

Medición de estrés oxidativo en el hongo *Histoplasma spp* : técnicas *in vitro* para un rápido análisis de mutantes.

Lesdy Ivhet Gonzalez Tobon ^a, Sebastian Bolivar Hernandez ^a, Ángela López García ^{a, b}, Susana Torres Morales ^{a, b}, Orville Hernández ^{a, b}

^aEscuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín;

^bUnidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín

RESUMEN

Las reacciones de óxido-reducción son fundamentales para la elaboración de diferentes procesos celulares, generalmente aerobios. Se basan en el intercambio de electrones, donde por diferentes rutas del metabolismo se da la producción de moléculas denominadas ERO, las cuales presentan una característica de inestabilidad teniendo la capacidad de reaccionar con cualquier otra molécula alterando su estructura y su funcionalidad. Las células como mecanismo de defensa han desarrollado estrategias enzimáticas que contrarrestan específicamente este efecto. En este estudio, se evaluaron diferentes técnicas *in vitro* para medir el efecto de estrés oxidativo causado por sustancias como H₂O₂ y menadiona, utilizando cepas de *Histoplasma spp.* con un silenciamiento génico para las enzimas SOD3 y CATp. Se encontró que estos ensayos no son concluyentes para la medición del estrés oxidativo en este modelo biológico ya que no se obtuvieron los resultados esperados. Además se puede sugerir que al no verse mayormente afectadas las células silenciadas en comparación con el control estas utilizan vías alternas para regular el efecto de las ERO.

Palabras clave: estrés oxidativo, ERO, *Histoplasma spp.*, SOD3, CATp.

The oxidation-reduction reactions are fundamental in different cellular processes, commonly aerobic process. They are based on the exchange of electrons, where the production of molecules called ROS occurs through different pathways of metabolism, which presents a characteristic of instability. They have the ability to react with any other molecules, altering its structure and functionality. Cells as a defense mechanism have developed enzymatic strategies that specifically counteract this effect. In this study, different *in vitro* techniques were evaluated to measure the effect of oxidative stress caused by substances such as H₂O₂ and menadione, using strains of *Histoplasma spp.* with a gene *knock down* for the enzymes SOD3 and CATp. It was found that these tests are not conclusive for the measurement of oxidative stress in this biological model since the expected results were not obtained. In addition, it can be suggested that as the silenced cells are not affected more than the control cells, they use alternative pathways to regulate the effect of ROS.

Keywords: Oxidative stress, ROS, *Histoplasma spp.*, SOD3, CATp.

INTRODUCCIÓN

En los microorganismos fúngicos utilizados como modelos biológicos (*Candida spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) se estudian como se desarrollan algunos procesos que son propios del organismo (crecimiento, respuesta a estrés, fermentación entre otros) y cómo estos se modifican en condiciones de laboratorio. Se tiene como conocimiento que el oxígeno es un elemento esencial para el desarrollo de la vida aerobia, el cual presenta un perfil con doble efecto fisiológico participando activamente en procesos fundamentales a nivel celular y donde también puede presentar efectos tóxicos inherentes a su estructura¹

En dichos modelos se desarrollan gran cantidad de reacciones siendo las de óxido-reducción bastante fundamentales para la elaboración de diferentes procesos. Estas se fundamentan principalmente en el intercambio de electrones, donde por diferentes rutas del metabolismo celular se da la producción de moléculas denominadas radicales libres, las cuales presentan una característica de inestabilidad teniendo la capacidad de reaccionar con cualquier otra molécula de naturaleza lipídica, proteica o incluso el genoma, afectando así su estructura y su funcionalidad¹. Los sistemas biológicos cuentan con diferentes mecanismos para contrarrestar el efecto que ocurre por dichas reacciones, el estado de desequilibrio entre la generación y eliminación de estos agentes tóxicos se denomina estrés oxidativo. Estas reacciones también pueden llegar a cumplir un papel positivo al participar en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación².

Las células como mecanismo de defensa han desarrollado estrategias enzimáticas que contrarrestan específicamente las especies reactivas de oxígeno (ERO). Entre estas se encuentran enzimas que actúan directamente como desintoxicantes, mientras que hay otras que actúan como reguladores oxidoreductores (3,4). El funcionamiento en conjunto de estas enzimas contribuye a mantener el equilibrio redox de la célula superponiendo ambas estrategias. Además de esto, la célula cuenta con diferentes sistemas enzimáticos pero que efectúan actividades bioquímicas idénticas que pueden operar en diferentes compartimentos de la célula como el citosol o la mitocondria, actuando contra moléculas generadas a través de funciones metabólicas o provenientes de efectos externos^{3,4}.

La mayoría de los estudios sobre el estrés oxidativo a nivel molecular han utilizado una variedad de oxidantes externos o compuestos generadores de radicales libres identificando así genes que se activan o reprimen en respuesta a oxidantes⁵.

Para la estimación del estado fisiológico de una célula después de la exposición a varios tipos de estresores y factores químicos o físicos se hace necesario realizar

ensayos que permitan evaluar la viabilidad y la vitalidad celular en condiciones controladas del laboratorio antes de pasar a modelos *in vivo*. Han sido descritos varios métodos en modelos de levaduras como *Candida* spp. y *Saccharomyces* spp. ya que se tiene un amplio conocimiento de sus rutas metabólicas y genes involucrados en la desintoxicación. Igualmente se han realizado estudios en hongos dimórficos como *Sporothrix* spp., *P. brasiliensis* e *Histoplasma* spp.; tales ensayos pueden basarse en la capacidad de recuperación post estrés (Unidades Formadoras de colonia; UFC), cambios en el potencial de membrana (métodos basados en tinciones), determinación de la actividad enzimática (Medición de acumulación de ROS intracelular) entre otros ^{6,7}.

Histoplasma spp. es un modelo de dimorfismo térmico así como un patógeno primario utilizado para el estudio de la respuesta al estrés ^{8,9}. En su fase de levadura se espera un comportamiento similar a los modelos ya mencionados, aunque hasta el momento se ha encontrado que presenta una resistencia a las ERO en comparación con otras levaduras y se desconoce aún el porqué ^{10,11}.

