

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Microbiología**

**Ensayos de obtención de fragmentos vNAR para la detección
de *Coccidioides* spp.**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jamvier Baruc López Tello

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Jamvier Baruc López Tello

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

Miembros del comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Jamvier Baruc López Tello © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta Jamvier Baruc López Tello como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Ensayos de obtención de fragmentos vNAR para la detección de *Coccidioides* spp.

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Director de tesis

La fiebre del Valle de San Joaquín o Coccidioidomicosis (CM) es una enfermedad pulmonar causada por el hongo *Coccidioides* spp. La perturbación del suelo por humanos, animales o condiciones climáticas ocasiona la dispersión de esporas de *Coccidioides* en el aire, pudiendo ser inhaladas por personas susceptibles. Las esporas alojadas en un huésped forman esférulas, que una vez maduras liberan endosporas capaces de diseminar la enfermedad a otros órganos por la formación de nuevas esférulas. Debido al riesgo que representa esta enfermedad diversos autores han estudiado la distribución del hongo, y evaluado su incidencia con base a variables climatológicas como las temporadas de lluvias seguidas de periodos secos, la temperatura y las tormentas de arena. Además, se han realizado muestreos de animales que actúan como reservorios del agente etiológico. También se han analizado muestras de suelo por medio de métodos microbiológicos y moleculares. Los métodos actuales tienen limitantes ya que son influenciados por la información disponible en bases de datos epidemiológicos y genéticos; requieren altas medidas de bioseguridad para evitar contagios accidentales; requieren un gran esfuerzo de muestreo debido a la distribución aleatoria del hongo y/o implican costos altos de reactivos y equipos especializados. En este trabajo se propuso obtener fragmentos recombinantes de anticuerpos de tiburón (vNAR) afines a *Coccidioides* spp., los cuales permitan el desarrollo de un método de detección reproducible y de bajo costo para aplicarlo en zonas de riesgo. Este método facilitaría la detección directa del hongo sin requerir aislamientos del hongo o extracciones de ADN. Para la selección de anticuerpos afines a *Coccidioides* spp. se utilizaron dos antígenos: IDTP (IMMY©) y coccidioidina (InDRE). Se realizó una bioselección de fragmentos vNAR a partir de una biblioteca no inmune de fagos recombinados. Para la bioselección se utilizaron los dos antígenos no patogénicos obtenidos a partir del hongo, y para comprobar su eficiencia se realizaron pruebas de expresión, reconocimiento y especificidad por los antígenos. A partir de estos análisis se encontró un fragmento vNAR capaz de reconocer al antígeno IDTP, el cual podría ser utilizado para el desarrollo de un método de inmunodetección.

Palabras clave: *Coccidioides* spp., biblioteca vNAR, coccidioidina, IDTP, ELISA

Abstract of the thesis presented by **Jamvier Baruc Lopez Tello** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Assays to obtain vNAR fragments for *Coccidioides* spp detection.

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis Director

Valley Fever or Coccidioidomycosis (CM) is a pulmonary disease caused by the fungus *Coccidioides* spp. Soil disturbance by humans, animals or climate leads to *Coccidioides* spores dispersion in the air and spores inhalation by people. The spores form spherules inside a host that grow up creating endospores capable of disease dissemination and new spherules formation. Because of its prevalence, many authors had studied the fungus distribution as well as evaluated its incidence based on climatic conditions like rainy seasons follow by drought, temperature, and sandstorms. Animal sampling has been performed to assess reservoirs. Microbiological and molecular methods have been used to analyze soil samples. Current methods efficiency is affected by available epidemiological and genetic information, biosafety facilities needs, sampling effort, reagents costs, and specialized equipment needs. In this work, it was proposed to obtain recombinant fragments of shark antibodies (vNAR) capable of recognizing *Coccidioides* spp. This method would allow the development of a reproducible detection method of risk zones, at lower costs. This method would not require fungus isolation or DNA extraction. Antibody biopanning was performed using IDTP (IMMY©) and coccidioidin (InDRE) antigens as baits. vNAR fragment selection was made up using a synthetic library of nonimmune recombinant phages. Expression, recognition, and specificity analysis were done to evaluate its effectiveness as a detection method. We find a vNAR fragment capable of recognizing the IDTP antigen which would be useful for future immune-detection methods.

Keywords: *Coccidioides* spp, vNAR library, coccidioidin, IDTP, ELISA

Dedicatoria

*Si alguien ama a una flor de la que sólo existe un ejemplar
entre millones y millones de estrellas, es suficiente mirar al cielo
para ser feliz pues puede decir satisfecho: "Mi flor está allí, en alguna parte..."*

El Principito, Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimientos

A CONACYT por la beca 613469 para realizar mis estudios de maestría.

A CICESE por el apoyo que recibí durante el desarrollo de mi proyecto de tesis.

A la Dra. Meritxell Riquelme por ayudarme a desarrollar mi idea a pesar de los inconvenientes.

A los miembros de mi comité Dr. Alexei Licea y Dr. Ernesto García por las valiosas aportaciones a mi proyecto.

A Olivia Cabanillas y Jahaziel Gasperín por su constante disposición para mejorar mis resultados.

A Lluvia Vargas por todos sus consejos desde que inicie en el posgrado.

A mis profesores M.C. María Borráz y Dr. Eduardo Molina Gayosso por su apoyo y consejos.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1. Aspectos históricos de la Coccidioidomicosis.....	2
1.1.2 Biología de <i>Coccidioides</i> spp.....	4
1.1.3 Epidemiología.....	5
1.2 Antecedentes.....	6
1.2.1 Diagnóstico clínico de la Coccidioidomicosis.....	6
1.2.2 Detección de <i>Coccidioides</i> spp. en suelo.....	7
1.2.3 Anticuerpos.....	8
1.2.3.1 Estructura del anticuerpo.....	9
1.2.3.2 Inmunoensayos.....	10
1.2.3.3 Anticuerpos de dominio único.....	10
1.2.3.3 Anticuerpos IgNAR.....	12
1.3 Justificación.....	12
1.4 Hipótesis.....	12
1.5 Objetivos.....	13
1.5.1 Objetivo general	13
1.5.2 Objetivos específico.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Selección de fragmentos vNAR.....	14
2.1.1 Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> cepa ER2738.....	14
2.1.2 Preparación de fago ayudador (VCSM13).....	15
2.1.3 Bioselección.....	15

2.1.4 Producción de fago de colonias individuales.....	17
2.2 Síntesis de la proteína vNAR recombinante.....	19
2.2.1 Transformación.....	19
2.2.2 PCR de colonia.....	19
2.2.3 Inducción.....	20
2.2.4 Extracción de la proteína vNAR recombinante.....	20
2.3 Análisis de la proteína vNAR recombinante.....	21
2.3.1 ELISA de expresión.....	21
2.3.2 ELISA de reconocimiento.....	21
2.3.3 Purificación de la proteína vNAR.....	22
2.3.4 Electroforesis desnaturizante (Tricina-SDS PAGE).....	22
2.3.5 Inmunodetección (Western Blot).....	22
2.3.6 Diálisis de la proteína.....	23
2.4 Ensayos de reconocimiento.....	23
Capítulo 3. Resultados.....	25
3.1 Selección de fragmentos vNAR.....	25
3.1.1 Análisis de secuencias.....	27
3.2 Síntesis y análisis de la proteína recombinante.....	27
3.3 Ensayos de reconocimiento.....	32
Capítulo 4. Discusión.....	36
Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas.....	39
Literatura citada.....	40

Lista de figuras

Figura		Página
1	Mapa de áreas endémicas de <i>Coccidioides</i> spp.....	1
2	Ciclo de vida de <i>Coccidioides</i> spp.....	4
3	Estructura de la inmunoglobulina G.....	9
4	Diferencias estructurales entre anticuerpos comunes y anticuerpos de un solo dominio.....	11
5	Vector pComb3x con inserto.....	16
6	Evaluación de fagos de colonias individuales en placa de ELISA.....	18
7	Títulos de fagos en las rondas de selección contra el antígeno IDTP.....	25
8	Títulos de fagos en las rondas de selección contra el antígeno coccidioidina.....	26
9	Alineamiento de fragmentos vNAR.....	27
10	Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de expresión.....	28
11	Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de reconocimiento...	29
12	Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de fracciones de cada proteína.....	31
13	Gel de electroforesis de los productos amplificados en la PCR de colonias.....	32
14	Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de Elisa de expresión de cada proteína.....	33
15	Gráfica de los valores de absorbancia del análisis ELISA de reconocimiento.....	34
16	Análisis de las fracciones de la proteína Tz45.....	35
17	Gráfica de los valores de absorbancia del análisis ELISA de reconocimiento.....	35

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones para reacción de PCR	20

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades

La Coccidioidomicosis (CM) o fiebre del Valle de San Joaquín es una enfermedad sistémica causada por el hongo Ascomycota dimórfico *Coccidioides* spp., que incluye dos especies *C. immitis* y *C. posadasii* casi idénticas a nivel morfológico pero diferenciadas genéticamente (Fisher *et al.*, 2002). Este género fúngico se encuentra distribuido en el continente americano en regiones de clima árido o semiárido, con suelos de alta salinidad y pH alcalino (Fig. 1), prevaleciendo en estados al suroeste de EEUU y noroeste de México (Castañón-Olivares, 2004; Laniado-Laborín, 2006).

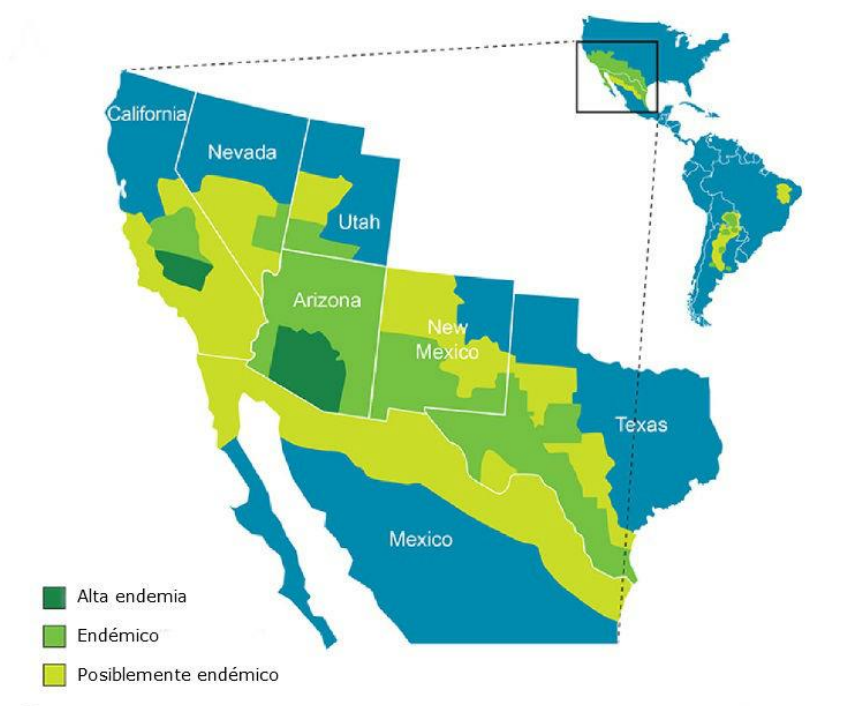


Figura 1. Mapa de áreas endémicas de *Coccidioides* spp. Modificado de Lee *et al.*, 2015

La caracterización de aislados fúngicos mediante técnicas moleculares, demostró la existencia de grupos genéticamente diferenciables en distintas regiones geográficas (Zimmermann *et al.*, 1994). Estos hallazgos demostraron la existencia de un taxón *California (immitis)* y otro *no-California (posadasii)* que no pueden realizar entrecruzamiento (Burt *et al.*, 1997).

Esta micosis se adquiere por inhalación de las artrosporas. Afecta a los pulmones y puede ser asintomática, benigna, grave o mortal. Las formas diseminadas afectan articulaciones, tejido cutáneo y huesos. El microorganismo actúa como agente patógeno primario en individuos sanos y como oportunista en individuos inmunodeficientes (Arenas-Guzmán, 2014).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en el aislamiento del hongo en cultivo, la presencia de esférulas en tejidos y secreciones, así como pruebas serológicas (Stevens, 1995; Warlick *et al.*, 1983). Las estrategias de tratamiento varían de acuerdo al grado de la infección. Los antimicóticos más utilizados son la anfotericina B, el fluconazol y el itraconazol (Laniado-Laborín, 2006).

1.1.1 Aspectos históricos de la Coccidioidomicosis

Existen investigaciones de antropología forense que han demostrado que individuos de la cultura Sinagua de Arizona (1400-1000 a. C.) padecieron la infección por *C. immitis* (Harrison *et al.*, 1991); sin embargo, el primer caso de CM fue reportado por Posadas (1892) en un soldado argentino que presentaba lesiones en la piel caracterizadas por tumores y úlceras; este caso se diagnosticó como psorospermia, y se consideró que era provocado por un protozooario del género *Coccidia* (Ophüls *et al.*, 1900).

Rixford y Gilchist (1896) estudiaron el primer caso de CM en EEUU, en un inmigrante portugués que se estableció en el Valle de San Joaquín, adquirió la enfermedad y desarrolló lesiones nodulares en el cuello con la progresión de la misma. Posteriormente a su muerte, Rixford y Gilchist estudiaron otro caso con las mismas alteraciones del caso precedente. El agente etiológico fue clasificado como un protozooario de la clase Sporozoa y se le denominó *Coccidioides immitis*. Las muestras cultivadas en diversos medios desarrollaron colonias blanquecinas que fueron considerados como contaminantes.

Ophüls y colaboradores (1900) descubrieron que los cultivos de material de necropsia obtenidos de un tercer caso con el mismo tipo de protozooario, daban lugar al crecimiento de un moho, y que éste, al ser inoculado en cobayos, producía lesiones en las que podían identificarse esférulas similares a las encontradas en el tejido de los pacientes. Posteriormente propusieron que el agente etiológico era un hongo dimórfico y no un protozooario como se había descrito inicialmente.

Cooks en 1914 utilizó por primera vez la coccidioidina, una prueba intradérmica para diagnosticar la CM en personas. En 1932, Stewart y Meyer aislaron el hongo a partir de suelo californiano en una zona donde se habían reportado casos de CM grave en trabajadores filipinos de una granja (Stewart & Meyer, 1932; Arenas-Guzmán, 2014).

En 1935, Dickson reportó un caso en el que uno de sus estudiantes en la Universidad de Stanford, contrajo una enfermedad aguda al inhalar las esporas del hongo *Coccidioides*, manifestando afección pulmonar y erupciones cutáneas. Dickson había observado estos síntomas en enfermos de “la fiebre del Valle de San Joaquín”, por lo que quedó demostrada la afirmación de Ophüls y Moffit (Dickson, 1938; Restrepo, 2006).

Durante la Segunda Guerra Mundial, Smith consultor de la Secretaría de Guerra de EEUU, recorrió los campos de aviación al sur de California; documentando la progresión de la infección en 39,500 reclutas que provenían de diferentes partes del país, lo cual llevó a establecer que la primoinfección era asintomática o benigna, que los pacientes no caucásicos eran más susceptibles, y que las formas mortales eran muy raras (Arenas-Guzmán, 2014).

En México, en 1932, Cicero y Perrin presentaron el primer caso de CM en la Academia Nacional de Medicina. En 1945, Ochoa definió zonas endémicas en 53 comunidades del país, describiendo tres zonas endémicas mayores y tres microrregiones. El sur de EEUU y la frontera norte de México se consideraron las regiones de más alta endemia; por ello González Ochoa llamó a la CM “la micosis mexicana” (Arenas-Guzmán, 2014).

