



Brito Devoto, Tomás

Estrategias terapéuticas para optimizar la farmacoterapia antimicótica contra la colonización/infección fúngica broncopulmonar en los pacientes con fibrosis quística



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Brito Devoto, T. (2023). *Estrategias terapéuticas para optimizar la farmacoterapia antimicótica contra la colonización/infección fúngica broncopulmonar en los pacientes con fibrosis quística. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4274>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>



Estrategias terapéuticas para optimizar la farmacoterapia antimicótica contra la colonización/infección fúngica broncopulmonar en los pacientes con fibrosis quística

u)

Lic. Tomás Brito Devoto

0 @) U @ U @
U h U @h U y" # \ V @ - u

Directora:) U O #

Codirector:) 8 k #



Índice

o

o

@

7 h

h #7uk

o

u

U

o

U h

\

=

\

\

U

u

o

#

u " U

o

Aspergillus Scedosporium Exophiala @k h\o tk# °U"

o

cyp51A *A. fumigatus*

non-wildtype

cyp51A h#k

o h#k

cyp51A

o

Aspergillus

o

cyp51A "#

A. flavus non-WT

o h#k

o tk# U h

\ tk#

#

-

in-vitro

k

u

7

Aspergillus Scedosporium Exophiala @k h\o tk# ° U"

A. fumigatus

cyp51A

Aspergillus

tk# Uh

#

-

in-vitro

)

u

7

Aspergillus Scedosporium Exophiala @k h\o tk# ° U"

A. fumigatus

cyp51A

Aspergillus

tk#

#

h

h

k

o

U

V

Agradecimientos

V

° M

° 0 8

" 7 0 K o U # K 7)

° 0 ° u U M h # ° - ° t o t

° U K 7 8 # 8 u U

@h° U

o 7 8 - @)U

" #

V° V\ " @u-# ° " @o

= V ° h ° = 8 ° V h

° 0 ° " # @) -7@

° U ° U °) # ° 77 " y"

Uh

° 7 ° o ° U ° # ° 7 ° y"

° 0 ° ° ° ° U @o

° y ° V ° j

Abreviaturas

#

" # cassette " uh

" h

) V) V

) V ") V

" U "

" U h

" V)

" V @ " V O @ O

" V \ t

" kV kV

" kV " kV

" U ## American Type Culture Collection

" uh

° o

7uk

@

@ E # @ E

@ @ Clinical and Laboratory Standard Institute

U

-

)

) @

) U - U Dulbecco's modified Eagle's medium

) U @

) U o \

Vuh

) \

-#E

E

-#

-#† -#\ 77

-) u

-U ° *European Medicines Agency*

-V #

-h \ #

-h 7

7) ° *Food and Drug Administration*

7-@7

@

7Qy

7J

= \

=O

=hO# y†

y†

@° U

@-

@8

8

@

@-k @

V

k

@u° @

V

u

@u8

)

@°

@k

)

M M o

σ U O U) U

U" h°
U -
U @

U Ou
UU
U

U \ ho V
U h

U o) *membrane spanning domains*
V

V° 8 V)
V")

U
Vh 8 V° V)

Vh
Vo7

\k7

h" o *buffer*

h#O

h#k

h)°

h) @

h-@

hM " Uh

hO

hO8

U) @

Vh

h\o

h#k h#k

k-V 7j k V 7 j

kV

k\o

kh =hO#

khU @ Roswell Park Memorial Institute

ku

o o Scedosporium

o) o

o7

o@7

oO/h

u- buffer'u -) u

u-U

u@ @

uk

y7#

y7h

yuk

yt

tk#

‡ u ‡ u #Ⓞ -#†

h)

1. Introducción

1.1 Fibrosis quística: Presentaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento

o) El diagnóstico de la fibrosis quística se realiza mediante pruebas genéticas que detectan mutaciones en el gen CFTR. La prueba de referencia es el análisis de ADN que busca alteraciones en los exones 10 y 23 del gen CFTR. Si se detectan mutaciones en ambos exones, el diagnóstico es definitivo. Si no se detectan, se recomienda realizar una prueba de sudor para confirmar el diagnóstico.

o) El tratamiento de la fibrosis quística se basa en la administración de medicamentos que mejoran la función del CFTR. Entre ellos se encuentran el ivacaftor, el lumacaftor y el tezacaftor, que actúan directamente sobre el canal de cloruro. Además, se utilizan medicamentos que ayudan a mejorar la función pulmonar y a prevenir infecciones, como los broncodilatadores y los antibióticos.

o) El pronóstico de la fibrosis quística ha mejorado significativamente gracias a los avances en el diagnóstico y el tratamiento. Sin embargo, el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado son fundamentales para mejorar la calidad de vida y prolongar la esperanza de vida de los pacientes.

o) El diagnóstico de la fibrosis quística se realiza mediante pruebas genéticas que detectan mutaciones en el gen CFTR. La prueba de referencia es el análisis de ADN que busca alteraciones en los exones 10 y 23 del gen CFTR. Si se detectan mutaciones en ambos exones, el diagnóstico es definitivo. Si no se detectan, se recomienda realizar una prueba de sudor para confirmar el diagnóstico.

o) El tratamiento de la fibrosis quística se basa en la administración de medicamentos que mejoran la función del CFTR. Entre ellos se encuentran el ivacaftor, el lumacaftor y el tezacaftor, que actúan directamente sobre el canal de cloruro. Además, se utilizan medicamentos que ayudan a mejorar la función pulmonar y a prevenir infecciones, como los broncodilatadores y los antibióticos.

o) El pronóstico de la fibrosis quística ha mejorado significativamente gracias a los avances en el diagnóstico y el tratamiento. Sin embargo, el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado son fundamentales para mejorar la calidad de vida y prolongar la esperanza de vida de los pacientes.

7

7

7

o 7

o

h - y k y

7

7

v -) #

7

7

7

7 h

8

u " o

o 7

- h 7 -h 7 -

o v v -h 7

o v

v o h " " v o # " " v

h v

O h V 7-@ 7
- @
O u @ u
7j u
7j -
h V
#uk #
o k V 7 j k-V 7j
@ V - k @-k
V O @ o VO
" \ k U) o o) U
@ -) o

1.2 Proteína CFTR: función y fisiopatología general

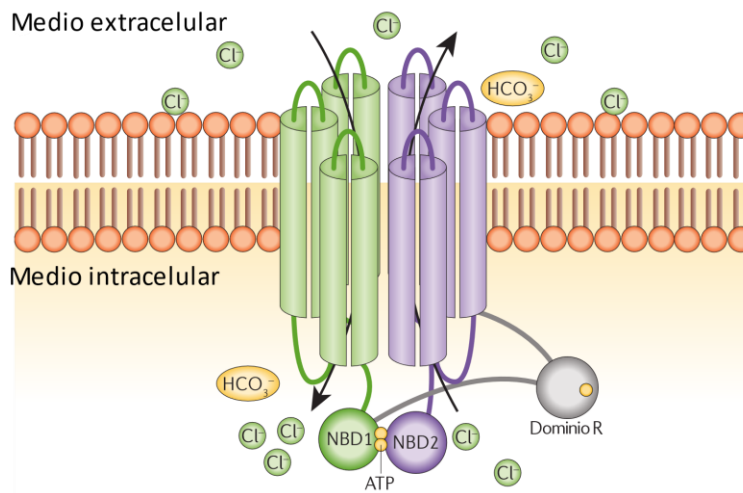
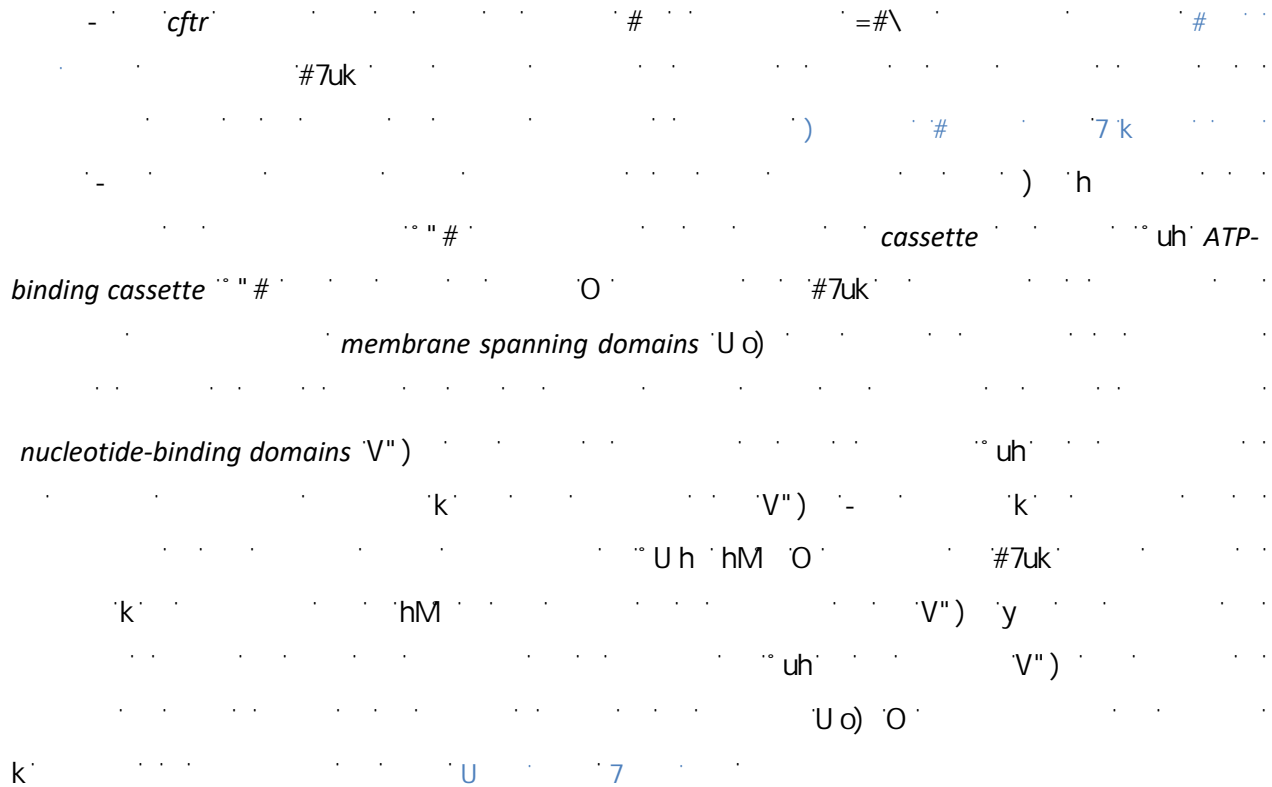


Figura 1.1 --

7 u k hM k #7uk - #7uk 7 j
 k hM V") y V")
 # =#\ Uo) O k
 °Uh V") @ 7 k hM Uo)

cftr
) M k
#7uk
CFTR2 Variant List History #7uk O
#7uk
U #
V") 7
" #77
7
@ h k k O
8 E
O
h
gold-standard
U
#7uk
clearance
h
) #
M -V #
#7uk k

h h

8

#=#\ #7uk

=

periciliary layer h#O "

O =#\ O =

)

h

h =#\ #

O #7uk

V -V # O

#7uk h

h

h

-V #

" # o

Ⓢ

" #)V°

)

-

o

h

u o

=

U

-V #

#

V

V

=#\

-

h

h

k

#uk @ O @ u @ - u @

h

#uk

h

7

#7uk 7j o -

#7uk O

#7uk

clearance =

u

7j O #7uk

7j o

#7uk

o

1.3 Agentes fúngicos frecuentemente aislados de secreciones respiratorias de pacientes con FQ

#	Nombre del agente	Referencia
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7, 10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M
	<i>Burkholderia cepacia</i>	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	
	<i>P. aeruginosa</i>	-
	<i>S. aureus</i>	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	#
	<i>Escherichia coli</i>	†, 10
	<i>Serratia marcescens</i>	
	<i>Proteus</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	8, †, 10
		=, 10, k
		h

o

o

Aspergillus fumigatus *Scedosporium apiospermum*

o

o

Candida

U -

- *A. fumigatus*

)

Aspergillus = *A. fumigatus*

u

o h \ *A. flavus* *A.*

niger *A. terreus* v h

Aspergillus *Scedosporium* *Exophiala*

o M

o

o

o

y tk#

h\o

U " h° o

tk# \

tk#

O Aspergillus 7j A.

fumigatus

" h ‡ y

h " Scedosporium

7j 7j

Exophiala dermatitidis Aspergillus

K

†)

7j U " h°

O Scedosporium Lomentospora

7j 8 U h

- A. fumigatus #

O Scedosporium Lomentospora

" O o - O

Scedosporium 7j

k 8 O

o Scedosporium

Lomentospora U " h° U " h°

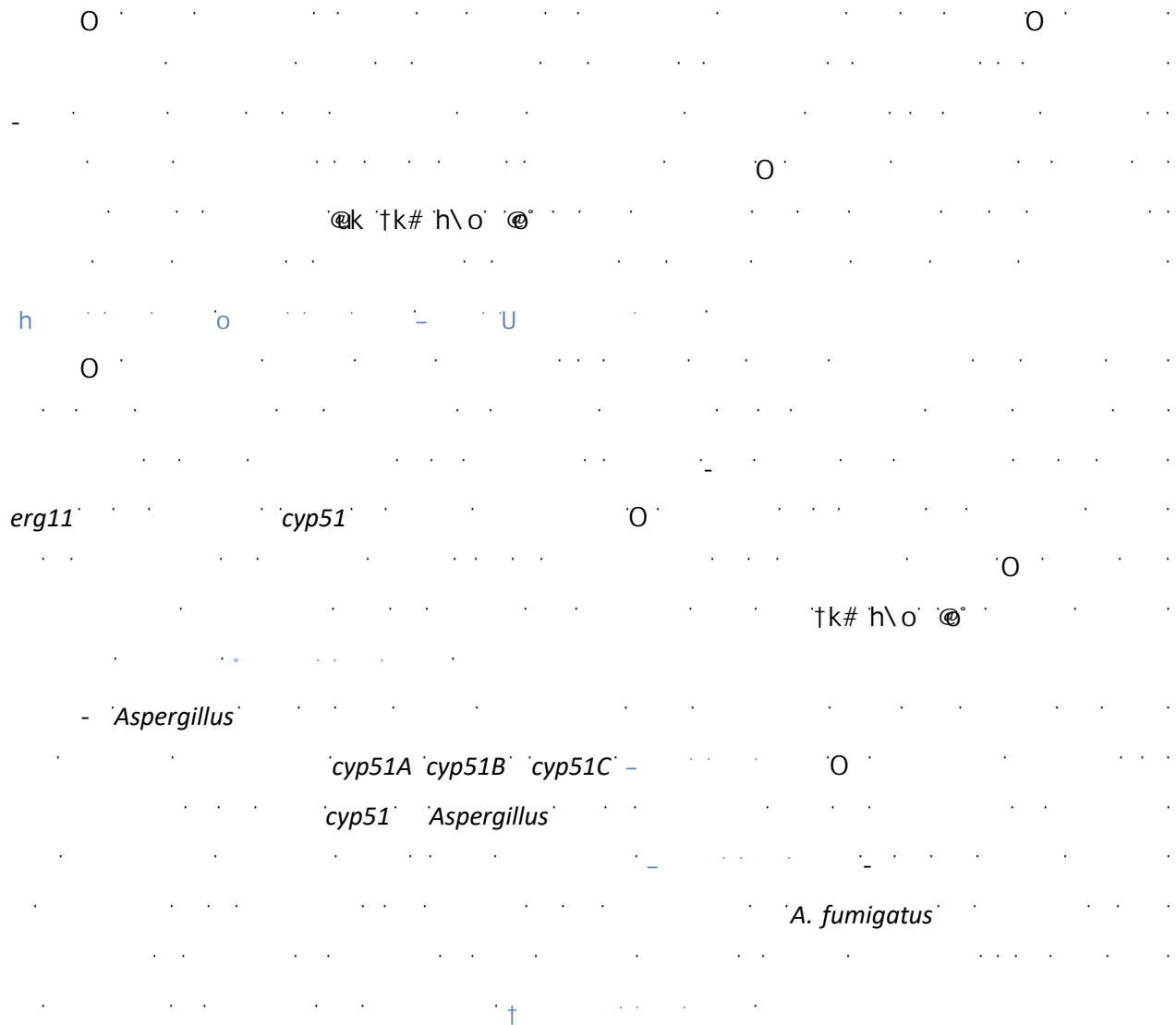
Scedosporium # #

U " h° Scedosporium

k O U h
 Aspergillus h
 @ k
 E. dermatitidis Tj
 M o
 Tj O E. dermatitidis " o
 7 -- yy M M
 O E. dermatitidis Tj
 O u E. dermatitidis
 Tj
 Tj 8 y o
 Tj E. dermatitidis
 M
 @8 E. dermatitidis
 M

1.4 Terapia antifúngica: fármacos y mecanismos de resistencias a los antifúngicos

Azoles



Polienos



o

h

U

o

Gold Standard

#

o

h

U

U

U

#

U

U

U

O U

Candida Cryptococcus

Aspergillus

Equinocandinas

O

o

o

)

fks

)

‡

h

h

#° o
 °V) U@)
 h
 °U"
 Candida Aspergillus
 u o
 M
 hotspot
 Fks1 Fks2 Candida glabrata
 h
)
 °U"
 7
)

1.4.1 Mecanismos de resistencia

7
) Aspergillus
 A. calidoustus A. lentulus A.
 parasiticus °U" @ O ‡
 A. terreus A. nidulans °U"
) O Scedosporium °U"
 @k " # -
 @ - S. aurantiacum
 tk# " O
 u Lomentospora prolificans
 h h E. dermatitidis
 °U" @k tk# h\o) 8 V -

M

O

O

#

#

U

7j

A. fumigatus

O

A. fumigatus

7j #

=

o

O

A. fumigatus

naïve

"

#

8

k

†

- *A. fumigatus*

cyp51A †

V

cyp51B

=

#

cyp51A

8

8

U

uk

cyp51A

uk

O

=

uk

7u

#

U

uk

cyp51A

U

=

A. fumigatus

=

A. flavus

cyp51C

o

O

o 7 o ° ' = ° h V) ' † U ' .
A. flavus # @ .
tk# O h o .
non-WT
cyp51 h .
7 *A. fumigatus*
h
A. fumigatus
O .
7j A.
fumigatus h " O .
o @ o - V @ h .
u u @ V y .
h " *A. fumigatus*
uk O = uk u ° ' 7
U 8 † - h .
uk O = o .

Tabla 1.1 – 0

Microorganismo	AMB	FLU	VRC	CAS	MIC	AND
<i>Candida albicans</i>
<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida krusei</i>
<i>Candida lusitanae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Acremonium</i>
<i>Alternaria</i>
<i>Blastomyces</i>
<i>Coccidioides</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Curvularia</i>
<i>Fusarium</i>
<i>Histoplasma</i>
<i>Mucorales</i>
<i>Rhizopus</i>
<i>Scedosporium</i>
<i>Trichoderma</i>
<i>Trichosporon</i>

Nota: AMB: anfotericina B; FLU: fluconazol; VRC: voriconazol; CAS: caspofungina; MIC: micafungina; AND: anidulafungina. +: especie fúngica susceptible al antifúngico; -: especies resistente; +/-: microorganismos que muestran una respuesta variable a los fármacos indicados. Adaptado de Szymański y col. (2022).

1.5 Administración de fármacos por vía pulmonar: ventajas y desventajas

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Alta biodisponibilidad • Efecto rápido • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitada capacidad de carga • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación
<ul style="list-style-type: none"> • Evita el metabolismo de primer paso 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un conocimiento adecuado de la técnica de inhalación

o h

O

#

Vh

Vh Vh oO/

Vh @ o

u ‡

h

O u

O

h

V

)
 u
)
 Food and Drug Administration
 European Medicines Agency

1.5.1 Micelas Poliméricas

delivery ‡
 core shell
 core
 shell =
 ‡
 U M V)
 core shell
 O k
 # Vh Uh
 y
 #U# V O #U#
 #U#
 #U#
 h

#U# h #U#

8 \

Hydrophilic-Lipophilic Balance =0

O Uh

\ Uh = u

u Uh

)

7

) o

8 O o

8 O

Uh

o o u

Uh

U"

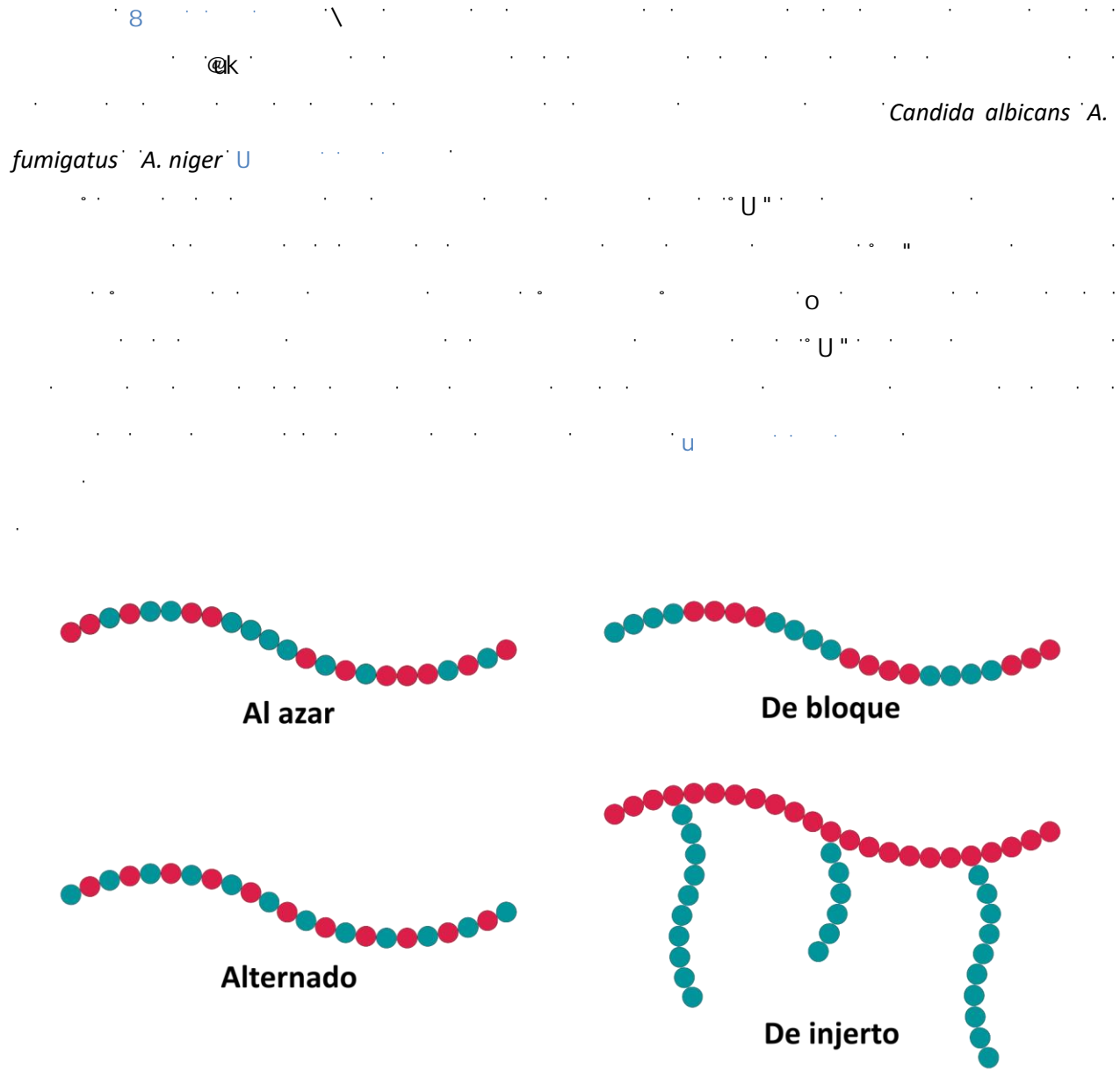


Figura 1.2 – #

M

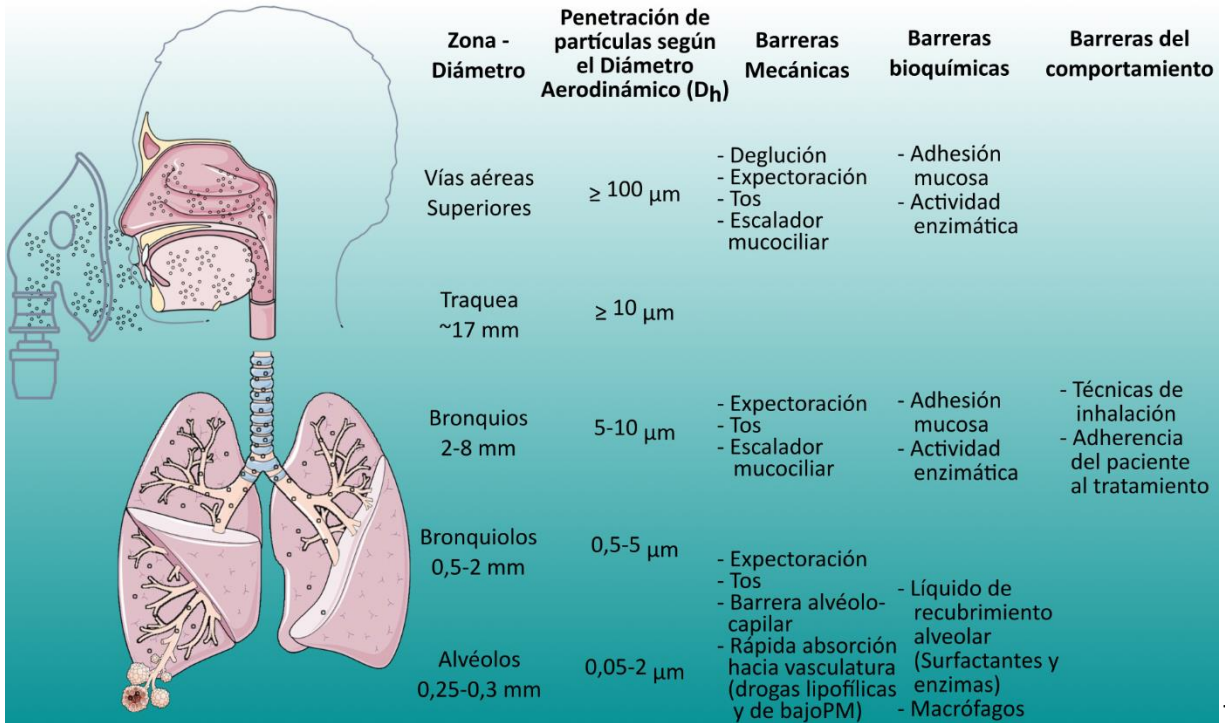


Figura 1.3 --

#

h

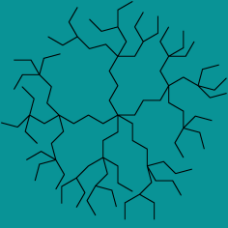

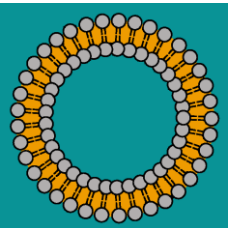
#

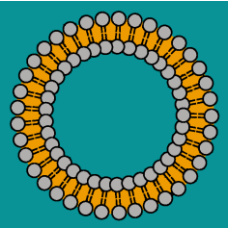
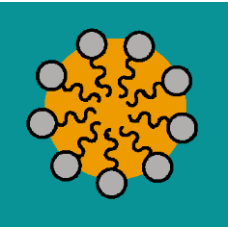
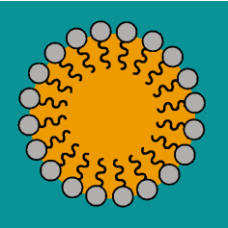
Tabla 1.2 – #

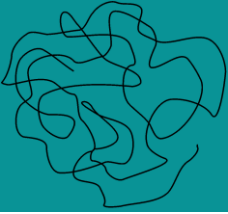
Ventajas	Desventajas
<p>Para direccionamiento pulmonar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Á ° Á) Á @ Á " Á h Á U Á 8 Á) 	<p>Para direccionamiento pulmonar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Á # Á v Á ° Á - Á h
<p>Para direccionamiento sistémico:</p> <ul style="list-style-type: none"> Á - Á U Á U Á - Á @ Á h Á 8 Á) Á O 	<p>Para direccionamiento sistémico:</p> <ul style="list-style-type: none"> Á h Á # Á) Á ° Á k Á - Á h

Nota: Adaptado de Cuestas y col. (2021).