Para adaptarse y establecer la infección en el hospedero, *Histoplasma* spp. debe enfrentarse a macrófagos y las células dendríticas que se encuentran como primera barrera de defensa del hospedero ^{12,13}. Dentro de la célula, la levadura debe someterse a condiciones desfavorables y de estrés entre las cuales se encuentran pocos nutrientes, pHs ácidos, cambios de temperatura, estrés nitrosativo y estrés oxidativo ¹⁴.

Las ERO producidas por las células fagocíticas son moléculas producidas a través de la activación del complejo NADPH-oxidasa que genera anión superóxido ¹⁵. Para protegerse de estos compuestos inductores de estrés oxidativo, el hongo cuenta con varios mecanismos entre los que se encuentra la producción de diferentes enzimas antioxidantes ¹⁶. Entre estas están las SOD las cuales catalizan la disminución del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (10,16). Adicional a estas enzimas la levadura también cuenta con la expresión de una familia de catalasas (CAT) que tienen como función catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, contrarrestando así el efecto nocivo de estos compuestos ¹⁵. CATa y CATb que se ha demostrado controlan el efecto de las ERO endógenas producidas por la propia célula, mientras que CATp se ha encontrado que ejerce su efecto sobre moléculas provenientes de otros procesos inherentes al hongo como resultado de la defensa de las células del hospedero, incluso evaluados en pruebas *in vitro* ¹⁵. Estas enzimas han sido postuladas como mecanismos de virulencia por su acción contra moléculas producidas por las células del hospedero, por tanto es necesario determinar su función durante el crecimiento normal de la célula y como respuesta al estrés oxidativo exógeno producido en condiciones de laboratorio.

Para determinar la función de las enzimas SOD y las pertenecientes a la familia de las catalasas (CAT), diferentes estudios utilizan organismos genéticamente modificados para alterar la expresión de estas moléculas, así como ensayos en

modelos murinos^{6, 10, 15, 16, 20}. Es así como se hace necesario establecer técnicas de análisis en condiciones controladas *in vitro* antes de utilizar modelos *in vivo*.

Por esto el objetivo de este trabajo es estandarizar métodos de evaluación de respuesta al estrés oxidativo exógeno en condiciones controladas *in vitro*, utilizando el modelo biológico *Histoplasma* spp. Para esto se compararon aislamientos silvestres y cepas con una disminución en la expresión de los genes que codifican para las enzimas HcSod3 Y CATp), obtenidos mediante la técnica de silenciamiento génico RNA antisentido desarrollados en el laboratorio de Biología Celular y Molecular BCM, CIB-UdeA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Todas las cepas de *Histoplasma* spp. utilizadas en este estudio se derivaron de la cepa de *Histoplasma capsulatum* 1980 (Hc1980), las cuales tenían un proceso previo de silenciamiento por la técnica de RNA antisentido, dando como resultado a asRNA HcSOD3 (HcSOD3) y asRNA HcCATP (HcCATP). Los inóculos iniciales para los ensayos de estrés oxidativo se realizaron a partir de aislamientos cultivados en medio infusión cerebro corazón (BHI) (Beckton Dickinson and Company) sólido suplementado con 5% de sangre de carnero estéril y 0,01% de L- cistina e incubados a 37 ° C con 5% de CO₂.

En los ensayos realizados se utilizó el Medio de cultivo Histoplasma-Macrófago (HMM) (17) (líquido y sólido suplementado con FeSO₄ 25 uM, para este último se utilizó agar al 0,8% para solidificarlo) y medio BHI sólido con glucosa al 1%. Los cultivos líquidos se incubaron a 37° C en agitación a 120 rpm hasta alcanzar su fase exponencial (~48 horas).

Curva de crecimiento

Aislamientos Hc1980, HcSOD3 y HcCATP cultivados en medio sólido, fueron utilizados para realizar el pre-inóculo de la curva de crecimiento en 25 mL de medio HMM líquido, e incubados a 37°C por 63 horas en agitación constante a 120 rpm. El crecimiento obtenido fue centrifugado en tubos cónicos a 3.500 rpm durante 10 minutos y el botón resuspendido en ~ 5 mL de medio HMM líquido. Un mL de esta suspensión fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos, y resuspendido en 1 mL de NaOH. La densidad óptica (DO) fue determinada a 600nm en fotómetro (Bio-Rad SmartSpec Plus) y de acuerdo con esta se ajustó la suspensión a una DO₆₀₀ 1. Posteriormente un mL de esta suspensión de células ajustadas fue inoculada en 30 mL de HMM líquido. La DO fue determinada a las 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, y 96 horas de crecimiento como se describió anteriormente^{15,18}.

Generación de estrés oxidativo exógeno con sensidiscos impregnados de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y menadiona

Aislamientos Hc1980, HcSOD3 y HcCATP fueron cultivados en 10 mL de medio HMM líquido e incubados a 37 °C por 63 horas en agitación constante a 120 rpm. Para realizar el ensayo, los cultivos fueron centrifugados en tubos cónicos a 3.500 rpm durante 10 minutos y el botón resuspendido en 10 ml de HMM líquido. La concentración de células fue determinada en una cámara de Neubauer y ajustada a 1x10⁸ células/mL. Para el ensayo 150 µl de la solución se sembraron por confluencia con asa estéril en medio HMM sólido.

Para el ensayo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sensidiscos de papel filtro de 1 cm de diámetro fueron impregnados con una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) que contenía H₂O₂ a concentraciones de 0M, 1M, 2M, 4M o 8M. Una vez completamente seco el medio, el sensidisco fue ubicado en el medio de la caja Petri e incubado a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂ durante ocho días. Este proceso se realizó por triplicado para cada aislamiento y cada concentración de H₂O₂.¹⁵

Para determinar el efecto de la menadiona sobre los aislamientos, sensidiscos de papel filtro de 1cm de diámetro fueron impregnados con una solución de menadiona a concentraciones de 0 mM, 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, diluida en molibdato de sodio dihidratado, EDTA, cloruro de sodio y agua estéril¹⁹. Una vez completamente seco el medio, el sensidisco fue ubicado en el medio de la caja Petri e incubado a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 5% durante ocho días. Este proceso se realizó por triplicado para cada aislamiento y cada concentración.

