



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>















#

-

*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"

"Uh"

"V)

°V@° V O @ O

°V\†°

°kV kV°

°kV °kV

°U## *American Type Culture Collection*

"uh"

#° o

#7uk

#@

#@E #@ E

#O@*Clinical and Laboratory Standard Institute*

#U #

#- #

)

)O

)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**





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

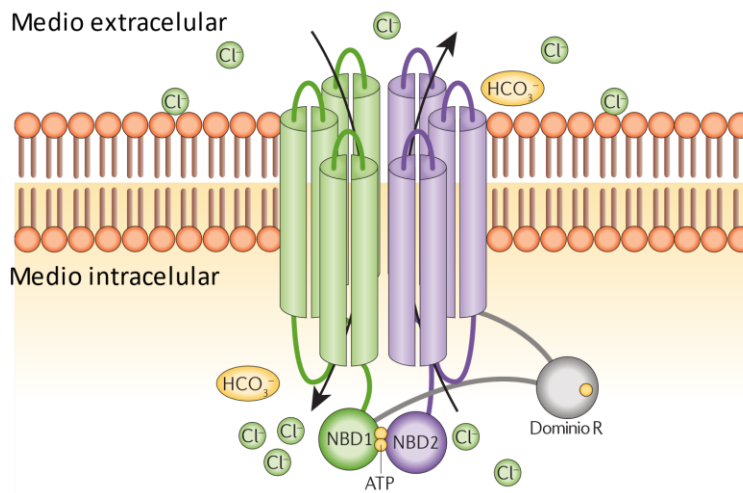
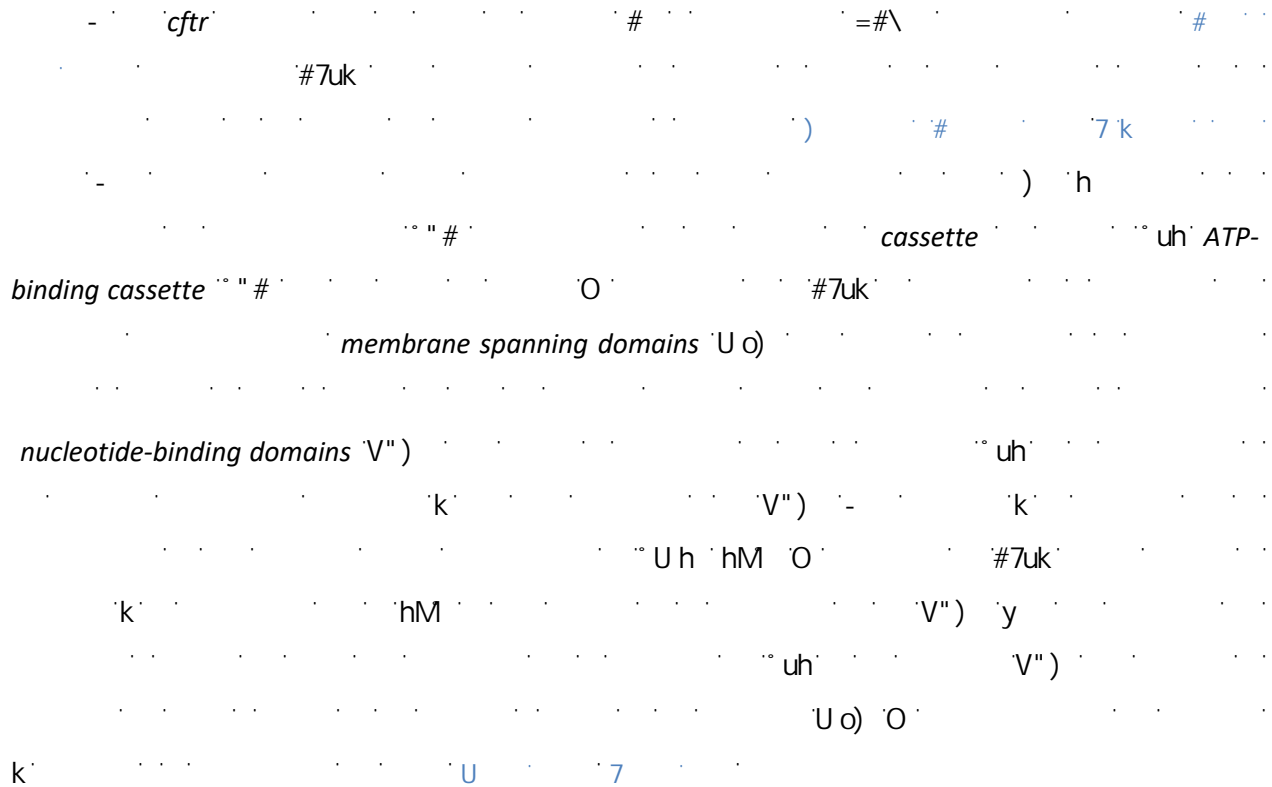