Tabla 1.3 – #

Estructura esquemática	Nanotransportador	Características principales	Ventajas	Desventajas
	Dendrímeros	<ul style="list-style-type: none"> ÁV Á# Á7 Á* 	<ul style="list-style-type: none"> Á* Á* Á* Á(Áh 	<ul style="list-style-type: none"> Á* Á7 Áo Áh ÁB Ák
	Fullerenos	<ul style="list-style-type: none"> Áh ÁV Á* 	<ul style="list-style-type: none"> Á# ÁB Áo Á* 	<ul style="list-style-type: none"> Áo Ák ÁU Á*
	Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> Áo Áy ÁU Á* Áy 	<ul style="list-style-type: none"> ÁB ÁU Áh ÁU Áh Á* 	<ul style="list-style-type: none"> Áh Áy Á* Áh Áo Áy Á# Áu Áo

Estructura esquemática	Nanotransportador	Características principales	Ventajas	Desventajas
	Niosomas Áy ÁU	Áy Á*	Áo Áh Á*	Á@ Áh Áh Áy ÁU
	Micelas	Á# Á# Áu	Áo Áh Á* Áh	ÁU Áu Áy Áo
	Nanopartículas lipídicas Áo ÁO Áu	Á* Áo Áy	ÁO ÁU ÁU ÁU	ÁU Áo Áy

Estructura esquemática	Nanotransportador	Características principales	Ventajas	Desventajas
	<p>Nanopartículas poliméricas</p>	<p>Á[#] Á_o hCB⁺ Áh h-@ hO</p>	<p>Á7 Áo Áh Áh Áo VG# ÁU Áh</p>	<p>Áo ÁO ÁV ÁV 7)</p>

Nota: PEI: polietilenimina; PLA: ácido poliláctico; PLGA: ácido poliláctico-co-glicólico. Adaptado de Cuestas y col. (2021).

Objetivos

Hipótesis del plan de trabajo

A. fumigatus · *C. albicans*

7j

h

Uh

Objetivos generales

Á # 7j

Á) 7j -

Objetivos específicos

- Á u γ
- Á - tk# @k h\o " U"
- Á ° *cyp51A*
A. fumigatus non-wildtype
- Á - *Aspergillus*
- Á @ tk# Uh
o
- Á #
- Á # *in-vitro* tk#
- Á -
- Á - *in vitro*

2. Materiales y métodos

La composición cuali y cuantitativa de los medios de cultivo y soluciones empleados en los ensayos experimentales desarrollados durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral se describen en la sección "Anexo".

2.1 Tipificación de los aislamientos fúngicos provenientes de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ de Argentina mediante técnicas de biología molecular

2.1.1 Cepas, cultivo y mantenimiento

h ... u) ... 7j ... = v ... h ... = 8 v h - ... # ... # U 7 U y ... O ... u ... @k ... tk# ... o ... Scedosporium Scedosporium Selective Agar ... -# ... k ... u 7 o O ...) ... o) ... h) ... # ... # ... O ... h ... # # - U - # O ... h ... h) ... # ... O ... # ... O ... O ... O

O o

2.1.2 Tipificación de los aislamientos mediante técnicas de Biología Molecular

h
camA *benA*

2.1.2.1 Extracción de ADN de hongos filamentosos

- °) V °) V u)
u
h y7# h
h)
‡ V # h
buffer U MB °
o h
U MB #
O #
O
°) V
U = u
#

u
 buffer u- kV kV
 °) V U MB ° # °) V #

2.1.2.2 Extracción de ADN de hongos levaduriformes

o
 y7# = \ u
 buffer U
 MB ° o
 O °) V
 V V)

2.1.2.3 Amplificación de los genes calmodulina (*camA*) y beta-tubulina (*benA*) por PCR

h h#k
 h#k 8 °) = h
 primers ##8° 8u° #° °88° 88##u#° ##8° u° 8° 8°8u#° u° °8°
 u88° camA 7 primers
 °88u° ° #° °° u#°88u°8#u°8#u°uu#° °##°#u#°° 8u°8u°° 8u8° ##°#uu°88#°
 benA 7
 h U
 primer °) V U Vuh U U # y Taq °) V
 buffer u h °) V ° @ =
 O h#k h - 8 h#k o
 #
 # primers #
 primers # O
 #

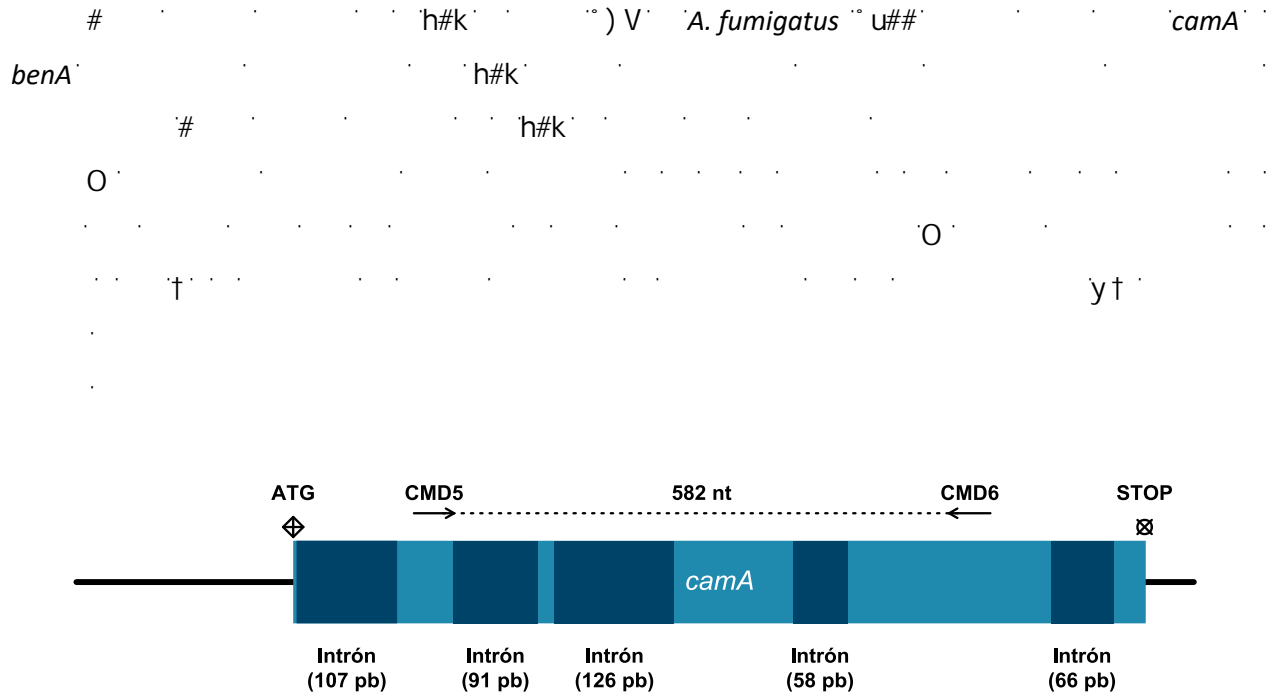


Figura 2.1 -- *camA* A. oryzae)

A. oryzae k@

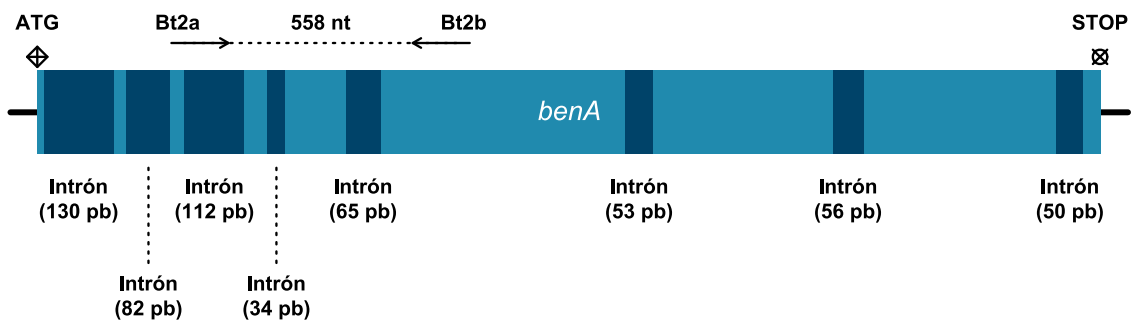


Figura 2.2 -- *benA* A. fumigatus

V O

2.1.2.4 Secuenciación nucleotídica de los productos de PCR y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

o
 camA benA primers
 ") u † ° " U @
 h#k h#k) V° M U @
 O h#k # #
) -U \ # # # -

2.1.2.5 Análisis filogenético de las secuencias obtenidas de los productos de PCR

O GenBank
 " o Muscle y y8-V-
 \ - Aspergillus
 = h Scedosporium
 h Exophiala u
 O
 GenBank u
 - U o
 U u
 8 8 o 7 h UO
 Sub-tree Pruning and Re-grafting ohk Nearest Neighbor Interchange VV@
 bootstraps 8 8 8 h
 7 u k

2.2 Evaluación de la sensibilidad antifúngica de los distintos aislamientos obtenidos de origen clínico pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Scedosporium* y *Exophiala* frente al ITR, POS, VRC y AMB por microdilución en caldo

h #

Aspergillus *Scedosporium* *Exophiala*

#@Clinical and Laboratory Standard Institute U

#@ o @k h\o tk# " U"

U MB

o

y K " #

khU@ = U MB

buffer U \ ho V U MB -

khU@ buffer

U \ ho = o

K " o #

h khU@ y7#

Candida krusei u## khU@

y khU@o # O

khU@

h

U #@) U o\

Ku ""

#

khU@ # khU@

h khU@

khU@

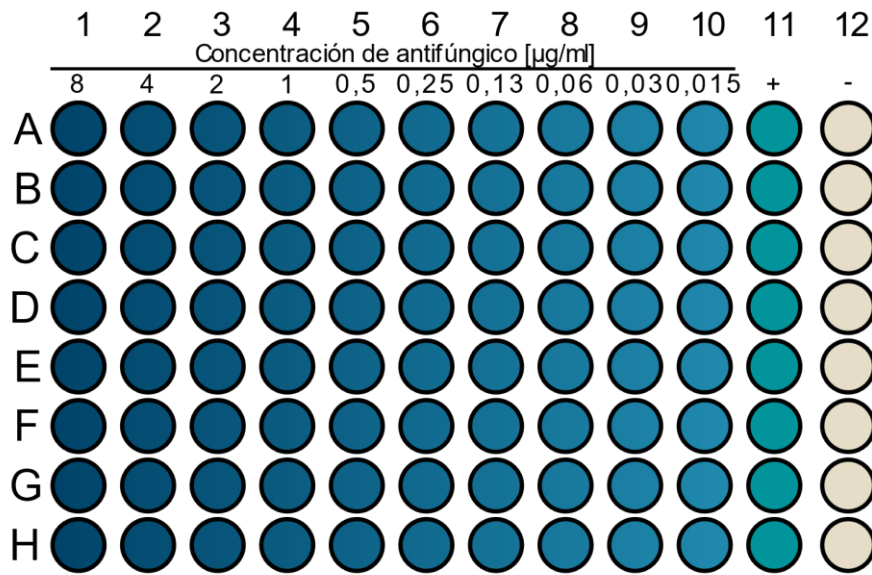


Figura 2.3 –

#

h # @ 'U # @ @

y 7# h

h) #

u U N B ° O

U 7 o

Improved Neubauer Chamber

y7# -
)
 y7# o
 o) ° -
 7 8 =
 'A. fumigatus' ° u## 'A. flavus' ° u##
 O #
 O
 #
 o
 #
 h #
 Epidemiological Cut-Off Values
 -#† -#\ 77 - wildtype WT
 non-wildtype non-WT -
 †k# 'A. fumigatus' #
 - Aspergillus # -#†
 U o # @ # u h 'A. fumigatus' -#†
 h\o @ u h
 Scedosporium Exophiala Aspergillus -#†
 # # -#†
 non-wildtype

Tabla 2.1 – h - #† Aspergillus

Sección	Especie	ECV (µg/ml)			
		AMB	ITR	POS	VRC
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>

2.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *cyp51A* y su promotor en aquellos aislamientos de *A. fumigatus non-wildtype* para antifúngicos triazólicos

h non-wildtype *A. fumigatus* # @ - # †
 *cyp51A*)
 8

2.3.1 Amplificación del gen *cyp51A* y su promotor por PCR

O) V o
 h *cyp51A*
 primers \ k 7 *cyp51A*
A. fumigatus primers
 \ k 7 - \ k 7 primers h ° u 8 ' 8 u 8
 ## 8 ° u 8 # u ° u 8 8 ° h # u 8 u # u # ° # u 8 ' 8 ° u ' 8 u 8 °) 8
 primers ° u # ° u ' 8 u u ' 8 # u # ° 8 # 8 8 ° ° ° ° 8 8 °
 # ° u # u # u 8 # 8 8 # ° ° u ° U 7 - primers
 8 ° u # ° # 8 # 8 8 u ## 8 ' 8 ° u ' 8 u 8 ° u 8 # u 8 ° 8 ## 8 ° ° u
 O = # ' h ° ° o
 h U
 primer) V U V u h U U # y) V
 Pfu DNA polymerase u 7 o buffer
 h # k
 O h # k h - 8 h # k ' o
 #
 # # primers
 # #
 # h # k) V wildtype *A. fumigatus* *A. fumigatus*
 ° u ## *cyp51A* h # k
 # h # k O

2.3.2 Secuenciación nucleotídica de los productos de PCR y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

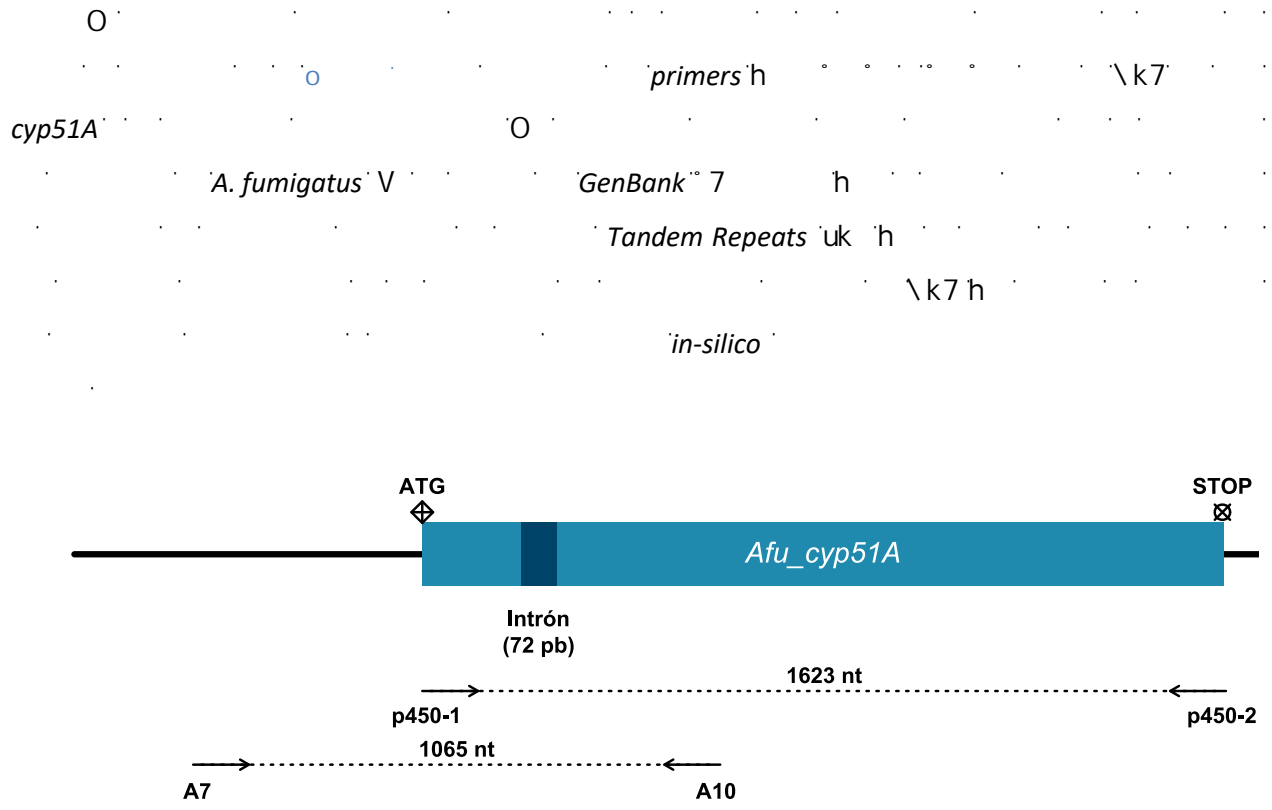
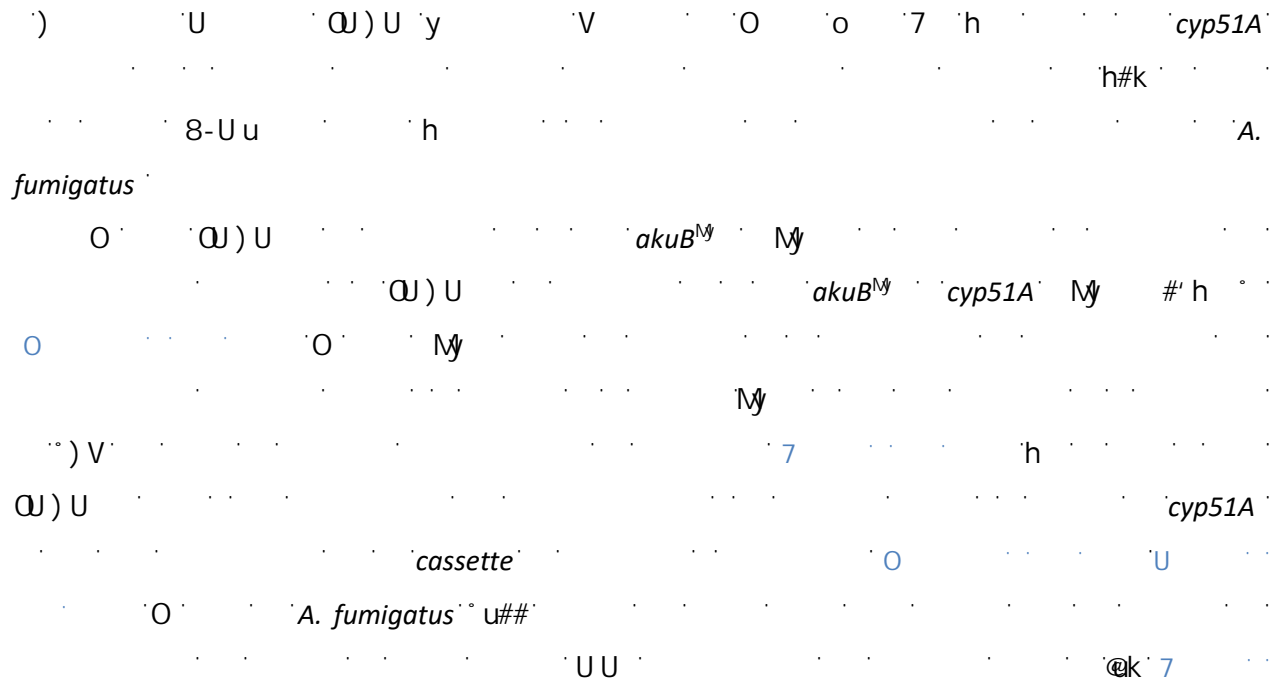


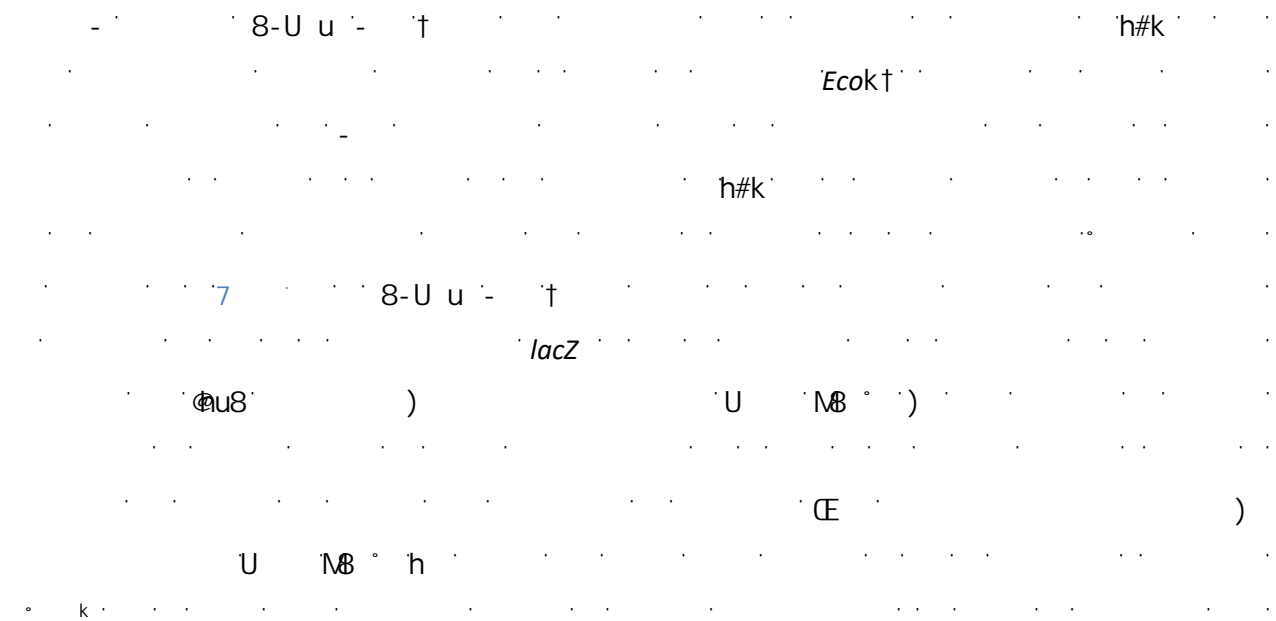
Figura 2.4 – Estructura del gen *cyp51A* de *A. fumigatus*. El gen *cyp51A* de *A. fumigatus* tiene un intrón de 72 pb. Los primers p450-1 y p450-2 se utilizaron para la amplificación por PCR. Los primers A7 y A10 se utilizaron para la secuenciación de Sanger.

2.3.3 Caracterización de nuevas mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* potencialmente asociados a resistencia a los triazoles

#	non-WT <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>cyp51A</i>
1	U	U	U
2	U	U	U
3	U	U	U
4	U	U	U
5	U	U	U
6	U	U	U
7	U	U	U
8	U	U	U
9	U	U	U
10	U	U	U
11	U	U	U
12	U	U	U
13	U	U	U
14	U	U	U
15	U	U	U
16	U	U	U
17	U	U	U
18	U	U	U
19	U	U	U
20	U	U	U
21	U	U	U
22	U	U	U
23	U	U	U
24	U	U	U
25	U	U	U
26	U	U	U
27	U	U	U
28	U	U	U
29	U	U	U
30	U	U	U
31	U	U	U
32	U	U	U
33	U	U	U
34	U	U	U
35	U	U	U
36	U	U	U
37	U	U	U
38	U	U	U
39	U	U	U
40	U	U	U
41	U	U	U
42	U	U	U
43	U	U	U
44	U	U	U
45	U	U	U
46	U	U	U
47	U	U	U
48	U	U	U
49	U	U	U
50	U	U	U



2.3.3.1 Clonado en el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector



E. coli

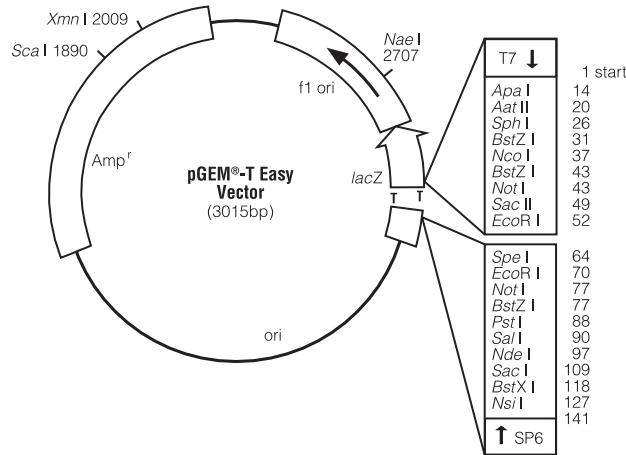


Figura 2.5 – Mapa circular del vector pGEM-T Easy Vector (3015bp).