El efecto de los reactivos productores de estrés oxidativo sobre el crecimiento de los aislamientos fue determinado midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno utilizando la técnica de manchado

Los aislamientos fueron cultivados bajo las mismas condiciones de los métodos anteriores. La concentración de células fue determinada en una cámara de Neubauer y ajustada a 1x10⁸ células/mL, a partir de esta se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de células iguales a: 1x10⁸, 1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵ y 1x10⁴. Para el ensayo se utilizó medio HMM sólido el cual fue combinado con una solución de H₂O₂ para obtener concentraciones finales de 150mM y 200mM. Cinco µL de las diferentes concentraciones de células fue sembrada en cada medio utilizando la técnica de manchado⁷. Los medios fueron incubados a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 5% durante ocho días.

Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno mediante coloración

El inóculo inicial de cada una de las cepas fue preparado en 10 mL de medio HMM líquido e incubado durante 48 h con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron las células obtenidas en tubos cónicos de 50 mL, 3500 rpm durante 10 min, y suspendidas en medio líquido. La concentración de células fue determinada en cámara de Neubauer y ajustada a 1×10^8 células/mL.

En tubos de ensayo se preparó una solución de 2 mL con H_2O_2 a una concentración de 300 mM, la solución de células fue añadida. La mezcla fue incubada por 1 hora a $37^\circ C$; la reacción se detuvo agregando 8 mL H_2O estéril. Células fueron centrifugadas durante 3 min a 3000 rpm (se descartó mayor parte del sobrenadante). Para determinar la viabilidad celular, una dilución 1:10 fue cultivada en medio BHI suplementado con glucosa al 1% e incubado a $37^\circ C$ con atmósfera de CO_2 por una semana. Adicionalmente, la viabilidad fue evaluada como la capacidad de la célula viva para reducir el colorante (Janus Green) a su forma incolora²¹. Se determinó el número células vivas mezclando volúmenes iguales del colorante y las células y dejando actuar por 10 minutos²¹.

Determinación de vitalidad celular

La vitalidad se evaluó como la capacidad celular de la levadura para metabolizar la glucosa a través de la bomba de protones ubicada en la membrana celular, dando como resultado la acidificación del medio debido a la producción de iones H^+ ¹⁶. Para el ensayo se contó con células concentradas (cultivo de 48 horas), lavadas con agua estéril (pH 7,0) dos veces. Dos mL de esta solución madre se adicionaron con 38 mL de agua estéril. Posterior a la estabilización del pH entre 5,5 a 6, fueron agregados 10 mL de glucosa al 20%. El pH se registró cada 3 minutos durante 30 minutos¹⁶.

Ensayo sensibilidad a menadiona en medio líquido

La sensibilidad a la menadiona (M5625, Sigma) fue determinada utilizando una placa de ELISA de 96 pocillos. Se dispuso de una concentración de células 4×10^6 de cada una de las cepas de *Histoplasma* spp.²². Estas se inocularon en cada pocillo junto con una solución de menadiona a unas concentraciones de: 0,0.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 μM . Las placas se incubaron a $37^\circ C$ en atmósfera de CO_2 a 5% durante ocho días, después del tiempo de incubación se determinó la DO_{600} de los cultivos a una longitud de onda de 595 nm¹⁶ en lector de microplatos iMark™BioRad.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico Prism versión 8 (GraphPad). Para determinar la distribución de los datos se realizarán las pruebas estadísticas D'agostina-Pearson y Shapiro-Wilk. Para comparar la media entre dos grupos, se usó una T- Students de una cola para los datos con distribución normal. Para identificar las diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía o dos vías según el número de parámetros analizados, seguido de un análisis post hoc utilizando el método de comparaciones múltiples de Bonferroni usando el programa GraphPad Prism versión 7. Se consideró el valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La expresión disminuida de HcCatp pero no HcSod3 afecta el crecimiento de las células de *Histoplasma* spp. a las 24 y 48 horas

El aislamiento Hc1980 aumentó la masa celular entre las 24 a las 72 horas (Fig. 1), alcanzando la fase estacionaria a las 96 horas (Fig. 1). Se observa que entre las 48 y 72 horas la curva representa la fase exponencial, por lo cual esta ventana de tiempo fue seleccionada para realizar los ensayos de sensibilidad (Fig.1).

Los aislamientos con disminución de la expresión las enzimas SOD3 y CATp (HcSOD3 y HcCATp) presentaron el mismo comportamiento que la cepa control (Fig. 1A), alcanzando la fase estacionaria a las 96 horas. Sin embargo, el aislamiento HcCATp presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) a las 24 horas (Hc1980: 0.235 ± 0.167 ; HcCATp 0.170 ± 0.023 ; Media \pm DS) y 48 horas (Hc1980: Media: 1.002 ± 0.411 ; HcCATp: 0.555 ± 0.063 ; Media \pm DS) de crecimiento. Este comportamiento no se observó con el aislamiento HcSOD3 (24 Horas: 0.224 ± 0.099 ; 48 horas: 0.524 ± 0.220). Estos datos sugieren que la disminución en la expresión de la enzima Catp pero no Sod3 afectan el fitness celular.