Figura 1.1 –

Diagram illustrating the structure and function of the CFTR protein. The protein is shown as a multi-pass transmembrane protein with seven transmembrane domains (TMs) spanning the lipid bilayer. The NBD1 and NBD2 domains are located intracellularly, connected by a linker region. The R domain is also intracellular. The C-terminal region is extracellular. The diagram is labeled with 'binding cassette', 'membrane spanning domains', and 'nucleotide-binding domains'.

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







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 # #

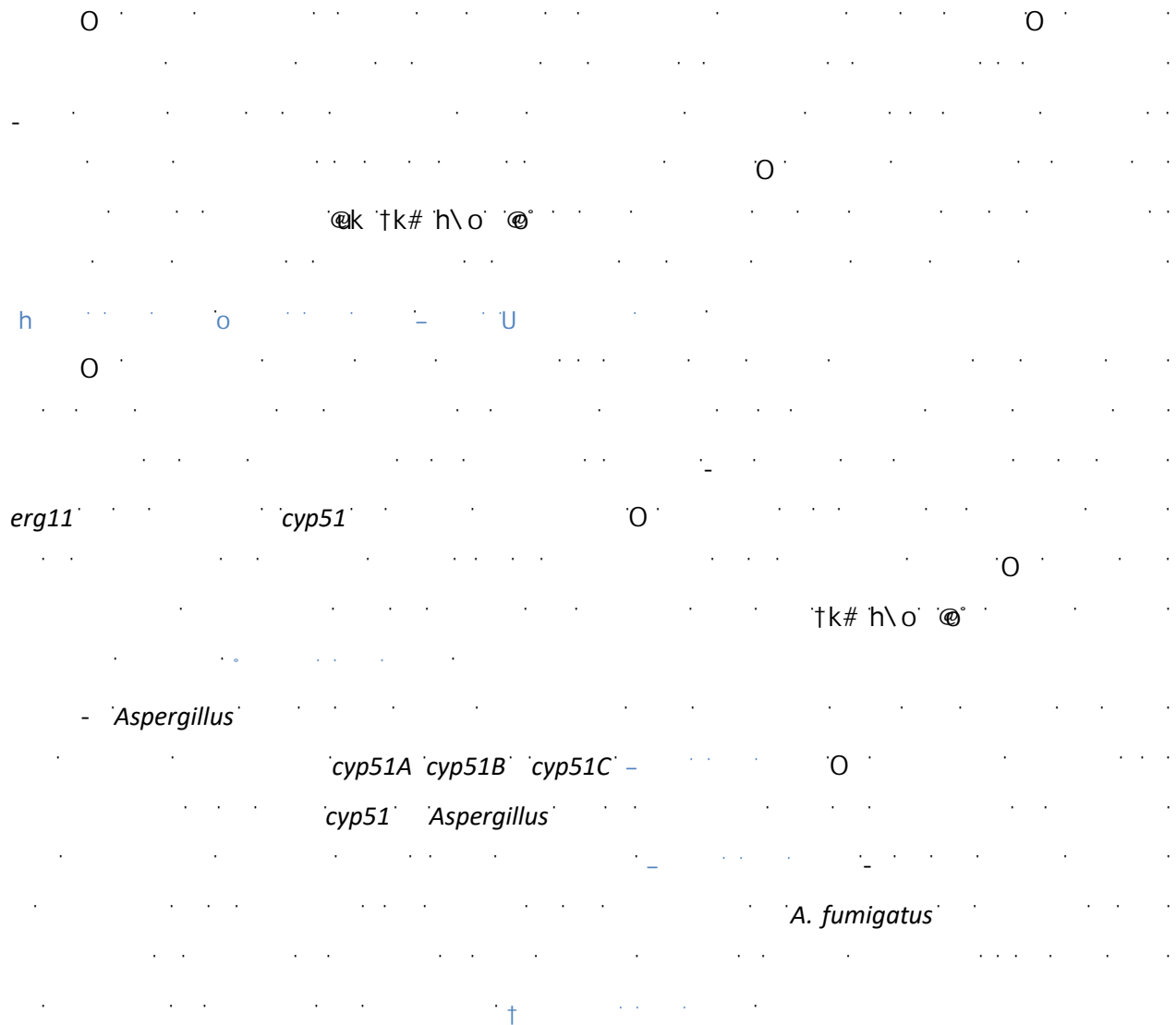
U " h° Scedosporium

Aspergillus  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis  
E. dermatitidis

