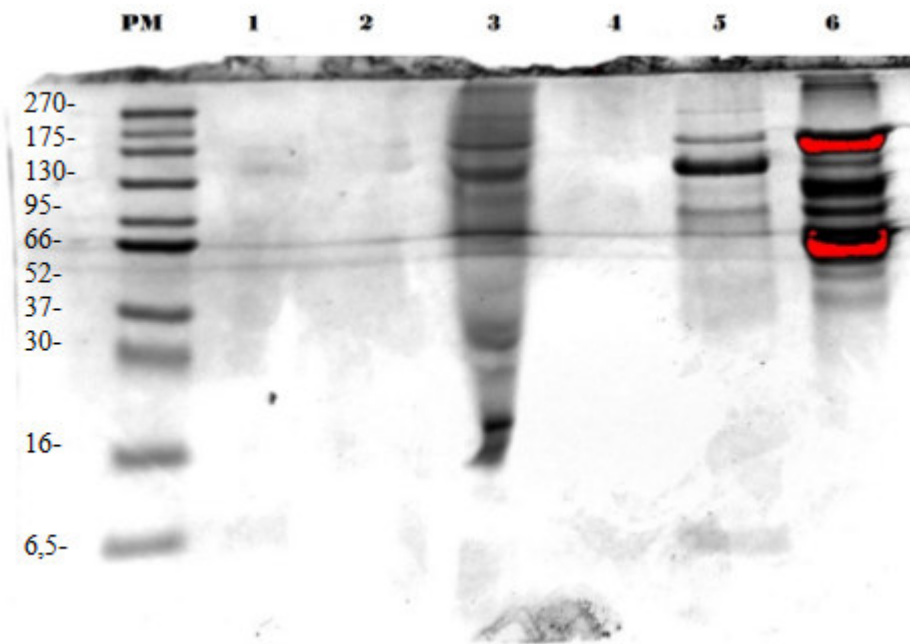


Imagen N°4. SDS-PAGE. PM-marcador de peso molecular, 1-histoplasmina dilución 1/10, 2-histoplasmina dilución 1/2, 3-histoplasmina, 4-frente de FPLC de histoplasmina, 5-eluido de FPLC de histoplasmina y 6-proteína M recombinante.

### **SDS-PAGE entre el frente y eluido de FPLC**

En la imagen N° 5 se observa que entre el eluido y el frente de FPLC hay una diferencia en las primeras tres bandas, alrededor de entre 80 y 120 Kda, estas bandas podrían pertenecer a las proteínas M y H, estas no se encuentran en el frente y si en el eluido.

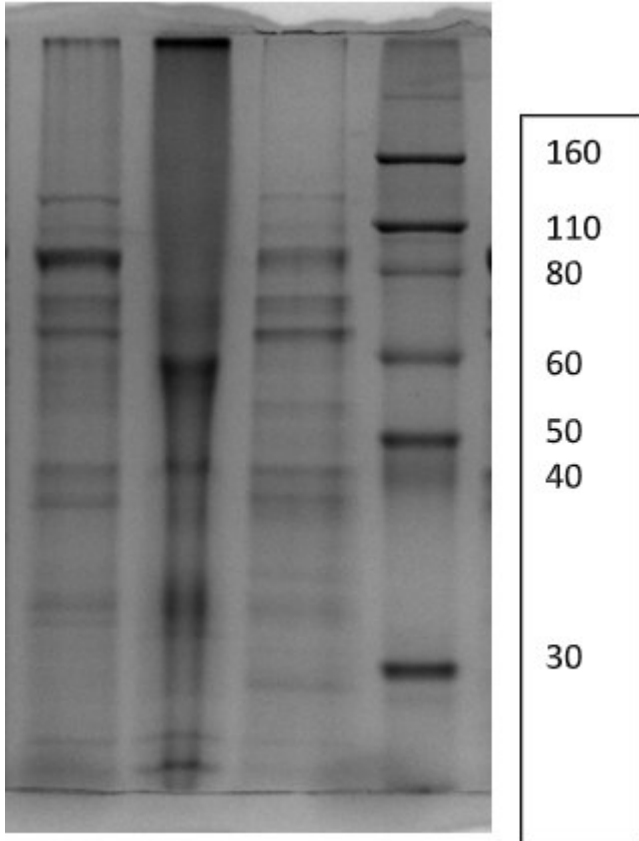


Imagen N°5 de izquierda a derecha 1-Histoplasmina, 2-FPLC frente, 3-FPLC unido, 4-marcador de peso molecular.