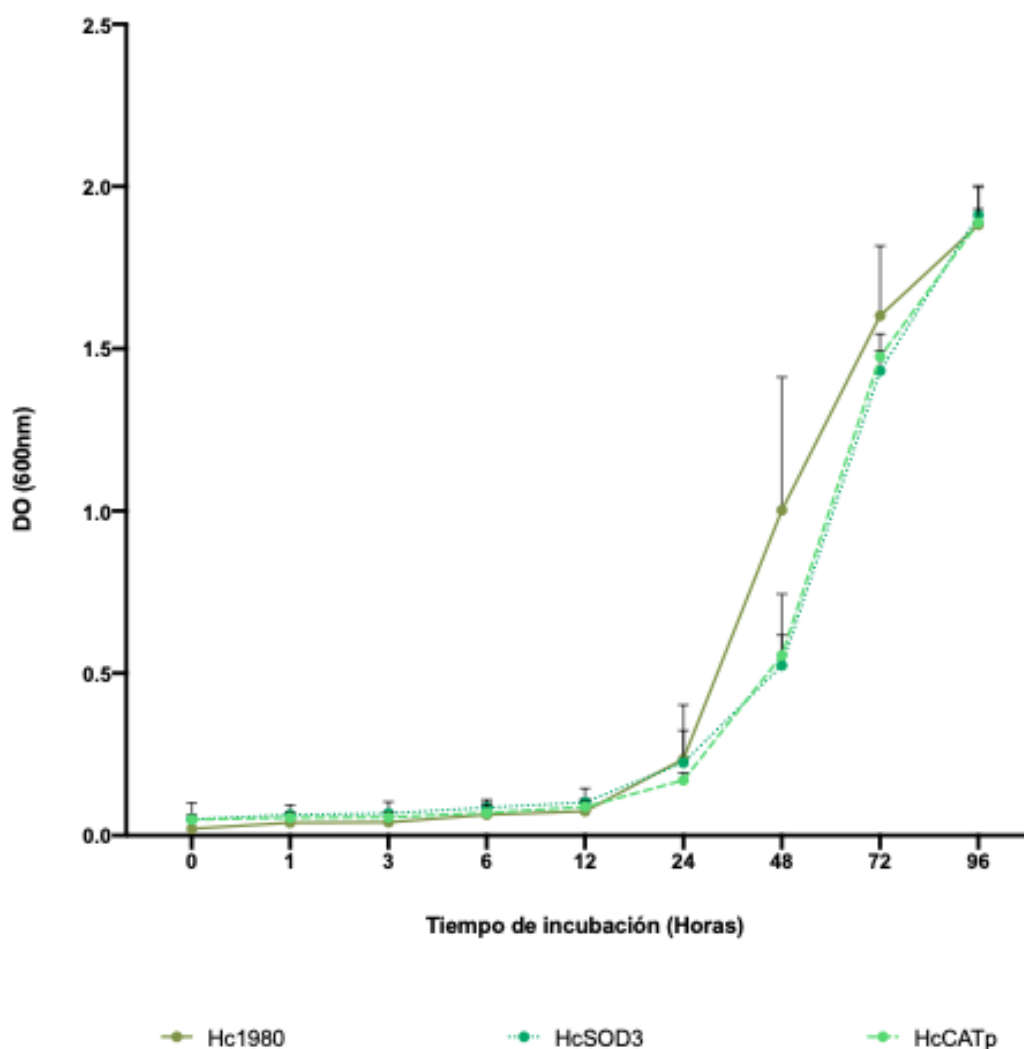


Fig. 1. El crecimiento de los aislamientos de *Histoplasma* spp. fue determinado por una curva de crecimiento en medio HMM por un total de 96 horas, realizando mediciones a las 0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas. Puntos representan media con DS.

La vitalidad celular medida a través del metabolismo de la glucosa debe ser interpretada según la acidificación total del medio

Las células de los aislamientos Hc1980, HcSOD3 y HcCATp fueron expuestas a glucosa después de la remoción del medio de cultivo a través de lavados con agua destilada. El pH fue determinado por un total de 30 minutos con mediciones cada 3 minutos. Para el aislamiento Hc1980 el pH inicial fue de 6.16, mientras que para los

aislamientos HcSOD3 y HcCATp fue de 6.25 y 7.25 respectivamente (Fig. 2.). Según la gráfica el pH del aislamiento HcCATp fue mayor que el de los otros aislamientos analizados. Sin embargo, a pesar de la diferencia inicial, la disminución total del pH para cada aislamiento fue de 0.21 (Hc1980), 0.22 (HcSOD3) y 0.23 (HcCATp), no presentando diferencia significativa entre aislamientos (Fig.2.). Esto sugiere que el análisis de la vitalidad utilizando este método debe realizarse según la disminución total del pH.

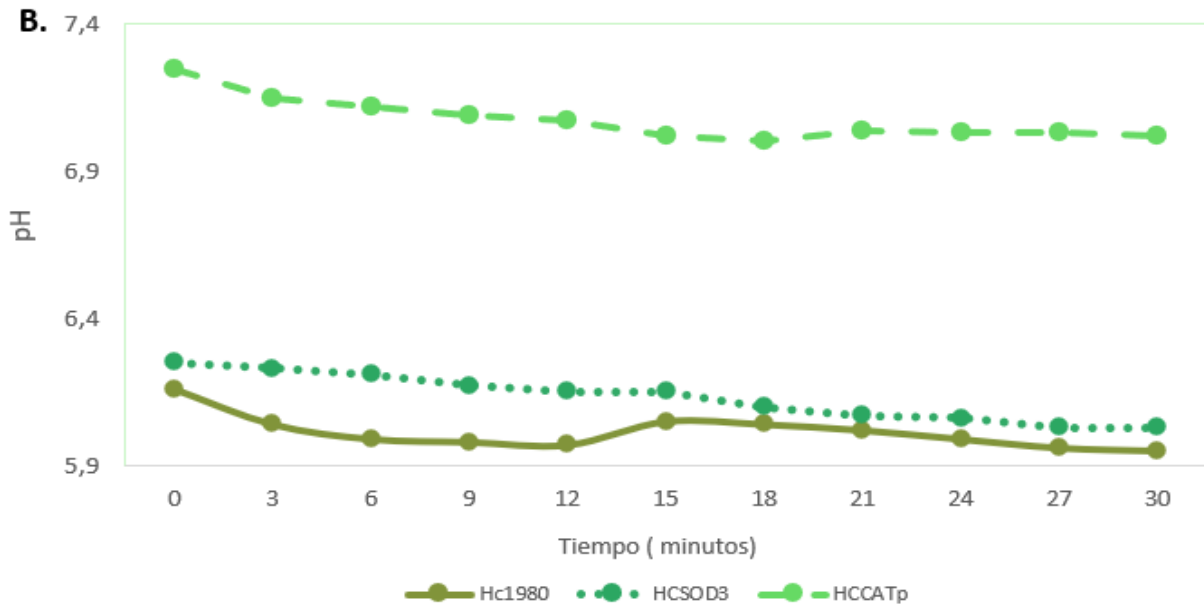


Fig. 2. La vitalidad fue estimada por la medición del pH en las suspensiones de levadura y se reportó en intervalos de tres minutos durante 30 minutos.

La exposición con diferentes inductores de estrés mediante sensidiscos permite evaluar inhibición del crecimiento en *Histoplasma spp.*

Los agentes exógenos H₂O₂ y menadiona, fueron utilizados como ejemplificación de inductores de estrés oxidativo en *Histoplasma spp.* Fueron seleccionados basados en que: I) son los más comúnmente utilizados en la literatura, II) La concentración 100% inhibitoria del crecimiento es alta en comparación con la necesaria para causar estrés ^{6, 10, 15, 16, 20}.