## 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

U

o

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"> <li>• Alta biodisponibilidad</li> <li>• Efecto rápido</li> <li>• Menor riesgo de efectos secundarios sistémicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitada capacidad de carga</li> <li>• Necesidad de inhalación adecuada</li> <li>• Mayor riesgo de infección</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evita el primer paso hepático</li> <li>• Menor costo de administración</li> <li>• Mayor adherencia al tratamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificultad de formulación</li> <li>• Necesidad de dispositivos de inhalación</li> <li>• Mayor riesgo de irritación local</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor estabilidad</li> <li>• Menor riesgo de contaminación</li> <li>• Mayor vida útil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de capacitación del paciente</li> <li>• Mayor riesgo de pérdida de fármaco</li> <li>• Mayor riesgo de efectos locales</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor riesgo de resistencia</li> <li>• Mayor comodidad para el paciente</li> <li>• Mayor precisión de dosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de dispositivos de inhalación</li> <li>• Mayor riesgo de irritación local</li> <li>• Mayor riesgo de efectos secundarios locales</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor estabilidad</li> <li>• Menor riesgo de contaminación</li> <li>• Mayor vida útil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de capacitación del paciente</li> <li>• Mayor riesgo de pérdida de fármaco</li> <li>• Mayor riesgo de efectos locales</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor riesgo de resistencia</li> <li>• Mayor comodidad para el paciente</li> <li>• Mayor precisión de dosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de dispositivos de inhalación</li> <li>• Mayor riesgo de irritación local</li> <li>• Mayor riesgo de efectos secundarios locales</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor estabilidad</li> <li>• Menor riesgo de contaminación</li> <li>• Mayor vida útil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de capacitación del paciente</li> <li>• Mayor riesgo de pérdida de fármaco</li> <li>• Mayor riesgo de efectos locales</li> </ul>

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"