### **Dot blot de las muestras de FPLC**

Se evaluaron las reacciones homólogas con el antisuero anti histoplasmina, el antisuero anti galactomanano de origen micelial y levaduriforme. Así mismo evaluaron las reacciones cruzadas de las distintas fracciones: histoplasmina; histoplasmina purificada por FPLC tanto el frente (FPLC frente) como la muestra que es eluida con NaCl (FPLC unido) y la histoplasmina precipitado con citrato de sodio (S1+S2+S3). Para ello se utilizaron antisueros policlonales de conejo contra otras micosis: antisuero anti-*Coccidioides posadasii*; Antisuero anti-*Paracoccidioides* sp.; Antisuero anti-*Aspergillus fumigatus*; antisuero anti *Cryptococcus neoformans*. (Ver imagen N°6)

Como se puede observar en la imagen N°6 los anticuerpos anti-histoplasmina tienen reacción cruzada con *Coccidioides posadasii*, y una débil reacción cruzada con *Paracoccidioides* y *Aspergillus*, pero no se observó reacción cruzada con *Cryptococcus*. Para el frente de FPLC dio positivo con el anticuerpo anti histoplasmina y tiene reacción

cruzada con *Coccidioide posadasii*, y *Paracoccidioides*, pero no hay reacción cruzada con *Cryptococcus*. Luego de la precipitación del citrato, el sobrenadante sigue teniendo las reacciones homólogas con el antisuero anti histoplasmina, y anti galactomanano. Pero continúan las mismas reacciones cruzadas. Cuando purificamos por FPLC podemos ver que la muestra purificada por FPLC (FPLC unida) si bien continúan las reacciones cruzadas se observa una mayor interacción con el antisuero homólogo de Histoplasmosis y tiene interacción con el suero anti galactomanano, lo que podría implicar que la muestra purificada por FPLC contenga el galactomanano.

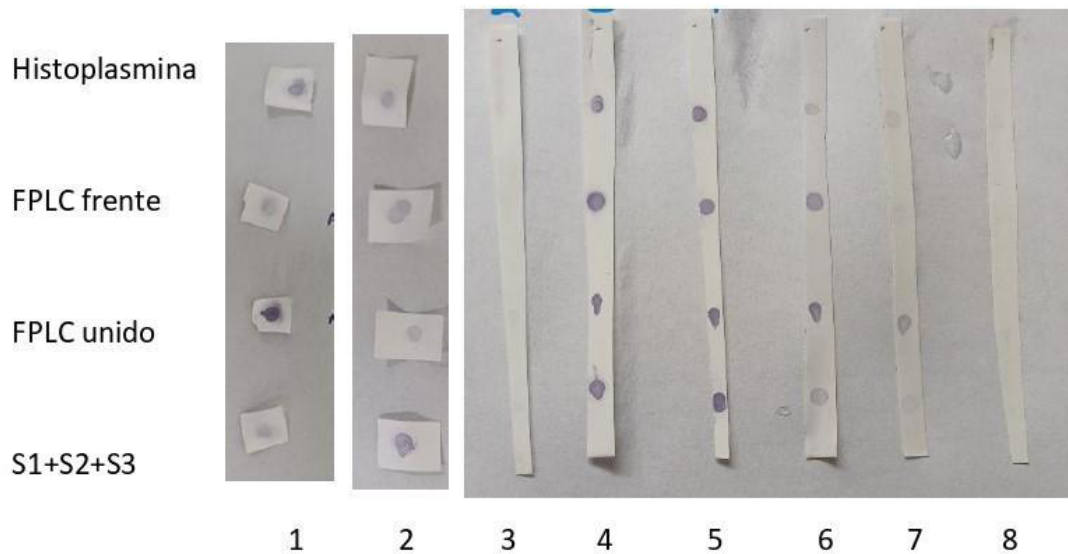


Imagen N°6. 1-anticuerpo anti *Histoplasma*-; 2-antisuero anti *Coccidioide posadasii*, 3 anticuerpos anti *Cryptococcus*, 4-anticuerpo anti Galactomanano micelial, 5-anticuerpo anti Galactomanano levaduriforme, 6-anticuerpo anti *Paracoccidioides*, 7-anticuerpo anti *Aspergillus*, 8-control negativo (si bien en la membrana de nitrocelulosa estan los antígenos, no contiene anticuerpos de conejo, en vez de tener el anticuerpo primario contiene PBS-leche, pero si le agregamos el anticuerpo secundario anti conejo).