Las células de *Histoplasma spp.* que expresan SOD3 y CATp constitutivamente (Hc1980) presentaron una disminución en el crecimiento directamente proporcional al aumento en la concentración de H₂O₂ o menadiona (Fig. 3.). De igual manera, este efecto fue observado en los aislamientos HcSOD3 y HcCATp (Fig. 3.).

Para determinar la diferencia significativa entre los halos de inhibición de la cepa control frente a los aislamientos con disminución en la expresión de HcSOD3 o HcCATp, el diámetro de la ausencia de crecimiento fue determinado para cada concentración de H₂O₂ o menadiona, y un análisis de varianzas de dos vías (ANOVA) fue realizado. Para el tratamiento con H₂O₂ o menadiona no se observó diferencia entre la cepa control Hc1980, HcSOD3 o HcCATp a ninguna concentración (Fig. 3.).

La evaluación mediante sensibilizadores permite la obtención de un registro visual en la disminución del crecimiento así como una cuantificación de este, permitiendo realizar comparaciones estadísticas.

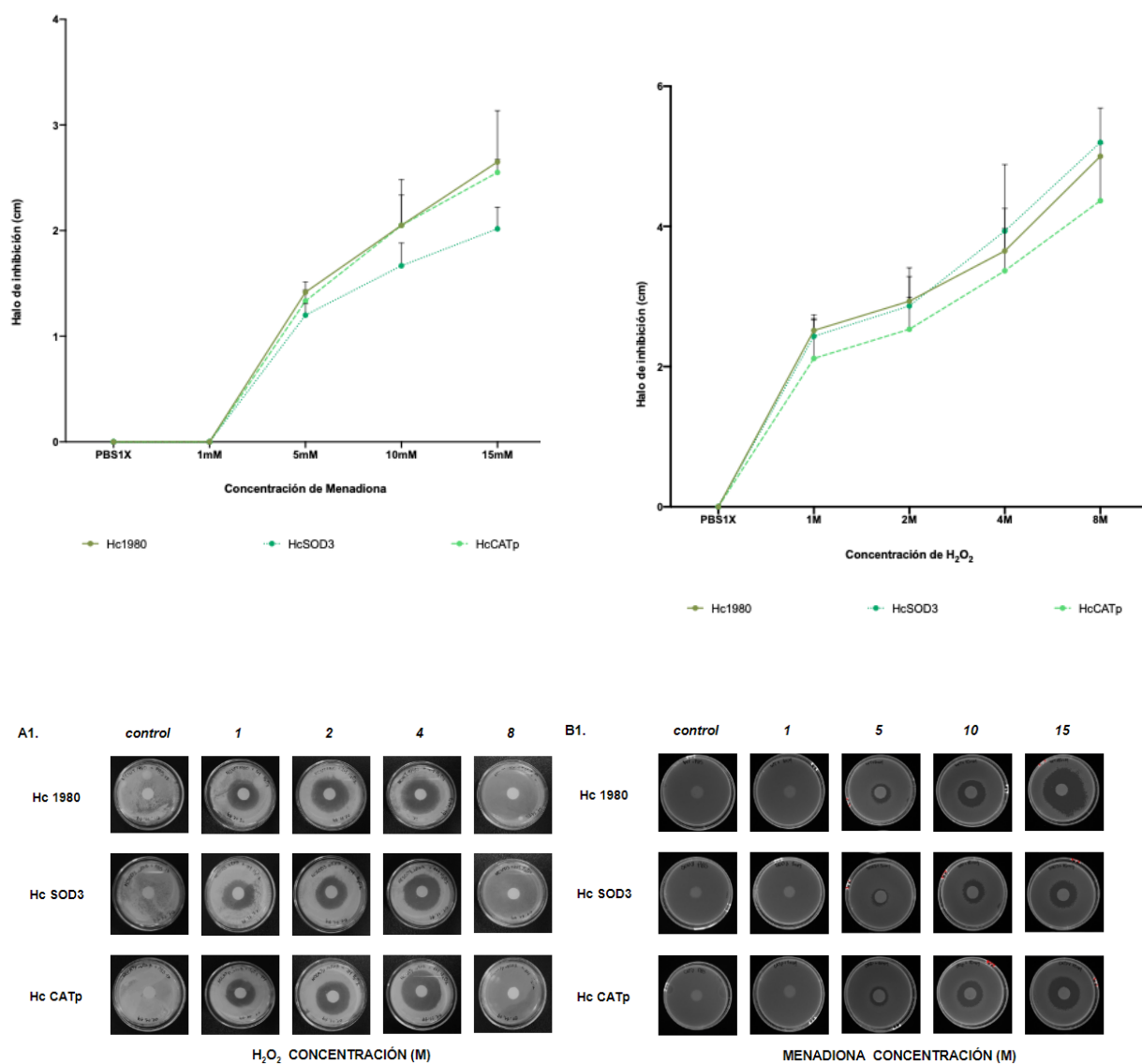


Fig. 3. Levadura de *Histoplasma* spp. Hc1980, HcSOD3 y HcCATp fueron expuestas a concentraciones crecientes de compuestos inductores de estrés (**A.** H₂O₂ y **B.** Menadiona). Se determinó la zona de inhibición como el área que no

presentó crecimiento de células de levadura. (Arriba). Los datos expuestos corresponden a la media y la DS de tres réplicas biológicas. (Abajo) imágenes de crecimiento de *Histoplasma* alrededor de discos saturados con estos inductores (**A1**. H₂O₂ y **B1**. Menadiona)

La exposición a la menadiona en placas de 96 pozos no es un método concluyente para evaluar estrés oxidativo en *Histoplasma spp.*

Células de Hc1980, HcSOD3 y HcCATp se expusieron a concentraciones crecientes de menadiona e incubadas por 8 días a 37 ° C, con 5% de CO₂ en una incubadora estática. El ensayo se realizó por triplicado. Posterior al tiempo de incubación, la DO₆₀₀ fue determinada en un lector de microplacas solo en el tiempo final de incubación.

Como se observa en la Fig. 4, el crecimiento del aislamiento control Hc1980 incremento en las primeras concentraciones (0,5 µM – 40 µM), aumentando levemente en la concentración de 80 µM para decaer nuevamente a la concentración final de 160 µM.