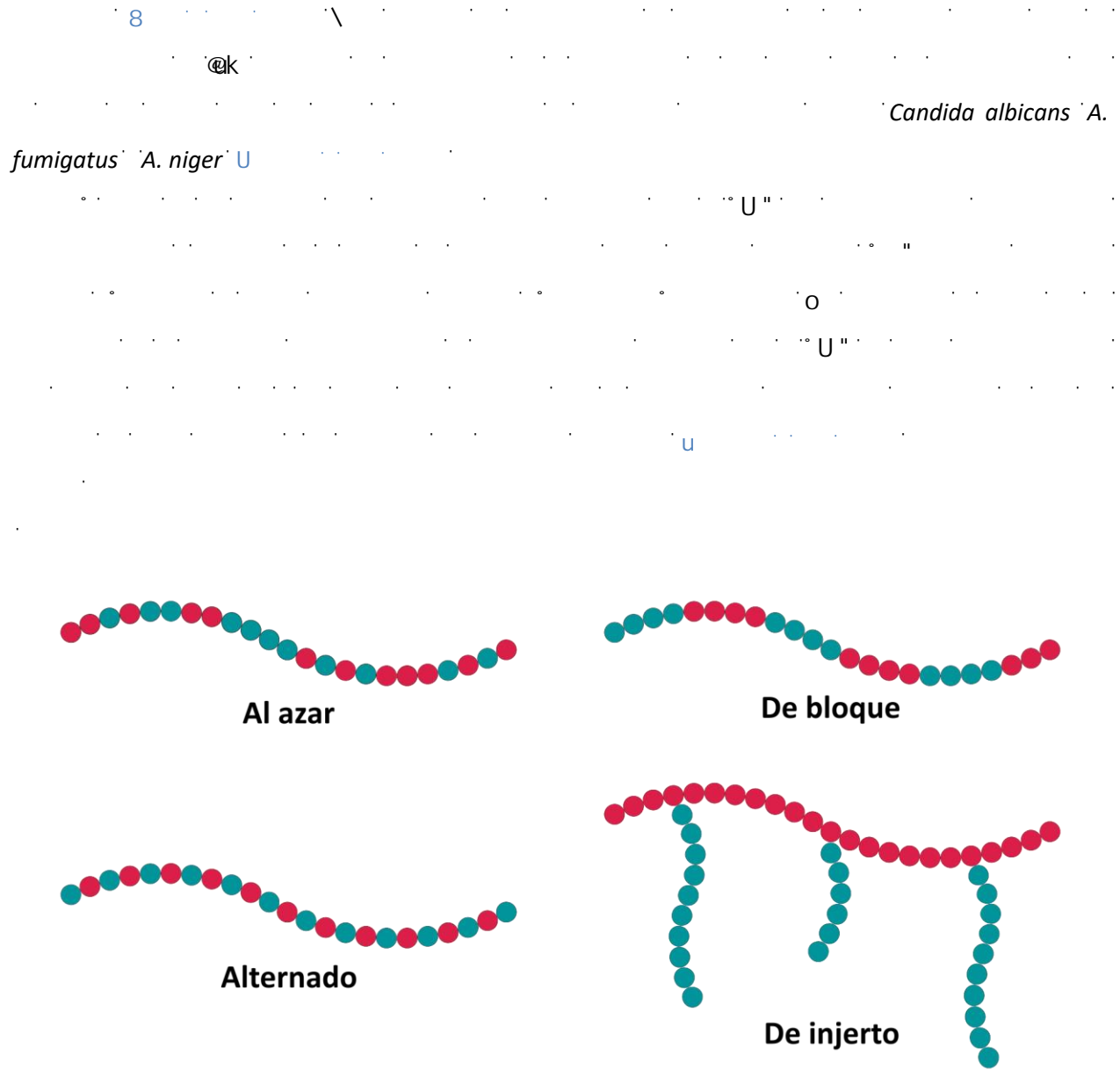


Figura 1.2 – #

M

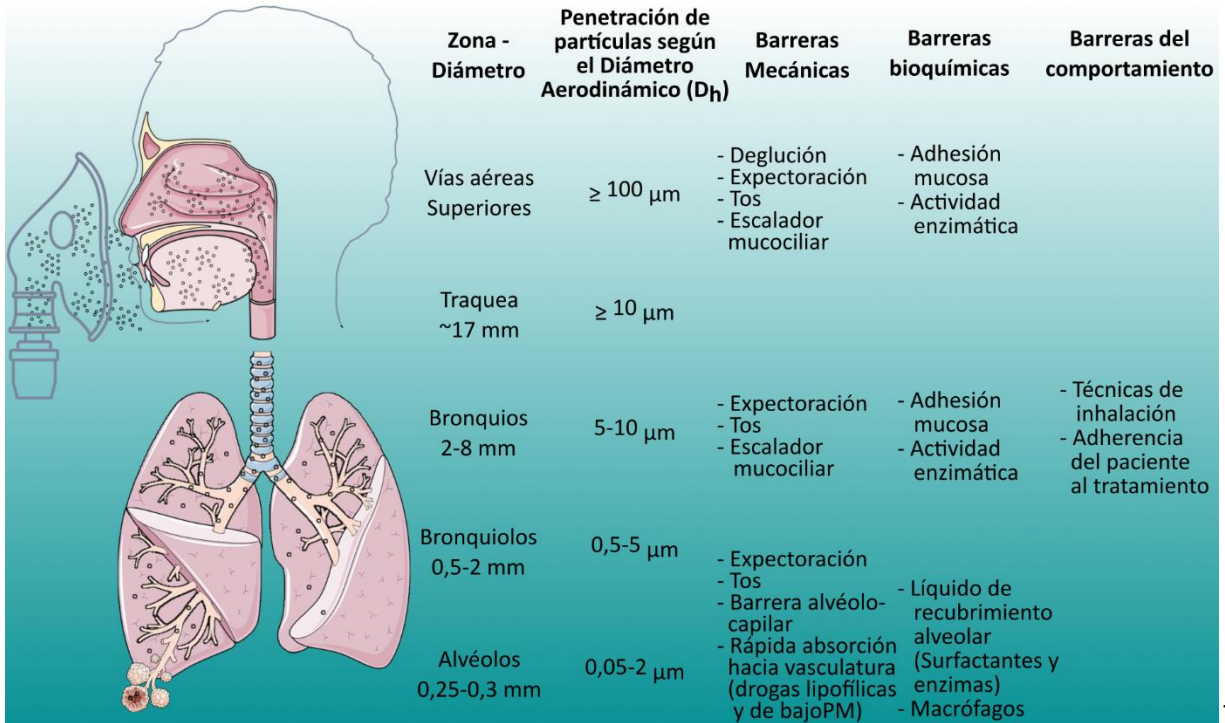


Figura 1.3 --

#

h

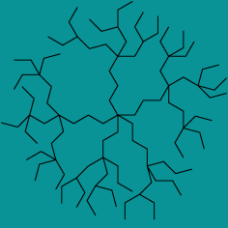

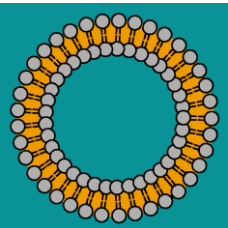
#

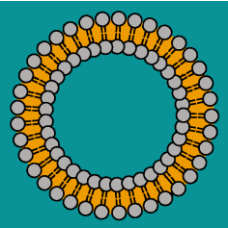
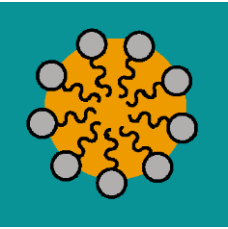
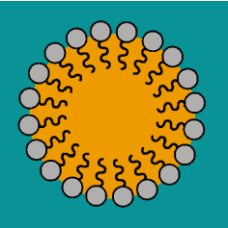
Tabla 1.2 – #

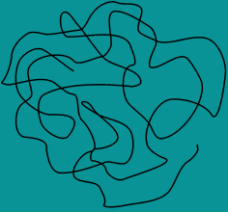
Ventajas	Desventajas
<p><b>Para direccionamiento pulmonar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Á °</li> <li>Á )</li> <li>Á @</li> <li>Á "</li> <li>Á h</li> <li>Á U</li> <li>Á 8</li> <li>Á )</li> </ul>	<p><b>Para direccionamiento pulmonar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Á #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

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

Tabla 1.3 – #

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

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

Estructura esquemática	Nanotransportador	Características principales	Ventajas	Desventajas
	<p>Nanopartículas poliméricas</p>	<p>Á<sup>+</sup></p> <p>Á<sup>o</sup></p> <p>hO<sup>+</sup></p> <p>h-@</p> <p>hO</p>	<p>Á<sup>7</sup></p> <p>Á<sup>o</sup></p> <p>Á<sup>n</sup></p> <p>Á<sup>n</sup></p> <p>Á<sup>o</sup></p> <p>VG<sup>#</sup></p> <p>Á<sup>U</sup></p> <p>Á<sup>n</sup></p>	<p>Á<sup>o</sup></p> <p>Á<sup>O</sup></p> <p>Á<sup>V</sup></p> <p>Á<sup>V</sup></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 7j
- 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 M8 # °) V #

**2.1.2.2 Extracción de ADN de hongos levaduriformes**

o  
 y7# = \ u  
 buffer U  
 M8 ° 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#° ° #8°  
 u88 camA 7 primers  
 ° 88u° ° #° ° u# 88u° 8#u° 8#u° u#° ° ## #u#° 8u° 8u° ° ## #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  
 #