### Resultados de los reactivos de látex

En la imagen N° 7 se observa en la parte izquierda una prueba de aglutinacion de latex positiva, a diferencia del de la derecha que es negativa.



Imagen n°7. resultados de las reacciones de los reactivos de látex

### **Evaluación de las condiciones óptimas de buffer de pegado de la proteína recombinante M**

Para la adsorción de proteína M recombinante se probaron dos buffer acetato (pH:4,8) y buffer PBS (pH:7,4). Como se observa en la tabla N°1 solo hubo aglutinación con el suero de conejo homólogo cuando la adsorción se realizó a pH 7,4. Esto es coincidente ya que nos informaron que el punto isoeléctrico de la proteína recombinante es de 7, en este pH la proteína no tiene carga y se favorecen las interacciones hidrofóbicas que son las que intervienen en la unión de las proteínas a las partículas de látex. Entonces se utiliza como óptimo el pH 7,4 ya que el de 4,8 no se observa aglutinación y con el buffer 7,4 se observa aglutinación hasta la dilución 1/4 del suero de conejo anti histoplasmina, utilizando el buffer de PBS.

		pH: 4,8	pH 7,4
Suero normal		-	-
Buffer		-	-
Suero conejo a`histo	puro	-	4+
	1/2	-	2+
	1/4	-	1+
	1/8	-	+débil
	1/16	-	-
	1/32	-	-

Tabla n°1. Adsorción de proteína M recombinante con dos pH diferentes. Resultados de aglutinaciones con antisuero anti histoplasmina.

### **Ensayos de aglutinación**

Se añadieron 25 µl de la solución de prueba y 25 µl de los SPLs con una pipeta sobre un portaobjetos negro. Luego se mezclaron completamente, y el portaobjetos se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en un rotador ajustado a 100 rpm. Se utilizó una escala visual de cuatro puntos que iba desde aglutinación débil (1+) hasta aglutinación fuerte (4+), la cual se muestra de manera pictórica en la imagen nª8.

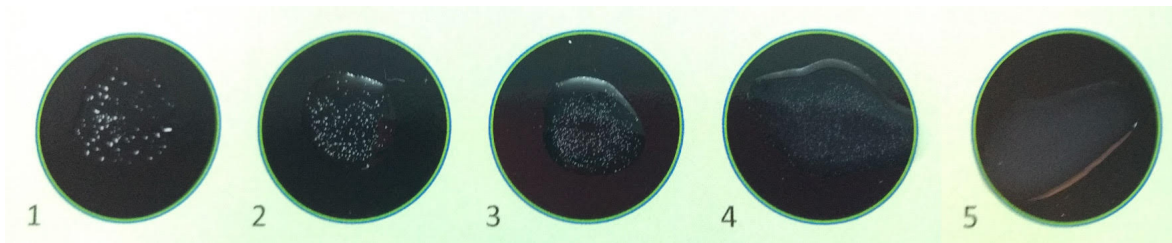


Imagen nª8. Interpretación de los resultados de la prueba de aglutinación: 1- Positivo 4+ (precipitado floculante denso formado en 3 min con fondo transparente); 2- Positivo 3+ (precipitado floculante denso formado en 5 min con fondo transparente); 3- Positivo 2+ (precipitado floculante ligero formado en 5 min con fondo transparente); 4- Positivo 1+ (precipitado floculante ligero formado en 10 min con fondo transparente); 5- Negativo (sin precipitado, fondo turbio y homogéneo)

### **Evaluación de sensibilidad analítica de los distintos antígenos**

Para evaluar la sensibilidad analítica se tiene en cuenta la última dilución que da un positivo mayor a 2+, según la imagen nª8. En la tabla nª2 se observa que la sensibilidad de la Histoplasmina, el frente de FPLC y la fracción unida nos da una dilución al cuarto, estas tres condiciones tienen una similar sensibilidad analítica, mientras que la proteína M recombinante tiene una dilución a 1/2 por lo cual nos da menor sensibilidad a comparación de las otras tres proteínas.