La situación epidemiológica actual de la CM en México se desconoce. Aunque se realizaron estudios en los años 90, que estimaban 1,500 casos anuales de CM primaria y 15 casos de enfermedad diseminada, no se cuenta con registros oficiales de la incidencia de la enfermedad en México desde 1995, debido a que la infección fue excluida del informe para el registro epidemiológico nacional (Baptista-Rosas & Riquelme, 2007).

1.1.2 Biología de *Coccidioides* spp.

La clasificación taxonómica del hongo está integrada de la siguiente forma: Reino: Eumycota; Phylum: Ascomycota; Sub-phylum: Pezizomycotina; Clase: Eurotiomycetes Orden: Onygenales; Familia: Onygenaceae; Género: *Coccidioides*; Especies: *immitis* y *posadasii* (Bowman *et al.*, 1996; Eriksson & Winka, 1997; Cavalier-Smith, 1998; Fisher *et al.*, 2002).

Coccidioides spp. es un hongo dimórfico (Fig. 2), con una fase saprobia micelial con producción de artroconidios encontrada en la naturaleza y cultivos de laboratorio, y una fase de esférula, que se desarrolla durante la fase infectiva cuando los artroconidios son inhalados e infectan a un mamífero hospedero (Dickson, 1938).

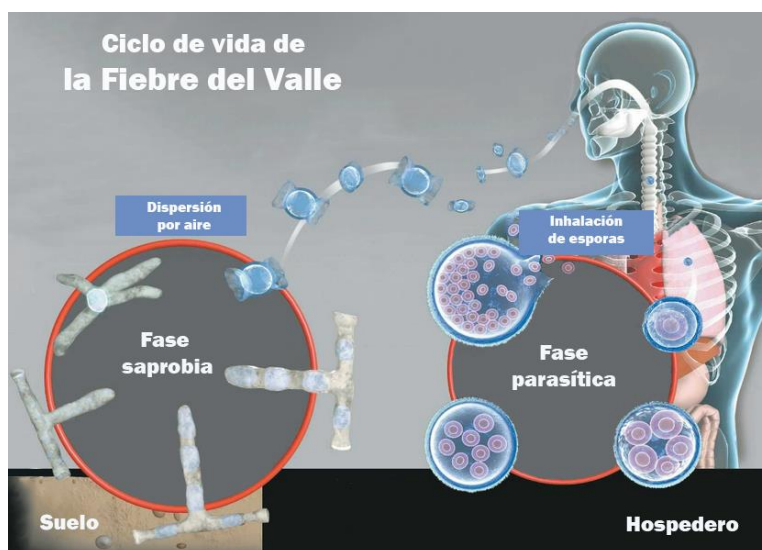


Figura 2. Ciclo de vida de *Coccidioides* spp. Modificado de Hector & Laniado-Laborin, 2005.

El hongo crece a temperatura ambiente en su medio natural, mientras que en condiciones de laboratorio crece a 37°C. En su estado saprófito produce un moho blanco algodonoso que desarrolla elementos tubulares (hifas), que al septarse forman los artroconidios (2-4.5 μm), los cuales son transportados fácilmente por el aire, particularmente cuando están asociados al polvo. En cultivos a 37°C, el moho desarrolla su ciclo parasítico; desarrolla una esférula de doble pared que se reproduce por endosporulación (partición sucesiva de núcleos), liberando las endosporas por la ruptura de la pared de la esférula madre. En los tejidos del hospedero también se observan esférulas (20-60 μm de diámetro) y endosporas (2-5 μm de diámetro) (Dickson, 1938; Restrepo, 2006).

En su forma micelial *C. immitis* es altamente infeccioso. La inhalación de artroconidios puede originar enfermedades pulmonares en humanos y animales. En su ciclo parasítico su virulencia está ligada a factores como: la gran cantidad de endosporas que son liberadas por la acción de proteasas, glucosidasas (glucanasas) y quitinasas en cada esférula; la latencia constitutiva de las esporas; y la substancia 'mucilaginosa' que protege a las esporas liberadas contra el sistema inmune del hospedero (Castañón-Olivares, 2004).

1.1.3 Epidemiología

La CM es una enfermedad respiratoria en el 98% de los casos, aunque existen casos cutáneos que se originan por la penetración del hongo a través de traumatismos. El periodo de incubación no es bien conocido; se sugiere que varía de entre 15-20 días a 4 semanas. En los casos cutáneos el periodo de incubación es 20 días e inicia con la aparición de un chancro con adenitis y linfangitis (Sánchez-Saldaña, 2010).

Las formas más graves están presentes en diferentes grupos étnicos, siendo tres veces más frecuente en mexicanos, afroamericanos y filipinos (Pappagianis & Zimmer, 1990; Lewis *et al.*, 2015). La infección puede ser adquirida por individuos de cualquier sexo o edad; por ejemplo, en aquellas personas que visitan o habitan en áreas endémicas y principalmente relacionadas con actividades y profesiones que impliquen perturbación del suelo, por personal de laboratorio y personas inmunocomprometidas. Se ha registrado un aumento del número de casos después de temblores, sequías, cambios en el suelo y cambios en la humedad relativa del aire (Arenas, 2014).

Su incidencia varía con la estación del año, agudizándose en los meses de verano y otoño (Smith *et al.*, 1946). En EEUU se calculan de 45,000 a 80,000 casos por año. El 60% de las infecciones agudas no producen síntomas, mientras que el otro 40% presentan síntomas que varían de leves a severos (Castañón-Olivares *et al.*, 2004).

La infección primaria pasa desapercibida y es comprobada por la hipersensibilidad cutánea a productos antigénicos derivados del agente etiológico (Restrepo, 2006). Los derivados antigénicos, esferulina y coccidioidina, se obtienen a partir del cultivo *in vitro* de esférulas o micelio, respectivamente (Levine *et al.*, 1975) y, al ser inoculados por vía intradérmica en individuos expuestos, ocasionan una reacción de

hipersensibilidad mediada por la memoria inmunológica de linfocitos T (Baptista-Rosas & Riquelme, 2007).

En infecciones primarias se han observado cambios residuales en el parénquima pulmonar (nódulos, fibrosis), así como síntomas leves similares a la influenza. En casos progresivos, el pulmón experimenta un daño continuo, que conlleva a la diseminación extra-pulmonar en órganos como hígado, bazo, ganglios linfáticos, adrenales, sistema nervioso central, gónadas, huesos, membranas mucosas y piel (Restrepo, 2006).

Muchas especies de animales adquieren la enfermedad de forma natural (caballos, ovejas, cerdos, leones marinos, delfines, entre otros); asimismo los animales domésticos en zonas endémicas presentan infección primaria pulmonar, linfadenopatía y lesiones en piel, sistema nervioso central y otros órganos (Arenas-Guzmán, 2014).

1.2 Antecedentes

1.2.1. Diagnóstico clínico de la Coccidioidomicosis

El diagnóstico de la CM se basa en una orientación clínica adecuada y en pruebas de laboratorio. Las muestras pueden ser escamas (lesiones cutáneas secas), exudados de mucosas, líquidos patológicos (líquido cefalorraquídeo) y expectoraciones (Arenas-Guzmán, 2014).

Los exámenes de laboratorio incluyen: examen directo con hidróxido de potasio (KOH) al 20%; cultivo en tubos con agar Sabouraud y agar Micosel a temperatura ambiente; biopsias para casos de lesiones cutáneas; pruebas inmunológicas con coccidioidina (fase filamentosa del hongo) o esferulina (fase parasitaria); pruebas serológicas tales como precipitación, aglutinación, y fijación de complemento (detección indirecta de anticuerpos circulantes); e inmunofluorescencia y diagnóstico diferencial (descartando otras enfermedades similares) (Sánchez-Saldaña, 2010; Barker, 2017).

Debido a la baja sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas, así como el tiempo de espera en el diagnóstico por cultivos y el riesgo que implica su propagación en los laboratorios clínicos, se han desarrollado métodos de detección rápida utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en

tiempo real que pueden ser utilizados para detectar *Coccidioides* spp. directamente de la muestra incluyendo: exudados, tejido fresco, tejido embebido en parafina y tejido fijado con formalina (Binnicker *et al.*, 2007, Barker, 2017).

1.2.2 Detección de *Coccidioides* spp. en suelo

Los primeros trabajos de aislamiento de *Coccidioides* fueron realizados por Emmons, quien utilizó diluciones de suelo para determinar el mejor método para obtener aislamientos *in vitro* a partir de un concentrado de esporas del suelo (Emmons, 1942). Este método consistía en inocular las diluciones en un medio de cultivo y animales. Un medio simple conteniendo extracto de levadura y antibióticos mostraba un aislamiento satisfactorio del hongo en comparación a la inoculación en animales (Swatek & Omieczynski, 1970). Los aislamientos *in vitro* fueron útiles para determinar si *Coccidioides* spp. estaba presente en el área, en especial en lugares donde las pruebas cutáneas no podían realizarse (Ajello, 1971).

Estudios posteriores se enfocaron en describir el hábitat de *Coccidioides* estudiando variables fisicoquímicas del suelo. Estas investigaciones determinaron que el hongo puede crecer en suelos de alta salinidad (Elconin *et al.*, 1964), que el hongo tiene una mayor propagación en suelos alcalinos de textura arenosa (Lacy & Swatek, 1974). Además, se demostró la influencia de otros factores clave como la temporada de lluvias, la humedad del suelo, la temperatura del suelo, así como la exposición a luz ultravioleta e inhibición competitiva con otros organismos (Fisher *et al.*, 2007).

En 1993 debido al incremento de casos, el Departamento de California de Servicios de Salud (CDHS; por sus siglas en inglés) y el Departamento de Salud del Condado de Kern en California, acordaron tomar medidas sanitarias para controlar y prevenir la CM, concluyendo que se debían caracterizar los factores ambientales de riesgo que conllevaban a adquirir la enfermedad utilizando técnicas más avanzadas además de los exámenes serológicos (Centers for Disease Control and Prevention, 1994).

Investigaciones más recientes han desarrollado métodos alternativos para el análisis de la distribución ambiental de *Coccidioides* spp. Estos estudios están basados en modelos del nicho ecológico del hongo considerando las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento del hongo e información de aislamientos positivos (Baptista-Rosas *et al.*, 2007); así como en el análisis molecular de muestras de

suelo utilizando PCR anidada, PCR multiplex y qPCR (Baptista-Rosas *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2012; Lauer *et al.*, 2012; Vargas-Gastélum *et al.*, 2015; Litvintseva *et al.*, 2015; Bowers *et al.*, 2018), y el análisis de polvo por qPCR en zonas de endémicas (Chow *et al.*, 2016). Otros estudios combinan imágenes satelitales, información de parámetros de suelo y PCR múltiple para analizar muestras de suelo, lo cual permite predecir e identificar los sitios de crecimiento de *Coccidioides* spp. (Lauer *et al.*, 2014).

Debido a que algunos mamíferos se cree que actúan como reservorios de *Coccidioides*, se han desarrollado estrategias para evaluar por medio de ELISA la presencia de anticuerpos anticoccidiales en suero de roedores capturados en zonas en donde se ha detectado el hongo (Catalán-Dibene *et al.*, 2014). Además, se han realizado análisis moleculares de suelo superficial y suelo de madrigueras de roedores (Vargas-Gastélum *et al.*, 2015) y armadillos (De Macêdo, 2011), así como de animales en cautiverio (Reyes-Montes *et al.*, 2016).

1.2.3 Anticuerpos

El sistema inmune está constituido por células y moléculas que responden de manera conjunta y coordinada a la introducción de sustancias extrañas. La defensa contra microorganismos, macromoléculas y sustancias químicas extrañas, está mediada por reacciones tempranas de inmunidad innata y respuestas tardías de inmunidad adaptativa o inmunidad humoral (Abbas *et al.*, 2012).

La inmunidad innata es una habilidad natural mediada por los fagocitos, un tipo de células sanguíneas (leucocitos) que absorben partículas extrañas y activan genes de defensa que codifican proteínas para su destrucción. La inmunidad adaptativa es un mecanismo que permite al sistema inmune reaccionar a moléculas en específico (antígenos), debido a la interacción de los antígenos con los receptores de células de defensa (Madigan *et al.*, 2012).

Las células principales del sistema inmune son: los linfocitos, las células presentadoras de antígenos y las células efectoras. Los linfocitos reconocen los antígenos extraños de manera específica, constituyen los mediadores de la inmunidad humoral y celular con distintas subpoblaciones que se diferencian por su forma de reconocer antígenos y función (linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK). Las células presentadoras de antígenos (APC) como macrófagos, células dendríticas y fagocitos, son encargados de

capturar los antígenos, transportarlos a los órganos linfáticos y presentarlos a los linfocitos T. Las células efectoras se encargan de la eliminación de las moléculas extrañas al final de la respuesta inmunitaria.

Los linfocitos B son las únicas células que producen moléculas de anticuerpo (inmunoglobulinas), proteínas circulantes diversas con capacidad específica para reconocer antígenos. Los anticuerpos existen en dos formas: los anticuerpos unidos a la membrana extracelular de los linfocitos B y los anticuerpos diseminados en la circulación, los tejidos y las mucosas, que neutralizan las toxinas e impiden la entrada y propagación de microorganismos patógenos (Abbas *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Estructura del anticuerpo

Las inmunoglobulinas (Ig) se dividen en 5 clases (isotipos) con base a sus características físicas, químicas e inmunológicas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. IgG es la más común en el suero sanguíneo; está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas, conectadas por enlaces disulfuro. En cada proteína hay 2 cadenas ligeras de 25 kDa y 2 cadenas pesadas de 50 kDa, teniendo como resultado un peso molecular de 150 kDa. Cada cadena ligera tiene aproximadamente 220 aminoácidos, en comparación a las cadenas pesadas que poseen 440 aminoácidos. Cada cadena pesada interactúa con la cadena ligera para formar un sitio de unión a antígenos funcional (Fig. 3). Cada cadena ligera de la IgG consiste de dos partes de tamaño equitativo, un dominio variable y un dominio constante (Madigan *et al.*, 2012).

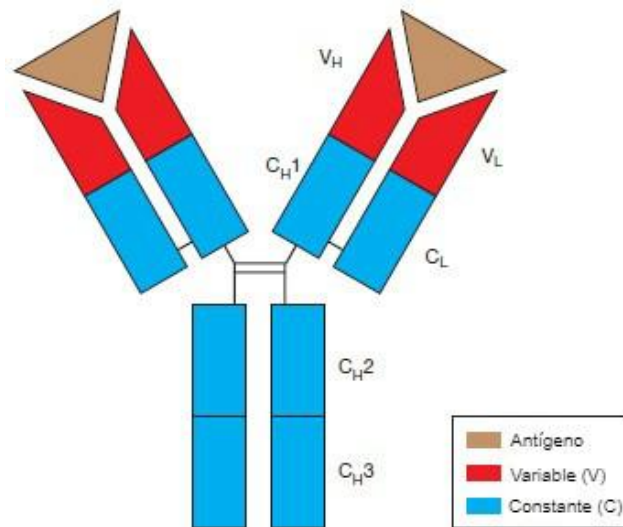


Figura 3. Estructura de la inmunoglobulina G. Una cadena pesada y una cadena ligera interactúan para formar un sitio de unión a un antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (V_H y V_L) se unen al antígeno. Los dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 , C_L) son idénticos en todas las proteínas IgG. Modificado de Madigan *et al.*, 2012.

Las regiones C de la cadena pesada de todos los anticuerpos de un isotipo tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero es diferente entre isotipos. En humanos las regiones C de los anticuerpos IgM e IgE contienen cuatro dominios de Ig en tándem; las regiones C de la IgG, la IgA y la IgD contienen sólo tres dominios de Ig. Las moléculas de anticuerpo son flexibles, lo que les permite unirse a diferentes series de antígenos, confiriéndoles flexibilidad en una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2} (Abbas *et al.*, 2012).