2.3.3.2 Reacción de ligación inserto-vector

Se preparó una mezcla de ligación que contenía el vector pGEM-T Easy Vector (3015bp) y el inserto de ADN. La reacción de ligación se llevó a cabo en un tubo de microcentrifugación con los siguientes componentes:

- Vector pGEM-T Easy Vector (3015bp)
- Inserto de ADN
- Buffer de ligación
- Enzimas de restricción

2.3.3.3 Transformación de bacterias *E. coli* One-Shot™ Top 10 quimio-competentes (Life Technologies Inc.)

Se realizó la transformación de bacterias *E. coli* One-Shot™ Top 10 quimio-competentes (Life Technologies Inc.) con el vector pGEM-T Easy Vector (3015bp) y el inserto de ADN. El protocolo de transformación se siguió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los componentes de la transformación fueron:

- Bacterias *E. coli* One-Shot™ Top 10 quimio-competentes
- Vector pGEM-T Easy Vector (3015bp)
- Inserto de ADN
- Buffer de transformación

h

σ #

) \ y

O

ou U U \ ho V \ = U M# = o

#

ou U U \ ho V \ = U M# U

= O

#

ou

E. coli u \ h

o O

#

@ o \ #

O

h O

O u @

Ⓞu8 (E8) #

E.

coli u \ h o

2.3.3.4 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico (minipreparaciones de ADN)

h

σ

h

#

7 °) V

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System h

) " " o #
 h " ") V cyp51A
 h#k " ") V primers h
 o " ") V A. fumigatus U U U
 PCR and DNA Fragment Purification Kit)

2.3.3.5 Preparación de conidias de *A. fumigatus* LMDM-31 y LMDM-32 electrocompetentes

u " " A. fumigatus h) #
 = \ " " 8
 y 7# - #
 O
 #
 = \ # " O
 " -) = #
 h
 buffer " - U o 7
 " -
 ") V cyp51A

2.3.3.6 Transformación de *A. fumigatus* LMDM-31 y LMDM-32 por electroporación

h " " A. fumigatus U U U = \
 " ") V cyp51A o
 h
 " k
 † 7
 Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems " k @

7

h UU

h UU

@k O

#

)V

2.3.3.7 Evaluación de la actividad antifúngica de los clones de *A. fumigatus* obtenidos

h *A. fumigatus* cyp51A

U #O@

o U

#O@ h @k h\o tk#

h tk# O h U

= O " o -)

U #O@#O@

y7# h

h

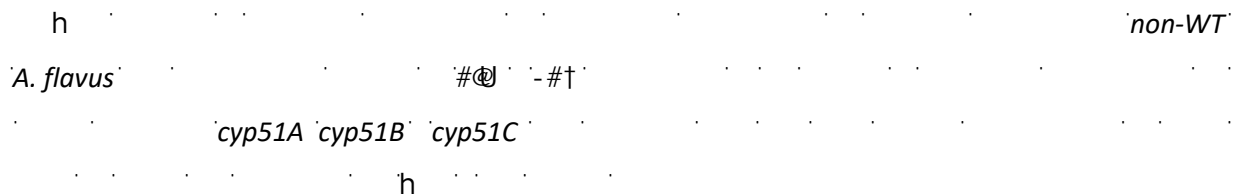
)

O #

2.4 Estudio y caracterización de *Aspergillus* spp. aislados de semillas provenientes de áreas agrícolas del país sometidas a fumigación con distintos antifúngicos azólicos de uso agrícola y su potencial resistencia cruzada a los triazólicos de uso clínico



2.4.1 Análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *cyp51A* y sus parálogos B y C, provenientes de aislamientos de *A. flavus non-WT* para antifúngicos triazólicos



2.4.1.1 Amplificación del gen *cyp51A* y sus parálogos por PCR

O')V' o'
 h' *cyp51A* *cyp51B* *cyp51C*
 *primers* u' 7) *cyp51A*
) *cyp51B*
) *cyp51C*
 h'
 U' *primer*)V' U' Vuh y)V'
Pfu DNA polymerase u' 7 o' *buffer*
 U' U' o\
 O' h#k' h' 8' h#k' o'
 #
 # #
 #
 # h#k')V' *A. flavus* *A. flavus* ° u##
 *cyp51A* *B* *C* h#k' #
 h#k' O'
 O' †
 yt'

2.4.2 Secuenciación nucleotídica de los productos de PCR y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

O'
 o' *primers* u'
 7' O' *A. flavus* RefSeq
 VkkO' h' *in-silico*

Tabla 2.2 – primers *cyp51A* *cyp51B* *cyp51C* *A. flavus* RefSeq VkkO

Gen	N° Acceso	Nombre	secuencia (5' -> 3')	Posición en la región		Tamaño del amplicón (pb)
				Inicio	Fin	
<i>cyp51A</i>	NC_054692 REGION: 2623672..2626904	# h ° 7 °	# ° 8 ° ° # ° 8##u8# ° # ° 8 ° 8 °	.	.	.
		# h ° k °	888u88 ° u# ° 8u#uu ° uu °	.	.	.
		# h ° 7 °	8# ° ° u# ° u#8u##u ° ° ° u# °	.	.	.
		# h ° k °	#u8u## ° uu#uu8u ° 88u °	.	.	.
		# h ° 7 °	8# ° u8 ° 888 ° 8 ° u#u ° u ° u8 °	.	.	.
		# h ° k °	##u ° u ° ° uu8#u88uu#8 °	.	.	.
		# h ° 7 °	u8 ° ° 8#u ° uu# ° ° u8u ° 8 ° # °	.	.	.
		# h ° k °	° #u8#u8 ° u88u8u8#u ° ° 8 °	.	.	.
<i>cyp51B</i>	NC_054693 REGION: 2772808..2775853	# h " 7 °	° ° # ° #8 ° #u ° 88 ° 8#u ° # ° # °	.	.	.
		# h " k °	# ° ## ° ° u## ° #u#u ° u# °	.	.	.
		# h " 7 °	8 ° u# ° 888 ° ° ° u8uu#uu# °	.	.	.
		# h " k °	° #8 ° u#8#u8 ° 8 ° uu ° # °	.	.	.
		# h " 7 °	8uu# ° 8# ° ° ° u8u#8 ° 8 °	.	.	.
		# h " k °	##uuu#8u#u ° ##u8uu °	.	.	.
		# h " 7 °	° 8u88 ° 8 ° 8# ° u## ° u ° 8u8 °	.	.	.
		# h " k °	##8 ° u ° u#uu8 ° ° #888uu8u °	.	.	.
<i>cyp51C</i>	NC_054696 REGION: 922829..926116	# h #7 °	#u8uu8# ° 8 ° 8##8uu8 ° u8 °	.	.	.
		# h #k °	# ° ° ° 8 ° 8#8 ° # ° # ° u ° ° 8 °	.	.	.
		# h #7 °	88u ° ° u8u#u88u# ° u ° 88 °	.	.	.
		# h #k °	° u8 ° 8#uu88 ° ° uu888 °	.	.	.
		# h #7 °	#8 ° ° uu# ° u##u# ° ° u88 °	.	.	.
		# h #k °	8u#u#u#88 ° u# ° # ° uu °	.	.	.
		# h #7 °	88 ° ° #u#u ° ## ° ° 8 ° 8# °	.	.	.
		# h #k °	##u ° 8 ° u ° # ° 8#u ° 8 ° u ° ### °	.	.	.

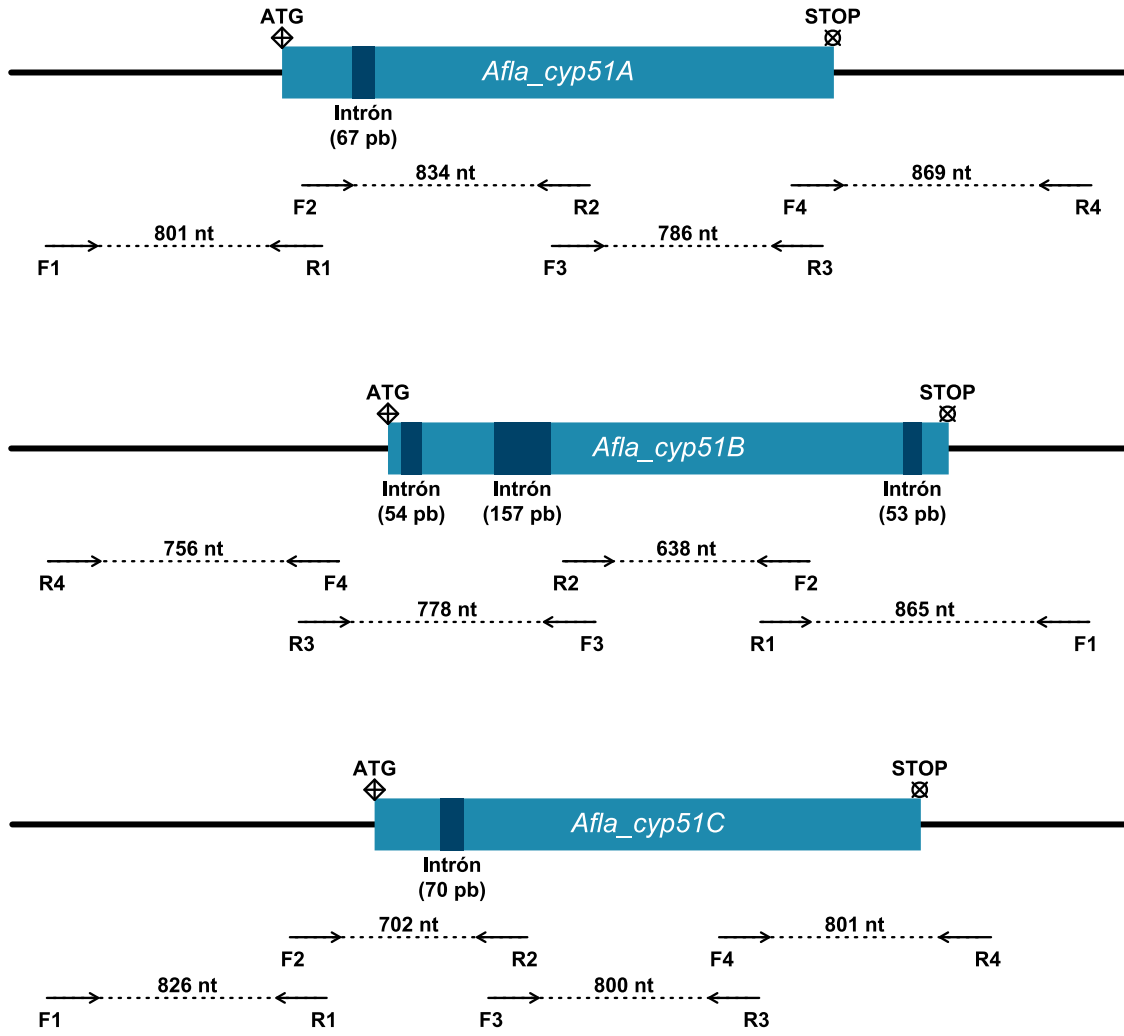


Figura 2.6 – Schematic representation of the *cyp51* genes in *A. flavus*. The ATG start codon and the STOP codon are indicated. The intron sizes are given in base pairs (pb). The primer pairs (F1, R1; F2, R2; F3, R3; F4, R4) and the amplicon sizes (nt) are shown. The primers were designed in-silico using the *A. flavus* genome sequence (GenBank accession # F05370.1). The primers are labeled as Forward (F) and Reverse (R). The upstream and downstream regions are indicated.

2.5 Encapsulación de VRC en MPs

2.5.1 Obtención de micelas con y sin VRC

h ... Uh ... o ... ° o7 ...

h ... h ... o ... = \

U MB ... # o ... tk#

O

... O

U

tk# o 7 ... = \

tk# h

Uh tk#

O Uh ... # h

Uh #

O

2.5.2 Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones obtenidas

2.5.2.1 Determinación del tamaño e índice de polidispersión de las MPs

- ...) ... h) @

) ...)

) ... O *Dynamic Light Scattering*) @ h ... V - V

-oh --V U @

h

U ... # O

2.5.2.2 Morfología de las micelas sin y con VRC

o' Uh' tk#
 Transmission Electron Microscopy u-U h #U u-U 7-@
 # h Uh
 o
 Uh

2.5.2.3 Estabilidad *in vitro* de los sistemas en fluido pulmonar y nasal simulado

o' Uh o@7
 Vo7 # O tk#
 = \ o@7 Vo7 O
) h)@)@ # h
 o@7
 Vo7

 - o@7 =
 U # V # M# V =h\ V =#\ V o\
 # # # = V \ - Vo7
 @ U M# V # M#
 # # = h

2.5.2.4 Liberación del VRC en fluido pulmonar simulado

o' Uh Uh
 o@7 u h Uh
 = \ tk#
 h tk#
) o h
 O
 O
 #

2.5.2.5 Cuantificación de VRC por HPLC-UV

O' tk# U h # O
) kh =hG# O - Q" #
 buffer # yt - =hG# o
 G# G# °u
 oh) U o@ " o@ °=u
 #u\ °oth #) U °h
 software O o
 O 8
 o
 =hG# U MB °)
 # h
 O tk# tk#
 =hG# U MB ° - buffer U
 = tk#
 O tk#)
 tk#

2.5.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del sistema contra distintas especies fúngicas de colección y las provenientes de los aislamientos clínicos

h #@ U h tk# #O@
 Clinical and Laboratory Standard Institute U #O@

o h Uh khU @ Æ
 tk# O
 O Uh
 = \
 O Uh
 tk#) U o \ O
 'Aspergillus' 'Scedosporium' 'Exophiala'
 7j u) u
 'A. fumigatus' u##

2.5.4 Estudio de la citotoxicidad *in-vitro* de las formulaciones obtenidas frente a una línea celular animal

h Uh † u## #
) U - U 'Dulbecco's modified Eagle's medium' 'High Glucose' 8
 o7' " @ o - k ° #
 # \) h" o Æ
 u Q - 8
 h †
) U - U o7' #
 O Uh tk# °
 # O
 U M8 °
 V) V ° 8 #
 V ° 8 V
) Vh 8 V ° Vh ° 8 V ° - Vh °
 O
 7 o U

) O Uh

$$Viabilidad (\%) = \frac{células tratadas (\%)}{células control (\%)} \times 100$$

#

Uh #

3. Resultados

3.1 Tipificación de los aislamientos fúngicos provenientes de las secreciones respiratorias de pacientes con FQ de Argentina mediante técnicas de biología molecular

Identificación de especies fúngicas	Identificación de especies bacterianas
<i>Aspergillus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Exophiala</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Scedosporium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Scedosporium</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Exophiala</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>B. cepacia</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Alternaria</i>	<i>u</i>
<i>Curvalaria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Exophiala</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Rasamsonia</i>	<i>Aspergillus</i>

O *Aspergillus*

Fumigati

@

O

Flavi

O

O

Nigri

O

O

Terrei

O

@

)

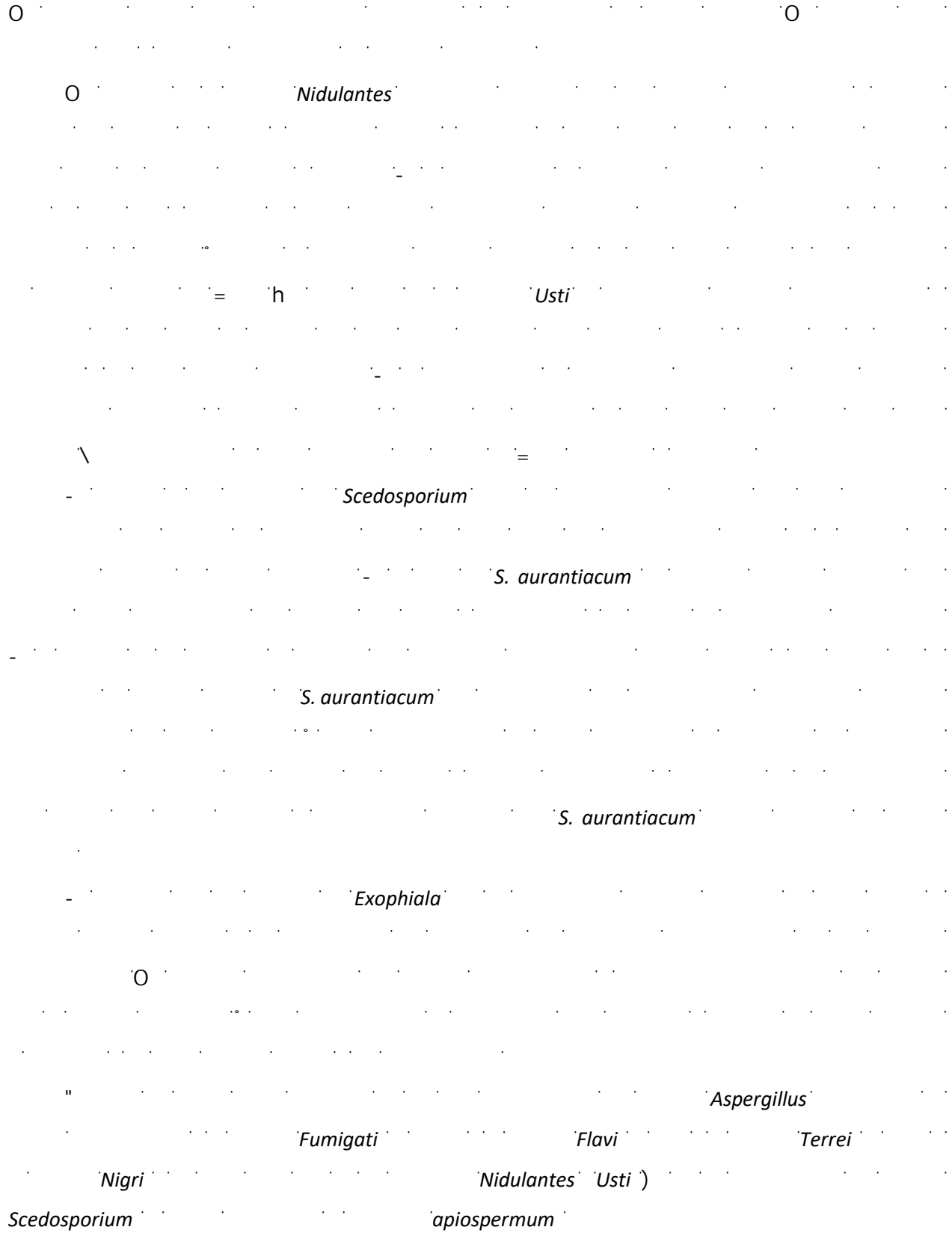


Tabla 3.1 –

Especies	Cantidad de pacientes	Edad media	Sexo	Infección/colonización concomitante								Estado clínico	
				SA	CA	PA	SM	MC	KP	BC			
<i>Alternaria nobilis</i>			U	☒	☒		☒						-
<i>Aspergillus alabamensis</i>			U	☒	☒								"h"
<i>Aspergillus calidoustus</i>			7	☒									-
<i>Aspergillus flavus</i>			7 U	☒	☒	☒	☒						"h"
<i>Aspergillus fumigatus</i>			7 U	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒		"h"
<i>Aspergillus lentulus</i>			U	☒	☒		☒						-
<i>Aspergillus nidulans</i>			7	☒		☒							-
<i>Aspergillus niger</i>			7 U	☒	☒	☒	☒						-
<i>Aspergillus parasiticus</i>			7	☒	☒	☒							"h"
<i>Aspergillus pseudonomius</i>			7	☒	☒			☒	☒				-
<i>Aspergillus pseudoterreus</i>			U	☒	☒								-
<i>Aspergillus terreus</i>			7 U	☒	☒	☒	☒						"h"
<i>Curvularia coateciae</i>			U		☒								-
<i>Exophiala dermatitidis</i>			7 U	☒	☒	☒	☒	☒	☒				-
<i>Fusarium oxysporium</i>			7	☒	☒	☒							-
<i>Paecilomyces variotti</i>			U	☒	☒								-
<i>Rasamsonia aegroticola</i>			7	☒	☒	☒							-
<i>Rhodotorula rubra</i>			7	☒	☒			☒	☒				-
<i>Scedosporium apiospermum</i>			7	☒									-
<i>Scedosporium aurantiacum</i>			7	☒	☒	☒							-
<i>Scedosporium boydii</i>			7 U	☒	☒	☒	☒			☒			-
<i>Trichosporon asahii</i>			U	☒	☒								-
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>			7	☒	☒	☒							"h"

Nota: ABPA, aspergilosis broncopulmonar alérgica; F, femenino; M, masculino; SA, *Staphylococcus aureus*; CA, *Candida albicans*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; SM, *Stenotrophomonas maltophilia*; MC, *Moraxella catarrhalis*; KP, *Klebsiella pneumoniae*; BC, *Burkholderia cepacia*.

h

h h#k benA camA

h

o)

A. fumigatus A. flavus A. terreus E. dermatitidis S. apiospermum

Aspergillus welwitschiae Scedosporium boydii Aspergillus lentulus Aspergillus alabamensis Scedosporium aurantiacum A. niger Rhodotorula rubra Trichosporon asahii Trichosporon mycotoxinivorans Alternaria nobilis Aspergillus parasiticus Aspergillus pseudonomius Aspergillus nidulans Aspergillus luchuensis Aspergillus pseudoterreus Aspergillus calidoustus Curvularia coatesiae Fusarium oxysporum Paecilomyces variotii Rasamsonia aegroticola Scedosporium angustum

- 7

7j 7

7j

)

A. fumigatus A. flavus A. fumigatus A. terreus A. fumigatus A. niger A. fumigatus "h" A. flavus A. alabamensis T. mycotoxinivorans

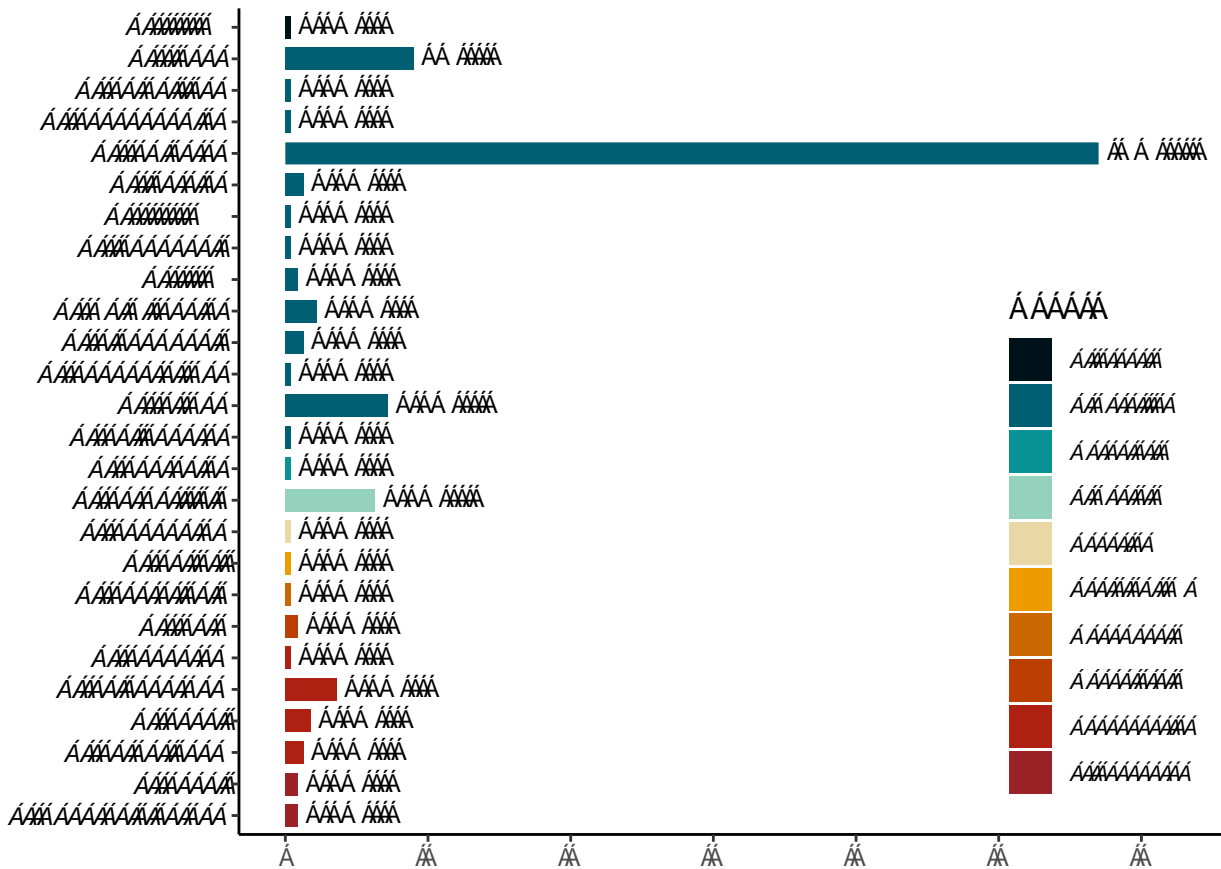


Figura 3.1 – h

7

3.1.1 Árboles filogenéticos

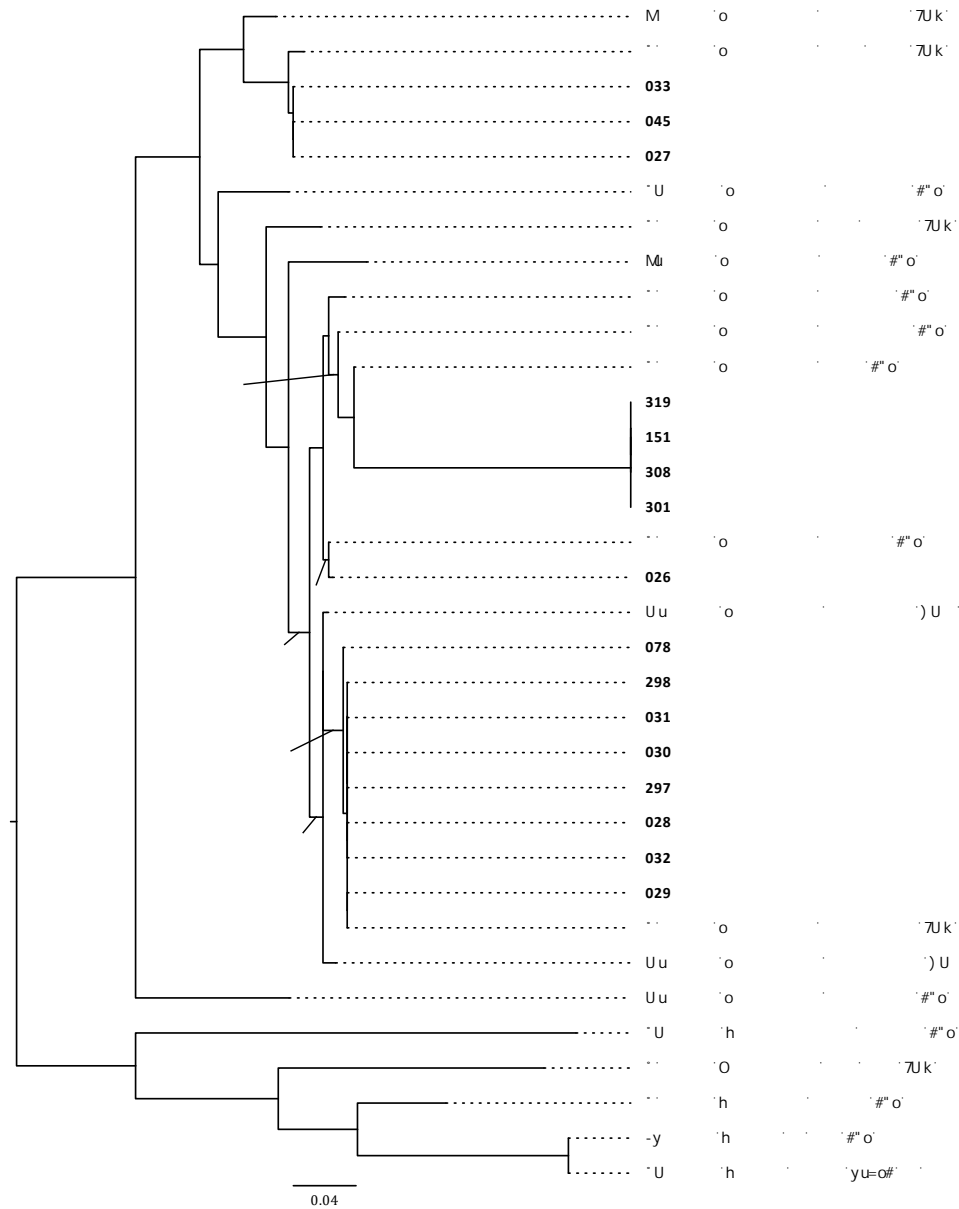
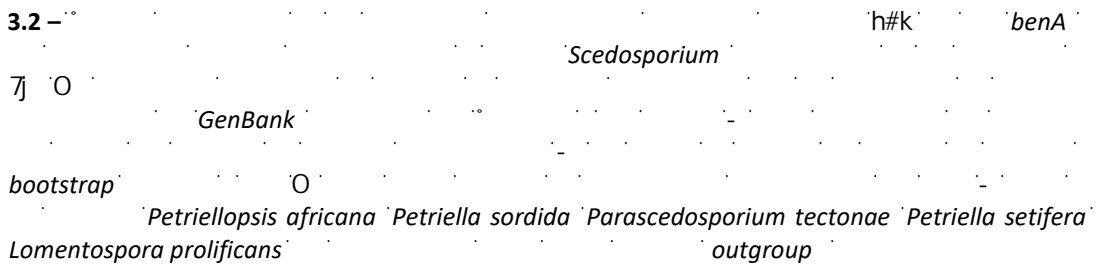