El aislamiento HcSOD3 presentó disminución en el crecimiento a las concentraciones de 20 µM y 40 µM. Por el otro lado, este efecto para el aislamiento HcCATp se observó a partir de 10 µM. Al igual de la cepa control, ambos aislamientos aumentaron la DO a 80 µM y decayeron a la concentración de 160 µM. Los datos no presentaron diferencias significativas entre los aislamientos a ninguna concentración.

Contrario a los esperado, según lo observado en el ensayo de los sensidiscos, no se observó una disminución en el crecimiento inversamente proporcional a la concentración de menadiona.

El efecto en el aumento de la densidad óptica a concentraciones tan altas 80 µM puede deberse a una lisis celular o descomposición del medio, por tanto aumenta la densidad óptica, lo cual no fue evaluado en este estudio.

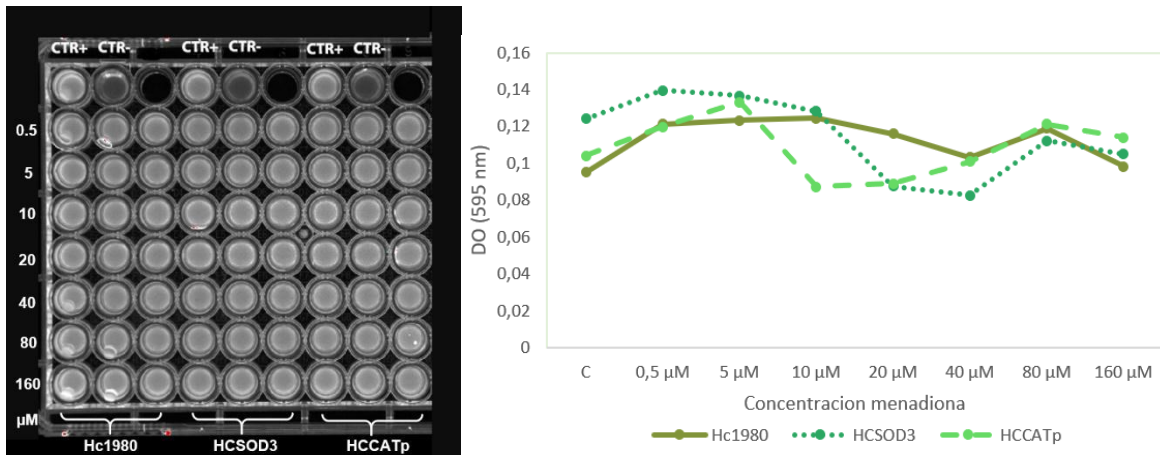


Fig. 4. Se utilizó una placa de 96 pocillos en la se inocularon células de levadura 4×10^6 de cada aislado en BHI que contenía cantidades crecientes de menadiona (0,5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 μM). Las placas se incubaron a 37°C , con 5% de CO_2 durante 8 días.

***Histoplasma spp.* depende de una concentración celular mínima para lograr su crecimiento.**

Células de Hc1980, HcSOD3 y HcCATp cultivadas fueron diluidas a una concentración inicial de 1×10^8 . Diluciones seriadas 1:10 se realizaron a partir de la solución inicial y 5 μl fueron sembrados en el medio HMM sólido con o sin H_2O_2 (150mM y 200mM).

En el medio HMM sólido, sin la presencia de H_2O_2 , se observó crecimiento en los puntos que contenían la dilución inicial de células de 1×10^8 para todos los aislamientos evaluados (Fig. 5.). Sin embargo, en las diluciones subsecuentes, no se observa crecimiento sugiriendo que *Histoplasma spp.* requiere una concentración celular mínima para lograr su crecimiento la técnica de manchado.

Las células expuestas a las dos concentraciones de H_2O_2 presentan una inhibición completa de crecimiento, adicional a un cambio de coloración del medio debido a la disminución de pH.

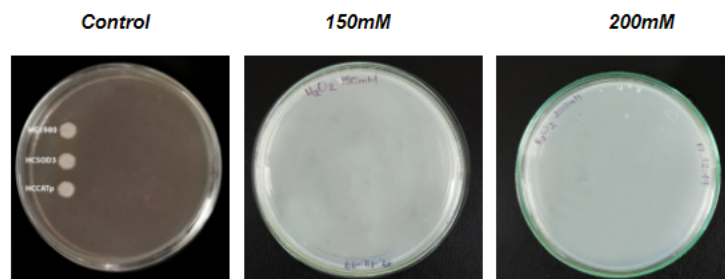


Fig. 5. La sensibilidad de *Histoplasma spp.* al H_2O_2 fue determinada a través del crecimiento de células de levadura inoculadas en diluciones exponenciales al medio

HMM con dos concentraciones de H_2O_2 (150mM y 200mM). Registro del crecimiento luego de una semana de incubación.

Bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno no reflejan un efecto nocivo relevante en células de levadura de *Histoplasma* spp.

Los aislamientos Hc1980, HcSOD3 y HcCATp, fueron expuestos a H_2O_2 en medio líquido durante una hora, la reacción fue detenida usando agua destilada después del tiempo de incubación. Para determinar el efecto del compuesto sobre la viabilidad celular, las células expuestas fueron incubadas en medio BHI suplementado con glucosa.

No se aprecia disminución en el crecimiento, encontrando un crecimiento confluyente en la placa.

Para la coloración se observaron células de levadura teñidas, evidenciando la muerte celular pero sin representar un gran porcentaje en comparación con las células vivas. También se observó que algunas células presentaban la característica de contener vacuolas intracelulares con el colorante ingerido pero sin suponer la muerte de estas.