1.2.3.2 Inmunoensayos

Los inmunoensayos son métodos de diagnóstico utilizados en clínicas y laboratorios de investigación para detectar patógenos en específico o moléculas de patógenos utilizando anticuerpos. El uso de anticuerpos como método de detección se ha extendido, por el uso de animales inmunizados para la obtención de suero policlonal y la producción de anticuerpos monoclonales utilizando cultivos celulares (Madigan *et al.*, 2012; Jayasena, 2009).

Las técnicas de detección con anticuerpos han sido mejoradas utilizando anticuerpos de nueva generación como anticuerpos conjugados o inmunocitosinas. Asimismo, se han introducido sitios de unión a antígenos en el fragmento Fc de la IgG humana reduciendo la complejidad natural de un anticuerpo (Krah, *et. al*, 2015).

Además del desarrollo de moléculas derivadas de anticuerpos, la ingeniería de anticuerpos ha permitido el descubrimiento de anticuerpos de dominio único (sdAbs, del inglés single domain Antibodies). El sistema inmune de camélidos y tiburones comprende anticuerpos que se unen a los antígenos por un solo dominio denominado dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos en camélidos (VHH, por sus siglas en inglés) y dominio variable de anticuerpos en tiburón (vNAR), respectivamente (Krah, *et. al*, 2015).

1.2.3.3 Anticuerpos de dominio único

Los anticuerpos comunes son proteínas heterotetraméricas. En contraste, los anticuerpos de dominio único como los anticuerpos de tiburón (IgNAR, del inglés Immunoglobulin new antigen receptor), sólo

están compuestos de cadenas pesadas (Fig. 4). Debido a la exposición de aminoácidos polares y cargados en el dominio variable son altamente solubles en agua, y poseen mayor estabilidad fisicoquímica por la ausencia de enlaces disulfuro característicos en las inmunoglobulinas. Asimismo, poseen una gran variedad de estructuras y tamaños de horquillas, lo que incrementa su capacidad de unirse a epítopes crípticos (Könning *et al.*, 2017).

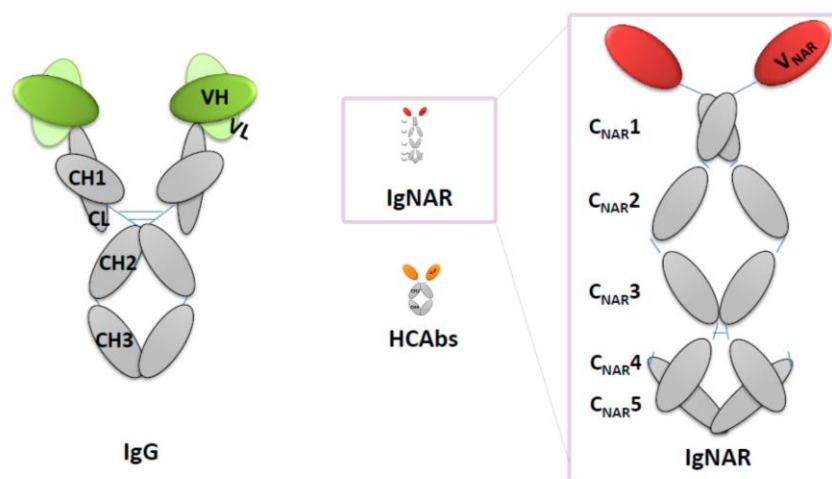


Figura 4. Diferencias estructurales entre anticuerpos comunes y anticuerpos de un solo dominio. El paratopo en anticuerpos convencionales (óvalos verdes) se forma de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras (V_H, V_L), mientras que el paratopo de los anticuerpos de camélidos (óvalos naranja) y tiburón (óvalos rojos) se forma a partir de un dominio variable único de la cadena pesada. Modificado de Herng Leow *et al.*, 2017.

Los sdAbs son obtenidos a partir de la clonación por PCR del repertorio de dominio variable obtenido a partir de sangre, nódulos linfáticos o cDNA del bazo de animales inmunizados. Los anticuerpos con afinidad por un antígeno son seleccionados por bioselección de librerías de fagos en antígenos inmovilizados, además de utilización de librerías semi-sintéticas por la mutación de regiones CDR (regiones determinantes de la complementariedad con el antígeno). La afinidad de los sdAbs en librerías inmunes se atribuye a la selección natural durante el proceso de inmunización de los animales de laboratorio, mientras la afinidad de los sdAbs en librerías no inmunes se obtiene imitando este proceso de forma *in vitro*, mutando las regiones CDR o modificando las condiciones de astringencia durante la bioselección (Wesolowski, *et. al*, 2009).

1.2.3.3 Anticuerpos IgNAR

El sistema inmune adaptativo de los tiburones produce anticuerpos denominados IgNAR, los cuales en su forma soluble están formados por un homodímero de dos cadenas pesadas que consisten en cinco dominios constantes (C_{NAR} , por sus siglas en inglés), y un dominio variable terminal ($vNAR$, por sus siglas en inglés) que se une a los antígenos (Könning *et al.*, 2017). Estos anticuerpos son moléculas de gran estabilidad debido a su estructura en los dominios C_{NAR} , que les permite tener un mayor número de residuos hidrófilos en su superficie; además de horquillas entre enlaces disulfuro y enlaces de hidrógeno que le dan mayor estabilidad en la región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) en el dominio $vNAR$ (Griffiths *et al.*, 2013).

Debido a las diferentes estructuras formadas en la región de unión a antígenos (CDR), los anticuerpos IgNAR tienen la capacidad de unirse a sitios crípticos no antigénicos para anticuerpos convencionales. Adicionalmente, los genes asociados a la región variable están organizados en un cluster de genes altamente diversificable para la detección de diferentes antígenos, lo que les permite compensar la falta de combinaciones entre cadenas pesadas y ligeras encontradas en los anticuerpos convencionales (Könning *et al.*, 2017).

1.3 Justificación

La incidencia de la Coccidioidomycosis ha aumentado en las últimas décadas, por ello es necesario crear métodos efectivos para la detección ambiental de *Coccidioides* spp, reduciendo el riesgo para los profesionales involucrados.

1.4 Hipótesis

Los fragmentos $vNAR$ de anticuerpos del tiburón *Hererodontus francisci* permiten la detección de *Coccidioides* spp.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar un método sensible de inmuno-detección de *Coccidioides* spp. a partir de anticuerpos de tiburón.

1.5.2. Objetivos específicos

Determinar la afinidad de los anticuerpos de tiburón hacia *Coccidioides* spp.

Evaluar la sensibilidad de los anticuerpos por *Coccidioides* spp.

Capítulo 2. Metodología

Para lograr el primer objetivo se utilizó una biblioteca no inmune (naïve) de fagos recombinantes con anticuerpos de tiburón, elaborada previamente en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE, y se expuso a dos extractos antigénicos de *Coccidioides* spp. para la selección de fragmentos vNAR. El antígeno IDTP del inmunoensayo de inmunodifusión IMMY©, obtenido a partir del filtrado de un cultivo del hongo en fase micelial, fue proporcionado por el Dr. Sean Bauman, director ejecutivo y presidente de la compañía IMMY©; y la coccidioidina, obtenida por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de México (InDRE) a partir del filtrado del medio de cultivo, fue proporcionada por la Dra. Laura Rocío Castañón Olivares del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2.1 Selección de fragmentos vNAR

2.1.1 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* cepa ER2738

Con el fin de seleccionar fragmentos vNAR afines a los antígenos se siguió el protocolo de Barbas *et al.*, 2001, con algunas modificaciones sugeridas por O. Cabanillas-Bernal (comunicación personal). Para obtener células electrocompetentes se realizó un preinóculo de células de *E. coli* ER2738 en 10 ml de medio Super Broth (SB) sin antibiótico (Tryptona 3.2%, Extracto de levadura 2%, NaCl 0.5%, pH 7) y se incubó a 37°C, con 250 rpm de agitación, durante 24 h. Después del tiempo de incubación, se agregó el preinóculo a 490 ml de medio SB suplementado con 10 ml de glucosa (20%) y 5 ml de MgCl₂ (1M). El cultivo se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.7 – 0.9. Cuando el cultivo alcanzó la densidad deseada se pasó a tubos de 50 ml previamente enfriados en hielo por 20 min. Los tubos fueron centrifugados a 3000 x g, a 4°C, por 20 min y se descartó el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido con 50 ml de glicerol al 10% enfriado y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El proceso se repitió con centrifugaciones consecutivas reduciendo el número de tubos de 10 a 5, y de 5 a 2. El botón final fue resuspendido con 2 ml de glicerol al 10% enfriado y se realizaron alícuotas de 50 µl y 10 µl que se congelaron a -80 °C.

2.1.2 Preparación de fago ayudador (VCSM13)

Para obtener el fago ayudador (VCSM13) se realizó un cultivo de 2 ml de medio SB con 2 μ l de células *E. coli* ER2738 y se incubó por 1 h a 37°C. Después de la incubación, el cultivo se infectó con 1 μ l de una dilución 10^{-9} de fago ayudador VCSM13; se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se sembró en placas de agar LB con kanamicina (50 μ g/ml) que se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, se preparó un cultivo de 10 ml de medio SB con 10 μ l de células *E. coli* ER2738 que se incubó a 37°C y 250 rpm por 1h. Después, el cultivo fue inoculado con una colonia aislada en las placas de agar LB y se incubó a 37°C por 2 h a 250 rpm. El cultivo fue transferido a un matraz con 500 ml de medio SB suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) y se incubó bajo las mismas condiciones por 24 h. El cultivo fue transferido a tubos de 50 ml y se incubó a 70°C por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 2500 x g por 15 min. y el sobrenadante se decantó en tubos nuevos que fueron almacenados a 4°C.

Para determinar la eficiencia de la infección, se inocularon 2 ml de medio SB con 2 μ l de células *E. coli* ER2738 y se incubaron a 37 °C y 250 rpm por 1 h. Posteriormente, se infectaron 50 μ l del cultivo de células con 1 μ l de diferentes diluciones del fago ayudador preparado (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12}); se incubaron a temperatura ambiente por 15 min y se inocularon en placas de agar LB con kanamicina (50 μ g/ml) que fueron incubadas a 37°C por 24 h. Se contabilizó le número de colonias y se calculó la eficiencia de la transformación.

2.1.3 Bioselección

Para el proceso de bioselección de fragmentos vNAR se amplificó una biblioteca previamente sintetizada por Cabanillas-Bernal (2017) procedentes de un tiburón *H. francisci* no inmunizado. El vector utilizado para la síntesis de la biblioteca fue el pComb3x, que incluye características como: un sitio de restricción *Sfil* para la inserción de un gen, un promotor LacZ inducible por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido), un gen de resistencia a carbenicilina, secuencias para su inmunodetección (HA) y purificación (6xHis) y un codón ámbar para detener la traducción de la proteína de interés (Fig. 5).

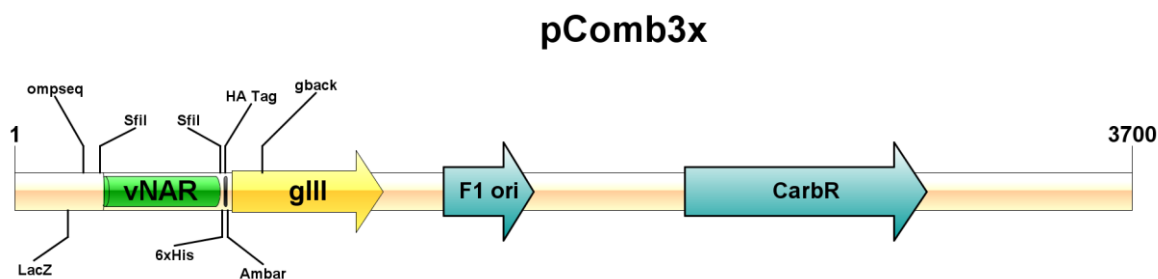


Figura 5. Vector pComb3x con inserto. En la imagen se muestran las características estructurales del vector que permiten la expresión y detección del fragmento vNAR. Adaptado de Barbas *et al.*, 2001.

Células electrocompetentes de *E. coli* ER2738 fueron inoculadas en medio de cultivo SB e incubadas a 37°C, a 250 rpm hasta alcanzar una DO de 1 a 600 nm. Después se agregaron 50 µl de la biblioteca de fagos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, para después agregarle carbenicilina (100 µg/ml) para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas. El cultivo fue transferido a un matraz de 500 ml y se incubó a 37°C y 300 rpm por 1 h; se agregaron 15 µl de carbenicilina (100 µg/ml) y se incubó bajo las mismas condiciones. Después se agregaron 2 ml de fago ayudador M13K07, 108 ml de medio SB, 55 µl de carbenicilina (100 µg/ml) y se incubó por 2 h en las condiciones antes descritas. Finalmente, se agregaron 224 µl de kanamicina (50 µg/ml) y se incubó toda la noche. El cultivo fue vertido en tubos de 50 ml y centrifugado a 4000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue transferido a tubos con 2 g de polietilenglicol 8000 (20% p/v) y 1.46 g NaCl (2.5 M). Posteriormente, se incubaron los tubos en hielo por 30 min previa centrifugación (9000 rpm / 15 min, 4°C), el sobrenadante fue descartado y el botón de fagos secado a temperatura ambiente. Los fagos se resuspendieron en 2 ml de BSA 1% en PBS 1x y centrifugados nuevamente (14000 rpm / 5 min), el sobrenadante se filtró a través de un filtro para jeringa de 0.2 µm y se utilizó en la ronda 1 de selección.

Para las rondas de selección, se inmovilizaron 50 µl de cada antígeno en una placa de ELISA Corning® de 96 pozos durante 12 h a 4°C. El antígeno sobrante no adherido fue descartado y se bloqueó la placa con 150 µl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1x), incubándolo a 37°C por 1 h, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los fagos con la microplaca. Posteriormente, se agregaron 50 µl de los fagos reamplificados y se incubó por 2 h a 37°C. Una vez concluido el tiempo, se realizaron lavados astringentes, que consisten pipetear 5 veces 150 µl de PBST (0.5% Tween-20 en PBS 1x) en cada pozo, incubando 5 min a temperatura ambiente entre cada lavado. Este proceso se repitió por 4 rondas: 5

lavados para la ronda 1; 10 para la ronda 2; 10 para la ronda 3 y 15 para la ronda 4. Después de los lavados, se agregaron 50 μl de tripsina (10 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente, se lavó vigorosamente 10 veces y los fagos afines se utilizaron para infectar un cultivo de 2 ml de células de *E. coli* ER2738 con una $\text{DO}_{600} = 1$. Se incubaron 15 min a temperatura ambiente para permitir la infección y se agregaron 6 ml de medio SB y 1.6 μl de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para obtener un título de entrada, en paralelo se infectaron 50 μl de células *E. coli* ER2738 ($\text{DO}_{600}=1$) con 1 μl de una dilución de la preparación de fagos (obtenidos en la ronda 1). Las células infectadas fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 min y sembradas en una placa de LB agar con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la cual se incubó por 24h a 37°C.

La estimación del título de salida se calculó tomando 2 μl que se diluyeron en 200 μl de medio SB, y que se sembraron en placas de LB agar con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en volúmenes de 10 y 100 μl . Los títulos de entrada y de salida se determinaron calculando el número de transformantes al multiplicar el número de clones por el volumen de cultivo y dividiendo el resultado entre el volumen extendido en placa, todo multiplicado por el factor de dilución.

El cultivo de 8 ml se incubó por 1 h, a 37°C y 300 rpm; se le agregaron 2.4 μl de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. Para la fase de amplificación, el cultivo se transfirió a un matraz para agregarle 1 ml de fago ayudador M13K07, 71 ml de medio SB y 36 μl de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó por 2 h más. Finalmente, se agregaron 112 μl de kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante a 300 rpm. Este proceso se repitió en cada una de las rondas de selección, exceptuando que en las rondas posteriores se empleó un pozo de la placa de ELISA con el antígeno y se incrementó el número de lavados.