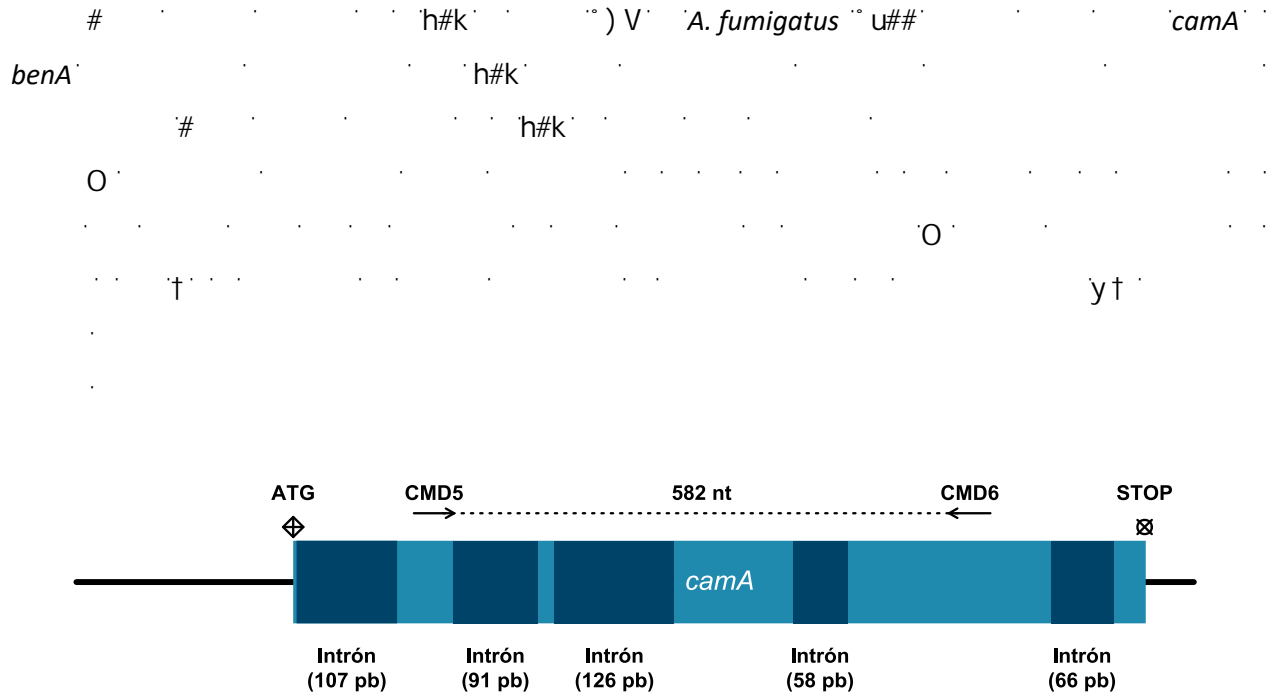


Figura 2.1 – Estructura del gen *camA* de *A. oryzae* (A. oryzae k@)

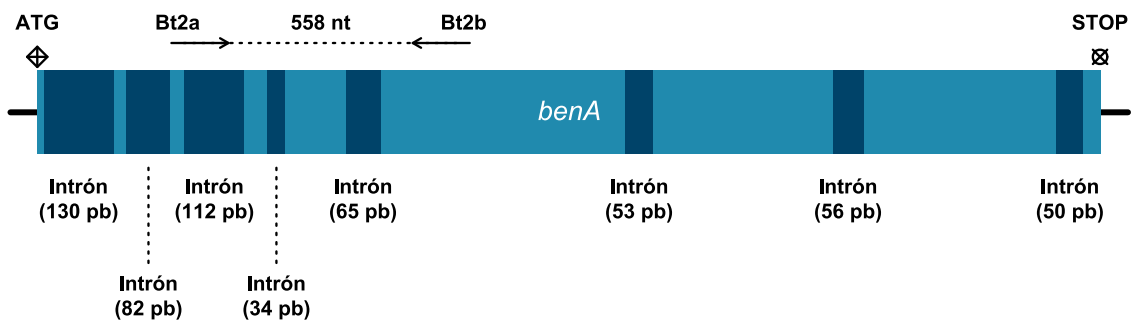


Figura 2.2 – Estructura del gen *benA* de *A. fumigatus* (A. fumigatus V)

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

o  
 o primers  
 camA benA  
 " ) 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@

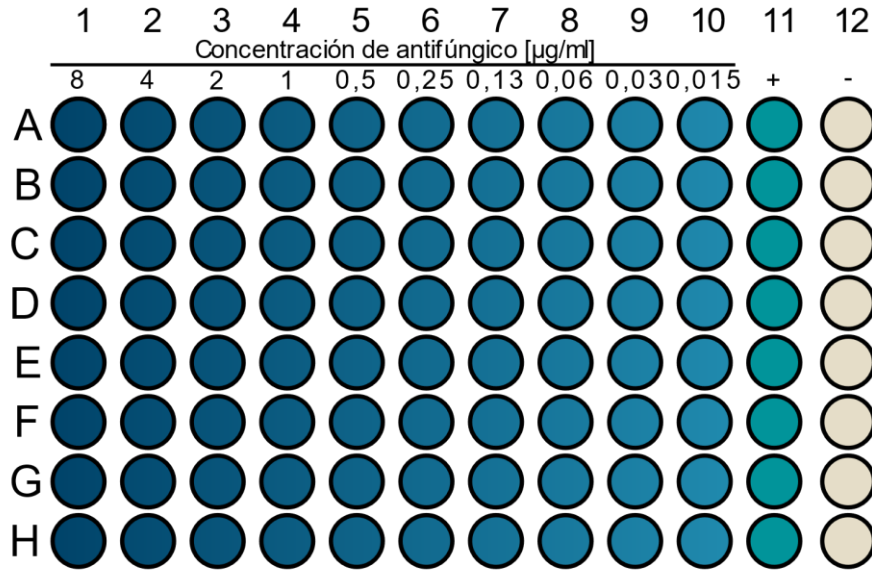


Figura 2.3 --

# # # # #

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>	.	.	.	.