		<b>Histoplasmina</b>	<b>Frente FPLC</b>	<b>Unido FPLC</b>	<b>Proteína M recombinante</b>
Suero normal de conejo		-	-	-	-
Buffer		-	-	-	-
Suero conejo a`histo	puro	4+	4+	4+	4+
	1/2	4+	4+	4+	2+
	1/4	3+	3+	3+	1+
	1/8	+d	+d	+	+débil

	1/16	-		-	
	1/32	-			

Tabla n°2. Evaluación de la sensibilidad analítica de Histoplasmina ,el frente de FPLC, unido de FPLC y proteína M recombinante.

### **Evaluación de reacciones cruzadas de los distintos antígenos**

En la tabla N° 3 se observa que en la fracción de suero de conejo anti-*Coccidioides* hay una alta reacción cruzada con la histoplasmina, debido a que la la histoplasmina, contiene una mezcla de antígenos glicoproteicos (como H y M) que comparten epítopes de carbohidratos con otros patógenos fúngicos, lo que genera reactividad cruzada debido a determinantes antigénicos comunes (Zancopé-Oliveira et al., 1994), y en los demás antígenos del frente de FPLC, unido de FPLC y proteína M recombinante no se observa reacción cruzada con el suero de conejo anti-*Coccidioides*, Esta falta de reactividad se justifica por la mayor pureza de estos antígenos. Tampoco hay reacción cruzada con *Paracoccidioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, lo mismo ocurre para el frente y unido de FPLC y para la proteína M recombinante en la fracción pura, esta observación se justifica por la baja homología antigénica entre *H. capsulatum* y estos patógenos (*Paracoccidioides brasiliensis*, especies de *Aspergillus*). También no se observa en el frente de FPLC y unido de FPLC para *C.neoformans* y *Aspergillus fumigatus* reacción cruzada, radica en la selectividad de la cromatografía FPLC, que retiene proteínas específicas y desecha otras.

Suero	histoplasmina (9)				Frente FPLC	Unido FPLC	proteína M recombinante
	puro	1/2	1/4	1/8	puro	Puro	Puro
Suero conejo anti- <i>Coccidioides</i>	4+	4+	4+	-	-	-	-
Suero conejo anti- <i>Paracoccidioides</i>	-				-	-	-
Suero conejo anti- <i>Aspergillus fumigatus</i>	-				-	-	-
Suero conejo anti- <i>Aspergillus niger</i> (2017/5)	-				-	-	-
Suero conejo anti- <i>Aspergillus flavus</i> (lote 2019/2)	-				-	-	-
Suero conejo anti <i>C.neoformans</i>					-	-	

Suero conejo anti- <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> (2018/2)					-	-	
---	--	--	--	--	---	---	--

Tabla nº3 .Se evaluó las reacciones cruzadas de Histoplasmina ,el frente de FPLC, unido de FPLC y proteína M recombinante frente a sueros de conejo inmunizados con antígenos micóticos.

### Conclusiones

En este trabajo se evaluaron distintas preparaciones antigénicas nativas y recombinantes de *Histoplasma capsulatum* para utilizar en la detección de anticuerpos para evaluar las distintas fracciones obtenidas como candidatos de antígeno para la sensibilización de partículas de látex. Por un lado se purificó histoplasmina por FPLC para la evaluación de las distintas fracciones obtenidas como candidatos de antígeno para la sensibilización de partículas de látex. En el FPLC se eligió la cromatografía en columna catiónica CM-FF (carboximetil fast flow) porque nos dió un pico más definido que la cromatografía en columna catiónica fuente SP-XL (sulfopropyl-sepharosa XL). Al analizar las fracciones obtenidas del FPLC por SDS-PAGE pudimos observar la presencia de bandas que por su PM (entre 60-110) podrían corresponder a la proteína M y H, aunque están impurificadas junto con otras proteínas de menor PM (ver Imagen N°4). En la fracción del frente no están esas bandas que podrían corresponder a la proteína H y M, por otro lado se recibió proteína M recombinante del equipo de María Lujan Cuestas en el Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPam, CONICET-UBA), para ello se fusionó con el MBP la proteína diana para que pueda purificarse. Además los antígenos fueron evaluados y cuantificados por SDS PAGE, DOT BLOT. En cuanto a la evaluación de la inmunoreactividad se evaluó las reacciones homólogas y heterólogas de los distintos antígenos para ello se utilizaron distintos antisueros. Los antisueros que se utilizaron para evaluar las reacciones homólogas fueron anti histoplasmina (obtenidos con la inmunización de histoplasmina) y anti galactomanano (obtenidos por la inmunización de galactomanano purificado a partir de la histoplasmina). Para evaluar las reacciones heterólogas se utilizaron los antisueros de *Coccidioide posadasii*, *Cryptococcus*, *Paracoccidioides* y *Aspergillus*. Se presentaron reacciones cruzadas con todos los antisueros ensayados excepto *Cryptococcus*. Al evaluar las muestras purificadas por FPLC, se observan en todas las muestras Histoplasmina, el FPLC unido, frente y en la fracción del citrato, luego de la precipitación de este último, el sobrenadante sigue teniendo las reacciones homólogas con el antisuero anti histoplasmina, y anti galactomanano. Cuando purificamos por FPLC podemos observar que la muestra