2.1.4 Producción de fagos de colonias individuales

A partir de la última ronda de selección, se aislaron clones individuales utilizando cultivos de 1 ml de medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los cultivos fueron incubados a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 1$; se agregaron 100 μl de fago ayudador MK13K07 a cada cultivo y se incubaron a 37°C por 30 min sin agitación. Los cultivos fueron centrifugados a 1700 rpm por 15 min; se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió cuidadosamente. A cada tubo se le añadió 1 ml de medio SB

suplementado con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los cultivos se incubaron a 37°C y 250 rpm toda la noche, y se centrifugaron por 15 min a 3500 rpm.

Posteriormente, se evaluaron los cultivos con una prueba de ELISA de fagos recubriendo 46 pozos de una placa de ELISA Corning® con 50 μl de un anticuerpo de rata anti HA-tag de Roche© (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se añadió a la prueba 50 μl de anticuerpo anti HA-tag para el control positivo y un control negativo con PBS 1x incubado a 37°C por 2 h. Las soluciones en los pozos fueron descartadas y los pozos se bloquearon con 150 μl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1x), incubando la placa a 37°C por 1 h. Después de la incubación se descartó la solución de bloqueo y se agregó a cada pozo 10 μl de solución BSA 5% - PBS 1x y 40 μl de sobrenadante de cultivo de fagos. Para el control positivo se agregaron 10 μl de solución BSA 5% - PBS 1x, 39 μl de PBS 1x y 1 μl de la mezcla de bibliotecas, y para el control negativo se agregaron 50 μl de PBS 1x (Figura 6).

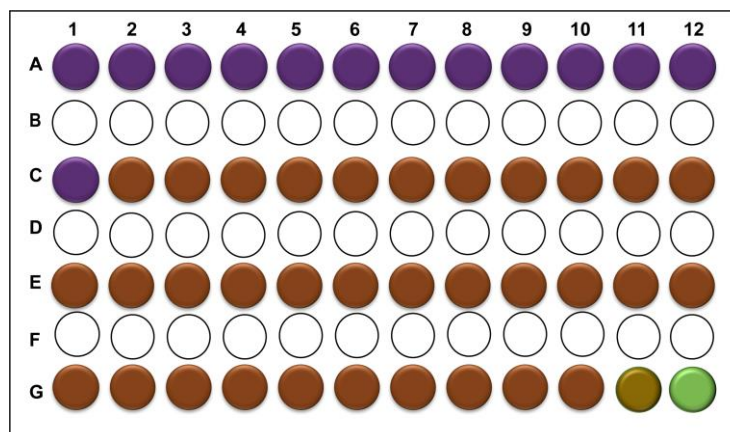


Figura 6. Evaluación de fagos de colonias individuales en placa de ELISA. Los círculos representan cultivos de fagos de la ronda de selección 4, ronda 3 y los controles; en color morado, rojo, ocre y verde, respectivamente.

La placa fue incubada por 1 h a 37°C; se descartó la solución de fagos y se realizaron 5 lavados con una solución de lavado de Tween 20, al 0.05% y PBS 1x. Posteriormente, se agregaron 50 μl de un anticuerpo de ratón anti-M13-HRP de GE Healthcare© (1:5000) en solución BSA 1% - PBS 1x, la placa se incubó a 37°C por 1 h. La solución de anticuerpo se descartó y la placa se lavó 5 veces con la solución de lavado (Tween 20 0.05% - PBS 1x); se agregaron a cada pozo 50 μl de sustrato 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) para revelar y se incubó 15 min a 37°C. Finalmente, a cada pozo se agregaron 50 μl de solución STOP (HCl 1N) y se leyó la placa a 450 nm. Los cultivos con lecturas mayores al control negativo fueron seleccionados para la purificación del plásmido por lisis alcalina y los plásmidos purificados fueron

enviados a Eton Bioscience (San Diego, California) para su secuenciación de acuerdo a las instrucciones sugeridas por la compañía.

Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron analizadas con el programa CLC Sequence Viewer v.7.8.1 de QIAGEN. Las características analizadas de cada secuencia fueron: la presencia de fragmentos vNAR, la ausencia de codones de paro en la secuencia y su correcto marco abierto de lectura (Cabanillas – Bernal, 2017). Finalmente, los plásmidos con insertos con estas características fueron seleccionados para la expresión de la proteína vNAR.

2.2 Síntesis de la proteína vNAR recombinante

2.2.1 Transformación

Para la expresión de la proteína se transformaron células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* BL21, para lo cual en un tubo se mezcló 1 µl del plásmido de interés con 50 µl de células. El tubo se incubó 30 min en hielo, 1 min a 42°C, se colocó en hielo y se agregaron 250 µl de medio SB. Posteriormente, el tubo se incubó sucesivamente 30 min a 37°C, sin agitación y con agitación. Finalmente, se sembraron 50 µl y 200 µl de las células en placas de agar LB con carbenicilina (100 µg/l) y se incubaron a 37°C por 24 h.

2.2.2 PCR de colonia

Para comprobar que las bacterias transformadas contenían el fragmento vNAR, se realizó una PCR de colonia seleccionando 4 colonias al azar de los fragmentos vNAR seleccionados. El volumen de reacción fue de 20 µl la cual contenía Buffer Green 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 10 mM, 1U de GoTaq® Flexi Polimerasa (Promega) y 10 mM de los cebadores sentido Ompseq (AAGACAGCTATCGCGATTGCAG) y antisentido Gback (GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC). El programa utilizado en el termociclador se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la reacción de PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
30	95 °C	30 s
30	56 °C	30 s
30	72 °C	30 s
1	72 °C	5 min

Para observar los fragmentos amplificados se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 2 %. Las condiciones de corrida fueron 100V constantes, 75 mA, 1 h.

2.2.3 Inducción

Las células transformadas se propagaron en un preinóculo de 5 ml de medio SB con carbenicilina (100 µg/ml) durante 24 h a 37°C y 250 rpm. En 100 ml de medio SB con carbenicilina (100 µg/ml), se inocularon 2 ml de preinóculo y se incubó a 37°C y 250 rpm hasta llegar a una densidad óptica de 0.7 a 600 nm. Una vez alcanzada la DO, se indujo la expresión de la proteína con 200 µl de IPTG 500 mM y se incubó a 37°C, 250 rpm durante 6 h. Después, el cultivo se centrifugó (4000 rpm, 15 min), y la pastilla bacteriana se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

2.2.4 Extracción de la proteína vNAR recombinante

El botón bacteriano fue resuspendido en un amortiguador con Tris-HCl 3 mM y sacarosa (20%), en una proporción de 5 ml/g de células. Posteriormente se agregó EDTA (1mM) a cada tubo y se incubaron en baño de hielo con agitación por 10 min en un agitador de balanceo. Los tubos se centrifugaron a 8000 x g por 20 min a 4°C, y el sobrenadante fue recuperado en tubos nuevos etiquetados como Tris-Sacarosa. El botón celular de cada tubo fue resuspendido en una solución de MgSO₄ (5 mM) en una proporción de 5 ml/g de células. Los tubos fueron incubados en baño de hielo con agitación por 20 min y centrifugados,

bajo las condiciones antes descritas. El sobrenadante se recuperó a tubos nuevos etiquetados como $MgSO_4$ y se almacenaron a $-20^\circ C$ para su posterior purificación.

2.3 Análisis de la proteína vNAR recombinante

2.3.1 ELISA de expresión

Los extractos Tris Sacarosa y $MgSO_4$ fueron analizados por ELISA para confirmar la presencia de la proteína. Para ello se inmovilizaron 50 μl de cada extracto por triplicado en una placa de ELISA Corning®, añadiendo un control con 50 μl BSA 1% - PBS 1x y otro con PBS 1x por triplicado, la placa se incubó a $4^\circ C$ por 24 h. Posteriormente, se descartaron los extractos y los pozos fueron bloqueados con 150 μl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1x), incubando la placa a $37^\circ C$ por 1 h. Después de la incubación se descartó la solución de bloqueo y se agregaron 50 μl de un anticuerpo de rata anti-HA-HRP de Roche® (1:1000) en solución BSA1% - PBS 1x. La placa se incubó a $37^\circ C$ por 1 h. La solución de anticuerpo fue descartada y la placa se lavó 3 veces con la solución de lavado PBST (Tween 20 al 0.05% - PBS 1x); se añadió a cada pozo 50 μl de solución de revelado TMB y se incubó 15 min a $37^\circ C$. Por último, a cada pozo se agregaron 50 μl de solución STOP (HCl 1N) y se leyó la placa a 450 nm.

2.3.2 ELISA de reconocimiento

Para evaluar la afinidad de los extractos por los antígenos, se inmovilizó 50 μl de cada antígeno por triplicado en una placa ELISA Corning® a $4^\circ C$ por 24 h. Después se bloquearon los pozos con 150 μl de BSA 3% - PBS 1x durante 1 h a $37^\circ C$, se agregaron 50 μl de cada extracto (proteína recombinante) y se incubó a $37^\circ C$ por 1 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados con la solución Tween 20 0.05% - PBS 1x y se añadieron 50 μl de una dilución 1:1000 de anticuerpo anti HA-HRP en solución BSA 1% - PBS 1x y se incubó a $37^\circ C$ por 1 h; el resto del procedimiento se siguió como se describe en la sección 2.2.1. Como controles se utilizaron 50 μl de BSA 1% - PBS 1x y 50 μl de PBS 1x inmovilizados por triplicado.

2.3.3 Purificación de la proteína vNAR

Los extractos periplasmáticos se mezclaron y el extracto obtenido fue purificado mediante cromatografía de afinidad a metales utilizando el protocolo NiNTA de QIAGEN® con algunas modificaciones sugeridas por Cabanillas-Bernal, 2017. Previo a la purificación, el pH del extracto se ajustó a pH 8.0, la muestra de extracto se clarificó de material celular de desecho por una centrifugación a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. La purificación fue realizada en una columna de plástico de 10 ml (Poly-Prep® Chromatography Columns BioRad), la cual contenía 1 ml de resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN®). Inicialmente se realizó una corrida (Black Run) con 10 ml de amortiguador de lavado 1 (Imidazol 5 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). El extracto se pasó tres veces a través de la columna utilizando y posteriormente se realizó un segundo lavado con 15 ml de amortiguador de lavado 2 (Imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). La proteína se eluyó en 5 fracciones utilizando 500 µl de amortiguador de elución (Imidazol 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), con un tiempo de incubación de 5 min entre cada una.

Adicionalmente, se realizó un ELISA de cada fracción como se describe en el apartado 2.3.1 para determinar si la proteína estaba presente en las eluciones obtenidas, utilizando como control el amortiguador de elución.

2.3.4 Electroforesis desnaturizante (Tricina-SDS PAGE)

Las fracciones fueron evaluadas para corroborar la presencia de la proteína. Para ello se realizó un análisis electroforético de un gel de poliacrilamida al 12% con base al protocolo de Schagger y von Jagow (1987). Las condiciones de corrida fueron 150 V por 1h 15 min.

2.3.5 Inmunodetección (Western Blot)

El gel obtenido en la electroforesis desnaturizante se evaluó mediante Western Blot por transferencia semiseca utilizando un sistema de transferencia Transfer Blot SD, una membrana Bio-Rad® de nitrocelulosa de 0.45 µm y un amortiguador Towbin 1x (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3). Las condiciones de transferencia fueron 200 mA, 20 V por 1h. Terminada la transferencia, se procedió con la inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-HA-HRP en PBST (Roche®). Para ello la

membrana se bloqueó en una solución de leche descremada (Svelty©) 5% en PBST con agitación moderada por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con una solución de leche descremada 1% en PBST y el anticuerpo anti-HA-HRP (Roche©) en una dilución 1:1000, bajo las mismas condiciones por 2 h.

Al terminar la incubación se realizaron tres lavados de la membrana con PBST en lapsos de 3 min, y después se hizo un revelado colorimétrico con 7 ml de DAB Substrate Kit (Thermo Scientific©) de acorde a las instrucciones del proveedor.

2.3.6 Diálisis de la proteína

Las fracciones purificadas donde se detectó la proteína vNAR fueron dializadas con una membrana de diálisis SnakeSkin™ de Thermo Scientific© de acorde a las instrucciones del proveedor. Se utilizó como amortiguador de diálisis PBS 1x y agitación constante a 4°C. El amortiguador de diálisis se cambió 3 veces cada dos horas, dejando la membrana bajo las mismas condiciones por 24 h en el último cambio de amortiguador.

2.3 Ensayos de reconocimiento

Para los ensayos de reconocimiento se utilizaron los antígenos IDTP y coccidioidina, además de 3 antígenos fúngicos como control negativo. Para la obtención de los antígenos fúngicos se utilizó un reporte de la diversidad fúngica en un sitio endémico de *Coccidioides* spp. (Vargas-Gastélum *et al.*, 2015). Con base a este, se seleccionaron las cepas *Fusarium oxysporum* (cepa FFOCR), *Macrophomina phaseolina* (cepa FDSDc13), donadas por el Laboratorio de Fitopatología de CICESE y *Neurospora crassa* (cepa N1) del cepario del laboratorio Riquelme. Las cepas fueron procesadas para la obtención de los antígenos tomando de referencia la metodología de Thornton, 1993, la cual se describe a continuación.

Las cepas se cultivaron en placas de Petri conteniendo medio PDA (infusión de papa 0.4%, dextrosa 2%, agar 1.5%) por 4 días a 25°C. El cultivo de *N. crassa* se incubó durante el mismo tiempo a 30°C. Posteriormente, se inocularon matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio PDB (infusión de papa

0.4%, dextrosa 2%) con 1 cuadro de agar de cada cepa y se incubaron bajo las mismas condiciones, en oscuridad sin agitación. Después de la incubación, el cultivo fue filtrado a través de filtros de plástico estériles cubiertos con tela Magitel® para recuperar el micelio en tubos de 50 ml. Posteriormente, el micelio fue liofilizado y pulverizado. Los antígenos fueron preparados utilizando 20 mg de micelio de cada cepa en 10 ml de PBS 1X estéril pH 8.0. La solución se mezcló en vórtex, se dejó precipitar 5 min y se centrifugó a 2000 x g por 10 min. El sobrenadante y el pellet resuspendido fueron utilizados como antígenos de control.

Para el ensayo se realizó un ELISA indirecto como se describe en la sección 2.3.2, inmovilizando antígeno IDTP y coccidioidina, así como los antígenos de control antes descritos a una concentración 0.03 mg/ml tomando como referencia los valores mínimos de detección de antígenos fúngicos en suelos arenosos (Otten *et al*, 1997).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Selección de fragmentos vNAR

Para la selección de anticuerpos se utilizaron los antígenos IDTP y coccidioidina. Debido a que se desconocía su pureza ambos fueron utilizados sin diluir. Para las rondas de selección se utilizaron 50 μl de cada antígeno, siguiendo el protocolo propuesto. El título de entrada inicial para la bioselección del antígeno IDTP fue de 1.08×10^{11} UFC/ml (Fig. 7). Al finalizar el proceso de selección de fagos se obtuvieron 2.4×10^4 UFC/ml presuntivamente afines al antígeno IDTP. Para el antígeno coccidioidina el título de entrada inicial fue de 3×10^{11} UFC/ml (Fig. 8), de los cuales se seleccionaron 1.6×10^4 UFC/ml.