Figura 3.2 –



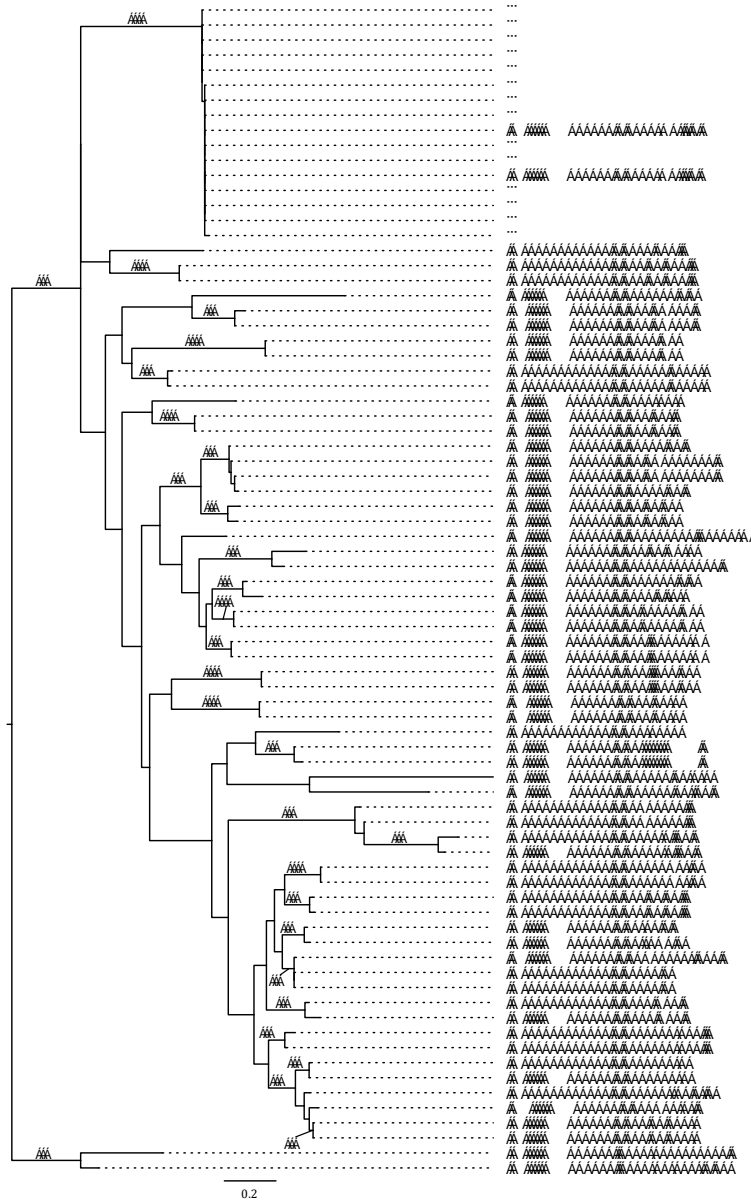
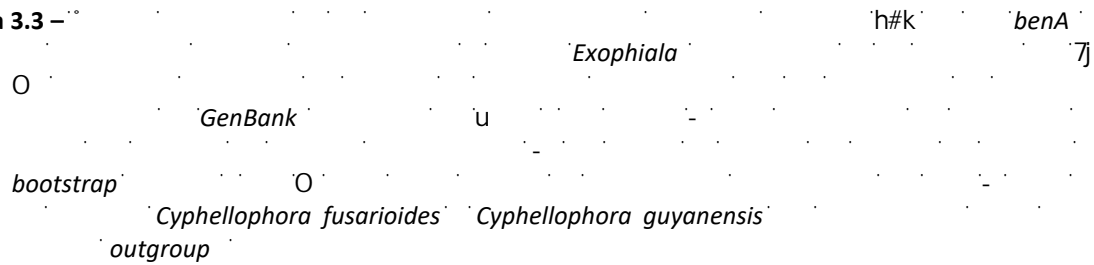


Figura 3.3 –



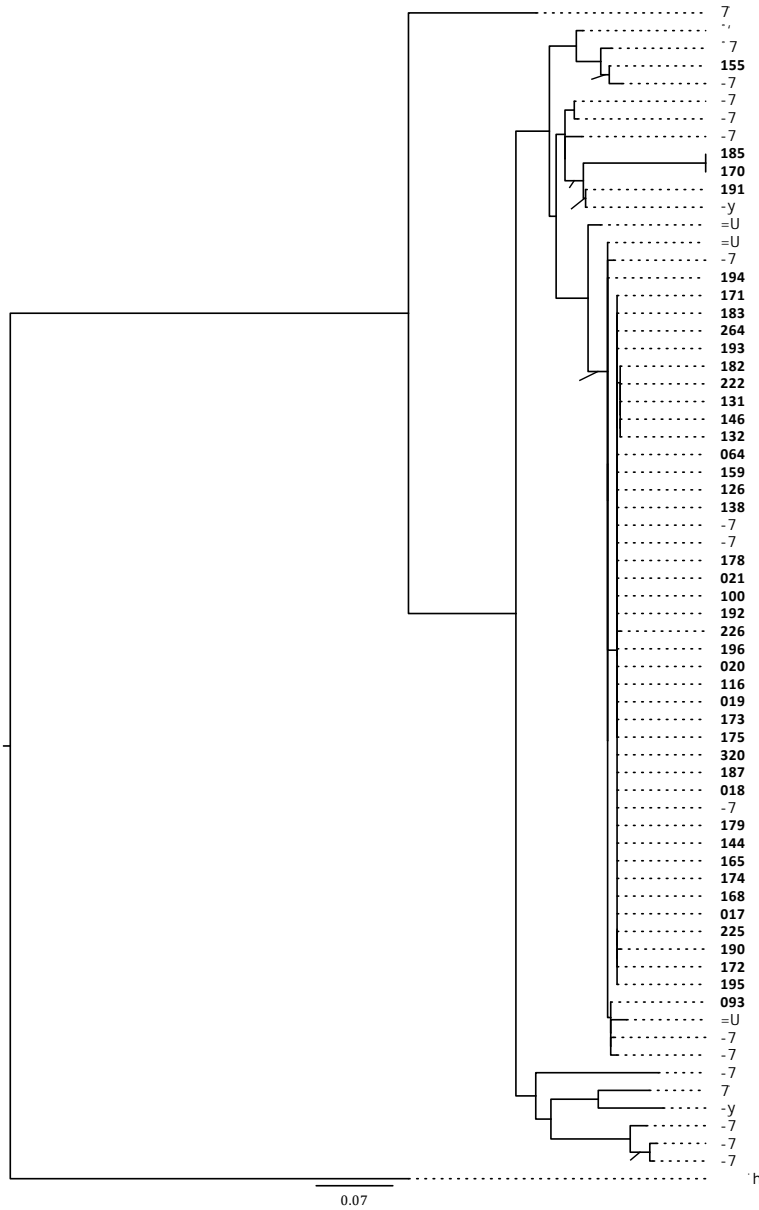
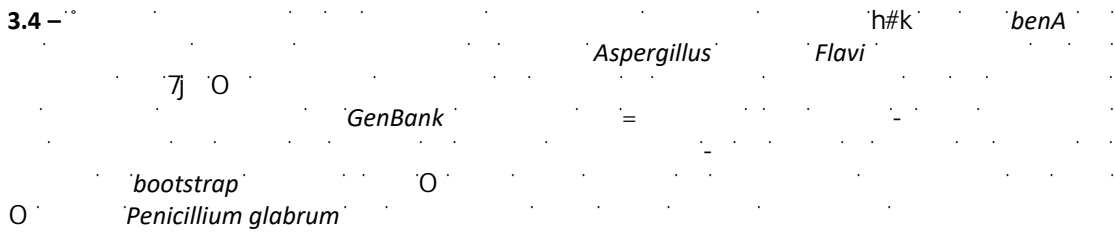


Figura 3.4 –



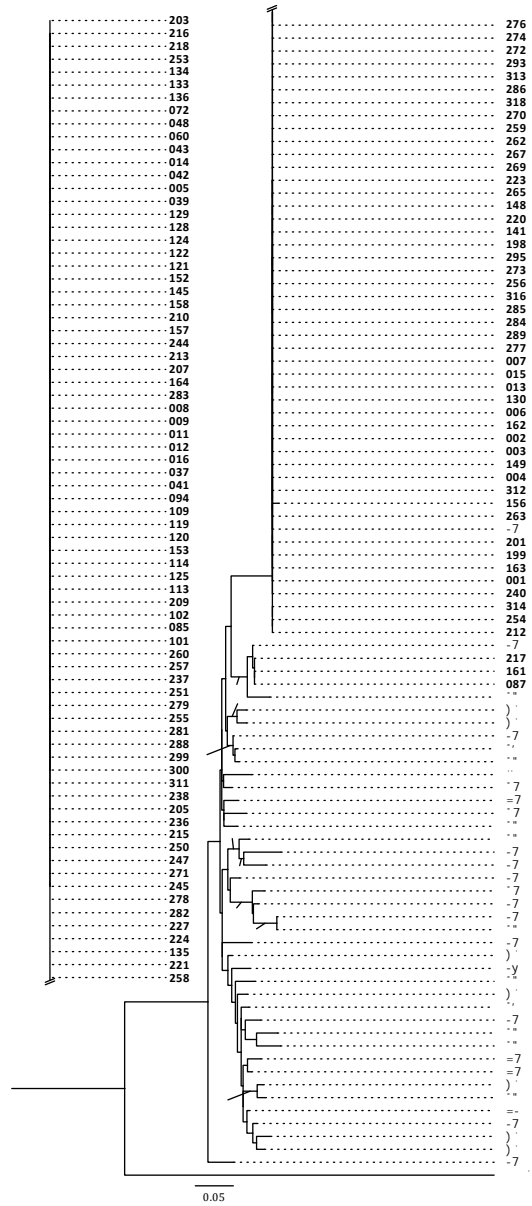
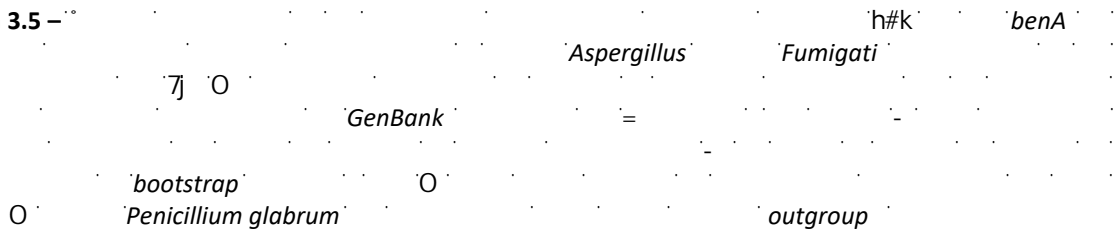


Figura 3.5 –



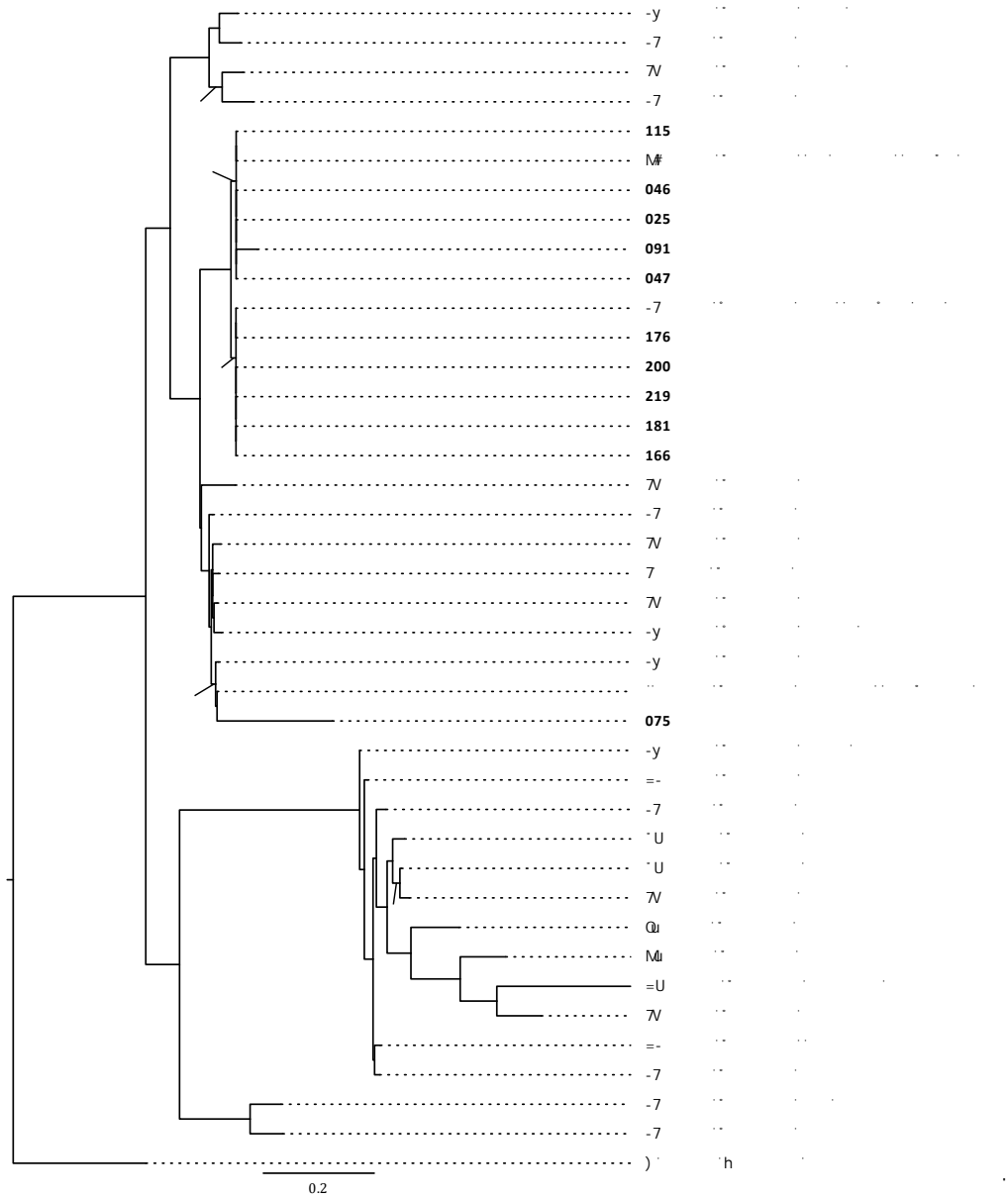
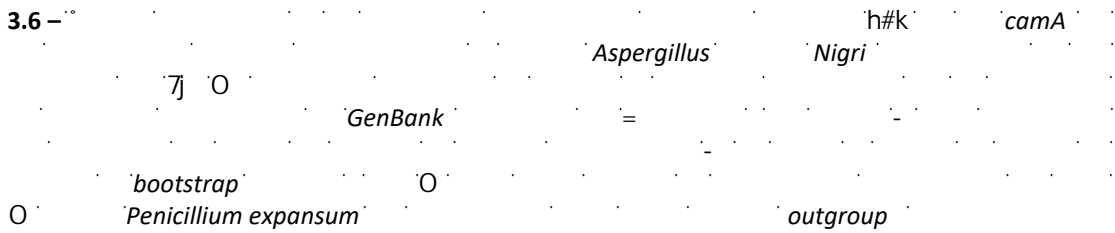


Figura 3.6 –



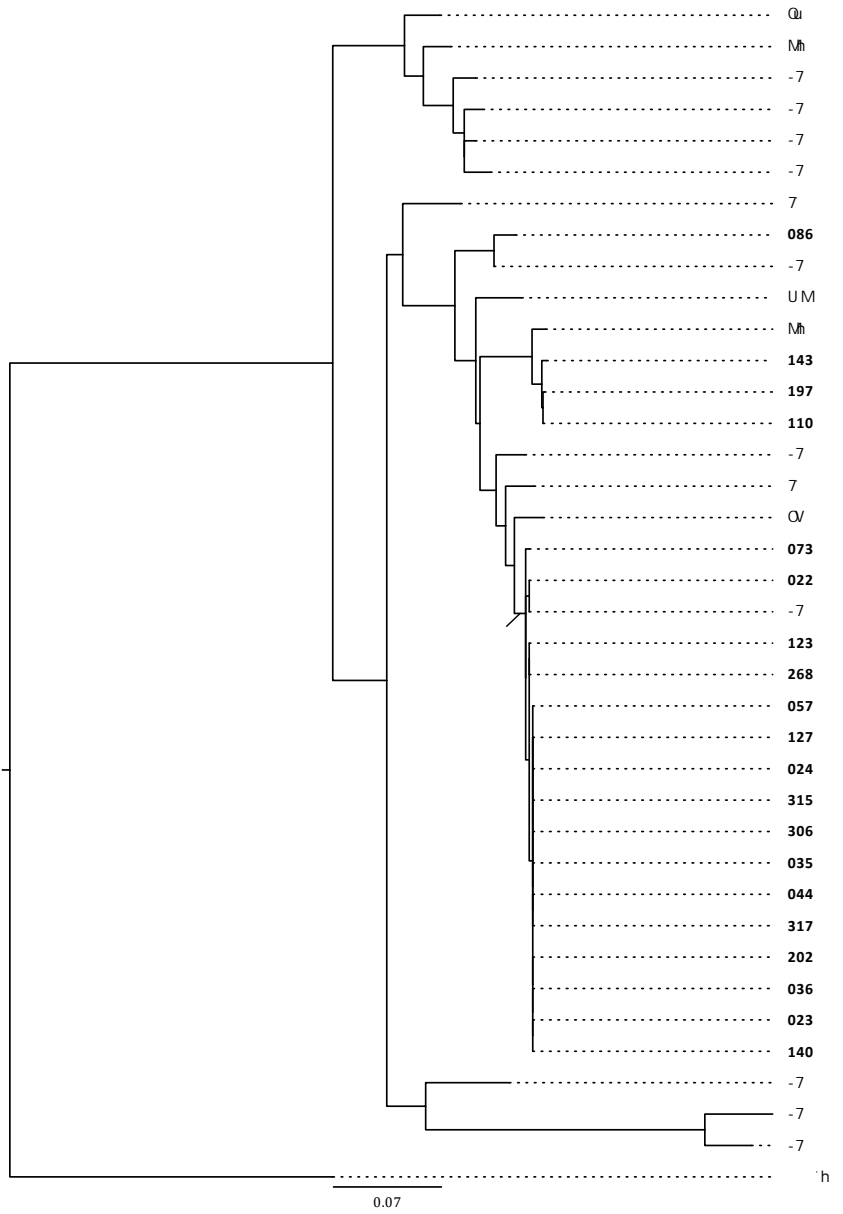
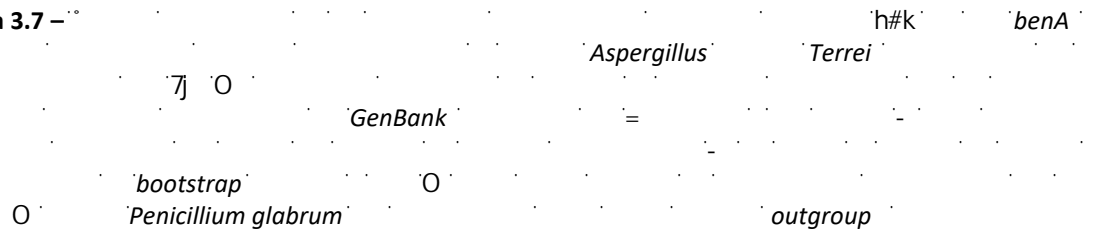


Figura 3.7 –



3.2 Evaluación de la sensibilidad antifúngica de los distintos aislamientos obtenidos de origen clínico pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Scedosporium* y *Exophiala* frente al ITR, POS, VRC y AMB por microdilución en caldo

Genus	Species	ITR	POS	VRC	AMB
<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. terreus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. lentulus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. parasiticus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. pseudoterreus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. calidoustus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. flavus</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. nidulans</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. niger</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>A. nidulans</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>Scedosporium</i>	<i>S. apiospermum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. boydii</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. aurantiacum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. angustum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. apiospermum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. boydii</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. aurantiacum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. angustum</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>S. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>Exophiala</i>	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	<i>E. dermatitidis</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

calidoustus u
 tk# E. dermatitidis A. calidoustus A. lentulus u
 O # @ # @
 # @
) Aspergillus A.
 calidoustus # @ # @ @k
 h\o tk#
 ° U" #
 A. calidoustus
 ° U" u h E. dermatitidis
 # @ # @ ° U"
 # @ # @ Scedosporium
 # @ # @ tk#
 h\o
 ° U" @k u
)
 Scedosporium E. dermatitidis
 # @ #
 S. aurantiacum S. angustum S. apiospermum
 # @ ° U" @k
 h\o @k h
 Scedosporium # @ @k
 # @ ° U" E.
 dermatitidis # @
 tk#
 tk# @k h\o
 - Aspergillus # @
 7j # A.
 pseudoterreus A. parasiticus # @ ° U" A. calidoustus
 A. lentulus # @ tk# h\o @k
 ° U" tk# @k A. flavus

A. fumigatus # @ U " @k tk# *A. fumigatus*
 U o # @ tk#
 u h -#†
Aspergillus u
non-WT U " - *A. flavus*
A. terreus *A. fumigatus* *A. fumigatus*
non-WT) *non-WT*
 tk# @k h\o tk# h\o @k
 - # @
 - *A. flavus* *A.*
fumigatus *A. terreus* *E. dermatitidis* *S. apiospermum* *S. aurantiacum*
 # @
 h
E. dermatitidis
 # @ @k
 # @ h\o tk#
 7 -
 # @ *S. apiospermum*
 h\o tk# 7 -
A. terreus # @ @k h\o
 # @ tk#
 -#† 7
A. fumigatus
 # @ -#† tk# h 7
A. flavus
 # @ @k h\o 7 -
S. aurantiacum # @ h\o
 tk# 7

Tabla 3.2 –) # @
 7j " U "

Especie	N	Número de aislamientos fúngicos con un valor de CIM (µg/ml) de:									
		≤0,015	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	≥8,00
<i>A. flavus</i>									—		==
<i>A. parasiticus</i>											==
<i>A. pseudonomius</i>								==			
<i>A. fumigatus</i>							—		==		
<i>A. lentulus</i>							—				==
<i>A. nidulans</i>							==				
<i>A. luchuensis</i>										==	
<i>A. niger</i>										==	
<i>A. welwitschiae</i>								—	==		
<i>A. alabamensis</i>										==	
<i>A. pseudoterreus</i>									—		==
<i>A. terreus</i>								—		==	
<i>A. calidoustus</i>										==	
<i>E. dermatitidis</i>						—				==	
<i>S. angustum</i>											==
<i>S. apiospermum</i>											==
<i>S. boydii</i>										==	
<i>S. aurantiacum</i>											==

Nota: Los valores subrayados y doble subrayados indican los percentilos CIM₅₀ y CIM₉₀, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM₉₀). Los recuadros grises indican los aislamientos incluidos en la categoría non-WT (CLSI, 2022a).

Tabla 3.3 –)

Especie	N	Número de aislamientos fúngicos con un valor de CIM (µg/ml) de:									
		≤0,015	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	≥8,00
<i>A. flavus</i>						–	=				
<i>A. parasiticus</i>						=					
<i>A. pseudonominus</i>							=				
<i>A. fumigatus</i>							—	==			
<i>A. lentulus</i>								–			=
<i>A. nidulans</i>								=			
<i>A. luchuensis</i>								=			
<i>A. niger</i>								=			
<i>A. welwitschiae</i>								–	=		
<i>A. alabamensis</i>								–	=		
<i>A. pseudoterreus</i>			=								
<i>A. terreus</i>						–	=				
<i>A. calidoustus</i>											=
<i>E. dermatitidis</i>								–			=
<i>S. angustum</i>											=
<i>S. apiospermum</i>											=
<i>S. boydii</i>											=
<i>S. aurantiacum</i>											=

Nota: Los valores subrayados y doble subrayados indican los percentilos CIM₅₀ y CIM₉₀, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM₉₀). Los recuadros grises indican los aislamientos incluidos en la categoría non-WT (CLSI, 2022a).

Tabla 3.4 –) # @
 7j h\o

Especie	N	Número de aislamientos fúngicos con un valor de CIM (µg/ml) de:									
		≤0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	≥8,00
<i>A. flavus</i>						—	=				
<i>A. parasiticus</i>							=				
<i>A. pseudonominus</i>					=						
<i>A. fumigatus</i>					—	==					
<i>A. lentulus</i>							—	=			
<i>A. nidulans</i>							=				
<i>A. luchuensis</i>											
<i>A. niger</i>					=						
<i>A. welwitschiae</i>						—	=				
<i>A. alabamensis</i>					—	=					
<i>A. pseudoterreus</i>					=						
<i>A. terreus</i>				—		=					
<i>A. calidoustus</i>											=
<i>E. dermatitidis</i>							—				=
<i>S. angustum</i>										=	
<i>S. apiospermum</i>									—		=
<i>S. boydii</i>							—	=			
<i>S. aurantiacum</i>									—	=	

Nota: Los valores subrayados y doble subrayados indican los percentilos CIM₅₀ y CIM₉₀, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM₉₀). Los recuadros grises indican los aislamientos incluidos en la categoría non-WT (CLSI, 2022a). Para *A. fumigatus*, no está definido el ECV para POS en dicha guía, por lo cual se utilizó el valor de corte publicado por Espinel-Ingroff y col. (2018).

Tabla 3.5 –) # @
 7j tk#

Especie	N	Número de aislamientos fúngicos con un valor de CIM (µg/ml) de:									
		≤0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	≥8,00
<i>A. flavus</i>							—		=		
<i>A. parasiticus</i>							=				
<i>A. pseudonominus</i>								=			
<i>A. fumigatus</i>							—	23	=		
<i>A. lentulus</i>											=
<i>A. nidulans</i>							=				
<i>A. luchuensis</i>							=				
<i>A. niger</i>											
<i>A. welwitschiae</i>							=				
<i>A. alabamensis</i>							—	=			
<i>A. pseudoterreus</i>									=		
<i>A. terreus</i>									=		
<i>A. calidoustus</i>											=
<i>E. dermatitidis</i>									—		=
<i>S. angustum</i>									=		
<i>S. apiospermum</i>									—	=	
<i>S. boydii</i>							=				
<i>S. aurantiacum</i>									—	=	

Nota: Los valores subrayados y doble subrayados indican los percentilos CIM₅₀ y CIM₉₀, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM₉₀). Los recuadros grises indican los aislamientos incluidos en la categoría non-WT (CLSI, 2022a). El valor en negrita en *A. fumigatus* sensu stricto indica los aislamientos incluidos en la categoría de sensibilidad **Intermedia**. Las cepas de *A. fumigatus* con valores de CIM ≥ 2 µg/ml se incluyen en la categoría **Resistente** (CLSI, 2022b).