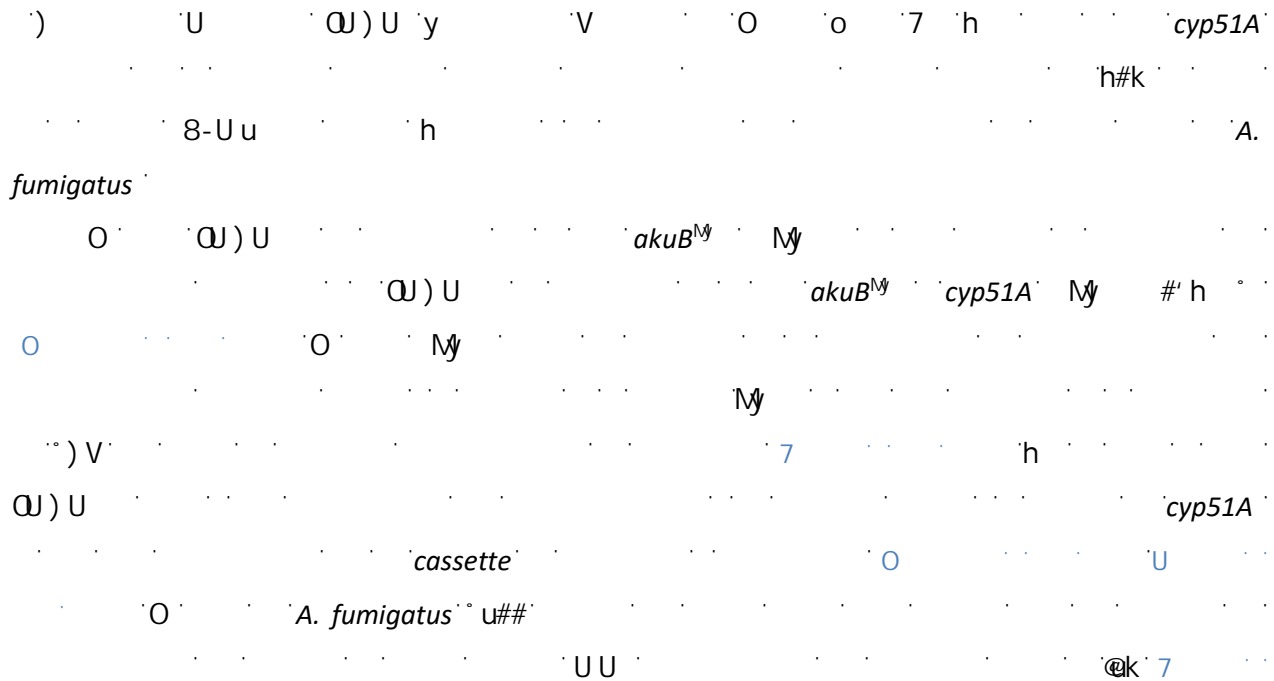
## 2.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *cyp51A* y su promotor en aquellos aislamientos de *A. fumigatus non-wildtype* para antifúngicos triazólicos