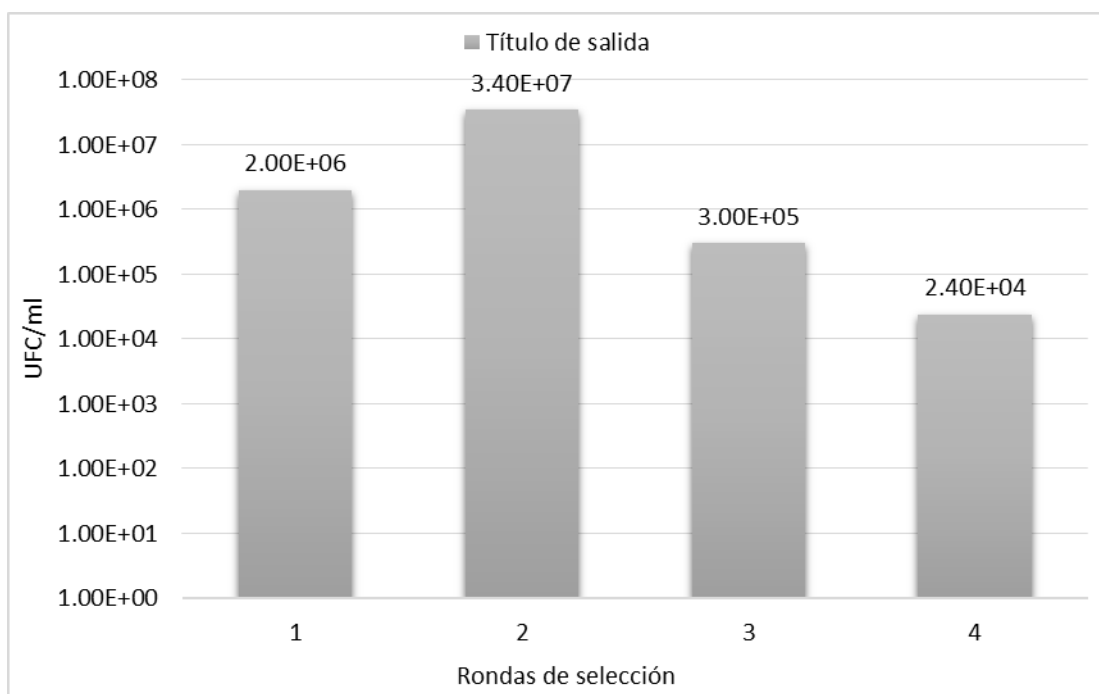


Figura 7. Títulos de fagos en las rondas de selección contra el antígeno IDTP.

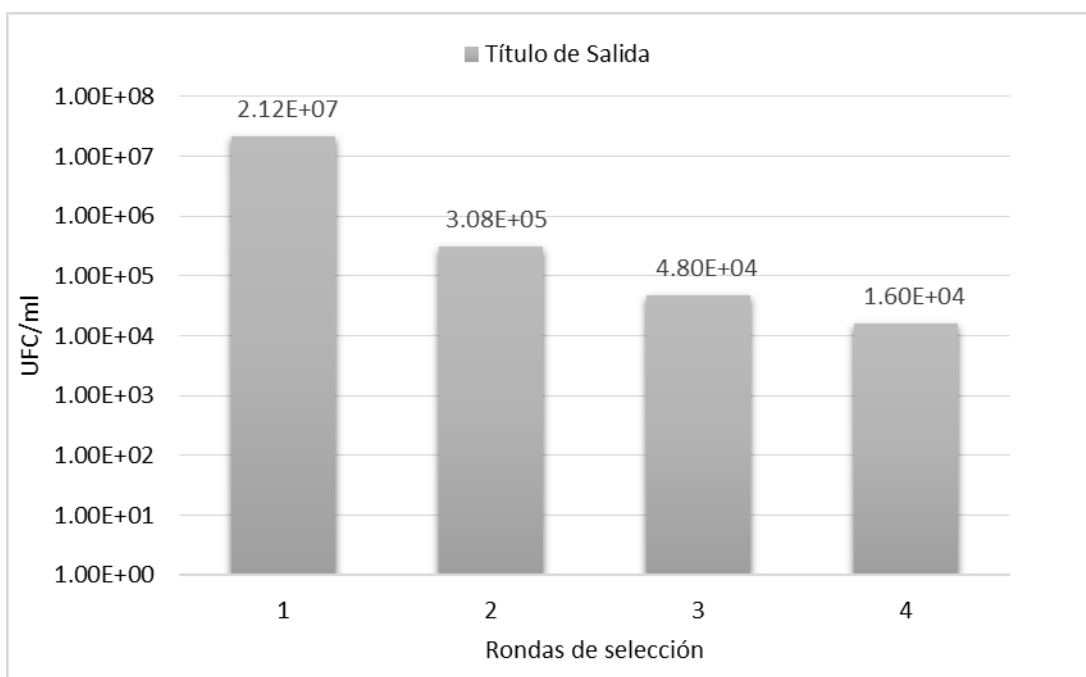


Figura 8. Títulos de fagos en las rondas de selección contra el antígeno coccidioidina.

A partir de las placas de los títulos de salida obtenidas en las últimas rondas (R3, R4) se tomaron clonas individuales al azar para infectar cultivos individuales de células de *E. coli* ER2738. Los cultivos fueron procesados para analizarlos por una prueba de Elisa sándwich, con el fin de reconocer fagos completos que expresaran fragmentos vNAR en su superficie.

Cada cultivo fue etiquetado con una clave para identificar el antígeno contra el que se había seleccionado cada clona (T para IDTP y C para coccidioidina), la ronda de la que se había obtenido (y - R3, z - R4) y un número consecutivo para diferenciar las clonas en cada cultivo.

Para el antígeno IDTP se obtuvieron 12 cultivos con una absorbancia con valores entre 0.097 - 1.882 en comparación al control negativo con absorbancia de 0.039, los cuales fueron utilizados en los experimentos posteriores. En comparación, para el antígeno coccidioidina se encontraron 11 cultivos con valores de absorbancia entre 0.096 - 0.183 respecto al control negativo de 0.06.

3.1.1 Análisis de secuencias

Las secuencias del DNA plasmídico de clonas obtenido por lisis alcalina, fueron analizadas para buscar fragmentos vNAR completos con correcto marco de lectura. Las secuencias fueron analizadas con el programa CLC para buscar sitios consenso y regiones conservadas. Estas presentaban las regiones vNAR características FR1, CDR1, HVR2, HVR4, FR3, CD3 y FR4 (Fig. 9).

	FR1	20	CDR1	40	HVR2	60	HVR4	FR3	80
Tz44_gback (-3)	AASLDQTPRT	ATRETGESLS	INCVLDTSH	ILFGTKWFWN	NPGSTDWESI	TIDGRYVEFV	NNQAKSFSLQ	IKDLTVEDSG	80
Tz45_gback (-1)	AASLDQTPRT	ATRETGESLS	INCVLDTSH	ILFGTKWFWN	NPGSTDWESI	TIGGRYDQYV	NNQAKSFSLQ	IKDLTVEDSG	80
Ty25_gback (+1)	AARVDQTPRT	ATRETGESLT	INCILDTTRC	GLYGTSWFRN	NPGSTDWERI	TIGRRYVESV	NKGAKSFSLQ	IKDLTVEDSV	80
Cz1_gback (-3)	AASLDQTPRT	ATRETGESLS	INCVLDTSH	ILFGTKWFWN	NPGSTDWESI	TIGGRYVESV	NNQAKSFSLQ	IKDLTVADSG	80
Cz22_gback (-2)	AASLDQTPRT	ATRETGESLS	INCVLDTSH	ILFGTKWFWN	NPGSTDWESI	TIGGRYVESV	NNQAKSFSLQ	IKDLTVEDSG	80
Cz25_gback (-3)	AASLDQTPRT	ATRETGESLS	INCVLDTSH	ILFGTKWFWN	NPGSTDWESI	TIGGRYVESV	NNQAKSFSLQ	IKDLTVEDSG	80
Cz37_gback (-2)	-----	-----	-----	YGTNCFWD	NPGSTEWESI	TIGGQYVEYV	NKQAKSFYLQ	IKDLTVEDSG	48

	FR3	CDR3	100	FR4	120	SfiI	6XHis	HA-tag	140	STOP
Tz44_gback (-3)	TYYCKAQT	IG	CRKRGPLASL	LVMMGSSVYY	GAGTVLTVNG	GQAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	YAS*E	145	
Tz45_gback (-1)	TSYCKAQT	IG	FRKRGPLASL	PAMMGSSDYY	GAGTVKTVNG	GQAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	SAS*E	145	
Ty25_gback (+1)	TYYCNAS	- - -	RGRVWVM	RLVCGLGRYD	GAGTVLTVNG	-QAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	YAS*E	138	
Cz1_gback (-3)	TYYCKAII	MK	GWWPGWMNLR	VISLLTRGY	GAGTVLTVNG	CQAGQHHHHH	HGAYPYAVPH	YAS*E	145	
Cz22_gback (-2)	TYYCKARR	VF	WPMWRPWRK	LFKWPVMTYY	GAGTVLTVNG	GQAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	YAS*E	145	
Cz25_gback (-3)	TYYCKALS	VP	NFFSWWHEKG	RWRYFGRGY	GAGTVLTVNG	GQAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	YAS*E	145	
Cz37_gback (-2)	TYYCKALS	VP	KFFSWWHEKG	SWRYIGRYY	GAGTVLTVNG	GQAGQHHHHH	HGAYPYDVPD	YAF*E	113	

Figura 9. Alineamiento de fragmentos vNAR.

Para el antígeno IDTP se encontró 1 fragmento de la ronda 3 (Ty25) y 2 fragmentos de la ronda 4 (Tz44, Tz45); mientras que para el antígeno coccidioidina se encontraron 4 fragmentos de la ronda 4 (Cz1, Cz22, Cz25, Cz37). Asimismo, se encontraron otros fragmentos con las regiones conservadas, pero con codones de paro dentro de la secuencia (Ty22, Tz22, Tz53, Cz2, Cz20, Cz44, Cz45), los cuales fueron almacenados para su posible utilización con una mutación dirigida que sustituya el codón ámbar.

3.2 Síntesis y análisis de la proteína recombinante

Los plásmidos con el marco de lectura correcto se seleccionaron para expresar las proteínas afines a cada antígeno, por lo que se realizó una inducción a pequeña escala en un cultivo de 100 ml de medio SB con células transformadas con los plásmidos de interés. Las proteínas fueron recuperadas por una extracción periplasmática de la que se obtuvieron dos extractos: Tris-Sacarosa y MgSO₄. Posteriormente, se hizo un ELISA de expresión para evaluar la presencia de las proteínas en forma soluble en cada uno.

Las clonas de fagos afines al antígeno IDTP no presentaron diferencias significativas entre extractos, con excepción de las clonas Ty25, Cz1 y Cz25 para las cuales se detectó una mayor absorbancia en el extracto Tris-Sacarosa en comparación al extracto MgSO₄ (Fig. 10).

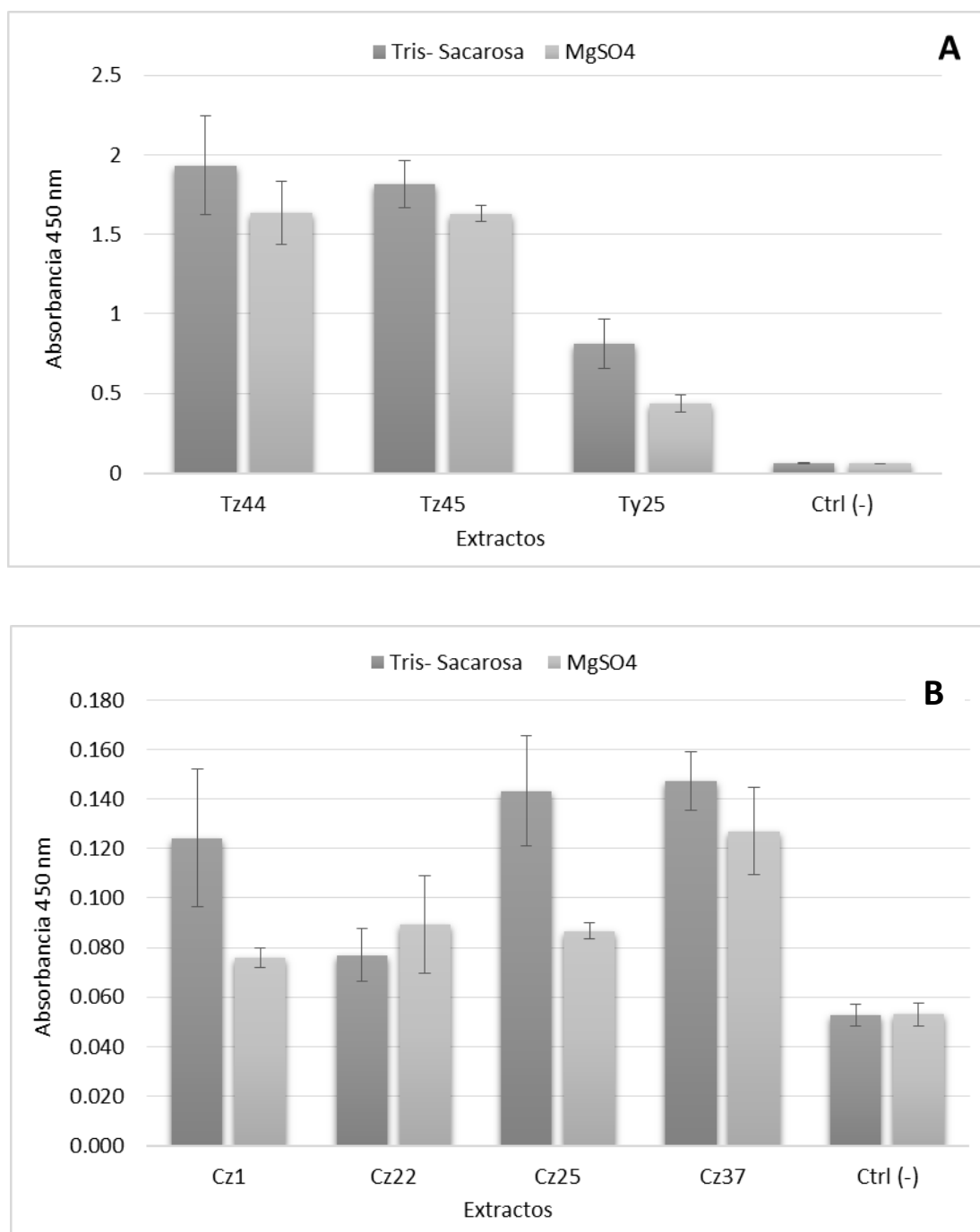


Figura 10. Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de expresión. A) valores de los extractos obtenidos de las colonias afines al antígeno TP; B) valores de los extractos obtenidos de colonias afines al antígeno coccidioidina. En ambos casos se utilizó el amortiguador PBS 1x como control negativo. Las barras representan el error estándar de los datos.

Debido a que las lecturas de absorbancia en el ELISA de expresión fueron mayores para los extractos Tris-Sacarosa, estos se utilizaron para evaluar el reconocimiento de las proteínas obtenidas por los antígenos. Se realizó un ELISA de reconocimiento inmovilizando el extracto de cada clona por triplicado, así como un control negativo con BSA y un blanco con PBS 1x ambos por triplicado (Fig. 11). Se observó que las proteínas Cz25 y Cz37 (Fig. 11-B) afines a coccidioidina no tienen un buen nivel de reconocimiento en comparación al control negativo por lo que fueron descartadas.