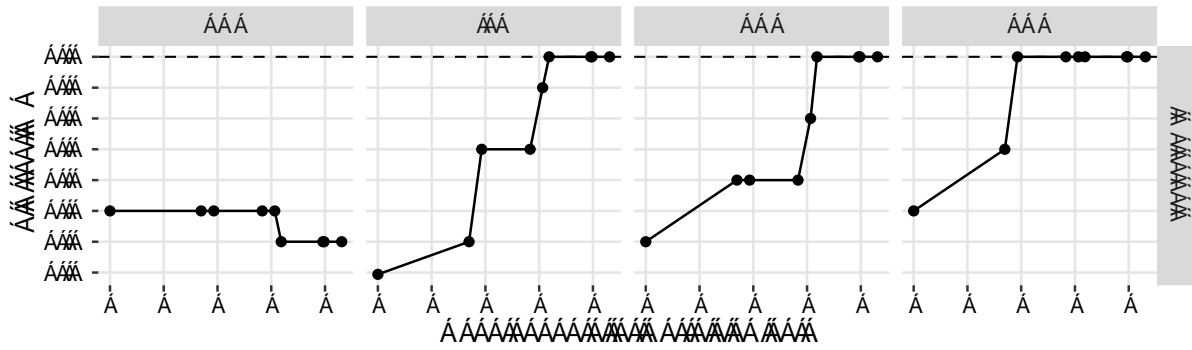


Figura 3.8 – † #Ⓞ *E. dermatidis* #Ⓞ ○

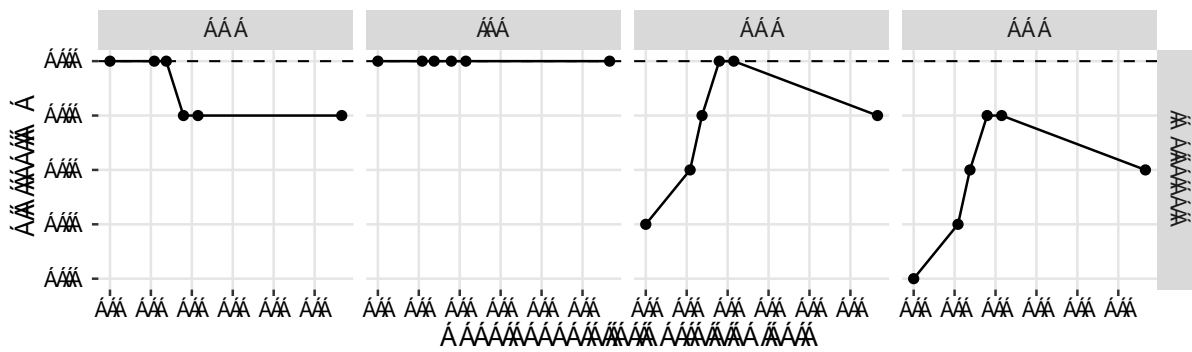


Figura 3.9 – † #Ⓞ *S. apiospermum* #Ⓞ ○

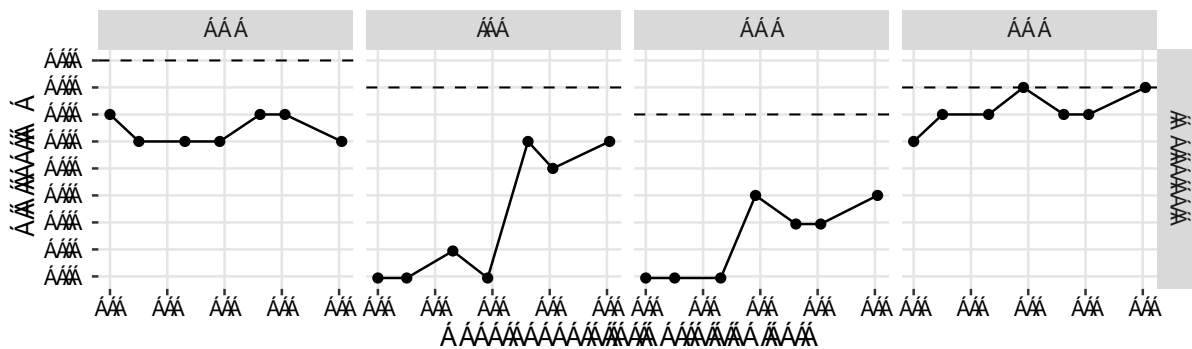


Figura 3.10 – † #Ⓞ *A. terreus* #Ⓞ -#† ○

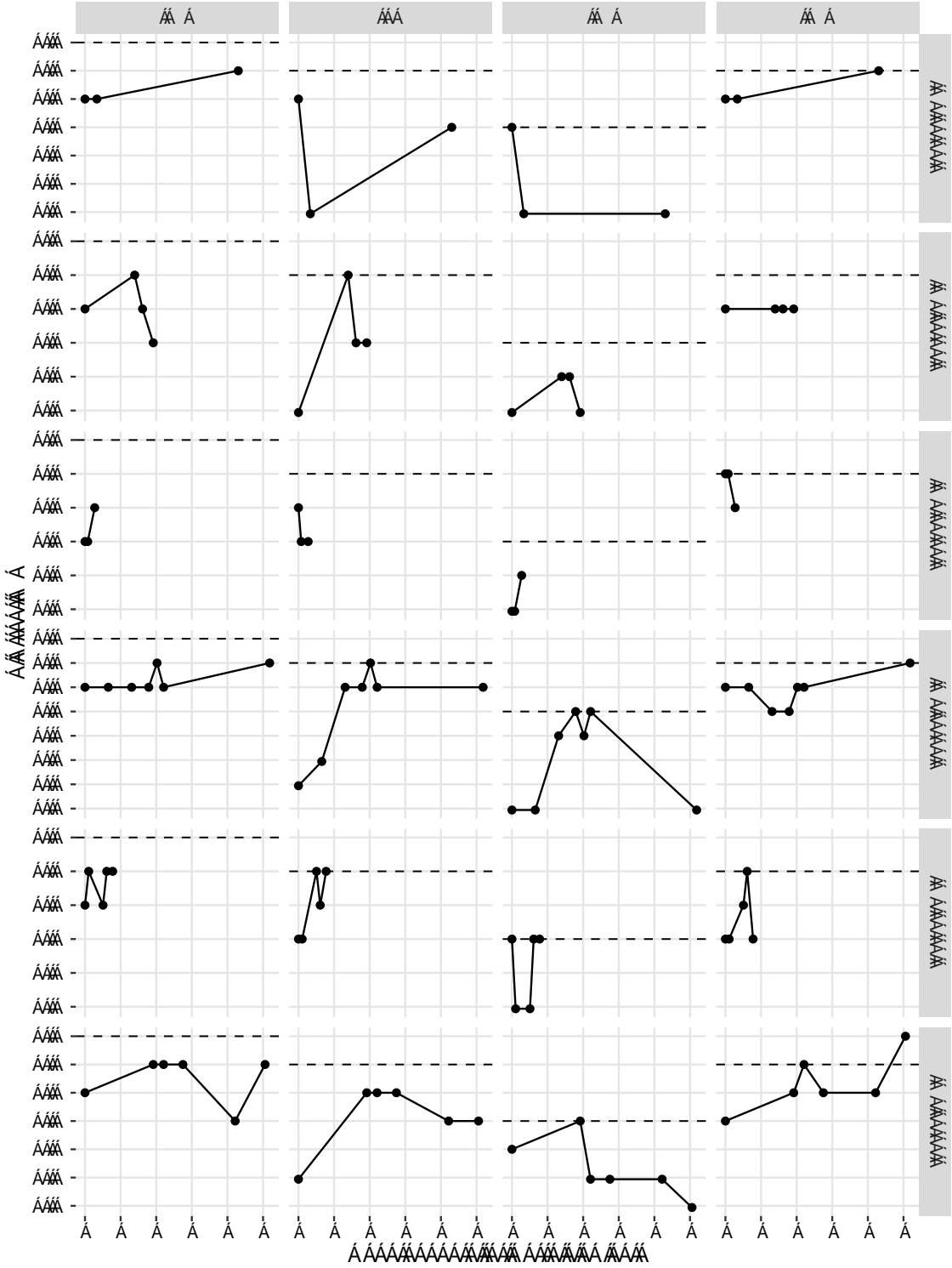


Figura 3.11 – # @ # @ - # † h

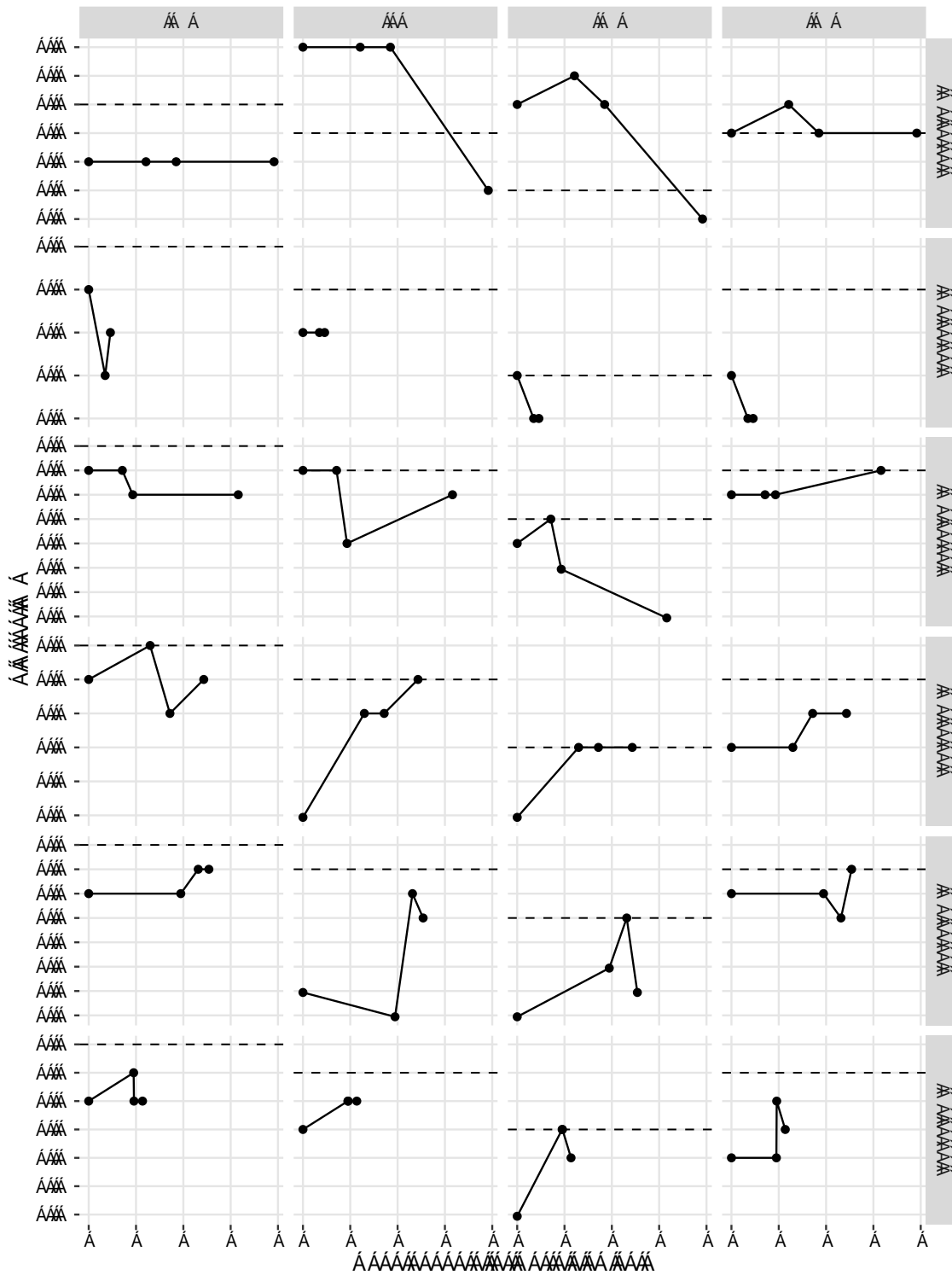


Figura 3.12 – \dagger # $\text{\textcircled{C}}$ # $\text{\textcircled{C}}$ -# \dagger h

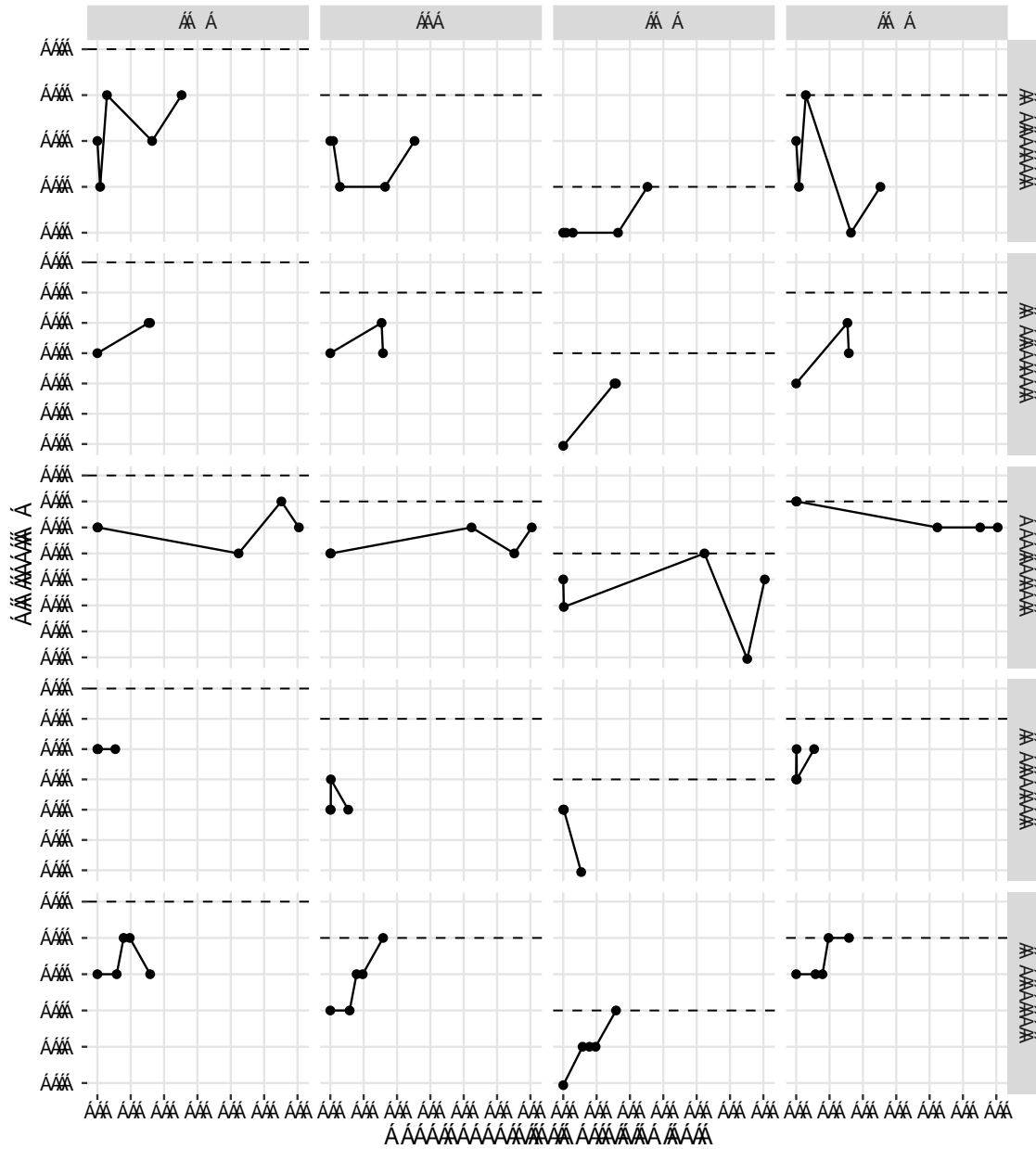


Figura 3.13 – † #Ⓢ

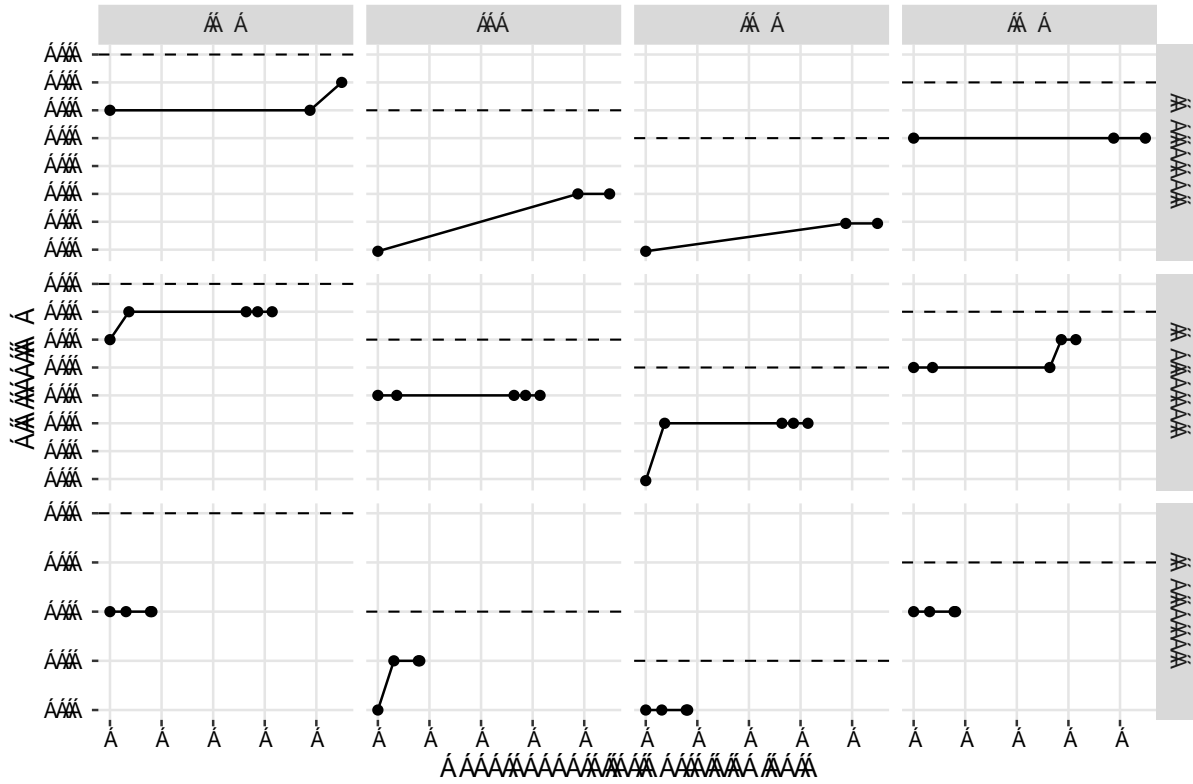


Figura 3.14 – † #Ⓞ -#† ○

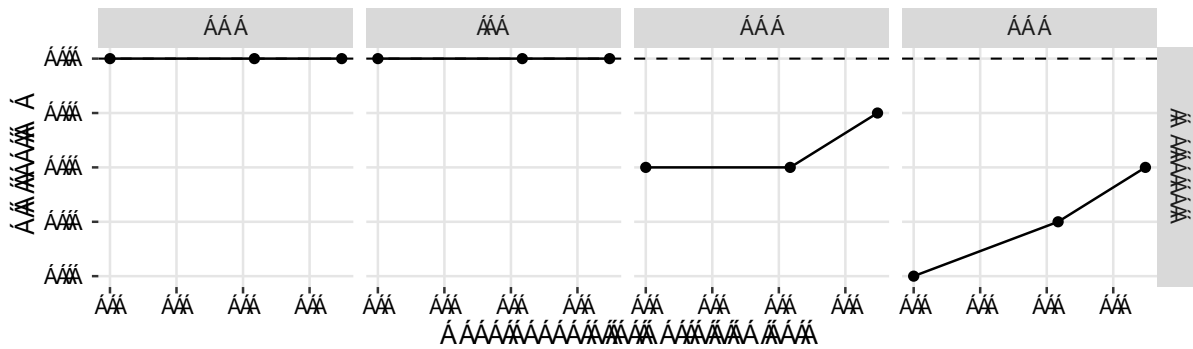


Figura 3.15 – † #Ⓞ -#† ○

3.3 Análisis del perfil de resistencia a triazoles de aislamientos de *A. fumigatus* mediante el análisis nucleotídico del gen *cyp51A* y su promotor

```

- . . . . . cyp51A
      non-wildtype A. fumigatus A.
fumigatus 7 GenBank " o
- . . . . . Tandem Repeat uk
      7 O =
# h o h # h
      o u -
      # h
      U A. fumigatus
- . . . . . uk O = o u
      # )
      uk O =
k M7 - uk k MO = o u
      # @ @k tk# h\o
      uk O =
# @ @k tk# h\o u
      ) " #
      u U o U Ou
      " _ "
      @k #
      tk#
      O U Ou
- . . . . .
housekeeping

```

#

sequence type ou h O

O

O A. fumigatus

U Ou ANX4 BGT1

CAT1 LIP MAT1-2 SODB ZRF2 # O

A. fumigatus

ANX4 BGT1 CAT1 LIP MAT1-2

SODB ZRF2 - u

)

#

Tabla 3.6 – h A. fumigatus " #

Genes	Cepa A	Cepa B	Cepa C
° V E			
" 8 u			
# ° u			
O			
U ° u			
o \) "			
-k7			

Nota: Se indica el número de alelo de cada gen según el esquema de MLST propuesto por Bain y col. (2007).

Tabla 3.7 – † # @ A. fumigatus cyp51A

Cepa	Genotipo del cyp51A y su promotor				CIM (µg/ml)		
	5' UTR	Residuo 65	Residuo 98	Residuo 297	VRC	ITR	POS
°	uk	° 8 ° k	# ° # ° =	° #8 ° u			
"	uk	° ° ° M	# ° # ° =	° #8 ° u			
#	uk	° 8 ° k	# ° # ° =	° #8 ° u			
)	uk	° 8 ° k	# ° # ° =	u#8 ° o			

Nota: Para cada residuo se indica el codón de nucleótidos y el aminoácido que codifican entre paréntesis.

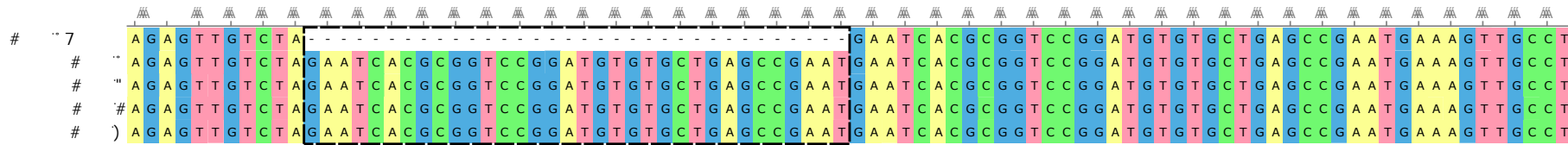


Figura 3.16 – *cyp51A* *A. fumigatus* non-WT *A. fumigatus* 7

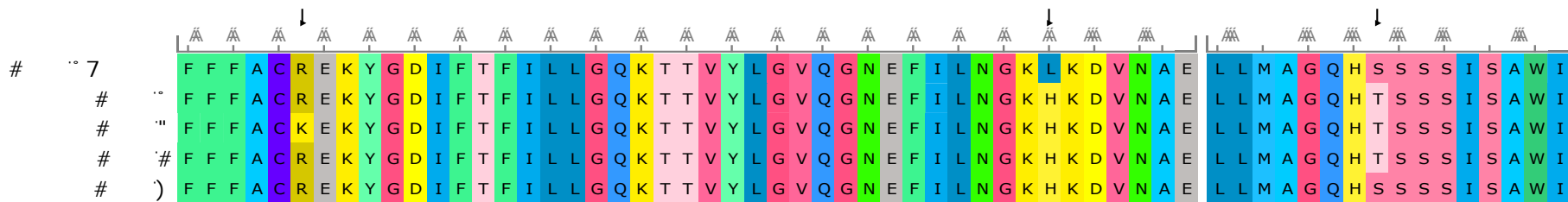


Figura 3.17 – *cyp51A* *A. fumigatus* non-WT *A. fumigatus* 7

k M
 cyp51A
 A. fumigatus Q) U akuB^{My} Q) U Q) U
 # h # o akuB^{My}
 My 7
 h Q) U
 cyp51A U) A.
 fumigatus Q) U uk O = uk k MO =
 A. fumigatus Q) U
 k M uk k M
 h A. fumigatus Q) U
 uk O = uk k MO = h#k
 primers) V cyp51A
 yuk
 O = 7 h primers) V
 k M7 " O 8-U u
 - h " Q) U
 O U U @k
 h A. fumigatus Q) U
) V h#k
 k M uk k M-
 k M) V A. fumigatus Q) U cyp51A O
 h#k primers k M k #u # u#u8 8 #uu8##uuu
 #c#u8# #8# ° ° 8 ° ° 8 ° ° #u#u8u ° 88 k M 7 ##u # ° 8u#u#u#u#u8#8u
 8# ° 8g8 ° ° ° ° 88# ° ° 8u# u# ° ° 8 ° uu8 u ° 8
 h#k primers 8-U u- 7 #
 - primers k M
 k) V primers k M 7 k M
 O

h#k primers 8-U u-

7) - A. fumigatus U) U

UU @k

A. fumigatus

U) U U) U uk O = U) U

U) U uk k MO = U) U U) U uk k M U) U U) U k M

) cyp51A @k

UU UU

@k O U) U uk O = U) U uk k MO =

UU @k U) U k M U) U uk k M

UU @k 7) V

U) U

k M h#k -

primers -

7 h

h#k primers u#u#u8# #

8# 8 8 u # - primer

h#k u u

7 7

h#k cyp51A

primers h in-silico

o

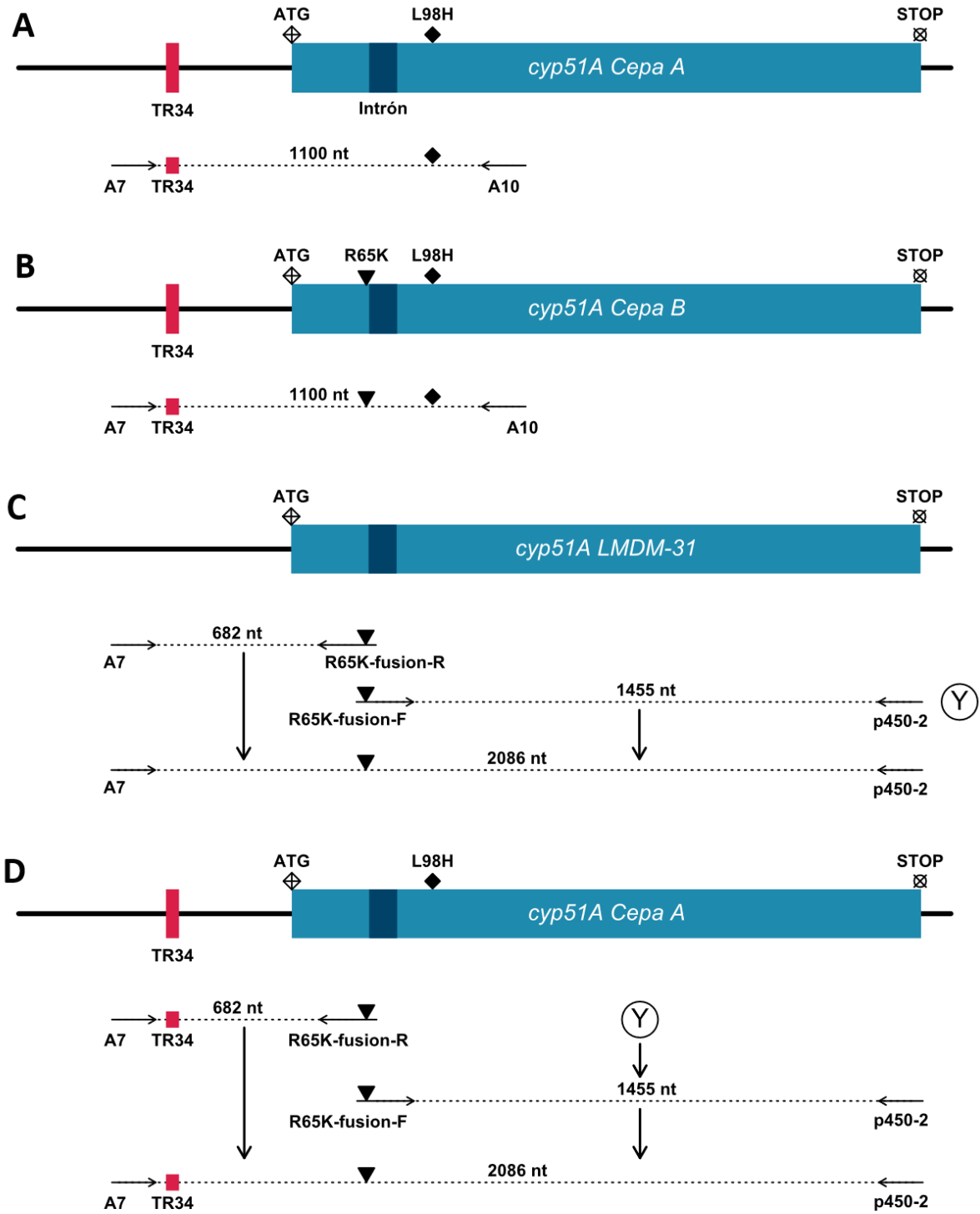


Figura 3.18 –) *Aspergillus fumigatus* (QJ) U ... #) ° 7 uk O = " 7 uk k M

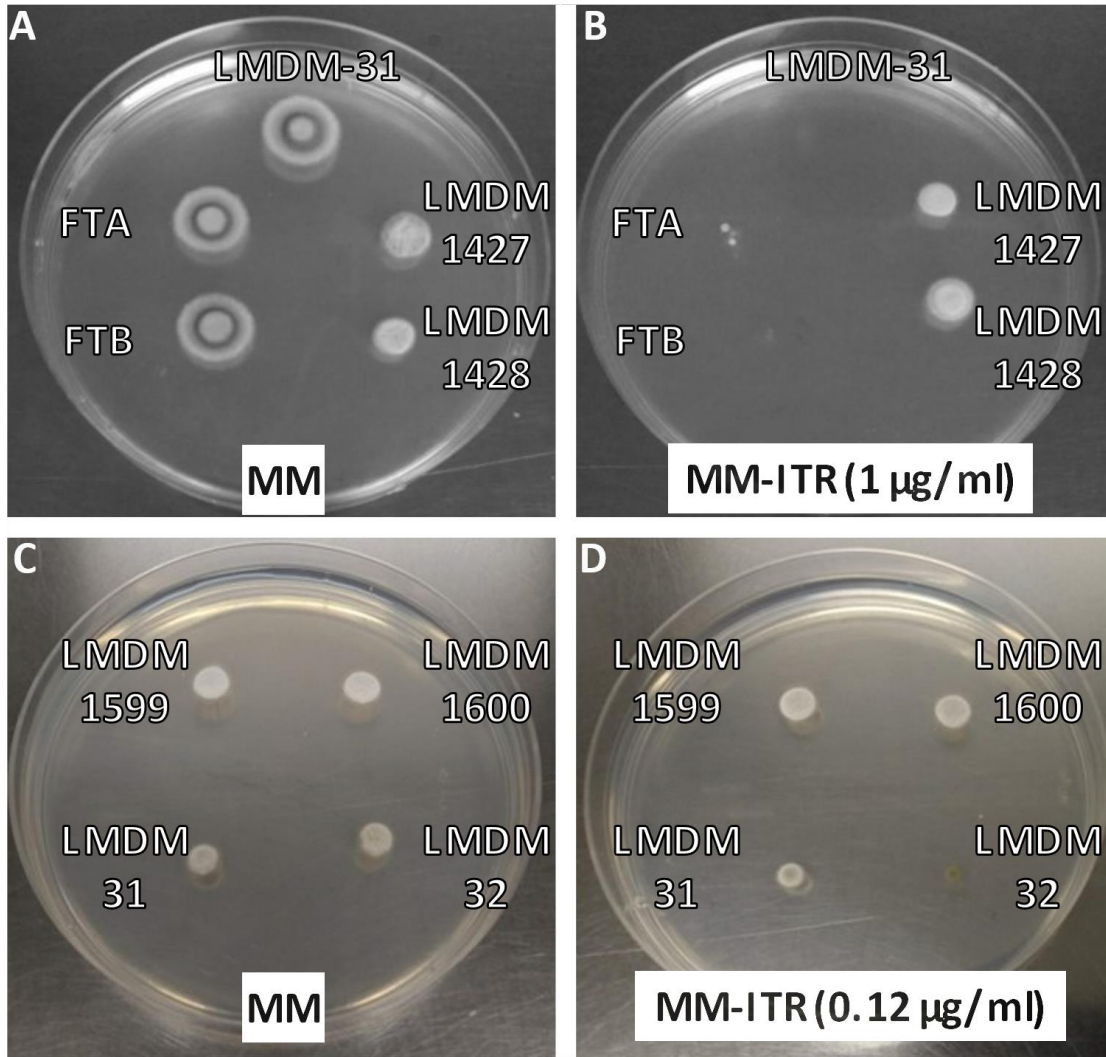


Figura 3.19 –)