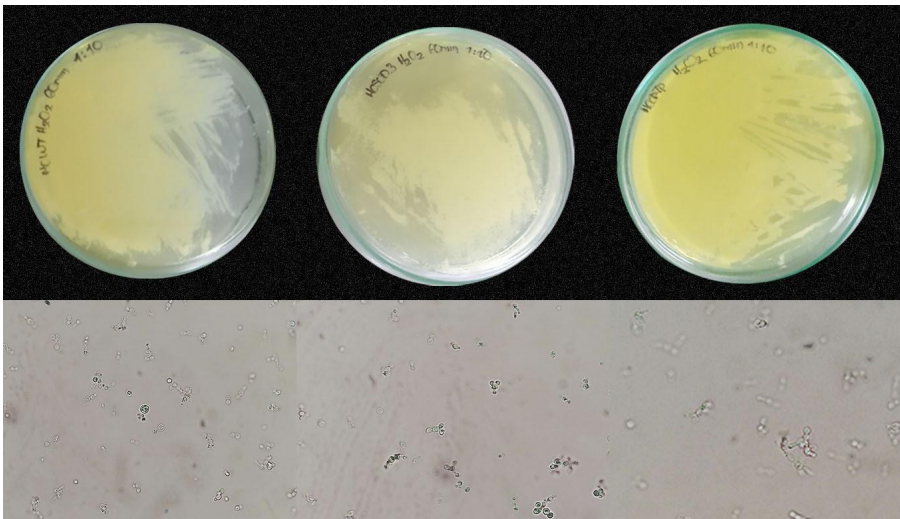


Fig. 6. El efecto del peróxido de hidrógeno sobre las células de *Histoplasma* spp. fue determinado midiendo la viabilidad celular por medio de la coloración con Janus Green luego de una hora de reacción y por medio de UFC después de una semana de incubación.

DISCUSIÓN

Ha sido descrito el efecto tóxico en diferentes especies de microorganismos de algunos agentes químicos tales como el peróxido de hidrógeno, la menadiona, el

paraquat y algunos alcoholes ⁷. Estas sustancias producen un efecto de estrés oxidativo a nivel celular en el proceso de generación de especies reactivas de oxígeno las cuales tienen un efecto negativo en otras moléculas afectando así los procesos celulares del microorganismo ³. La determinación de la viabilidad y la vitalidad celular son los métodos más ampliamente utilizados para evaluar el impacto que tienen estos compuestos en la célula ¹⁵. La muerte celular es una de las consecuencias de la toxicidad, aunque estas sustancias también pueden generar una serie de alteraciones celulares que pueden influir en la capacidad de las células para dividirse sin causar necesariamente la muerte ¹⁵.

En este estudio se utilizaron tres cepas de levadura de *Histoplasma* spp. de las cuales dos presentaban una disminución en la expresión enzimática de Sod 3 o Catp, con una posible sensibilidad mayor al estrés oxidativo y una cepa de tipo salvaje como cepa control. Para determinar el efecto de las ERO exógenas sobre el crecimiento celular se evaluaron una variedad de métodos utilizando sustancias inductoras de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno y la menadiona, las cuales generan las ERO que son neutralizadas por las enzimas que codifican los genes silenciados en los aislamientos usados en este trabajo ¹⁹.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron el aislamiento silvestre Hc1980, y aislamientos con disminución en la expresión de los genes *HcSOD3* o *HcCATP* previamente desarrollados por la técnica de asRNA y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ^{15, 16} en el laboratorio de Biología Celular y Molecular CIB-UdeA. Los aislamientos presentaban entre el 45 al 50% en la disminución de la expresión de los genes blanco.

El aislamiento HcCATp, pero no HcSOD3 presentó diferencias significativas en el crecimiento celular a las 24 y 48 horas con respecto a la cepa control Hc1980, diferencia que no se observó a las 96 horas (Fig. 1.). En los hongos dimórficos, la definición de factor de virulencia es aquel gen que es necesario para causar infección pero que su disminución en la expresión no afecta el fitness celular ²³. Este parámetro no fue evaluado con anterioridad en aislamientos *knock out* para Catp ²⁴, por tanto no se puede determinar si las diferencias en el crecimiento se deben a la disminución parcial de la expresión de Catp o el sitio de integración en el genoma del ADN de transferencia que se integró durante la transformación con *A. tumefaciens* ^{15,16}.

Las técnicas aquí utilizadas fueron la selección de diferentes metodologías aplicadas a evaluar la respuesta y comportamiento del microorganismo luego de ser sometidos a un proceso causante de estrés que probablemente afectase su conducta normal. Para esto se establecieron las más precisas y apropiadas para poder obtener un resultado de apreciación cualitativa y cuantitativa del daño causado al hongo. Los métodos están fundamentados en la capacidad celular del microorganismo para crecer en el medio, entre los que encontramos la medición de la zona de inhibición del crecimiento, la prueba de machado, el cultivo en medio líquido y métodos basados en tinciones, siendo estas pruebas de carácter cualitativo y algunas arrojan datos cuantitativos que permiten hacer una comparación

estadística ⁷. La selección de estas técnicas fue debido a sus características de baja complejidad de uso y desarrollo, los bajos costos que representaban y su reproducibilidad.

Los resultados que se obtuvieron muestran que el uso de sensidiscos impregnado con estas sustancias es un método que funciona de manera efectiva para evaluar cualitativamente la inhibición de crecimiento causado a raíz del estrés oxidativo generado por dichas sustancias. Igualmente, al permitir la medición cuantitativa se puede determinar si lo observado, presenta una diferencia significativa o no. De esta manera se evidencio una disminución del crecimiento que fue proporcional al aumento de la concentración de estos compuestos, lo que demuestra lo tóxico que resultan las ERO para las 3 cepas utilizadas (Hc1980, HcSOD3, HcCAP). Por otro lado contrario a lo que se esperaba el efecto tóxico impacto más las células de la cepa salvaje que los aislamientos de las cepas silenciadas para las enzimas que contrarrestan este efecto, lo que conlleva a plantearse que las cepas silenciadas al suponer una mayor sensibilidad al daño puedan tener o utilizar otras vías alternas para defenderse del estrés oxidativo exógeno (Fig. 3.).

Adicional a la técnica de inhibición de crecimiento evaluamos otras de las técnicas más comúnmente utilizadas como son la técnica de manchado (Fig. 5.) la cual permite observar el crecimiento de las células en replicación activa y el crecimiento posterior al estrés (Fig. 6.) ¹³. Ambas técnicas generalmente utilizadas con otros modelos muestran un efecto positivo para la evaluación de la respuesta al estrés, pero en este caso ninguna de las dos logra dar un resultado efectivo, haciéndolas de poca utilidad para esta evaluación en *Histoplasma spp.* La técnica de machado presentó un efecto desfavorable debido a la acidificación del medio pasando de un pH de 7 a uno de 4 debido a la interacción del H₂O₂ con los componentes del medio, evitando así de cualquier manera el crecimiento de la levadura debido al cambio de las condiciones óptimas, teniendo en cuenta que para el medio control esto no sucedió. Aún así en el medio control solo se obtuvo crecimiento en el inóculo de mayor concentración (1x10⁸), esto nos permite inferir que concentraciones inferiores a esta no son aptas o lo suficientemente capaces de reproducirse (Fig. 5.).