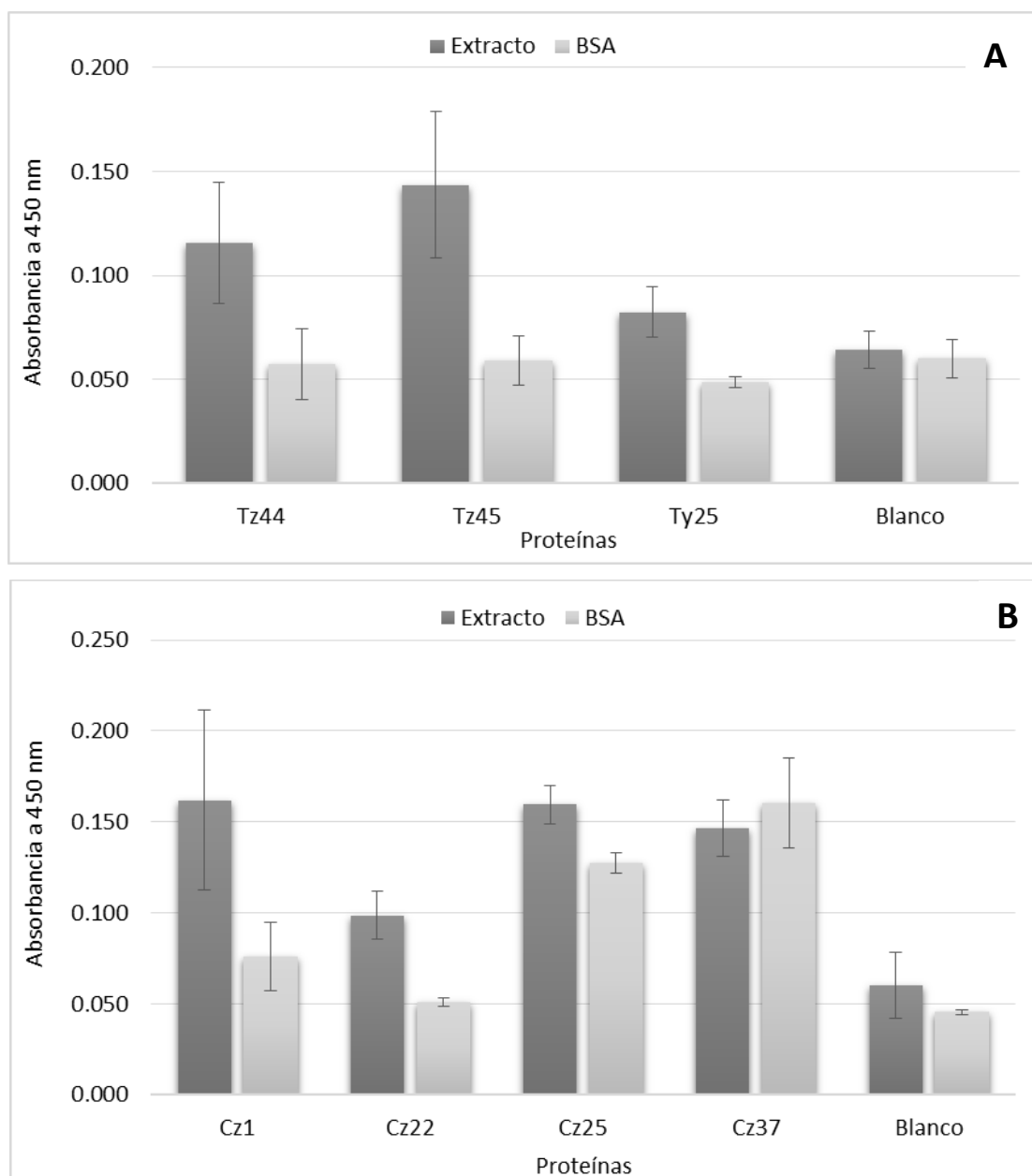
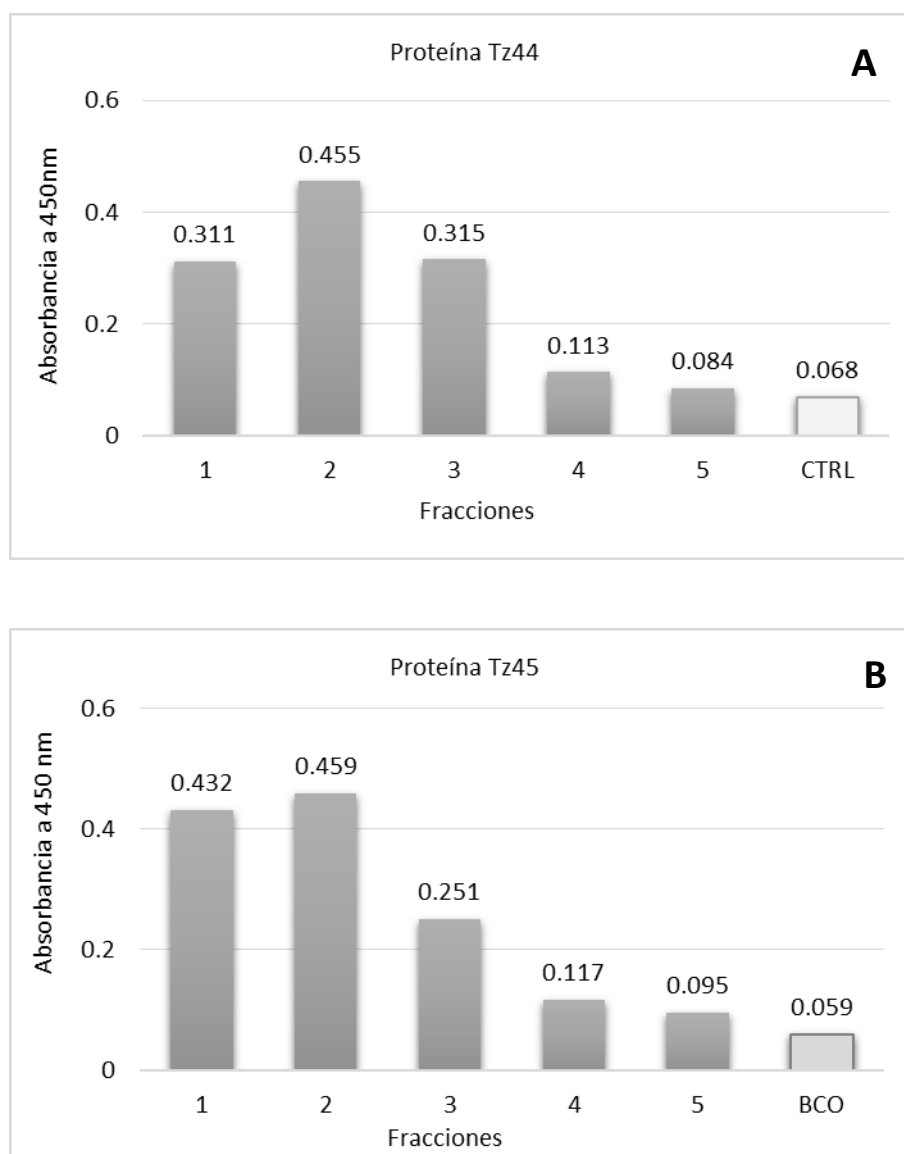


Figura 11. Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de reconocimiento. A) valores de los extractos obtenidos de las colonias afines al antígeno IDTP; B) valores de los extractos obtenidos de colonias afines al antígeno coccidioidina. En ambos casos fue utilizado amortiguador PBS 1x como blanco. Las barras representan el error estándar de los datos.

Los extractos obtenidos fueron purificados por cromatografía de afinidad y debido a que en el análisis por Western Blot no se detectaron proteínas vNAR, las fracciones purificadas fueron evaluadas por un análisis ELISA, en el cual se determinaron las fracciones con mayor cantidad de cada proteína (Fig. 12).

Estas fracciones se mezclaron para obtener una fracción única para su posterior diálisis. Para las proteínas Cz1, Ty25, Tz44 y Tz45 se utilizaron las eluciones 1 y 2; mientras que para la proteína Cz22 se utilizaron las eluciones 3 y 4.



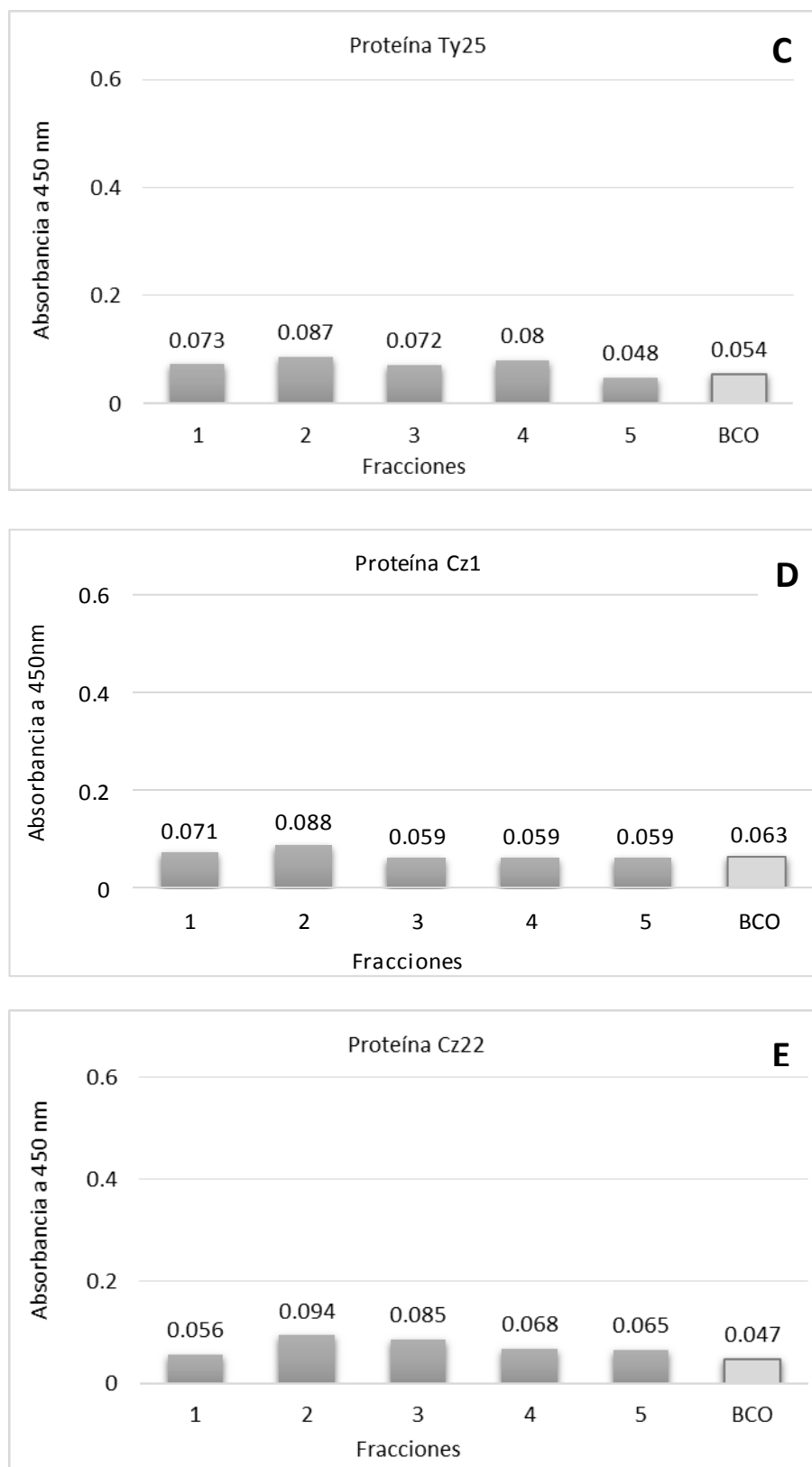


Figura 12. Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de fracciones en cada proteína. A) valores de las fracciones de la proteína Tz44; **B)** valores de las fracciones de la proteína TZ45; **C)** valores de las fracciones de la proteína Ty25; **D)** valores de las fracciones de la proteína Cz1. **E)** valores de las fracciones de la proteína Cz22.

Se cuantificó la cantidad de proteína de cada mezcla de fracciones en un NanoDrop de ThermoFisher® dando como resultado una concentración de 35 µg/ml para Ty25, 27 µg/ml para Tz44, 38 µg/ml para Tz45, 28 µg/ml para Cz1 y 16 µg/ml para Cz22. Sin embargo, los análisis de estas fracciones en SDS-page y Western Blot no dieron resultados positivos. Además, los análisis de estas fracciones, procesadas con un concentrador de proteínas con MWCO (peso molecular de corte, por sus siglas en inglés) de 10K, dieron resultados negativos.

Previamente a la expresión de proteínas, se realizó una comprobación molecular como se describe en la sección 2.2.2, para evaluar la transformación de bacterias quimio competentes. En el gel obtenido (Fig. 13) se observó que no todas las clonas contenían el plásmido: para la proteína Cz1 sólo la clona 4 contenía el fragmento; para Tz44, la clona 3; para Tz45, la clona 4 no fue positiva; y para Cz22 se visualizó el fragmento en todas las clonas.

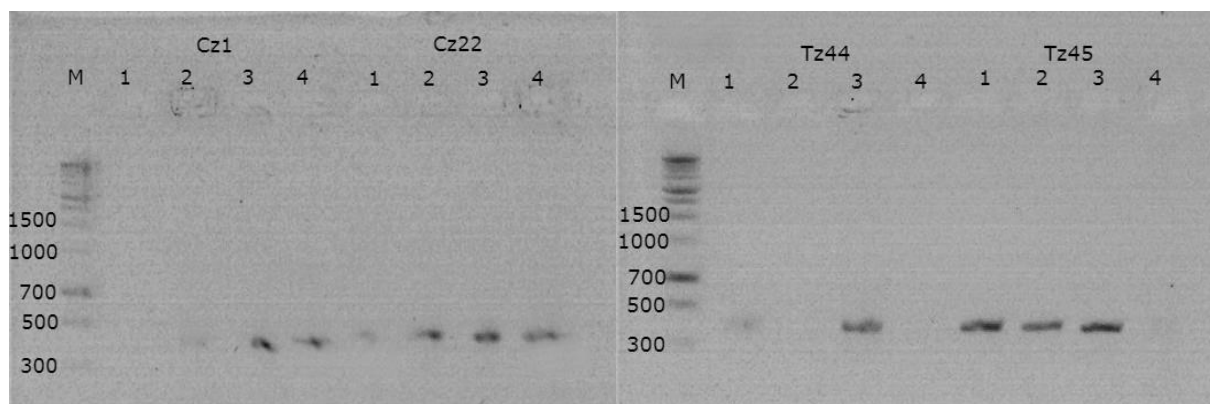


Figura 13. Gel de electroforesis de los productos amplificados en la PCR de colonia En el gel se analizaron las colonias que contenían fragmentos vNAR, junto con un plásmido purificado como control positivo. Las bandas que corresponden a los fragmentos vNAR se ubican entre 300 – 500 bp. MW: marcador de peso de 1kb.

Considerando los resultados de la comprobación molecular, así como los niveles de expresión y reconocimiento obtenidos se decidió utilizar las proteínas Tz45 y Cz1 para experimentos a mayor escala con 1L de medio de cultivo. Los análisis de expresión de los extractos Tris-Sacarosa y MgSO₄ combinados se muestran en la Fig. 14, junto con los controles negativos.