7u 7u" 7

A. fumigatus UU UU @k

A. fumigatus akuB^{KU80}Δ

h

ω)U ω)U uk O = ω)U ω)U uk k MO = ω)U

ω)U uk k Mω)U ω)U k M" O uk O = uk k M

O = @k @k

ω)U ω)U #) - ω)U

@k ω)U O cyp51A

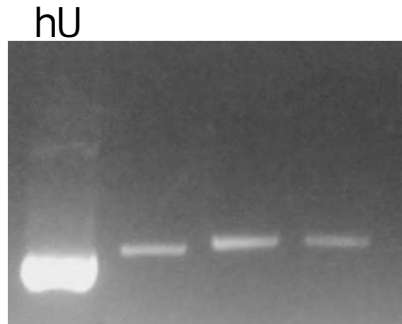


Figura 3.20 – DNA Electrophoresis Marker (M) = primer. *A. fumigatus* (uk) = *cyp51A* (h#k) =

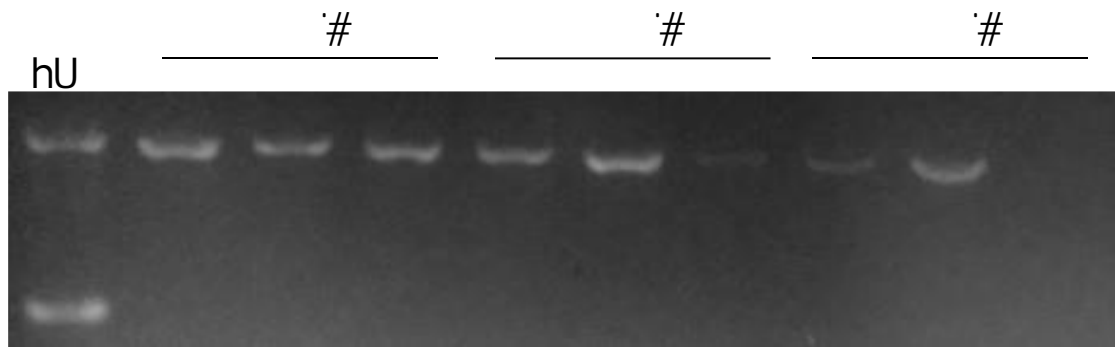


Figura 3.21 – DNA Electrophoresis Marker (M) = primer. *A. fumigatus* (uk) = *cassette* (h#k) = *primers* (#) =

h *A. fumigatus*
cyp51A

U #
U #
o
u A. fumigatus) U
A. fumigatus
) U " O
@ @k
A. fumigatus) U u h A. fumigatus) U
uk k MO = # tk#
h\o @) U @k tk#
uk O =) U tk#
A. fumigatus) U) U uk O = -
A. fumigatus) U uk k MO =
tk# 7
)
A. fumigatus cyp51A
A. fumigatus h
O =) U
WT u

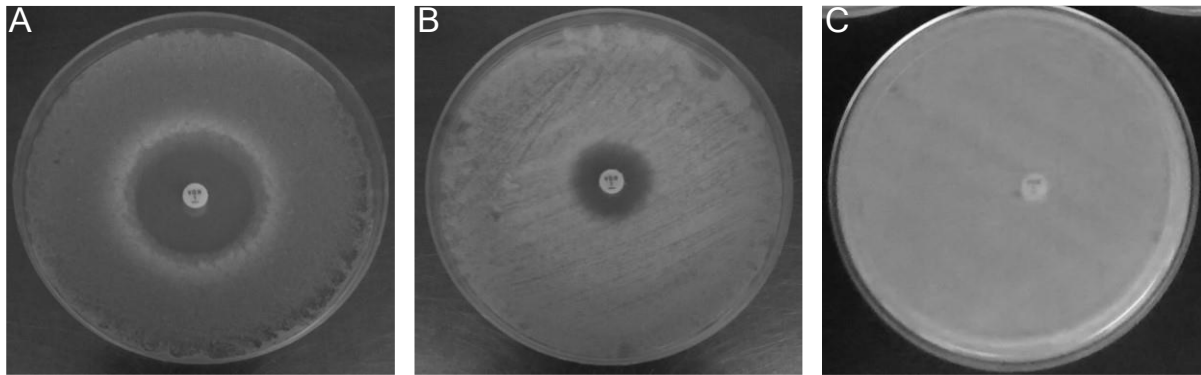


Figura 3.22 – *A. fumigatus* (U) U WT # *A. fumigatus* (U) U uk O = # # *A. fumigatus* (U) U MO = #

Tabla 3.8 – *A. fumigatus* *cyp51A*

Cepa	Genotipo del <i>cyp51A</i> y su promotor			CIM (µg/ml)		
	5' UTR	Residuo 65	Residuo 98	VRC	ITR	POS
°	TR34	° 8° k	#° #° =	° #8° u		
"	TR34	° ° ° M	#° #° =	° #8° u		
#	TR34	° 8° k	#° #° =	° #8° u		
Ω) U	WT	° 8° k	#u#° O	u#8° o		
Ω) U	WT	M\	M\	M\		
Ω) U	TR34	° 8° k	#° #° =	u#8° o		
Ω) U	TR34	° ° ° M	#° #° =	u#8° o		
Ω) U	TR34	° ° ° M	#u#° O	u#8° o		
Ω) U	WT	° ° ° M	#u#° O	u#8° o		

Nota: Para cada residuo se indica el codón de nucleótidos y el aminoácido que codifican entre paréntesis. Los valores entre paréntesis de VRC indican el diámetro de inhibición en mm. K.O.: Knock-Out. *: CIM ≥ 16 µg/ml según Macedo y col. (2020).

3.4 Estudio y caracterización de *Aspergillus* aislados de semillas provenientes de áreas agrícolas del país sometidas a fumigación con distintos antifúngicos azólicos de uso agrícola y su potencial resistencia cruzada a los triazólicos de uso clínico

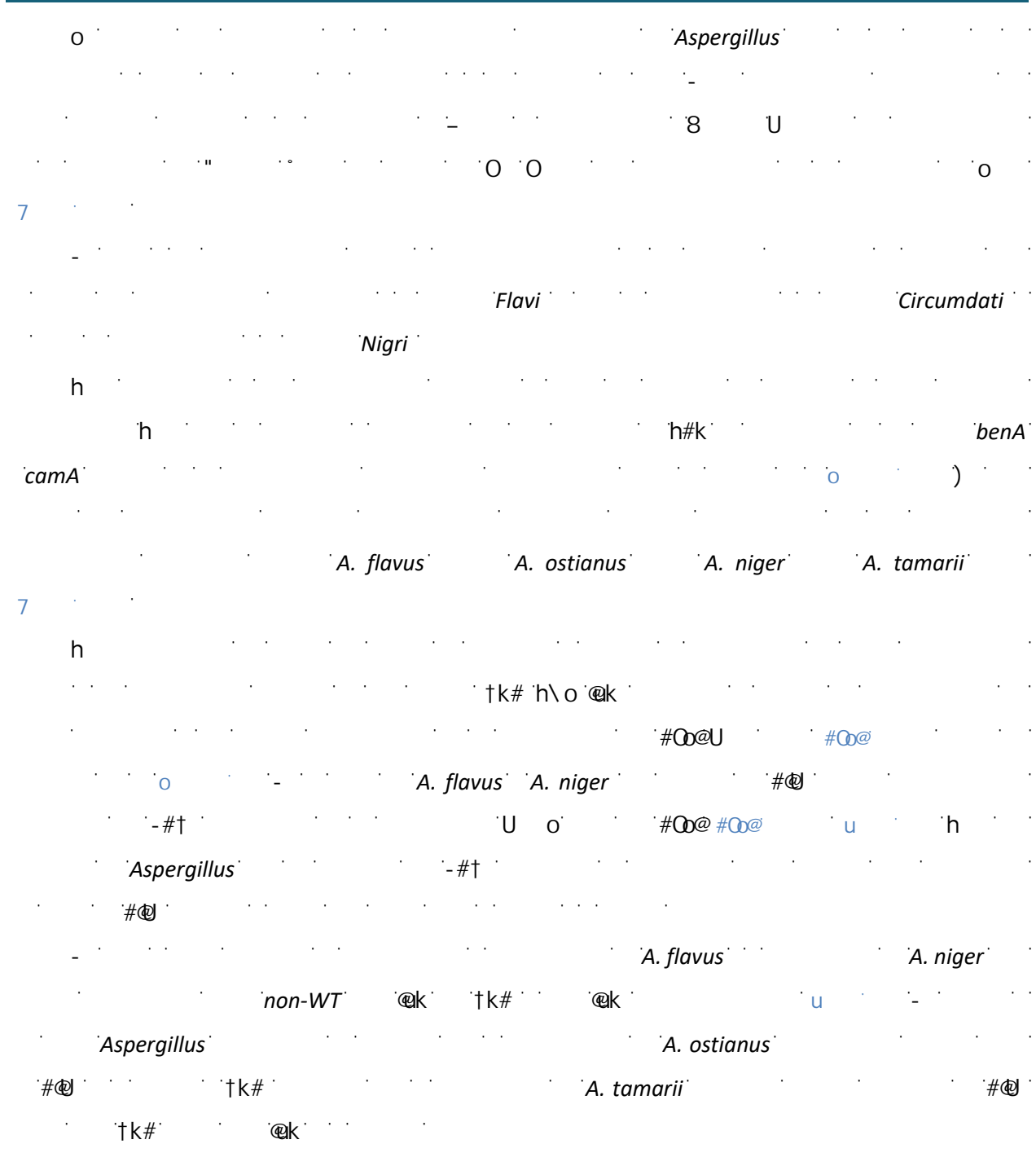




Figura 3.23 – O
B

Aspergillus *Aspergillus sp. - Circumdati* *Aspergillus Nigri* *Aspergillus Flavi*

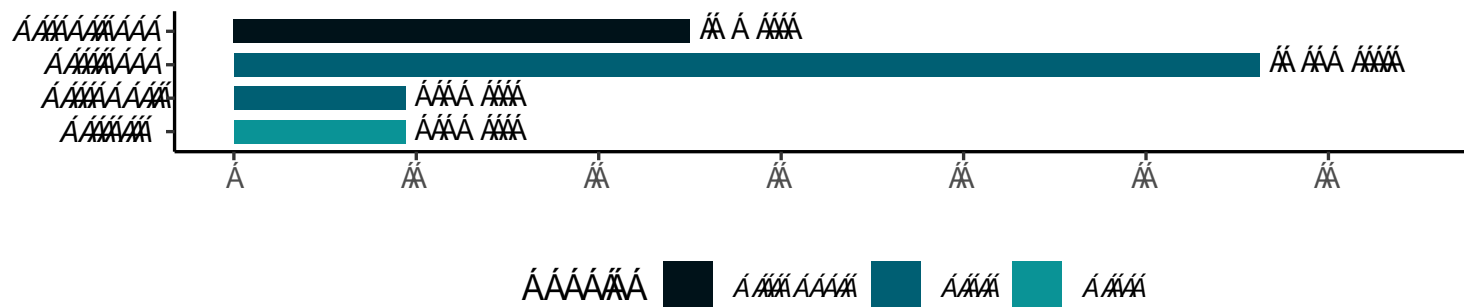


Figura 3.24 – h

Aspergillus

Tabla 3.9 – † # 2 Aspergillus

Cepa	Sección	Especie	CIM (µg/ml)		
			ITR	POS	VRC
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	■
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	■
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	■	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	■
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	■	.	■
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	■
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. flavus</i>	.	.	.
°	Nigri	<i>A. niger</i>	■	.	.
°	Nigri	<i>A. niger</i>	.	.	.
°	Nigri	<i>A. niger</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Circumdati	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. tamarii</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. tamarii</i>	.	.	.
°	Flavi	<i>A. tamarii</i>	.	.	.

Nota: Los recuadros grises indican los aislamientos incluidos en la categoría non-WT (CLSI, 2022a).

h non-WT A.
flavus #Ⓢ -#†
cyp51A *cyp51B* *cyp51C* #
A. flavus WT
 7j -
A. flavus k o
 VkkO
cyp51A *cyp51C* *cyp51B*
) *A. flavus* WT non-WT
 # h
 # h # - # h V
 M V non-WT WT
 # h #
M54T S240A 8 ° **S361W** u h 7 o **N423D**) -
 WT non-WT u O
 U u
 V) o

Tabla 3.10 –

h

A. flavus

#

Cepa	Origen	ECV	CIM (µg/ml)			Sustituciones aminoacídicas detectadas en el CYP51C							
			ITR	POS	VRC	M54T	S240A	G333A	S361W	T385P	F403S	N423D	D426E
#	#	WT				CE	CE		CE			CE	
#	#	WT				CE	CE						
o	o	WT					CE					CE	
o	o	WT				CE						CE	
o	o	non-WT				CE	CE					CE	CE
o	o	non-WT				CE							
o	o	non-WT				CE	CE						
o	o	non-WT				CE						CE	
o	o	non-WT							CE			CE	
o	o	non-WT						CE		CE	CE		

Nota: Para cada residuo se indica el aminoácido que codifican en la cepa de referencia NRRL_3357, la posición del mismo, y el aminoácido por el cual es reemplazado. La columna ECV indica si alguno de los valores de CIM es mayor al ECV (aislamiento non-WT), o si todos son menores o iguales (aislamiento WT). Los ECV utilizados son los reportados en el documento M57s (CLSI, 2022a). ^a: Aislamientos que presentaron las mutaciones N37Y y K328N en el *cyp51A*.

3.4.1 Ensayos de sensibilidad frente a fungicidas azólicos utilizados en la agricultura

Table with 10 columns and multiple rows. The table contains data related to fungicide sensitivity tests, including labels like 'A. flavus', 'non-WT', 'WT', and 'Student'. The text is partially obscured by a grid pattern.

	o	h	p-value			
)				-#		
non-WT						
-#			WT		#	
u	∅					WT non-WT

Tabla 3.11 –† -# A. flavus

Cepa	CIM (µg/ml)			ECV	EC ₅₀ (µg/ml)				Sustituciones aminoacídicas detectadas en el CYP51C							
	ITR	POS	VRC		Protioconazol	Epoxyconazol	Tebuconazol	Cyproconazol	M54T	S240A	G333A	S361W	T385P	F403S	N423D	D426E
•				WT						CE					CE	
•				WT					CE						CE	
•				no-WT					CE	CE					CE	CE
•				no-WT					CE							
•				no-WT					CE	CE						
•				no-WT					CE						CE	
•				no-WT								CE			CE	
•				no-WT							CE		CE	CE		
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												
•				WT												

Nota: La columna ECV indica si alguno de los valores de CIM para los antifúngicos de uso clínico es mayor al punto de corte epidemiológico (aislamiento non-WT), o si todos son menores o iguales (aislamiento WT). Los puntos de corte utilizados son los reportados en el documento M57s (CLSI, 2022a). EC₅₀: Concentración de antifúngico que inhibe el crecimiento en un 50%.

Tabla 3.12 – *Prueba de Kolmogórov-Smirnov para la comparación de la distribución de los datos de mortalidad de WT y non-WT.*

Antifúngico	Estadístico D	Valor P	Hipótesis nula
#			V
-			V
h			k
u			k

Nota: El estadístico D indica la máxima diferencia entre las dos distribuciones acumulativas. El Valor P responde a cuál es la probabilidad de que el valor del estadístico D de Kolmogórov-Smirnov sea igual o mayor que el observado. La hipótesis nula es que ambos grupos provienen de poblaciones con distribuciones idénticas, y comprueba cualquier violación de esa hipótesis nula ya sea por medianas diferentes, varianzas diferentes o distribuciones diferentes.

3.5 Encapsulación de VRC en MPs

3.5.1 Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones obtenidas

o Uh o

core tk# Uh tk# O

) h)@ Uh tk#

) O o

Uh tk#

Uh h)@

u

u Uh

#

) h)@@

h)@ Uh

Uh

u

h Uh #

h

Uh

O Uh *in-vivo*

h

h)@ Uh o

Vo7 o

o Uh

u h

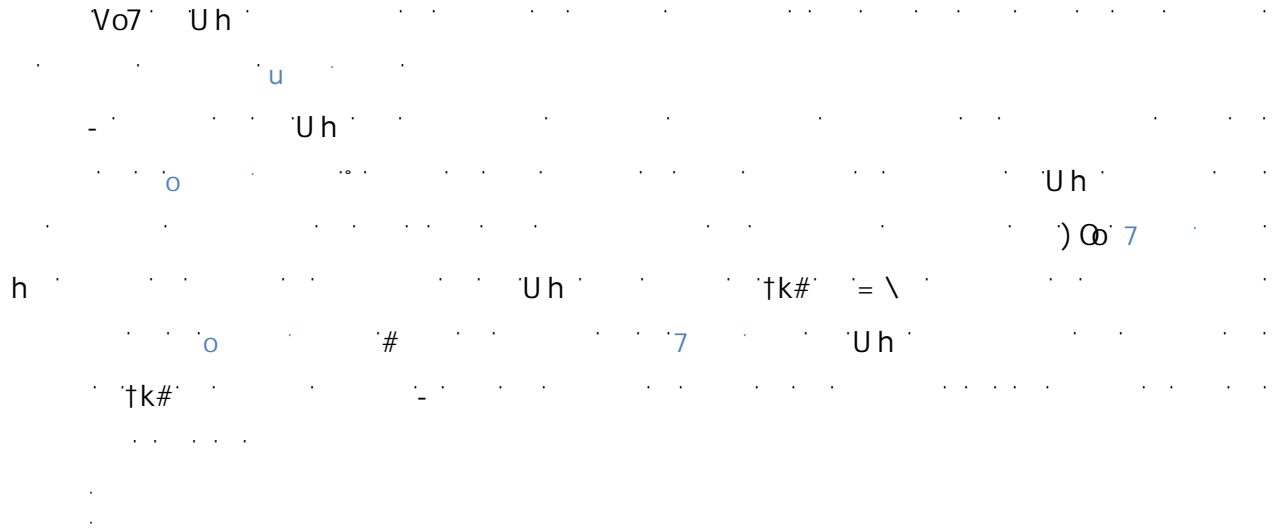


Tabla 3.13 – u Uh o tk# = \ # Uh

Formulación	Condición	VRC (mg/ml)	Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)	PDI	± DE
o	O						

Nota: Los resultados se expresan como el promedio (n = 3) ± desviación estándar (±DE).

Tabla 3.14 – # tk#

Tiempo (d)	Condición de conservación	Primer pico			Segundo pico			PDI	± DE
		Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)	Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)		
u									
#									
O									

Nota: DE = Desvío estándar. PDI = índice de polidispersión.

Tabla 3.15 -- U h o tk#

Tiempo (h)	Primer pico			Segundo pico			PDI	± DE
	Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)	Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)		
.
.
.
.
.
.
.
.
.
.

Nota: Los resultados se expresan como el promedio (n = 3) ± desviación estándar (±DE).

Tabla 3.16 -- U h o tk# Vo7

Tiempo (min)	Tamaño (nm)	± DE (nm)	Intensidad (%)	PDI	± DE
.
.
.
.
.
.
.
.
.
.
.

Nota: Los resultados se expresan como el promedio (n = 3) ± desviación estándar (±DE).

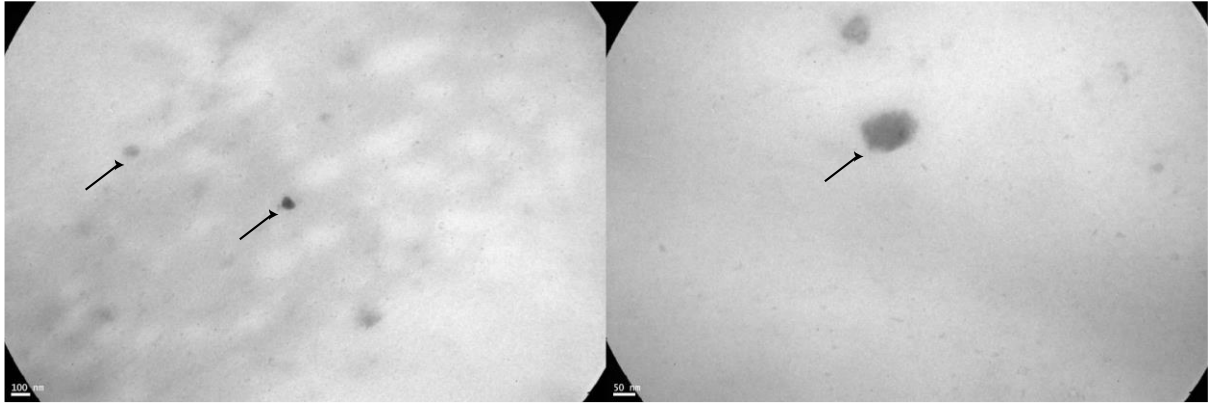


Figura 3.25 – U

o tk# O Uh = \ u @)

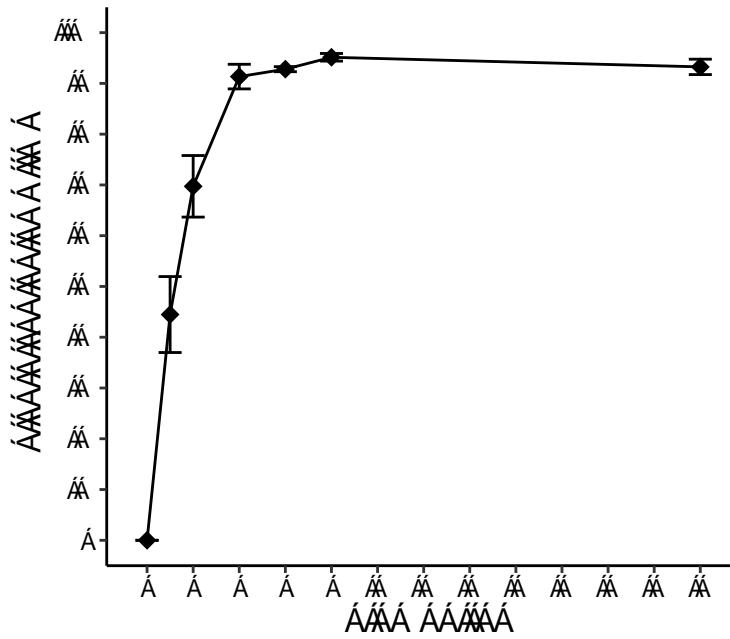


Figura 3.26 – -

o tk# Uh o α@7 # tk#

3.5.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del sistema contra distintas especies fúngicas de colección y las provenientes de los aislamientos clínicos

h
 # @ # @ U
 o # u U h
 tk# delivery tk#
 # @ tk# h
 tk# = \
 U h # @ h U h
 tk#
 u

Tabla 3.17 – Valor de CIM de las cepas de hongos en presencia de VRC en MP y en DMSO y en suspensión acuosa.