purificada por FPLC unido continúan las reacciones cruzadas y se observa una mayor interacción con el antisuero homólogo de Histoplasmosis y tiene interacción con el suero anti galactomanano, lo que podría decirnos que la muestra purificada por FPLC contenga el galactomanano, que podría estar implicado en las reacciones cruzadas con otras micosis.

El pH de histoplasmina ya se había definido (Leguizamon Camila Daiana. 2023. “Desarrollo de un reactivo para la detección de anticuerpos anti-Histoplasma Capsulatum, por aglutinación con partículas de látex”. UNAJ.), dado a los resultados de aglutinación a pH 4,8 en buffer acetato que es la condición óptima para la sensibilización de las partículas de látex, por lo cual usando el buffer con este pH se favorece la adsorción pasiva. En cuanto a la evaluación de las condiciones óptimas de buffer de pegado de la proteína recombinante M solo se observa que solo hubo aglutinación con el suero de conejo homólogo cuando la adsorción se realizó a pH 7,4. Sin embargo la sensibilidad del reactivo con el antígeno recombinante es menor que las demás muestras.

En la evaluación de reacciones cruzadas de los distintos antígenos pegados a partículas de látex no se observan reacciones cruzadas en la mayoría de las fracciones tanto unido FPLC y frente FPLC, inclusive la proteína M recombinante, a diferencia de la histoplasmina quien sí presentó reacciones cruzadas, pero solamente con el Suero de conejo anti-Coccidioides. En la imagen N°4 y la tabla N°3 se observa como hay una gran reacción cruzada con la histoplasmina y el suero anti Coccidioides, lo que confirma lo dicho anteriormente. La diferencia observada en cuanto a las reacciones cruzadas entre látex y dot blot se debe a que el dot blot es más sensible, por lo cual es posible que no llegue a detectar esa reacción cruzada.

Si bien los resultados son prometedores al utilizar la histoplasmina o la fracción purificada por FPLC como antígeno adsorbido a partículas de látex, es importante evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica con muestras clínicas. Ya que solo se probaron sueros de conejos inmunizados con los antígenos, pero la respuesta inmune a una infección en humanos puede ser muy diferente.

Se evaluaron diversos antígenos de *Histoplasma capsulatum* (histoplasmina, galactomanano, proteína M recombinante y fracciones purificadas por FPLC, como el frente y el unido). La histoplasmina, obtenida del sobrenadante de cultivo micelial, demostró una alta sensibilidad analítica, sin embargo, presenta una desventaja significativa en términos de especificidad, ya que exhibe una fuerte reacción cruzada con antisueros contra *Coccidioides posadasii*, lo que podría generar falsos positivos en pacientes con otras micosis endémicas. Las fracciones purificadas por FPLC (frente y unido) mostraron una sensibilidad analítica comparable a la histoplasmina, con la ventaja adicional de una mayor pureza y menor reactividad cruzada, mas en la fraccion unida que en el frente. Donde no se observaron reacciones cruzadas significativas con antisueros contra *Paracoccidioides sp.*, *Aspergillus spp.* o *Cryptococcus neoformans*, lo que mejora su especificidad diagnóstica. La proteína M recombinante, producida en sistemas de expresión heteróloga, presentó una

sensibilidad analítica inferior, lo que la hace menos efectiva para detectar anticuerpos en concentraciones bajas.