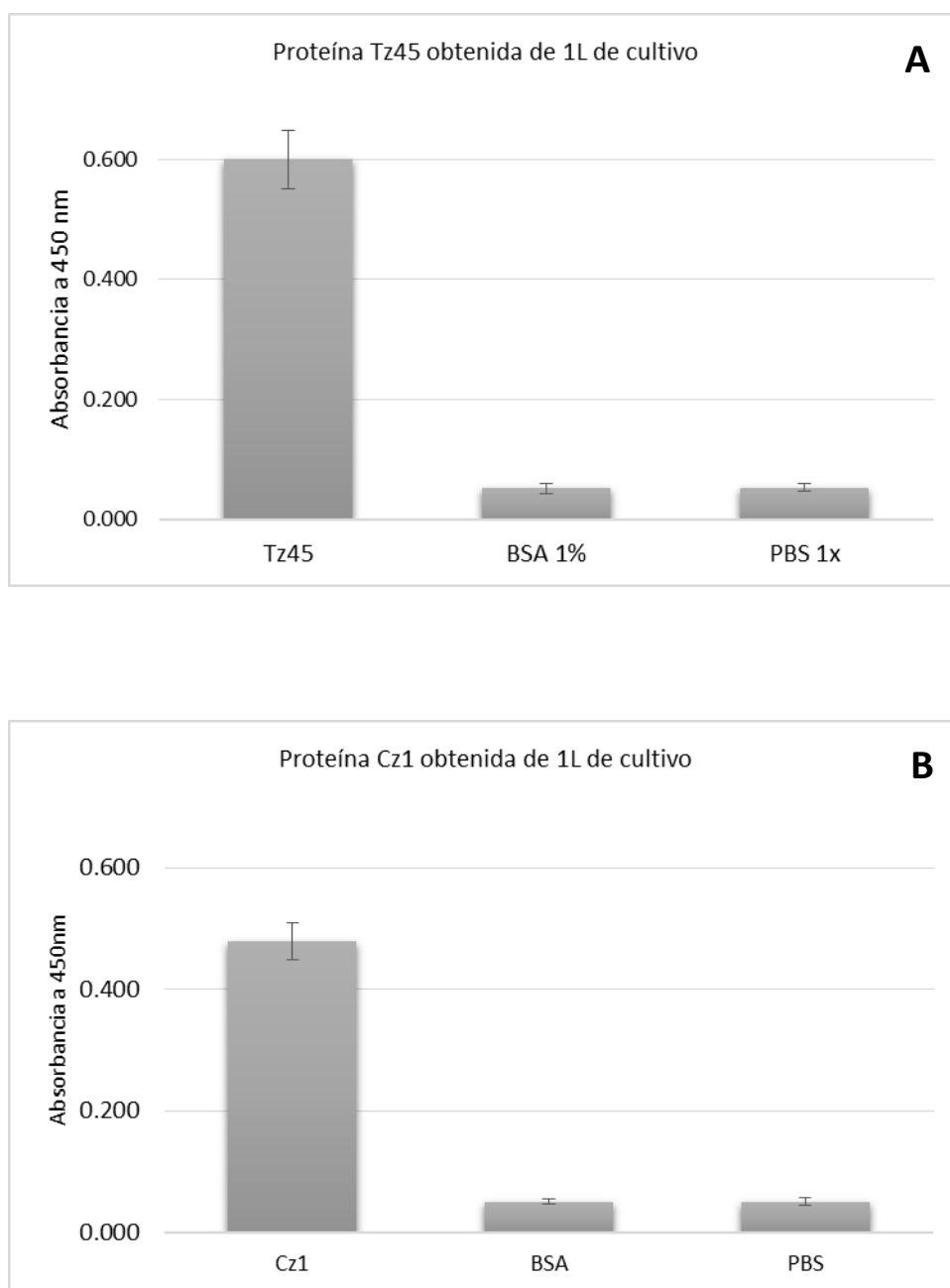


Figura 14. Gráficas de los valores de absorbancia de los análisis de ELISA de expresión en cada proteína. A) valor de expresión de la proteína Tz45; B) valor de expresión de la proteína Cz1. Controles: BSA 1% y PBS 1x.

3.3 Ensayos de reconocimiento

Antes de realizar los ensayos de especificidad con la proteína dializada, se analizaron los extractos para evaluar su afinidad por el antígeno contra el que fueron seleccionadas (IDTP o coccidioidina), así como otros antígenos como control negativo descritos en la sección 2.3. Los resultados de estos análisis se

muestran en la Fig 15. Se observó que Tz45 mostró mayor especificidad por IDTP. La proteína Cz1 tiene reactividad cruzada con *Neurospora crassa*, así como con los demás hongos.

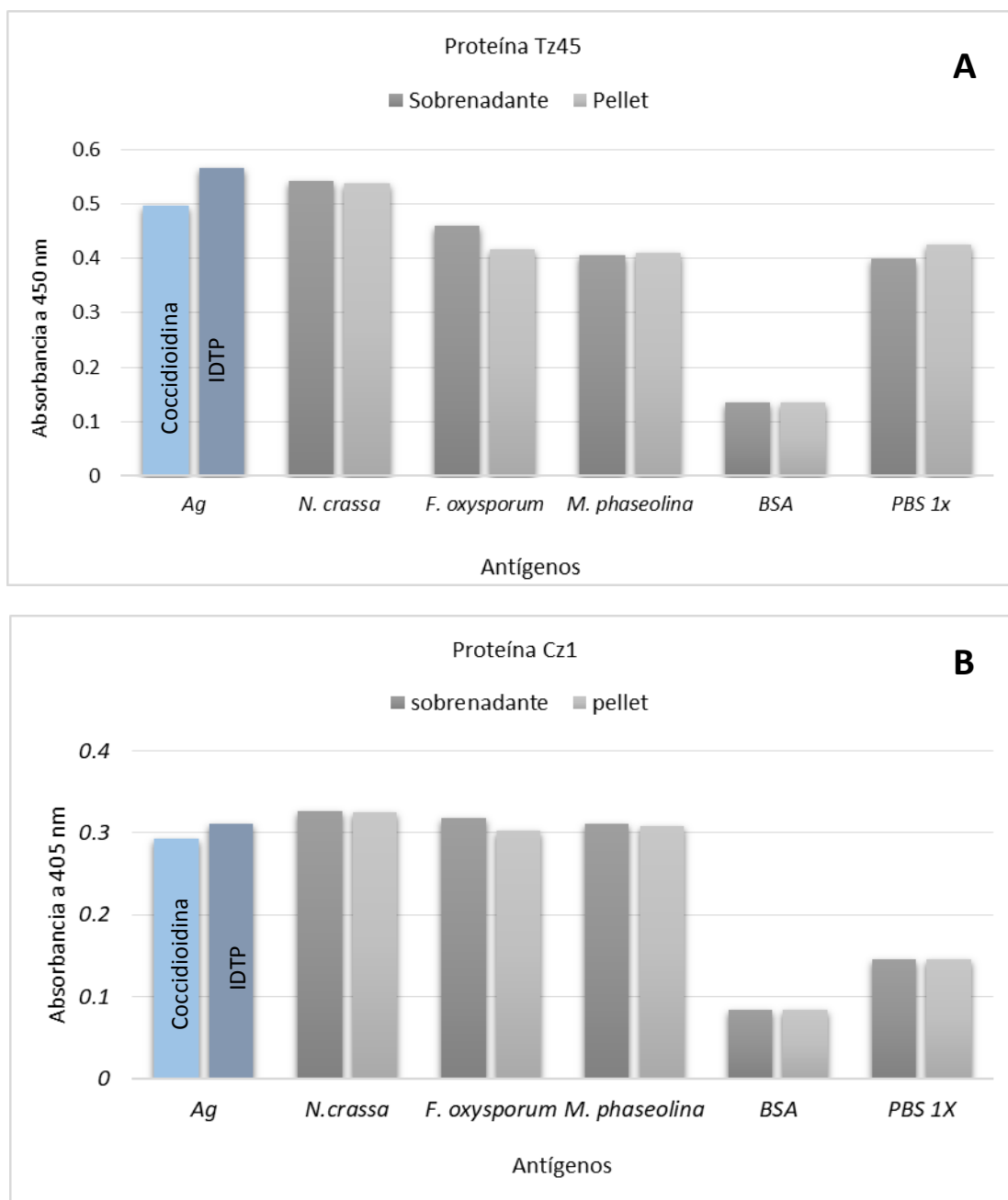


Figura 15. Gráfica de los valores de absorbancia del análisis ELISA de reconocimiento. Análisis de ELISA indirecto de diferentes antígenos fúngicos utilizando como anticuerpo primario las proteínas vNAR. (A) Reconocimiento de antígenos por Tz45 (B) Reconocimiento de antígenos por Cz1. En la sección Ag (antígeno) la primera barra representa el reconocimiento por coccidioidina y la segunda barra el reconocimiento por el antígeno IDTP. Se muestran los controles negativos BSA 1% y PBS 1x.

Tomando en consideración estos resultados se decidió purificar el extracto de la proteína Tz45, para realizar un análisis del reconocimiento de la proteína dializada. El análisis a las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad (Fig. 16) mostró que la proteína se obtiene en las dos primeras fracciones. Estas fueron utilizadas para una diálisis de acuerdo a lo sugerido en la sección 2.3.6. La concentración de la proteína Tz45 estimada en Nanodrop® fue de 145 µg/ml. El análisis de la proteína dializada con diferentes antígenos mostró que esta es específica para el antígeno IDTP (Fig. 17).

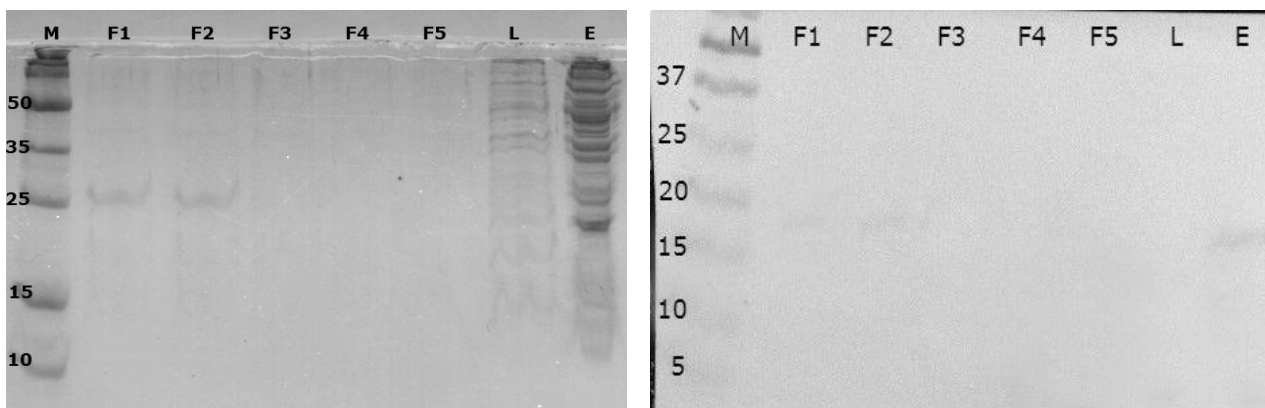


Figura 16. Análisis de las fracciones de la proteína Tz45. (Izquierda) SDS-Page teñido con Coomassie. (Derecha) Western Blot revelado con quimioluminiscencia. En la imagen se observan las bandas de proteína en las dos primeras fracciones (F1 y F2). M: marcador de peso; F1-F5: fracciones de proteína; L: buffer de lavado; E: extracto no purificado.

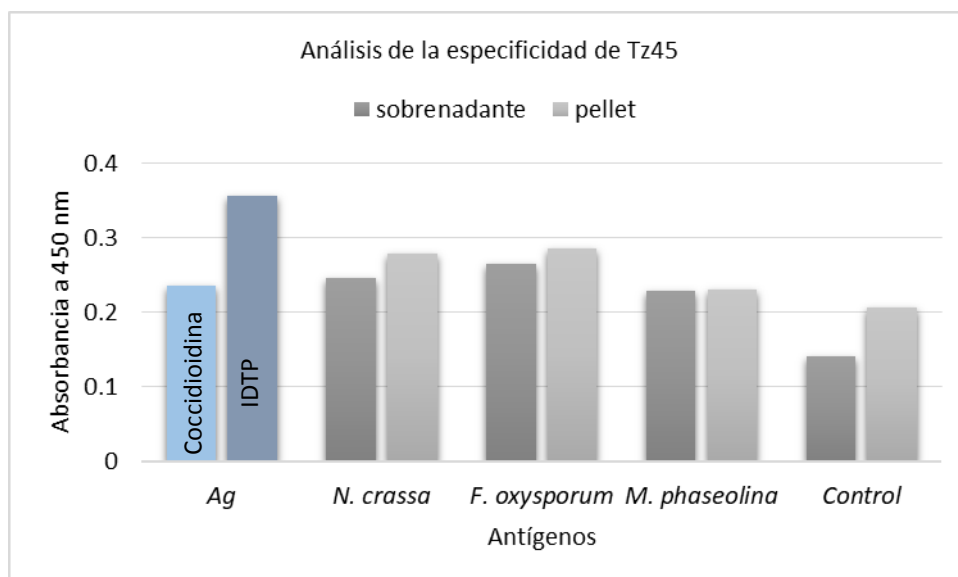


Figura 17. Gráfica de los valores de absorbancia del análisis ELISA de reconocimiento. Análisis de ELISA indirecto de diferentes antígenos fúngicos utilizando como anticuerpo primario el fragmento vNAR Tz45. En la sección Ag (antígeno) la primera barra representa el reconocimiento por coccidioidina y la segunda barra el reconocimiento por el antígeno IDTP. Se muestran los controles negativos BSA 1% (izquierda) y PBS 1x (derecha).

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se reportan los ensayos realizados para diseñar un método de inmunodetección ambiental del hongo *Coccidioides* spp. Como hipótesis se planteó que los fragmentos vNAR de anticuerpos de tiburón son capaces de reconocer el hongo, la cual fue validada al encontrar una proteína con correcto marco de lectura con buena afinidad por el antígeno IDTP de *Coccidioides*.

Para cumplir con el primer objetivo del trabajo que planteaba encontrar fragmentos afines a *Coccidioides* spp. se utilizaron como cebo de anticuerpos el antígeno IDTP, producido por la compañía IMMY®; y coccidioidina, producida por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en México. La bioselección se realizó utilizando una biblioteca de fagos recombinados con fragmentos vNAR, previamente sintetizada por Cabanillas-Bernal en el Laboratorio de Inmunología y Biotoxinas del CICESE.

En la bioselección de fragmentos vNAR se utilizaron dos antígenos IDTP y coccidioidina, ambos antígenos se obtienen de forma soluble en medios de cultivo (Immuno-Mycologics Inc, 2007; Castañón-Olivares. L, comunicación personal), por lo que se puede inferir que tienen diferentes composiciones de moléculas como azúcares, proteínas y lípidos de pared. Debido a esto se consideró utilizar el mismo volumen de cada antígeno, con el fin de evitar un sesgo en la obtención de fragmentos afines; además fueron utilizados en los ensayos de reconocimiento para evaluar la especificidad de los fragmentos seleccionados.

En la etapa de reamplificación de la biblioteca se obtuvieron valores similares, por lo que se puede asumir que la infección de células por fagos recombinantes y fagos ayudadores no presentó inconvenientes. Sin embargo, se encontró una mayor población de UFC por ml afines al antígeno IDTP (2.4×10^4), en comparación a las UFC afines al antígeno coccidioidina (1.6×10^4). Esta población probablemente es similar en ambos casos, debido a que la mutación dirigida con la que se diseñaron las bibliotecas sólo es exitosa en un 40% (Cabanillas-Bernal, 2017), por lo que los fagos recombinantes no analizados de cada población podrían tener codones ámbar en su secuencia o podrían contener fagos recombinantes que no son diferentes entre sí.

Después de cuatro rondas de selección de anticuerpos se obtuvieron las clonas con mejor afinidad, las cuales fueron procesadas para la secuenciación de los anticuerpos afines. Aunque no todos los plásmidos secuenciados presentaron un marco de lectura correcto, aquellos que presentaron codones de paro en

el dominio CDR podrían ser modificados con una mutación dirigida para cambiar su secuencia y utilizar estas proteínas vNAR en estudios posteriores (Kunkel, 1988).

Para la expresión de proteínas con correcto marco de lectura se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* con el fin de inducir la producción de proteína recombinante con IPTG. Los resultados del análisis ELISA directo mostraron que la proteína era extraída más eficientemente en el extracto de sacarosa. No obstante, en experimentos posteriores con mayores volúmenes de cultivo se necesitará optimizar la cantidad de proteína obtenida en cultivo por medio de ensayos de expresión a diferentes concentraciones de IPTG para cada proteína vNAR (Yildir *et al.*, 1998). Esto permitirá obtener mejores resultados de detección de los antígenos utilizados.