Especie	Cepa	Valor de CIM en $\mu\text{g/ml}$			
		VRC _{MPs}	VRC _{DMSO}	VRC _{Suspensión}	MPs
<i>A. niger</i>	U#	100	100	100	100
<i>S. apiospermum</i>	U#	100	100	100	100
<i>E. dermatitidis</i>	U#	100	100	100	100
<i>S. aurantiacum</i>	U#	100	100	100	100
<i>A. flavus</i>	U#	100	100	100	100
<i>A. fumigatus</i>	U#	100	100	100	100
<i>A. terreus</i>	U#	100	100	100	100
<i>A. fumigatus*</i>	U##	100	100	100	100

Nota: Los resultados se expresan como el promedio ($n = 3$). **A. fumigatus* ATCC 204305. VRC_{MPs}: MPs cargadas con VRC (5 mg/ml). VRC_{DMSO}: VRC libre disuelto en DMSO. VRC_{Suspensión}: VRC libre suspendido en H₂O_d

3.5.3 Estudio de la citotoxicidad *in-vitro* de las formulaciones obtenidas en una línea celular de mamífero

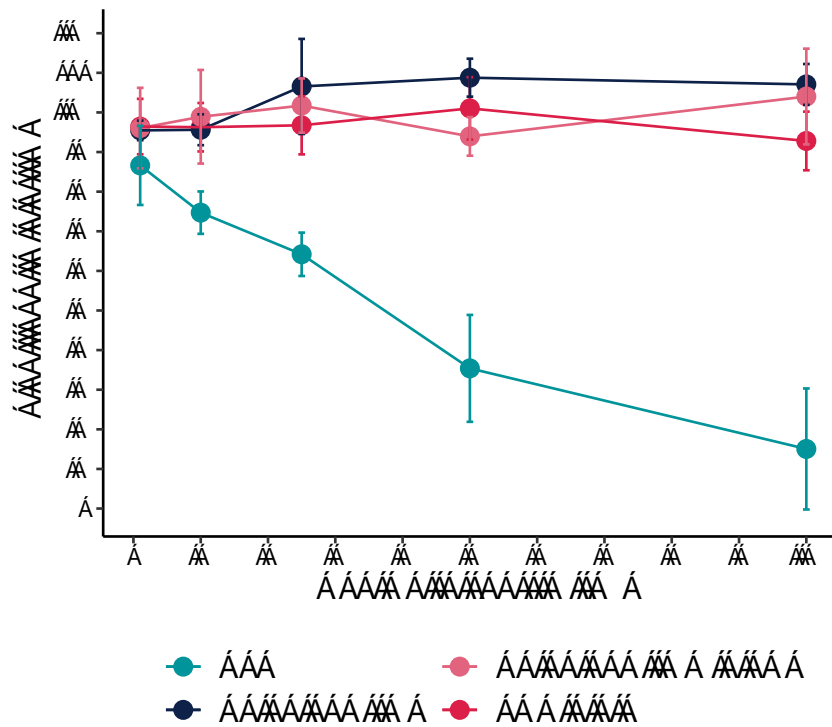
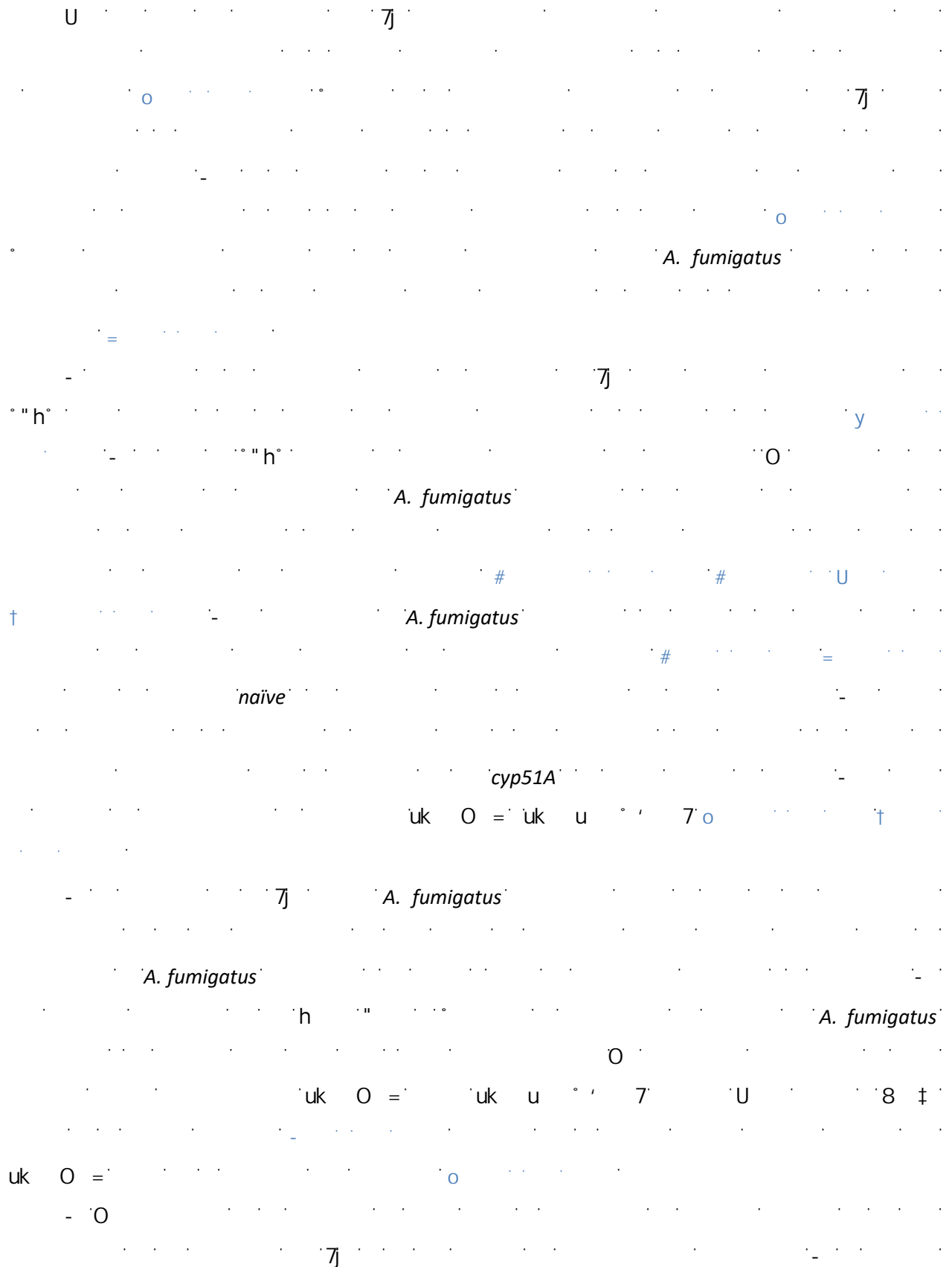


Figura 3.27 – huCE h tk# tk#

4. Discusión



..... *A. fumigatus*
 'uk O = 'uk ' 7u 'uk
)U@
 U
 h *A. fumigatus*
 U M '8 - ' # h
 @k 'uk O = *naïve*
 " h " *A.*
fumigatus 'uk O = o u7 @
 7j
 h
 8 - 'uk ' 7u *A. fumigatus*
 7j @ O
 - 'u)
 7j
 U"
 h
 7j *A. fumigatus*
) 'u)
 7j

Tipificación de los aislamientos fúngicos provenientes de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ de Argentina mediante técnicas de biología molecular

O
 7j *camA*

benA)

Aspergillus *Scedosporium* *Exophiala* °

o

Scedosporium *Exophiala* # 7j

Aspergillus

v - -

Aspergillus *A. fumigatus* 7j

o

- *Aspergillus* 7j

=

- 7j

#

o "h

A. fumigatus -

Aspergillus

7j

=

7j

Aspergillus 7j

7j @k

Aspergillus "h

o

"h *Aspergillus*

- u) *A. fumigatus*

7j

8

A. fumigatus

U O o

Aspergillus

Aspergillus

A. flavus *A. terreus*

Aspergillus

K

Aspergillus

S. aureus *P. aeruginosa* *S. maltophilia*

Aspergillus *Scedosporium* *Exophiala*

h

Aspergillus

Scedosporium *Scedosporium*

Aspergillus o

Scedosporium

k O

8 k u u

7j

O Scedosporium

S. apiospermum S. apiospermum

sensu stricto S. aurantiacum

S. apiospermum

O apiospermum S. angustum

7j

M

E. dermatitidis

7j

7j

" k y = O U

O M Exophiala

7j h

y Oh

) 8 O

7j

h

= M h

7j

=

7j E. dermatitidis

A.

fumigatus O

7j 8 O h

Trichosporon asahii T. mycotoxivorans T. asahii T. mycotoxivorans

A. fumigatus Trichosporon Trichosporon

Trichosporon beigelii T. mycotoxivorans A. fumigatus S. apiospermum =

Rasamsonia aegroticola Curvalaria coateciae Fusarium oxysporum Alternaria nobilis Paecilomyces variotti sensu stricto Talaromyces Penicillium

R. aegroticola #

Aspergillus Scedosporium R. aegroticola =

O O

#

O
A. fumigatus *C. albicans* *cyp51* *erg11*
cyp51 *erg11* h # o
O
U O

Evaluación de la sensibilidad antifúngica de los distintos aislamientos obtenidos de origen clínico pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Scedosporium* y *Exophiala* frente al ITR, POS, VRC y AMB por microdilución en caldo

u)
7
Aspergillus *Scedosporium* *Exophiala*
in-vitro U" h
#@ U #@#@
o
O #@
U" @k U" #@
@k #@ # o
S. apiospermum #@ @k O
S. boydii u)
tk# #@
#@ h
Scedosporium O
Scedosporium Lomentospora
A. fumigatus
cyp51A

O *Aspergillus* #
 non-WT *Nigri* *Nidulantes* O #
Flavi "U"
Terrei h
 h *A. parasiticus* *Flavi* *A. pseudoterreus*
Terrei "U" *A. calidoustus*
Usti O h *A. lentulus*
Fumigati
 "U" †
 u) # "U" @k †k#
 - *Aspergillus* *Nigri*
 # *A. welwitschiae* A.
tubingensis *A. niger* # = O
 #
tubingensis) - u)
niger *A. welwitschiae* *A. niger*
tubingensis
 # "U" # #
 "U" *Flavi* *Terrei* u
A. terreus "U")
 - *Aspergillus* *Scedosporium* #
 "U" 7
 O) "U"
Aspergillus
 k O
 "U" *Aspergillus*

U" =

U" U

o

non-wildtype U"

A.

fumigatus uk O =

E. dermatitidis

@ # @

) # E.

dermatitidis u) # @

tk# # @ @k h\o u

tk# 7 - tk#

\

A. fumigatus o

k # @

A. fumigatus Scedosporium E.

dermatitidis)

" o

-

WT

@ A. fumigatus V 7)
 # @
 WT non-WT
 h
 V A. fumigatus @k h\o tk#
 WT 7 O
 V V h
 h A.
 fumigatus o k y
 A. fumigatus
 cyp51A
 =
 Aspergillus Scedosporium E. dermatitidis
 # @ " U" @k h\o tk# o
 A. fumigatus
 u E. dermatitidis tk#
 tk# @k tk# @k h\o V
 cyp51 \ y
 Aspergillus 7j

Análisis del perfil de sensibilidad y resistencia a triazoles de aislamientos de *A. fumigatus* mediante el análisis nucleotídico del gen *cyp51A* y su promotor

† A. fumigatus
 7j k U O

h " U @ 7 " O
U h _
- °
A. fumigatus
7j
h u
) A. fumigatus
7j
A. fumigatus
7j non-WT
A.
fumigatus
o
" °
- °
cyp51A uk O =
A. fumigatus
k U
h A. fumigatus 8 -
@k naïve O
uk 7u
@ -
cyp51A h
kV cyp51A
cyp51B = -
Hmg1
non-WT
uk O =
" # o u -
U

'k M # h
 uk O = #
 O uk k MO = k M uk k M
 # @ U
 O @k
 # tk# O 'U Ou
 #
 uk O = uk
 U
) 8 k †
 U Ou
 uk O =
 o u # @k tk#
 U Ou
 uk k MO = o u -
 # 'U Ou
 'k M @k
 tk# y
 M k
 k M- k M
 =
 @
 A. fumigatus @
 O

Estudio y caracterización de *Aspergillus* aislados de semillas provenientes de áreas agrícolas del país sometidas a fumigación con distintos antifúngicos azólicos de uso agrícola y su potencial resistencia cruzada a los triazólicos de uso clínico

Aspergillus = o *A. fumigatus*
A. terreus *A. flavus* M o
A. flavus O
Flavi *Circumdati*
7 †
= @ U o
\ = o
A. fumigatus #
U 7 U - *A. flavus*
cyp51A *cyp51B* *cyp51C* h
k U o O
h
u) ° U"
Aspergillus V
A. tamarii *A. ostianus*
© *A. tamarii* = U
† *A. tamarii* # ©
†k# 8 # ©
A. flavus 8
A. tamarii *Flavi* #
u)
A. tamarii

M M h
 h #
 A. ostianus Circumdati U
 @k U o y A.
 ostianus #
 @k U" @ h\o tk# @
 tk# U" #
 Flavi Circumdati
 V t h A. niger
 # @k
 ° u7
 A. flavus sensu stricto
 non-WT tk# @k non-WT
 U" - cyp51C
 non-WT -
 o 7° hV) t U" = tk# h o
 o u)
 U u o ° o † V) WT non-WT
 O A. flavus
 WT non-WT) A. flavus
 U u V)
 o o † u
 cyp51C
 o V) tk# A. flavus O
)
 #
 k WT
 8 ° u h 7 o) -

uk k MO = -

A. fumigatus

cyp51A *cyp51B*

O V M V

non-WT WT) O

cyp51A *cyp51B* WT non-WT

-

A. flavus *A. fumigatus* " U

o *A. flavus* o

7j

-) U@

O non-WT

Mo

WT non-WT

-

) U@ *A. flavus* #

†) U@ *A.*

fumigatus) 7 k o k

uk 7u

WT) U@ #

uk O =

k *A. flavus* O non-WT

#@) U@

@k) U@ -

flavus -

#k@k #

cyp51 *mdr1* *mdr2* *atrF* *mfs1* ku h#k

A. flavus

Encapsulación de VRC en micelas poliméricas

O tk#

O Vh Uh

u) o

tk# Uh O Uh

O

Uh Vh h)

tk# Vh hØ

\ Vh On=

M o Uh

U" o

y Uh @k

C. albicans A. fumigatus A. niger U h "

tk# t

O Uh u)

#@

tk# u

tk#

o tk#

u

tk# o" -#) o

o" -#)

clearance

O 7j

y

7j

h v

)

7

O h

o

Uh delivery tk# o

"h in-

vivo O 7j

5. Conclusiones

Á o Aspergillus Scedosporium Exophiala
 Trichosporon Rhodotorula Alternaria Curvalaria Fusarium Paecilomyces Rasamsonia O
 Á o Aspergillus Fumigati
 Flavi Terrei Nigri
 Nidulantes Usti.) Scedosporium
 apiospermum
 Á Aspergillus A. fumigatus A. lentulus
 Fumigati A. flavus A. parasiticus A. pseudonomius Flavi
 A. terreus A. pseudoterreus A. alabamensis Terrei
 A. niger A. welwitschiae A. luchuensis Nigri A. nidulans
 Nidulantes A. calidoustus Usti
 Á Scedosporium S. apiospermum S. boydii S.
 aurantiacum S. angustum
 Á Exophiala E. dermatitidis
 Á o A. fumigatus A. niger
 A. fumigatus A. niger
 Á o A. fumigatus A. flavus A. alabamensis T. mycotoxivorans
 A. fumigatus A. niger
 Á o Aspergillus E. dermatitidis Scedosporium
 # @ - # † # @
 Á - # @ " U " # @ @k
 h \ o †k#
 Á) E. dermatitidis # @ Scedosporium
 # S. aurantiacum S. angustum
 S. apiospermum # @ " U " @k -
 E. dermatitidis †k# # @
 # @ †k# @k h \ o - Aspergillus
 # @ †k#

5. CONCLUSIONES

Á o *A. fumigatus non-WT*)
 *non-WT* tk# @k h\o
 tk# h\o @k - *non-WT*
 uk O =
 # h

Á U k M uk O = *cyp51A*
 *A. fumigatus*

Á o *A. flavus* *A. niger*
 *non-WT* @k tk# @k -
 -#

Á - # h ° " # *A. flavus non-WT*
 # h #
 WT *non-WT*
 # h # *non-WT* 8 ° u h 7 o
) - *non-WT*
 *cyp51C*

Á o Uh o tk# - Uh O
 Uh
 α@7 Vo7

Á O Uh tk# *delivery* tk#
 #@ tk#
 h tk# = \
 Uh #@

Á O Uh tk#
)
 tk#

Perspectivas

O

7

)

A. fumigatus

cyp51A

A. flavus

non-WT

E.

dermatitidis

#

o

O

O

U"

y

7

Uh

u)

o

tk#

†)

tk# Uh tk#

O

Á \
Á @
Á @

-

7

tk#

software

TOPFIT program

ANOVA test posteriori

*Internacional Guiding Principles for
Biomedical Research Involving Animals* Council for Internacional Organizations of Medical
Sciences @U o *International Council for Laboratory Animal Science* @O o

Publicaciones

Publicaciones en revistas científicas

Á Devoto, T.B. Mh oK h k k - 7 KO # U O
U Aspergillus U U

Á Devoto, T.B. Mh 8 7 O 8 - 8 # U O =
Aspergillus fumigatus sensu stricto U

Á U) Devoto, T.B. h o 7 KO # U O 8 - 8 V
h ° U # h ° k Aspergillus fumigatus
Daiana Macedo y Tomás Brito
Devoto contribuyeron a partes iguales a este trabajo. El orden de los autores se determinó por orden decreciente de antigüedad.

Á = M Devoto, T.B. o 7 8 U o U 7 V O ° #
U # U O Aspergillus flavus # # U

Á Devoto, T.B. Mh 8 7 KO 8 - 8 # U O
Aspergillus Scedosporium Exophiala U

Á O U 7 O U KU Devoto, T.B. † K # 8 k # U O
j U) ° °

Otras publicaciones realizadas durante el transcurso de la beca doctoral

Á - V O V u U ° Devoto, T.B. h oK) 8 O @ # ° #
U O o Sporothrix brasiliensis # K U U

Á Devoto, T.B. u U ° M= - V h oK U U U ° U
V K k O # ‡ U # U O - V
- † K

Capítulos de libro

Á # U O Devoto, T.B. u U ° O U K @ 8 ° # 8 k V
7) o o) k O U #
)) o "

Á O U K u U ° Devoto, T.B. O U 7 # 8 k # U O °
) V ° k V ° o V

Presentaciones en congresos científicos

Á = M Brito Devoto T o 7 8 U o U 7 V O ° u °
 # U # U O ° Aspergillus
 u= @ 7 # y o # h

Á Brito Devoto T = M u U ° #) U U # U O ° h
 u= @ 7 # y o #
 h

Á Brito Devoto T o 7 8 ° 8 O 7 O h O 8 U o U 7 V
 O ° # U # U O ° Aspergillus flavus
 # u 7 # y V k - h † @

Á Brito Devoto T = M h o k h k k - 7 K O # U O U
 Aspergillus
 u= @ 7 # y o o " ° "

Á U) Brito Devoto T O 7 @ 8 # o # U O 8 - 8 -
 Aspergillus fumigatus #
 @ # o) @ o U u u °
 h

Á = M Brito Devoto T o 7 8 U o U 7 V O ° # U
 # U O ° Aspergillus flavus
 u= @ 7 # y o o " ° " h

Á U) Brito Devoto T O 7 @ 8 V U - # U O # o 8 - 8
 Aspergillus fumigatus @ # o) @ o
 U u u h

Á Brito Devoto T U) h o k 7 K O 7 \) # U O 8 - 8 ° °
 cyp51A Aspergillus fumigatus # #
 u= @ 7 # y o o h

Á Brito Devoto T h o k - 7 K O 8 o 8 - 8 # U O °
 Aspergillus Scedosporium Exophiala
 (# @ # o) @ # " ° "

Á Brito Devoto T h o k - 7 K O 8 o 8 - 8 # U O 7
 # (# @ # o) @ " ° "

Á Brito Devoto T h o) 7 \ o - O) 8 k - 7 'O# 'UO'
u=@\#yo# " h

Á Brito Devoto T h o) 7 \ o - O) 8 k - 7 'O# 'UO'
7 u=
@\#yo# " h

h

Á h @ o # # @ # h #

Á h #) @ # o @ # h
†@ k - @ U
u @ †@

Á) #
Aspergillus fumigatus

Referencias

8 k K " U = 7 k uk # U K7 K) 7 U #

7" U" @ °oo-u #)"")))

U k k \ V = @7 K @ 8 # o) U 7 O o U @) 8 \ o

U o # o h V h o o

k y o) = " kK o -V #U V u

u K 8 h K8h

U @ 8 = 88 8 o h

) \ U 8 =) " o @ # @ 8 U @

7 ‡ = # U k #Uk

@ 7 O # U

U o - U-uk@o

U U K = oKk 8) ‡ h o)) ‡ @ h k #

h k o 8 # # 8 # o V h h

y @ u h

°°#

K7 = - u @ U U o 7 U h

o \ V " o h

U # O k = 7 U 7 U K7 h hO 7

o U

U # O k = 7 U 7 U K7 h hO

uk O = uk 7u uk # o k

k) o) k 7 u - # @ ‡ O 7

= h ‡ # 7 # #=-ou

) = # 7 \ u h @ k u #) K) #

-) K # #7uk #

" @ V o "@U-)@"

8 u 8 k k K K) = U o =K7 @ U O 7 # h) o)

U # h) o #

o = U " hU M U u) K o = \))

o U kk M ‡ ") U K o)

ko#

U 8 - O 7 u @ O "

°°#

U u \ ° O k U ° 8 " U 8 7 h # @ 7

o K o O) k " U ‡ hO = M) K u h

k u # 7 h O 7) k k O 7 K

7 = = 8 o) o U U K7 U

" KU u)) K U) o) 8 V ° k \ 7# U

") ° # U # MM U @ O) K \ K o - ‡ 8 " V k

)) K#U

" o # " - " 7 # u

" K M) K V U

" 8 = # K u h u) = V U o # k 8 O 7 # V

" ## = U h8 o o O \ o u# U † # o#) o

" \ k U) o o) U @ -

" U U 7 k U U o # h k K8 @ u

" " ") o h k Mb U) 7 @ = 8 † u U # = " U " M)

" k# o) # 7 h u k U

" U U - † " O "))) 8 u

" - U - h 7 # # - K † u) M) o - U - U)

U K k # U \#

" h k " U u U - # K M k = @) # K)) M

= U K7 =) h = h k # 7

- @ Ok h # h- #

" h U U

" " # O = - # M U =) " o KM" k# k U h " h

O = o U O

k " k# o UK V V h O # U V h O O

oU u O K † U O' M - K) Ku † h- U † K8 k @ U

k U # o k O

) † k) o † 7 K # " o 7 = " u

" k k @ o U 7 o U - V V # h h O O Ok o U) h

k 7 o) # o -y# au 8 # o U #

o u o V @ #

7# # U O h k 8 8 U h) V K h

h o k 7 8 7 j

h o k 7 U 8 U o o) ° † " O " 7 " O " h " 8

o # # # 8)) ° † k U 8 7 # 7 " 7 o 7 " 8 o 7

U 8 O 8 U 8 = @ o O O O " O o O 8 U 8 U U 7

U " U M U O \ o h h h O O) h h o h) h K h)

j U U k 7 k † o U o o o † 8 u K u " u k † M † 7

† 8 - o V " @) ° 8 = † h h k h) † 7 " o

h u U k) 8 y
 # 8k h " " - M) O # k " " h o @ k U
 h
 # 7" " # KO † " k k j u 7 o " " \ U
 y u @ 7 @ @) u
 #77 h k) k # 7 7
 #7uk #7uk † O = u # 7 uk #7uk #7uk
 # o# = #O = U # \ U † o #
 # K7 uk # o=) - # - Ko Oh KK k o# † †K k 7°
 @u u o
 # o' O) 8 M † " # = o h # U K h h ' K # KM O = K M o = h o = # o U #
 K = ' K = @ h = U K # U
 # @ h = U K # U
 # K' U) M MO U 8 u h K U o #7uk =#\ V
 # U K † - K K U ' h ' K M o = o U 8 o K = U u k U
 † k @ o M = #
 # o = U - V 8 7 @ K "
 # " MM o 8 o V k = o U K7 # k U
 # M o (K U K7 # u k = = h O o h
 y # @ u = =
 # U K7 - U \ =
 # o # = 7 U K7
 # " # K † K7 # Kh #) " Kh # 7U" o)
 K U @ o)
 # @ - # † U - uk @ o o u - # O o
 @ U o
 # @ h o o u 7 7 - #
 O o @ U U o
 # @ k U ") U o u 7 7 - #
 O o @ U
 # @ U #)) o u V 7 7
 8 # O o @ U
 # # # # # o † U \ o (E
 o
 # O- o) = o K k h) h) o U # o =
 h U
 # U O) u" u U O U K @ 8 # 8k V 7))
 o o) k O U #)) o
 ") - " h o) V # h k = U "))
 U U

) ° o u 8 u † U 8 7 o † M u V K # k

) hK h h U " U " U O " k) U #) Mo h)
† h O V h h) O O " h u 7 @ U

) h" - u # 7 V - K U
° #oU\On=° kU° #-yu " oyhhO 7@ U h " o@ h) 7

)) † V-KU

) ° # hV V U V # M 8 M o oo V U V uU
h @

) u" Mo= h oK h k k - 7 KO # U O U U
K@h=° kU

) u" = Mh 8 7 KO 8 - 8 # U O

) u" = Mh 8 7 O 8 - 8 # U O = U

) u" u U ° M= - V h oK U U U U V K k O #
† U # U O

) 8 uU U - # - U k u KO " h U o) 8
@ k "Vu@#k\"@O° 8-Vuo° V) #-U\ u=-k° h

) MU # KU # 7 h h&

)) M) o # k k o @ † h # 7

) o K @)

) MK o = o U 8 o = U

) ° hU h 7# " V# o # U U h 8° 7) °)
@† o @ U - uk@o

) ° o " u U o # ") † U 8 y " \ U U k
#Uk

- #h " K) h= h K K o V M h o @

- K # 7 u K o

-) u8h o O K # U † K8 = 7 † h- U h U K7 h
K

- # 7 o KK#7

- @ " u K " @ ") - 8 8 8 K M o h u o U
U K " 7 " " # " # # " # " # o 8 8 U
8 K K - U M K† O 7 # O o U K U U - V #- h U u U
h U@ @

- ° V O V u U °) u" h oK) 8O@ # # U O o
o # ° #

- K U U

7 k @7 o V U Ku hk U @U - OU h t # k " 8) "U#
 U
 7 U -) o M U k t - o U 8 U = o = 7@yk-o = u " " 8 8 = u
 "My # 7 °oo-uo 8k° h=@ --M kh-8 -# °oo-u " " -
 7 " " o = o U O K u U 7 k o " h
 7 U 8 " U " U # " k k k k 8)) † " h u " K
 #
 7 # = † - #V = o" V # " U O u \ o 7 U †
 o k° = K u 7
 8 k o) ° =hO# K
 8 KU U # " - k Kh O# @U U O 8 U O U K o
 U K - h u VO#) ° U U ° @ U k u # #
 O V - @† \ h u u h
 † h h=° kU° #-yu@o
 8 O o " = # - u O U o - u
 # °°#
 8 k k # - U U - u k o " - h)
 8 U h o h # o h 7 -) # O V o h K # k
 KK# \ V k - O
 8 MU - k u U 7 U k K =) k o V #
) K V K h
 8 h = @ h # 7) U y # O U
 K#OO
 8 VO) 8 #) h#k
 U
 8 " oo o U # K 8 K # O @† o # k o
 o 7 #
 °°#
 8 U U U 8 7 K) V " U h h † #
 7 h-)@uk@o
 8 7 # " h M = h # 8 " U U U # 8 " O k u " " Kh
 - k # 7 h # h) U
 8 - ° 8 Kk # U o o # O @
 h h
 8 - u VO o K " - 8 O U U O " V †) U U 8 † U
 U #) ° h U K
)) o u Kk) ou
 8 K M o = k k u KO - U # " K = 8 o) o
 U U
 8 o) K 7 O † U = † 8 \ V ° U - U
 O h h U O o " U
 σ'σ' @ σ j
 8 o 8 \ " o 7 " O h U O o
 8 a u - 8 V - - K 7 u U
 K E

= 8 o = M 8 - u O

= @U 7 V o # 7 " = U k o U U

= U =) † U u M M) o k

= M u k 8 U y " o k K = U † U h

@M U 8 U - U h =) U

= M) u " o 7 8 U o U 7 V O # U # U O

= h † o) 7 † k U 8 † " O o = K † u K u

V k h † h # 7 K † # U

= " # 8 K#U

= u @ = # @ K 8 h h

= o O " † h K O " K U) u o V o U = k M k

) u # 7 h K # U

= # K) MU @U u U † K 8 † h - h) U

= U U K 7 K U U K) \ O o u K U U u \ U o =

- - K o) † U K @

= U o u - o # V 8 † # h u @ 7 h U

= 8 † U O V † V - k U = O k O k K U # " O " O (E o) 7 K

† " O † V h - o E 7 k

K # 7

= o " 8 o K o =) 7 K # o k h

U

= 8 o = 8 V O

= k o M h o k o " = 8 o o V @ 7 - -

h o # 7 k

= † M " u k 8 K K # "