## **ANEXO**

### **Gel de separación y siembra de SDS-page:**

se preparó gel de separación de acrilamida 7,5 %:

Agua destilada 4,8ml

Tris-HCL 1,5M de pH 8,8:2,5 ml

SDS 10% p/v: 100 ul

Solución de acrilamida 30% p/v / bis acrilamida 0,7% p/v: 2,5 ml

APS 10% p/v: 50 ul

TEMED: 5 ul

### **PBS-leche 5 %**

50 ml de PBS + 2,5 g de leche

### **Solución de 4 cloro 1 naftol (50 ml)1X**

50 mM TRIS  $121 \text{ g/mol} * 50 \text{ mM}/1000 * 0.05 \text{ L} = 0.3025 \text{ g}$

0,2 M NACL=  $58.5 \text{ g/mol} * 0.2\text{M} * 0.05 \text{ L} = 0.585 \text{ g}$

Mezclar 20ml de metanol, helado, con 60mg de 4-cloro-1-naftol (4CN)

Por separado mezcle 60 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % con 100ml de TBS a temperatura ambiente

Rápidamente mezcle las dos soluciones y úselas inmediatamente.

### **Revelador 5,88x (Cloronaftol en Metanol)**

Cloronaftol =  $178,62 \text{ g/mol} * 0.02 \text{ L} * 0.48 \text{ mM}/1000 * 5.88 (2.82 \text{ Mm}) = 0.01 \text{ g}$

Guardar en freezer -20 °c.

Al momento de usar, Diluir el cloronaftol 5,88X para llevar el metanol a 17%. 2,550 ml + 12.450 ml de Tris 50 Mm con Nacl 0,2M a Ph 7,6

Agregar 1% final de agua oxigenada

El buffer acetato con pH 4,8 (buffer acetato, NaCl 0,15M, pH 4.8: primero se pesaron 246 mg de acetato de sodio y 88 mg de NaCl 0,15M, luego se añadió 40ml de ácido acético 1N y se llevó a 100ml con agua purificada. Se ajustó el pH con acético 1N hasta llegar al pH deseado,4.8.

### **Referencias bibliográficas**

1. Azar, M. M., Loyd, J. L., Relich, R. F., Wheat, L. J., & Hage, C. A. (2020). Current concepts in the epidemiology, diagnosis, and management of histoplasmosis syndromes. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(1), 13-30.
2. Guillermo quindós.micologia clinica. 2015 Elsevier España, SLU.
3. Wheat, J., French, M. L., Kohler, R. B., Zimmerman, S. E., Smith, W. R., Norton, J. A., Eitzen, H. E., Smith, C. D., & Slama, T. G. (1984). The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis: Analysis of experience in a large urban outbreak. *Annals of Internal Medicine*, 101(6), 856-860.
4. Guimarães, A. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2006). Diagnosis of histoplasmosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 1-13.
5. Trovero, A. C., Mazza, M., Rogé, A., Rivas, M. C., Bordagorría, X., Bruno, S., & Davel, G. (2020). Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis. *Revista Argentina de microbiología*, 52(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.002>
6. Guimarães, A. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2006). DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 83822006000100001.
7. Alvarado, P., Pérez-Rojas, Y., Zambrano, E. A., Gonzatti, M. I., & Roschman-González, A. (2020). Improved serodiagnosis of histoplasmosis by use of deglycosylated extracellular released antigens of *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Microbiological Methods*, 175, 105981.
8. Janeway's immunobiology (2017). Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. 9th edition; New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis.

9. Rodríguez Labocetta, C., Toscanini, M. A., Videla Garrido, A., Posse, G. B., Capece, P., Valdez, R. M., Chacón, Y. A., González Maglio, D., Nusblat, A. D., & Cuestas, M. L. (2023). Evaluation of the *Histoplasma capsulatum* 100-kilodalton antigen dot blot for the rapid diagnosis of progressive histoplasmosis in HIV/AIDS patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 107(4), 116060.
10. Zancopé-Oliveira, R., Bragg, S., [et al.], & Peralta, J. M. (1994). Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(4), 418-424.
11. FPLC explained. (n.d.). *Approach Labs*. <https://www.approachlabs.com/fplc-explained/>. Consultado October 6, 2025
12. Kabita Sharma. March 10, 2024. Fast Protein Liquid Chromatography: Features, Principle, Applications. [Fast Protein Liquid Chromatography: Features, Principle, Applications](#)
13. César Menor-Salván. Febrero 2019. Rev. 3, Nov 2023. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida. [SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida - ChemEvol](#)

A photograph of a piece of paper with handwritten text in black ink. The text is arranged in three lines: the first line contains the name 'Santi' in a cursive script; the second line contains 'MENASE SANTIAGO FABIAN' in a mix of uppercase and lowercase letters; the third line contains the number '39.983.349'.