Sin embargo al comparar este último resultado con el crecimiento obtenido en medio BHI suplementado con glucosa, se observo un crecimiento a una concentración inferior que además se dio de manera muy confluyente que no permitió la obtención de colonias aisladas (Fig. 6.), con lo cual se puede suponer que el volumen utilizado es uno de los factores que influyó de manera directa en la no recuperación celular.

En la técnica de microplacas utilizada se estresan las células con la menadiona en varias concentraciones de esta, sin embargo no se obtuvieron resultados que permitieran medir el estrés causado en las células. Esta técnica en la literatura tuvo resultados concluyentes para otros hongos como *Paracoccidioides spp.* que pertenece al orden Onygenales igual que *Histoplasma spp.*, así que el motivo más acertado por el cual en este caso no se obtuviera resultados puede ser que el inóculo utilizado no fuese el adecuado ¹⁶. El metodo puede ser mejorado con incubación en estufa con agitación y la medición a diferentes puntos del crecimiento, de está manera se puede determinar con mayor seguridad el efecto de la

menadiona en las células evaluadas o se pueden corroborar nuestros datos y confirmar que el método descrito no es el adecuado para la evaluación.

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que a pesar de que la mayoría de estas técnicas no fueron concluyentes para medir el efecto del estrés oxidativo en células de *Histoplasma spp.* no se pueden descartar totalmente para ser utilizadas en este microorganismo, se hace necesario seguir estandarizando estos métodos para obtener resultados verdaderamente reproducibles para evidenciar cual es realmente el efecto que causa el en este el estrés oxidativo causado por las ERO.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corrales MSc LC, Muñoz Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 15 de diciembre de 2012;10(18):213.
2. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea Concepc*. 2006;(494):161-72.
3. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 1 de noviembre de 2008;1780(11):1217-35.
4. Warris A, Ballou ER. Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin Cell Dev Biol*. 1 de mayo de 2019;89:34-46.
5. Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 de abril de 2004;101(17):6564-9.
6. Párraga PG. Respuesta al estrés oxidativo (h₂O₂) en *Candida albicans*: función protectora del glutatión y las enzimas antioxidantes [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Murcia; 2007 [citado 24 de julio de 2020]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=258442>
7. Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res*. 1 de noviembre de 2014;14(7):1068-79.
8. Holbrook ED, Edwards JA, Youseff BH, Rappleye CA. Definition of the Extracellular Proteome of Pathogenic-Phase *Histoplasma capsulatum*. *J Proteome Res*. 1 de abril de 2011;10(4):1929-43.
9. Maresca B, Kobayashi GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol Rev*. junio de 1989;53(2):186-209.
10. Youseff BH, Holbrook ED, Smolnycki KA, Rappleye CA. Extracellular Superoxide Dismutase Protects *Histoplasma* Yeast Cells from Host-Derived Oxidative Stress. *PLoS Pathog* [Internet]. 17 de mayo de 2012 [citado 24 de julio de 2020];8(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355102/>
11. Brummer E, Kurita N, Yoshida S, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic Activity of Human Neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: Correlation with Phagocytosis. *J Infect Dis*. 1 de julio de 1991;164(1):158-62.
12. Funes D. 1. Medicina. 2. Infecciones Bacterianas y Micosis. 3. Micosis. I.

Riera, Fernan- do, comp. II. Título. CDD 616.969. 2019;224.

13. Ruiz-Baca E, Leyva-Sánchez H, Calderón-Barraza B, Esquivel-Naranjo U, López-Romero E, López-Rodríguez A, et al. Identification of proteins in *Sporothrixschenckii* sensu stricto in response to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Rev Iberoam Micol.* 1 de enero de 2019;36(1):17-23.

14. DuBois JC, Smulian AG. Sterol Regulatory Element Binding Protein (Srb1) Is Required for Hypoxic Adaptation and Virulence in the Dimorphic Fungus *Histoplasma capsulatum*. *PLOS ONE.* 6 de octubre de 2016;11(10):e0163849.

15. Tamayo D, Muñoz JF, Almeida AJ, Puerta JD, Restrepo Á, Cuomo CA, et al. Paracoccidioides spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. *Fungal Genet Biol FG B.* marzo de 2017;100:22-32.

16. Tamayo D, Muñoz JF, Lopez Á, Urán M, Herrera J, Borges CL, et al. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of Paracoccidioides spp. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 10 de marzo de 2016 [citado 24 de julio de 2020];10(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786090/>

17. Worsham PL, Goldman WE. Quantitative plating of *Histoplasma capsulatum* without addition of conditioned medium or siderophores. *J Med Vet Mycol.* 1 de mayo de 1988;26(3):137-43.

18. Uppuluri P, Chaffin WL. Defining *Candida albicans* stationary phase by cellular and DNA replication, gene expression and regulation. *Mol Microbiol.* 2007;64(6):1572-86.

19. Yamashoji S. Different characteristics between menadione and menadione sodium bisulfite as redox mediator in yeast cell suspension. *Biochem Biophys Rep.* 21 de marzo de 2016;6:88-93.

20. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, et al. High Resistance to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida glabrata* Is Mediated by a Single Catalase, Cta1p, and Is Controlled by the Transcription Factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell.* mayo de 2008;7(5):814-25.

21. Berliner MD, Reca ME. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. *Sabouraudia.* 1 de enero de 1967;5(1):26-9.

22. Goughenour KD, Balada-Llasat J-M, Rappleye CA. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of *Histoplasma capsulatum* Yeasts. *J Clin Microbiol.* octubre de 2015;53(10):3286-95.

23. Rappleye CA, Goldman WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:281-303.

24. Holbrook ED, Smolnycki KA, Youseff BH, Rappleye CA. Redundant Catalases Detoxify Phagocyte Reactive Oxygen and Facilitate *Histoplasma capsulatum* Pathogenesis. *Infect Immun.* julio de 2013;81(7):2334-46.