= K M o † # U V † E # U U M " = † " M o k 7 K #

h u

= o K #) U K 7 U # h # O U U # h) o)

) † 7

@)

= O V # h k # # V V " U

@ o V # #) 8 7 O O o # # U o U # = O) U " o

" # U o " h h k 7 U h h o)

o # @ o # #

@ 8 O 7 u @/ k V = t t o t # o" 8 - 8 7 #
 @ k @ = uk 7u U o

#

@ 8° # U O k M ") V # 8k)

) o U M o M @M) U V " M U r h
 # 7 V K 7

K ##U) o O- u8h' K" t U t # h) k V " k t h-
 U K7 U hK # o

) # 7 7 # # U U

K t k o VoO o K) K# k 7 # ")
 # t # 7 h h

M k) ok " K k oU o k 8 t M \ h M o " o MM
 V K V

M " o k KU " K U) # uM# " " U u O# @
 # 7 8 8 " o o#@V#-

M O \ U k h U o K - M

t O \ U - M) o = 8 o O o - " K k hU o K " "
 o k

M U " U h h

M - = = o k 8 O \ K k OO O = ° O - K U t K 8 t
 h- t o t k # K k

U O

M V O t \ # t # 8 U) @8 -
 K

7 o KK#7

M KV o OO K U @ U U h

M O t KM o) @o k k k V t " U t # U h
 # M # K#U # U

M O o K \ \ " ") t

M # M U 8 " # O 8 t " 8 U u u u U "U#
 h U

M V k U V t) K ")) k
 o CE

O U = 8o) t h- V U K # " @M # = U K7 o o
 o h o h o #

#

O U k t U # h U h U K7 M # = @ U o
 V o U

O U 7 O U K U) u" " t K # 8k # U O j U
 K CE

O) = U @ 7 " 8 @ - t " dU h

O k U 7) " @ = 0)) t = 7 U K7 h hO \

K #

O 7 " 7 y \ o)) O

O h O =) k 8 " O u o 7 - †

h U o

O kKo o o- o h " O = o

U °-U

O 7 U)) # # U o 8 o 8 - 8

u @ # #

°°# °oo-u 7-) 7 " 7 # "

) " 7 - " # °oo-uo 8k h=@ -°# Kh-8

O 7 u OV U - U)) # U 8 o 8 - 8 7

U 8 - # o k @

O hh " K " " U u M - K) M M 8° k " K t ° 8 8 o#

o 7) K U K7 U † K8 † h- h u @ k

V U o h V @)

O -U 8 h k t \ o" O U# - \ =# h U #7uk

O K'o O # O) - = O ")

h # # h' 7

O UKU U ° " - #) # U O u #

U o - #

O UKu U °) u" O U 7 # 8k # U O) V° kV

o V

O K† U U # † O M'h = = hU # - U - M o-

u U) - 8 h " K† y O 7 # M V U # ") †

h # M # o) U KV OV U U † K8 † h-

h -⊕

O K† U t) † t h- U U

Oh KK u # U k

#Uk

O † o # † O † † - ") Ok u u 8U #8 # † k

#

°°#

O h # u K† k)))

k K))k

O KU † h K= M † 8 o - o \ U U h))

K Uh °oo-u @ ° 8-o O k8- 7@yk- Kh-8

O K 8 K @k U \ @ h u 7 O U 8 h

O 8- h #Mb " h " k k u - h K h

U)) u" h o 7 KO# U O 8 - 8 ° V # #h ° U

h k

°°#

U † O k 7 o 8 # † " 7 =) @ = u uo " KM 7 " # = o

U 7 o † o U - o 8 U \ kh h

h

U \ o) o - o - " M 8o U 8 k #)
 #=-U\ u=-k h
 U U M h h #
 U o hMM o MU K7 # @
) @ K # U
 K#U
 U O O" - - 7 8 U - " † U
 U # † O # k K# 7 † o K
 U " M) h" M U † @ K#7 h
 hhyO
 U # 7 k Mo h U K) U - 7 - u = ou O - K u o V # # #
 KU # U O U = h #U k KU o O o hk # 8k # # #
 7 u # k 7 # 7 @ h u # 7
 k##U \#
 U K7 # k KO 7 U # † h- #
 h k o O o " "
 kou"
 U -) 8 uU # - U k u KO @ u) o)
 k 8 \ K # U
 K#U
 U - 8 - 8 " 7 O U † K8 † h- # - U k u KO
 # °°#
 U - 8 - 8 " U K" 7 O # - U k u KO u
 # °°# °oo-u 7 °) " 7- °
 "7)") °oo-uo 8k h=# - #
 K#8
 U # k # k - j K u U # O) V U 8 h K - \ # † # =
 " k o # k @ k - † # =
 # °°#
 U k k k k † o h O U = @ -
 K # 7
 U - 8 MV " k k U U V " U " U h
) * ky K h o
 U U u " 8 h 7 O 8 @ k 8 \) # u # # o u h U
 # 8 " Kh k
 o @ K
 U 7 " 88) " @ = o - 8 =) " o U U h hO
 = uk O = 7
 U † o u o = 7 ho 7 °ho 7
 U k" # 7 h h @ u
 V U o u U U M o U " h - = = 7 " = =
 @ K U U
 V - Ko U " # † KU 8 #- k K U K- #
 U U

V M8 V 8 k o h " 8 t M " 7 @ " K h o

V t t Mk o) t h

V oh) u)

V oU M Oo = MK o KV O V @ "hU@

V † # h " " UK † Kk M = o " K " U " M ") " " # " K
 " h #) # U # k) k) ho 7 U 7 V 7 V 7 ut 7
 k 7 V 7 " 8 KO 8 UK 8 " 8 8 = 8 M 8 K o 8 k = " =
 = =) = = = K = o K KM V M = M MM u M o M
 k M u O " O Kh O † O " O # U † = U 8 o U " O U ' U U U
 U U @ U o U O \ V o h @ h U h U h # h " O " U
 k - k V k U k y k = k 8) # ok) k h KU
 k #U k o o o O o U o 7 K# o) o Mo k o o u
 U u 7 u 8 " # k †) † K † \ † K" K= 7 # 8 K- MU
 U = V " ")) † 8

V V " U M7 o M M o))

V # h)) k

V - @ - o @ V

U o U-uk@o

\ M8 \ 7 U t " t @8 \ 88 M) k M'o U
 u u y y8-V-
 "@@7kU°u@o"uo

\ kh = =8 7 # h # " @
 \ - OU M k K= # o= " u # @)
 u"O 8@

\ o# #) h' o U o h V u

h " 8 M " U 8@ 7) O # @ #7uk"-V°#- O7 j U

h 8 k U 7 - # U k U 8 7 U 8 K @ o

h K- † " 8 o h # O U K8 O M) - M o O k # h K
 # "

h k° k oU) U o h 8 " MM = t o " k # " U
 † k # @ @ k U
 h h # # #
 h k° k oU U K7 U K† # V " = o # h #
 k #

h " k 8 " @ " U o O k = @ 70 h
 O @

h U U O U # h \ = M 8 #7uk O #7 =
 K # 7 KK#7

h # " O 7 O 8 K # K

h O U # h # V - # M h U O u
 @ 8 KU -- 8@

h) o U V o

h " u ĆĆĆ = UK U = k o U u \ M h = † O # O =
 = h - U † " " = k o) # h " U † UK - K k V°uyk-

h u 8 o o 8 k " Kh o o ĆĆ

h U # K # " #)) O o 7 " Kh h U # K # " #)

) O o 7 " Kh \

h M = - M K = U U h U MK " ") U # # U - \ K † U U
 # U k - h U - V 8 k

7 uk " " Q \)

h O " # 8 u h 8 O O O † U U O o - " #
 @ # # h uk O = o u 7 @ o) 7 k k

o " #

h k - U # " O 8) 7 † M k # 8 O \ U " # # h 8
 k O u U u @

K # 7

h † † # U O 8) - U # u U

-

k 7 u o

k U \ 8 " U U M k) 7 h

@

k 8 h k " @ " - k h k U K †) Ć U @ o k
 o = † † h 8 O " Kh 8 o # o k K " @ U 8 U u
 O o OU h K o # " u M # K U † # O K V U O
 U @ O U † = o) = 7 O o O

UU' U' Ć

k " " † K U O - K - o) h O KK u - † † @ † - =
) u " # o @ # 7 h

° #

k 7 " o # k o U 8 # = j O " # V k) h

k O 7 O O h O U U O h #) O ok o " - o U

U

k K K Ć - j - O) 7
 uk 7 u K = U

k K # U V " - # † O U KU h UK 8 O U # o † o o
 U K - h #) U U h K)) o u @

K) au

k Kk k KU M " o V \ k k 8 - - K O o @ h V # KO)
 U O @ U # # 7 o u O # @ # 7 8 # #

) V o O # @ V # -

k U \ " @ U - # - U u k †
 h K 7

k U \ o) K # U V O K U @ U

o #

k u KO k u KO " K 8 K M " o = k = 8 o) # - U
 o U U

k U 8 #h # U h - U Oo h 7 7
 #7uk = U

k 8 o o @ # O Kk KU 8 oOV 8 U † " Kh
 o o h M 7 k U

k oU U o o -K # 7 V-KU

k 8M8 k o VK u o
 h o Khkk†

o 7 k O U " O v@- @ " - k †) #7uk U u h @
 @ # 7 #

o k° h o † 7 K# † K V u o U

o k° † #U = K = o" = † M # = † h 8 o M o " u K" †
 KM o o 8 u 7 K# h

o 7 V o # " k)V° h V
 o U h " O 7 # hV° o
 U #

o - † " - " Kk # M# K#)# # k 7 MM # M o U u U "
 " O # O o O - u V 7 U u h O o " u u † K † k u
 " † h M) o ou) V

o) # =) - \ = " #) @ o 8 o U #- " hK h
) h u 7 @ # 7 U

o † O # 7 # u # - # 7 @ o @ #7uk 8
) 8 8-V-o

o O 8 " o # 7 h o † " † o M U " = 8 O 8 M "
 o o o U u M' h o K #

o) U " O U h - o 8 K o U U o = " 8 O) M
 h # U h) K # @# K h) O O @ o U U † U u # 8 U U
 u K y † U K 8 u † KK) k 7 = k † = # \ °
 h o O

o k o O M " = U = " = 8 8 7 = " 8 = o U # k -
 h U o K h o M) o) - V o - " K = 7 U K 7 k

o uk - " h o KU 8 k K 7 U # - h " k "
 y k - y M #

o U h O = U 7 =
 o° k " K" @ \ k 8

o V) o † † # V) h)) " h " K " h o
 K ho

o M = k O K = O' O O K K # " h- h-8
 K # k

o # M k M V U 8) # @ U k U
 † k " # @ # = o) @ "
 # °° #

o) " M 8 # oh M - " # 7 #

o " h " " o " U h " u
o Kh- o) " 8 K 8) † V h o † 8 K U h " K
o # U # O # O † k o k o U Oo U # h o oU k 7 " #U
o # # 7 V-KJ V- KU V-KJ
o h- # oU u M " o 8 M 8=K O = " M # = U † K 8 †
h- u 7 # @ # k U u hO o \ V-
o - O = " O " M K k " KU U † K o k " U -) " k u U † K 8 †
h- k o o k U hO oU
o - † ") h u 7 - 7 (E = 7 o - O 7 k O " # h
o) " U) M † U K \ # 7 O) V - K U
o K " M # MK K h k O K h o † K " k o # o
= h U
o KK h h) # M U u V U
o U # o # y U U u @ U #
u #U # K =) † U
u (E- ") K V † j " † K " # OK j O u † (EK - = † (E # O " K u" (E
" hO h-8' #
u @ K V (W o
h U U V o o o h U k 8 y # " \ U
u u M KM o O o o V o)) h -
u OV o \ UK O U † # V o 7 h V # u U)
) " 7 V #) # u
u K V V o " K " o † V h h K@U # Ku † k \ #
" K
u K † V h U # Ku V OM " k h K@# KK 8 Kk h u 7 †
k \ @ † h " @ h " #
u † h h-8 ")) k
u † h o o (E K # k
u " U k U k -) # U U h K - U K h -) O
U † h 7 u # \ " o) U U - 8 " = O M # " O 7
h O o U " U # " u # # - U 8 K 8 K = o
= † M o O \ U K 7 y " K h 8 O 7 # -o#U@ -#UU
" o 7 # U @) o
u U " O UK 8 " † # U " - U U #) # U O h)
) o u (K) ou

u V " h) K " † V) ° -) ° u o y o

hV°o

y " K " KU " o)) † 8 " = O MO 7 # O k - U h † h -

† " 7 " U " U # " k " " # " o " " k KU "

) # K # - # # - U) 8 7 K 8 K h 8 K =

† K = k = # h M ## M V M " KO # O u O KO \ U

KU \ U K7 h Ok h k U k - k U o U o) # o K

o " † U K8 u † # # \ ")

-o#U@ -#UU -ko' # U @

† K8 o 8° @ U

†) 7U # " V @U " k@" uo° o u# o Ukk " # † U # O - U

@

)

oyhhO 7@ @k) ° oU) \#Æ

† - O M† h- #

† h- # U † K8 U K7 # @)

† h- = oK U † K8)) † h

† h- o - M 8= U - U † K

† U k k U u U K " K h

@ U #

† # 8 kU @ - 8 \ " h @h) h K o " 7 U

K k @

Kk@U

† #U † K = K U U M o " V 7 k o M 7 K# o k°

\ # o U

† O° 8 V° k U # " 7 7 8 "

† O7 U Oj j # # k " u U

° uU

† j " Mu " M" kK - U)) o # V

h

† Æ# j - Æk Æ- ÆU O O = o Æ7 Æ U @ K V

† " M Æ† - Æ" ooO" # 8 o O o † o \ o \ M Ko " " - hOk

@/o

† " " K) U

† † V h #

† h= @ h

† - K o K= M o= # U K " o M U V O † 8 O M y " o U 8 o oh

M U U UU' U'Æ

8 M'M M'8 M'M # \ " u 8 # V o # -

""

' K' @ K V ko' ... u ... o ... # O) y V "))
K # U t h #U
' # M u k @ @ # 7 ") @ = U
- " \ U) 7 k k U = h V " Kh = U k @U o U
- V K @ h = KK@=
- " O o O # 8 u o (E7 " - o
- K K O O o -) " KU k 8 - " K t h- o o-) U
- " 7 # h t V -U
- K O O O j " O t K u # h u
- O - h # - # o K u 7 = U 7 - K O k h
V " Uh-8h#O h-@ # @ K
- o o o o O 7 @U o
- " V U U U @ #))U@ 7 k h h
- k k k " M " Kh 8 o) U
h o 7 U

Anexo

Medios y soluciones

Buffer de lisis

u = # = U
 V # U
 -) u = U
 o) o

Buffer de siembra para ADN, 6X

8

Buffer PBS pH 7,4

V # U
 M# U
 V =h\ U
 M# h\ U

Buffer TE pH 7,4

u = # U =
 -) u U

Medio agarizado Czapek (CZA)

V V\
 M=h\
 M#
 U o\ = \
 7 o\ = \
 o
 #

Medio agarizado eritritol (ECA) con cloranfenicol (Hoog y Haase, 1993)

U O V ")) -- yy
 U
 #

Medio agarizado extracto de malta (MEA)

-
 h
 8

Medio agarizado papa glucosado (PDA)

h
 8

Medio agarizado Sabouraud glucosado (SDA) suplementado con 500 mg/l de cloranfenicol

h
 u
 8

.

Medio extracto de levadura y dextrosa (YED)

-
)
\

Medio extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD)

-
h
)
\

Medio fluido nasal simulado (NSF) pH 5,7 (Carvalho y col., 2013)

U @ U NB
V #
M#

° = V \ = U

Medio fluido pulmonar simulado (SILF) pH 7,40 (Arora y col., 2015)

U #
V #
M#
V =h\
V =#\
V o\

= V \
#

Medio Luria Bertani (LB) pH 7,5

u
-
V #
\

Medio mínimo (MM)

u # = V \ U
8
o
o

Medio RPMI (2x) CLSI

khU @
U \ ho

Medio semiselectivo para *Scedosporium* SceSel+ (Pham y col., 2015)

-
U
-
h
M# h\
U o\ = \

 #
 o
)
 "
 °
)
 #
 #

Medio SOC

u
 -
 8 U
 V # U
 M# U
 o U U

Solución de elementos traza 20 X (Solución TE de Hunter modificada)

- o\ = \
 = "\
 U # = \
 7 o\ = \
 # # = \
 # o\ = \
 V= U \ = \
 -) u° V -) u° = \

Solución de sales de Aspergillus 50X

M#
 U o\ = \
 M# h\
 o
 #oh

Solución Mg²⁺ (2M)

U # = \
 U o\

Números de acceso de las secuencias utilizadas.

Tabla 8.1 – V *GenBank*

Género	Sección/Complejo	Especie	<i>benA</i>	<i>camA</i>
		<i>aflatoxiformans</i>	U 8	U 8
		<i>alliaceus</i> (syn. <i>A. albertensis</i>)	-7	-7
		<i>arachidicola</i>	-7	-7
		<i>aspearensis</i>	U 8	U 8
		<i>austwickii</i>	U 8	U 8
		<i>avenaceus</i>	7K	7K
		<i>bertholletiae</i>	U 8	UV
		<i>caelatus</i>	-7	-7
		<i>cerealis</i>	U 8	U 8
		<i>coremiiformis</i>	-y	-y
		<i>flavus</i>	-7	-7
		<i>hancockii</i>	U " 70	U " 70
		<i>krugeri</i>	UM	UM
		<i>lanosus</i>	U 8	U 8
		<i>leporis</i>	-7	-7
		<i>luteovirescens</i>	U 8	U 8
		<i>magaliesburgensis</i>	UM	UM
	Flavi	<i>texensis</i> (= <i>A. minisclerotigenes</i>)	-7	U 8
		<i>mottae</i>	=U	U 8
		<i>neoalliaceus</i>	U 8	U 8
		<i>nomiae</i>	-7	-7
		<i>novoparasiticus</i>	U 8	U 8
		<i>oryzae</i>	-7	-7
		<i>parasiticus</i>	-7	-7
Aspergillus		<i>pipericola</i>	U 8	U 8
		<i>pseudocaelatus</i>	U 8	U 8
		<i>pseudonomiae</i>	-7	-7
		<i>pseudotamaris</i>	-7	-7
		<i>sergii</i>	U 8	U 8
		<i>sojae</i>	MK	MK
		<i>subflavus</i>	U 8	U 8
		<i>tamaris</i>	-7	-7
		<i>togoensis</i>	7K	7K
		<i>transmontanensis</i>	=U	=U
		<i>vandermerwei</i>	-7	-7
		<i>aculeatinus</i>	-y	-y
		<i>aculeatus</i>	=-	-7
		<i>brasiliensis</i>	7K	7V
		<i>brunneoviolaceus</i> (syn. <i>A. fjiensis</i>)	-7	-7
		<i>carbonarius</i>	-7	-7
		<i>costaricensis</i>	7K	7V
	Nigri	<i>crassihyphae</i>		
		<i>ellipsoideus</i>		
		<i>ellipticus</i>	-7	-7
		<i>eucalypticola</i>	-y	-y
		<i>floridensis</i>	=-	=-
		<i>heteromorphus</i>	-7	-7
		<i>homomorphus</i>	-7	7V

Género	Sección/Complejo	Especie	benA	camA
		<i>ibericus</i>	-7	-7
		<i>indologenus</i>	"	"U
		<i>japonicus</i>	=-	7V
		<i>labruscus</i>	M	M
		<i>luchuensis</i>	KE	KE
		<i>neoniger</i>	7K	7K
		<i>niger</i> (= <i>A. lacticoffeatus</i>)	-7	-7
		<i>piperis</i>	7K	-y
		<i>saccharolyticus</i>	=U	=U
		<i>sclerotiocarbonarius</i>	-y	-y
		<i>sclerotioniger</i>	7K	7V
		<i>serratalhadensis</i>	Q	Q
		<i>trinidadensis</i>	=-	=-
		<i>tubingensis</i> (= <i>A. pulverulentus</i>)	-7	-7
		<i>uvarum</i>	"U	"U
		<i>vadensis</i>	"	7V
		<i>welwitschiae</i>	UV	M
		<i>acrensis</i>	Q	Q
		<i>arcoverdensis</i>	"	"
		<i>assulatus</i>)j	UV
		<i>auratus</i>	-7	-7
		<i>aureolus</i>	-7	-7
		<i>australiensis</i>	-7	-7
		<i>bezerrae</i>	UM	UM
		<i>brevipes</i>	-7	-7
		<i>brevistipitatus</i>	=7	=7
		<i>caatingaensis</i>	"	"
		<i>conversis</i>	=7	=7
		<i>curviformis</i>		
		<i>delicatus</i>)j)j
		<i>denticulatus</i>)j)j
		<i>duricaulis</i>	-7	-7
		<i>elsenburgensis</i>	UM	UM
		<i>felis</i>	UV	KE
Fumigati		<i>fennelliae</i>	"7	-7
		<i>fischeri</i>	-7	-7
		<i>frankstonensis</i>	M	M
		<i>fumigatiaffinis</i>)j)j
		<i>fumigatus</i>	-7	-7
		<i>fumisynnematus</i>	"	"
		<i>galapagensis</i>)j)j
		<i>hiratsukae</i>	"7	"
		<i>huiyanae</i>	"	"
		<i>laciniosus</i>	"	"
		<i>lentulus</i>	-7	-7
		<i>marvanovae</i>	=-	=-
		<i>multiplicatus</i>)j)j
		<i>neoglaber</i>	-y	-y
		<i>nishimurae</i>	"	=-
		<i>novofumigatus</i>)j)j
		<i>oerlinghausensis</i>	M	M
		<i>papuensis</i>	"	"
		<i>pernambucoensis</i>	"	"

Género	Sección/Complejo	Especie	<i>benA</i>	<i>camA</i>
		<i>pseudoviridutans</i>	KJ914690	KJ914708
		<i>quadricinctus</i>	EF669806	EF669875
		<i>shendawei</i>	AB488754	AB488762
		<i>siamensis</i>	AB646989	AB776704
		<i>similanensis</i>	KM095494	KC920701
		<i>solicola</i>	MN969370	EU220284
		<i>spathulatus</i>	EF669803	EF669872
		<i>spinosus</i>	EF669844	EF669914
		<i>stramenius</i>	EF669840	EF669910
		<i>sublevisporus</i>	AB488759	AB488767
		<i>takadae</i>	LC367646	LC367657
		<i>takakii</i>	AB787221	AB787566
		<i>tasmanicus</i>	AY685180	AY689367
		<i>tatenoi</i>	EF669838	EF669908
		<i>thermomutatus</i>	EF669805	EF669874
		<i>tsunodae</i>	AB488755	AB488763
		<i>tsurutae</i>	AB488760	AB488768
		<i>turcosus</i>	DQ534143	DQ534148
		<i>udagawae</i>	LT796063	LT796064
		<i>unilateralis</i>	EF669852	EF669923
		<i>viridutans</i>	EF661252	DQ534162
		<i>waksmanii</i>	EF669794	EF669863
		<i>wyomingensis</i>	HF933359	HF933397
		<i>alabamensis</i>	KP987049	EU147583
		<i>allahabadii</i>	EF669531	EF669559
		<i>ambiguus</i>	EF669534	EF669564
		<i>aureoterreus</i>	EF669524	EF669538
		<i>bicephalus</i>	LT601381	LT601382
		<i>carneus</i>	EF669529	EF669569
		<i>citrinoterreus</i>	LN680657	LN680685
		<i>floccosus</i>	FJ491714	KP987066
	<i>Terrei</i>	<i>heldtia</i>	MK450981	MK451518
		<i>hortae</i>	FJ491706	KP987054
		<i>iranicus</i>	KP987045	KP987060
		<i>microcysticus</i>	EF669515	EF669565
		<i>neoafricanus</i>	EF669516	EF669543
		<i>neoindicus</i>	EF669532	EF669574
		<i>niveus</i>	EF669528	EF669573
		<i>pseudoterreus</i>	EF669523	EF669556
		<i>terreus</i>	EF669519	EF669544
		<i>abietophila</i>	JN112423	JN112425
		<i>angulospora</i>	JN112426	JN112427
		<i>aquamarina</i>	JN112434	JN112435
<i>Exophiala</i>		<i>arunalokei</i>		
		<i>asiatica</i>		
		<i>attenuata</i>		
		<i>bergeri</i>	EF551497	
		<i>bonariae</i>		
		<i>brunnea</i>	JN112442	
		<i>calicioides</i>		

Género	Sección/Complejo	Especie	<i>benA</i>	<i>camA</i>
		<i>campbellii</i>		
		<i>cancerae</i>	JN112444 KF928567	
		<i>capensis</i>		
		<i>castellanii</i>	KF928586 JN112506	
		<i>cinerea</i>	MG012745 MG012746	
		<i>clavispora</i>	KP347931 KP347932	
		<i>crusticola</i>		
		<i>dermatitidis</i>	KF928572 MF320217	
		<i>dopicola</i>		
		<i>ellipsoidea</i>	KP347921 KP347919	
		<i>embothrii</i>	MW055976	
		<i>encephalarti</i>		
		<i>equina</i>	JN112462 JN112461	
		<i>eucalypti</i>		
		<i>eucalypticola</i>	MH108039	
		<i>eucalyptorum</i>	KC455228	
		<i>exophialae</i>	EF551499 EF551500	
		<i>frigidotolerans</i>		
		<i>halophila</i>	JN112473	
		<i>heteromorpha</i>		
		<i>hongkongensis</i>	JN625236	
		<i>italica</i>		
		<i>jeanselmei</i>	EF551501 EF551502	
		<i>lacus</i>		
		<i>lamphunensis</i>	ON544227 ON544228	
		<i>lapidea</i>	ON544232 ON544233	
		<i>lavatrina</i>		
		<i>lecanii-corni</i>		
		<i>lignicola</i>		
		<i>macquariensis</i>	MH297438	
		<i>mali</i>		
		<i>mansonii</i>		
		<i>mesophila</i>	JN112476 JN112478	
		<i>moniliae</i>		
		<i>nagquensis</i>	KP347924 KP347923	
		<i>nidicola</i>		
		<i>nishimurae</i>	JX482552	
		<i>oligosperma</i>	EF551508 EF551507	
		<i>opportunistica</i>	JN112486	

Género	Sección/Complejo	Especie	<i>benA</i>	<i>camA</i>
		<i>palmae</i>	KY689829	
			KY689828	
		<i>phaeomuriformis</i>		
		<i>pisciphila</i>	JN112493	
			JN112496	
		<i>polymorpha</i>		
		<i>prostantherae</i>		
		<i>pseudooligosperma</i>	MZ127830	
			JN112497	
		<i>psychrophila</i>	JN112498	
		<i>quercina</i>		
		<i>radicis</i>	KT723463	
			JN112499	
		<i>salmonis</i>	KF928562	
			ON544238	
		<i>saxicola</i>	ON544239	
			ON544240	
		<i>siamensis</i>	ON544241	
			HQ535833	
		<i>sideris</i>	HQ535834	
		<i>spartinae</i>		
		<i>spinifera</i>	EF551516	
		<i>tremulae</i>	KT894148	
		<i>xenobiotica</i>		
		<i>angustum</i>	AJ889604	
			AJ889584	
	<i>apiospermum</i>	<i>apiospermum</i>	MT813170	
		<i>boydii</i>	AJ889590	
		<i>ellipsoideum</i>	AJ889595	
		<i>fusoideum</i>	AJ889601	
<i>Scedosporium</i>		<i>americanum</i>	MT813192	
			MT813171	
		<i>aurantiacum</i>	AJ889597	
		<i>cereisporum</i>	KJ599659	
		<i>dehoogii</i>	KT163401	
		<i>desertorum</i>	AM409106	
		<i>minutisporum</i>	AJ889592	