Durante la siguiente etapa de experimentación se observó que la proteína obtenida en los extractos no era purificada por completo. Durante la purificación se utilizó una bomba peristáltica para incrementar la velocidad de flujo en la columna, lo cual podría afectar el contacto de las proteínas del extracto con el níquel en la resina y por ello la cantidad de proteína que puede purificarse. Además, podría evaluarse utilizar otros métodos para obtener una mayor cantidad de proteína purificada (GE Healthcare Life Sciences, 2016).

Asimismo, la eficiencia de la migración de las proteínas en la electroforesis y el revelado de la membrana durante el análisis por Western Blot, se vio afectada por el valor de pH de las soluciones utilizadas para montar el gel desnaturizante y el tiempo de incubación de la membrana con el anticuerpo anti-HA-HRP (Mahmood & Yang, 2012). Además, un mayor número de mediciones durante el análisis de sensibilidad a antígenos haría que los resultados fueron más precisos; sin embargo, no se realizaron réplicas debido a la cantidad de muestra obtenida en las fracciones purificadas.

Diversos autores han reportado que la coccidioidina es altamente inmunogénica debido a las reacciones cruzadas con anticuerpos en personas expuestas a otras enfermedades fúngicas (Smith *et al.*, 1949; Goodman *et al.*, 1971; Levine *et al.*, 1975). Asimismo, se ha reportado que está compuesta principalmente por un polisacárido termoestable (Pappagianis & Johnson, 2012). Por ello, los fragmentos vNAR seleccionados podrían no ser específicos para *Coccidioides* spp, debido a la detección de azúcares con estructuras similares.

El antígeno IDTP se utiliza para detectar la enfermedad en las primeras fases en personas expuestas (Galgiani *et al.*, 1988; Pappagianis & Zimmer, 1990). Además, IDTP se ha reportado como un exoantígeno específico para detectar *Coccidioides spp.* entre diversos hongos (Huppert *et al.*, 1978), por lo que los anticuerpos vNAR seleccionados son más específicos en comparación a los fragmentos afines a coccidioidina que presentan inmunidad cruzada.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se planteó la detección por anticuerpos de tiburón como una alternativa a los métodos de detección actuales para analizar muestras de suelo en zonas endémicas de *Coccidioides* spp. Estos métodos tienen diversos inconvenientes como el esfuerzo de muestreo requerido, la disponibilidad de equipo especializado, los costos de realización, así como conocimiento especializado.

Los análisis de expresión y reconocimiento por el método ELISA fueron efectivos para descartar las demás clonas en comparación a la técnica de Western Blot en la que no se encontraron resultados sensibles a cantidades menores de proteína recombinante

La proteína Tz45 mostró buenos resultados de reconocimiento por el antígeno, por lo que podría ser utilizada en análisis con el cultivo puro del hongo o con muestras de suelo positivas. Asimismo, con la correcta validación podría ser utilizada para análisis de suelo *in situ* por medio de un sistema de detección o sensor.

Con el método descrito podrían seleccionarse más proteínas específicas utilizando otro cebo de fagémidos, como una proteína de pared en la fase micelial del hongo o una proteína sintetizada que sea descrita como específica de *Coccidioides* spp.

Literatura citada

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2012) *Inmunología celular y molecular*. (7th Ed.) Elsevier.
- Ajello, L. (1971). Coccidioidomycosis and Histoplasmosis a review of their epidemiology and geographical distribution. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 45(3–4), 221–230.
- Arenas-Guzmán, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. 5a Ed. McGraw-Hill Education.
- Baptista-Rosas, R. C., Catalán-Dibene, J., Romero-Olivares, A. L., Hinojosa, A. Cavazos, T., Riquelme, M. (2012). Molecular detection of *Coccidioides* spp. from environmental samples in Baja California: Linking Valley Fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecology*, 5(2), 177–190.
- Baptista-Rosas, R. C., Hinojosa, A., Riquelme, M. (2007). Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1111, 35–46.
- Baptista-Rosas, R. C., Riquelme, M. (2007). Epidemiología de la Coccidioidomycosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(2), 100–105.
- Barbas, C., Burton, D., Scott, J., Silverman, G. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Barker, B. M., Tabor, J. A., Shubitz, L. F., Perrill, R., Orbach, M. J. (2012). Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona soil samples. *Fungal Ecology*, 5(2), 163–176.
- Barker, B. M. (2017). The changing epidemiology and diagnosis of Valley Fever. *Clinical Microbiology Newsletter*, 39(20), 159–164.
- Binnicker, M. J., Buckwalter, S. P., Eisberner, J. J., Stewart, R. A., McCullough, A. E., Wohlfiel, S. L., Wengenack, N. L. (2007). Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 173–178.
- Bowers, J. R., Parise, K. L., Kelley, E. J., Lemmer, D., Schupp, J. M., Driebe, E. M., Engelthaler, D. M., Keim, P., Barker, B. M. (2018). Direct detection of *Coccidioides* from Arizona soils using CocciENV, a highly sensitive and specific real-time PCR assay. *Medical Mycology*, 1-10.
- Bowman, B. H., White, T. J., & Taylor, J. W. (1996). Human Pathogenic Fungi and Their Close Nonpathogenic Relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(1), 89–96.
- Burt, A., Dechairo, B. M., Koenig, G. L., Carter, D. A., White, T. J., Taylor, J. W. (1997). Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Molecular Ecology*, 6(8), 781–786.
- Canteros, C. E., Toranzo, A., Suarez-Alvarez, R., Davel, G., Castañon-Olivares, L. R., Napoli, J. (2009). Identidad genética del hongo causante del primer caso de Coccidioidomycosis descrito por Alejandro Posadas en 1892. *Medicina*, 69(2), 215–220.
- Castañón-Olivares, L. R., Aroch-Calderón, A., Bazán-Mora, E., Córdova-Martínez, E. (2004). Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 47(4).

- Catalán-Dibene, J., Johnson, S. M., Eaton, R., Romero-Olivares, A. L., Baptista-Rosas, R. C., Pappagianis, D., Riquelme, M. (2014). Detection of coccidioidal antibodies in serum of a small rodent community in Baja California, Mexico. *Fungal Biology*, 118,330–339.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six – kingdom system of life. *Biological Reviews Cambridge*. 73, 203-266.
- Centers for Disease Control and Prevention (1994). Coccidioidomycosis—California, 1991-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 43(23), 421-423.
- Chow, N. A., Griffin, D., Barker, B., Loparev, V. N., Litvintseva, A. P. (2016). Molecular detection of airborne *Coccidioides* in Tucson, Arizona. *Medical Mycology*, 54(6), 584–592.
- Cornell, L. H., Osborn, K. G., Antrim, J. E. (1979). Coccidioidomycosis in a California sea otter (*Enhydra lutris*). *Journal of Wildlife Diseases*, 15(3), 373–8.
- Dickson, E. C., Gifford, M. (1938). *Coccidioides* infection (Coccidioidomycosis). *Archives of Internal Medicine*, 62(5), 853-871.
- De Macêdo, R. C., Rosado, A. S., Da Mota, F. F., Cavalcante, M. A., Eulálio, K. D., Filho, A. D., Martins, L.M.S., Wanke, B. (2011). Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiology*, 11(1), 108.
- Elconin, A. F., Egeberg, R., Egeberg, M. C. (1964). *Coccidioides immitis*. *Journal of Bacteriology*, 87(3), 500–503.
- Emmons, C. W. (1942). Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. *Public Health Reports (1896-1970)*, 57(4), 109.
- Eriksson, O. E., Winka, W. (1997). Supraordinal taxa of Ascomycota, *Myconet*. 1, 1-16.
- 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 *C. immitis*. *Mycologia*, 94, 73-84.
- Fisher, F. S., Bultman, M. W., Johnson, S. M., Pappagianis, D., Zaborsky, E. (2007). *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States: A matter of scale. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1111(1), 47–72.
- Galgiani, J. N., Dugger, K. O., Ampel, N. M., Sun, S. H., Law, J. H. (1988). Extraction of serologic and delayed hypersensitivity antigens from spherules of *Coccidioides immitis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 11(2), 65–80.
- GE Healthcare Life Sciences. (2016). Affinity Chromatography (Vol. 2).
- Goodman, N. L., Larsh, H. W., Palmer, C. E. (1971). Cross reactivity in skin testing with histoplasmin. *American Review of Respiratory Disease*, 104 (2), 258-260.
- Harrison, W. R., Merbs, C. F., Leathers, C. R. (1991). Evidence of coccidioidomycosis in the skeleton of an ancient Arizona Indian. *The Journal of Infectious Diseases*, 164 (2), 436-437.

- Hector, R. F., Laniado-Laborin, R. (2005). Coccidioidomycosis- A fungal disease of the Americas. *PLoS Medicine*, 2, 0015–0018.
- Huppert, M., Sun, S. H., Rice, E. H. (1978). Specificity of exoantigens for identifying cultures of *Coccidioides immitis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(3), 346–348.
- Hurwitz, S., Young, J., Eddie, B. (1938). *Coccidioides immitis* intradermal skin reaction. *California and Western Medicine*, 48(2), 87–89.
- Johnson, S. M., Carlson, E. L., Fisher, F. S., Pappagianis, D. (2014). Demonstration of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* DNA in soil samples collected from Dinosaur National Monument, Utah. *Medical Mycology*, 52, 610–617.
- Könning, D., Zielonka, S., Grzeschik, J., Empting, M., Valldorf, B., Krah, S., Kolmar, H. (2017). Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, 45, 10–16.
- Kunkel, T. A. (1988). The Efficiency of Oligonucleotide-Directed Mutagenesis. In: Eckstein F., Lilley D.M.J. (eds) *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 2, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lacy, G. H., Swatek, F. E. (1974). Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California. *Applied Microbiology*, 27(2), 379–388.
- Laniado-Laborín, R. (2006). Coccidioidomycosis. Más que una enfermedad regional. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(4), 301–308.
- Lauer, A., Baal, J. D. H., Baal, J. C. H., Verma, M., & Chen, J. M. (2012). Detection of *Coccidioides immitis* in Kern County, California, by multiplex PCR. *Mycologia*, 104(1), 62–69.
- Lauer, A., Talamantes, J., Castañón Olivares, L. R., Medina, L. J., Baal, J. D. H., Casimiro, K., Shoff, N., Emery, K. W. (2014) Combining Forces - The Use of Landsat TM Satellite Imagery, Soil Parameter Information, and Multiplex PCR to Detect *Coccidioides immitis* Growth Sites in Kern County, California. *PLoS ONE* 9(11).
- Lee, C. Y., Thompson, G. R., Haste, C. J., Hodge, G. C., Lunetta, J. M., Pappagianis, D., Heinrich, V. (2015). *Coccidioides* endospores and spherules draw strong chemotactic, adhesive, and phagocytic responses by individual human neutrophils. *PLoS ONE*, 10(6), 1–28.
- Leow, C. H., Cheng, Q., Fischer, K., McCarthy, J. (n.d.). The Development of single domain antibodies for diagnostic and therapeutic applications the development of single domain antibodies for diagnostic and therapeutic applications. In *Antibody Engineering*.
- Levine, H. B., Restrepo, A., Ten-Eyck, D., Stevens, D. (1975). Esferulina y coccidioidina: reacciones cruzadas con la histoplasmina y la paracoccidioidina en pruebas de sensibilidad cutánea. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 10, 518–524.
- Lewis, E. R. G., Bowers, J. R., & Barker, B. M. (2015). Dust Devil: The life and times of the fungus that causes Valley Fever. *PLOS Pathogens*, 11(5).
- Litvintseva, A. P., Marsden-Haug, N., Hurst, S., Hill, H., Gade, L., Driebe, E. M., Ralston, C., Roe, C., Barker, B. M., Goldoft, M., Keim, P., Wohrle, R., Thompson, G. R. III, Engelthaler, D. M., Brandt, M. E.,

- Chiller, T. (2015). Valley Fever: Finding new places for an old disease: *Coccidioides immitis* found in Washington State soil associated with recent human infection. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(1), 5–7.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th Ed.). Pearson Education Inc.
- Mahmood, T., Yang, P. (2012). Western Blot : Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429–434.
- Ophüls, W., Moffit, H. C, Philadelphia, M. J. (1900). A new pathogenic mold. *The transactions of the Medical Society of the State of California*, *30* (29).
- Otten, W., Gilligan, C. A., Thornton, C. R. (1997). Quantification of Fungal Antigens in Soil with a Monoclonal Antibody-Based ELISA : Analysis and Reduction of Soil-Specific Bias. *Phytopathology*, *87*(7), 730–736.
- Pappagianis, D., Johnson, S. M. (2012). Revision and return of a Coccidioidal Skin Test reagent. *Mycopathologia*, *174*, 351-352.
- Pappagianis, D., Zimmer, B. L. (1990). Serology of coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *3*(3), 247–268. <https://doi.org/10.1007/BF02051487>
- Petkus, A. F., Baum, L. L., Ellis, R. B., Stern, M., Danley, D. L. (1985). Pure spherules of *Coccidioides immitis* in continuous culture. *Journal of Clinical Microbiology*, *22*(2), 165–167.
- Posadas, A. (1892). Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *Círculo Médico Argentino*, *5*, 585-587.
- Restrepo, A. (2006). *Coccidioides immitis* rixford et gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (splendore 1912) almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al Continente Americano. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *30*(116), 367–386.
- Reyes-Montes, M. D., Pérez-Huitrón, M. A., Ocaña-Monroy, J. L., Frías-De-León, M. G., Martínez-Herrera, E., Arenas, R., Duarte-Escalante, E. (2016). The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. *BMC Infectious Diseases*, *16*(1), 550.
- Rixford, E., Gilchrist, T. C. (1896). Two cases of protozoan (coccidioidal) infection of the skin and other organs. *Johns Hopkins Hospital Reports* (1), 209-210.
- Sánchez-Saldaña, L., Cabanillas-Becerra, J. (2010). Infecciones micóticas sistémicas o profundas: Coccidioidomycosis. *Dermatología Peruana*, *20*(1).
- Schägger, H., Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. *166* (2):368-379.
- Smith, C. E., Beard, R. R., Rosenberg, H. G., Whiting, E. G. (1946). Effect of season and dust control on Coccidioidomycosis. *JAMA*, *132*(14), 833–838.

- Smith, C. E., Saito, M. T., Beard, R. R., Rosenberger, H. G., Whiting, E. G. (1949). Histoplasmin sensitivity and coccidioid infection. *American Journal of Public Health*, 39.
- Stevens, D. A. (1995) Coccidiomycosis. *The England Journal of Medicine*, 332 (16), 1077 – 1082.
- Stewart, R. A., Meyer, K. F. (1932). Isolation of *Coccidioides immitis* (stiles) from the soil. *Experimental Biology and Medicine* 29 (8), 937 – 938.
- Swatek, F. E. Omieczynski, D. T. (1970). Isolation and identification of *Coccidioides immitis* from natural resources. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 41, 1–2.
- Thornton, C. R., Dewey, F. M., Gilligan, C. A. (1993). Development of monoclonal antibody-based immunological assays for the detection of live propagules of *Rhizoctonia solani* in soil. *Plant Pathology*, 42, 763–773.
- Vargas-Gastélum, L., Romero-Olivares, A. L., Escalante, A. E., Rocha-Olivares, A., Brizuela, C., Riquelme, M. (2015). Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(5), 1–13.
- Warlick, M. A., Quan, S. F., Sobonya, R. E. (1983) Rapid Diagnosis of Pulmonary Coccidioidomycosis Cytologic v Potassium Hydroxide Preparations. *Archives of Internal Medicine*, 143(4), 723–725.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerrhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157–174.
- Yildir, C., Önsan, I., Kirdar, B. (1998). Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in the production of the restriction enzyme Eco RI from recombinant *Escherichia coli* 294. *Turkish Journal of Chemistry*, 22, 221–226.
- Zimmermann, C. R., Snedker, C. J., Pappagianis, D. (1994). Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(12), 3040–3042.