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

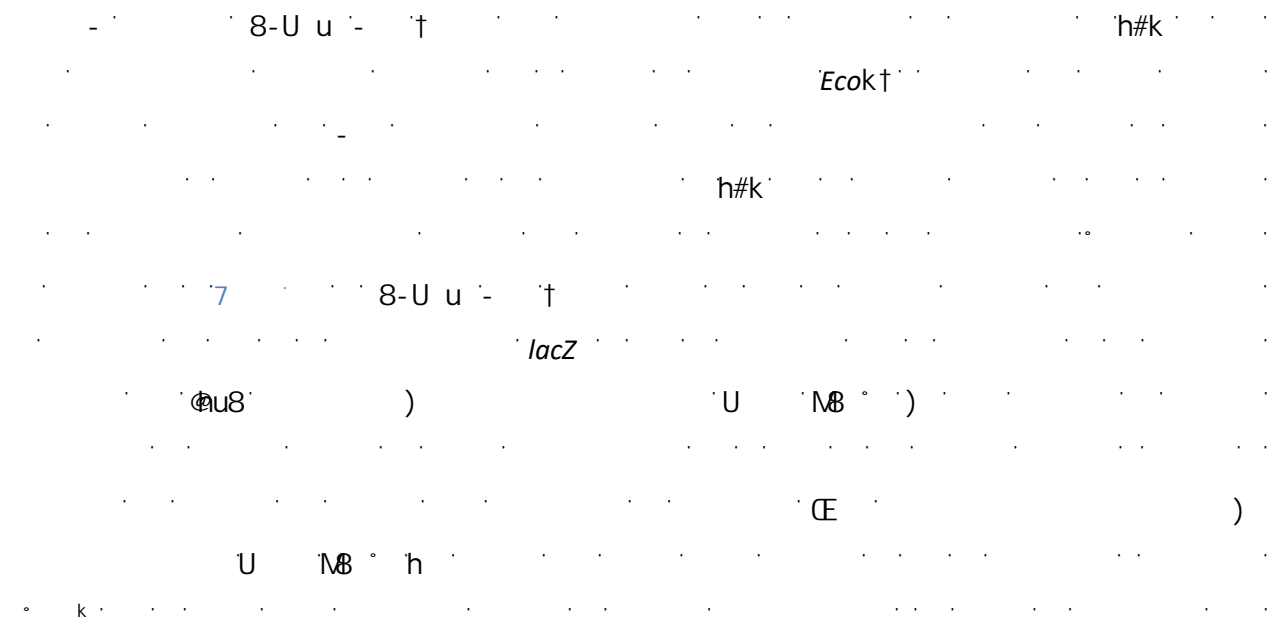
### 2.3.1 Amplificación del gen *cyp51A* y su promotor por PCR

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 ° ° u 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 . . . . .





2.3.3.1 Clonado en el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector



*E. coli*

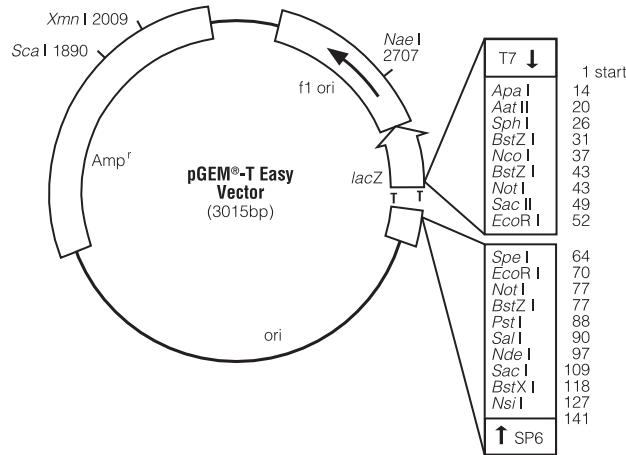


Figura 2.5 – Mapa del vector pGEM-T Easy Vector (3015bp).

### 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 realizó en un volumen total de 10 µl, utilizando un buffer de ligación y un tiempo de incubación de 1 hora a 16°C. El producto de la ligación se purificó y se transformó en bacterias *E. coli* One-Shot™ Top 10 quimio-competentes (Life Technologies Inc.).

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

Se preparó una mezcla de transformación que contenía el producto de la ligación y el inserto de ADN. La transformación se realizó en un volumen total de 10 µl, utilizando un buffer de transformación y un tiempo de incubación de 1 hora a 16°C. El producto de la transformación se purificó y se transformó en bacterias *E. coli* One-Shot™ Top 10 quimio-competentes (Life Technologies Inc.).

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



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

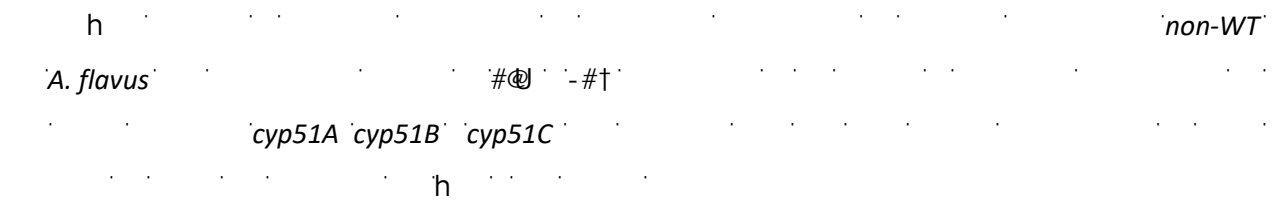
)

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

h

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

Vkko h

A. flavus RefSeq

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 ° ### °			

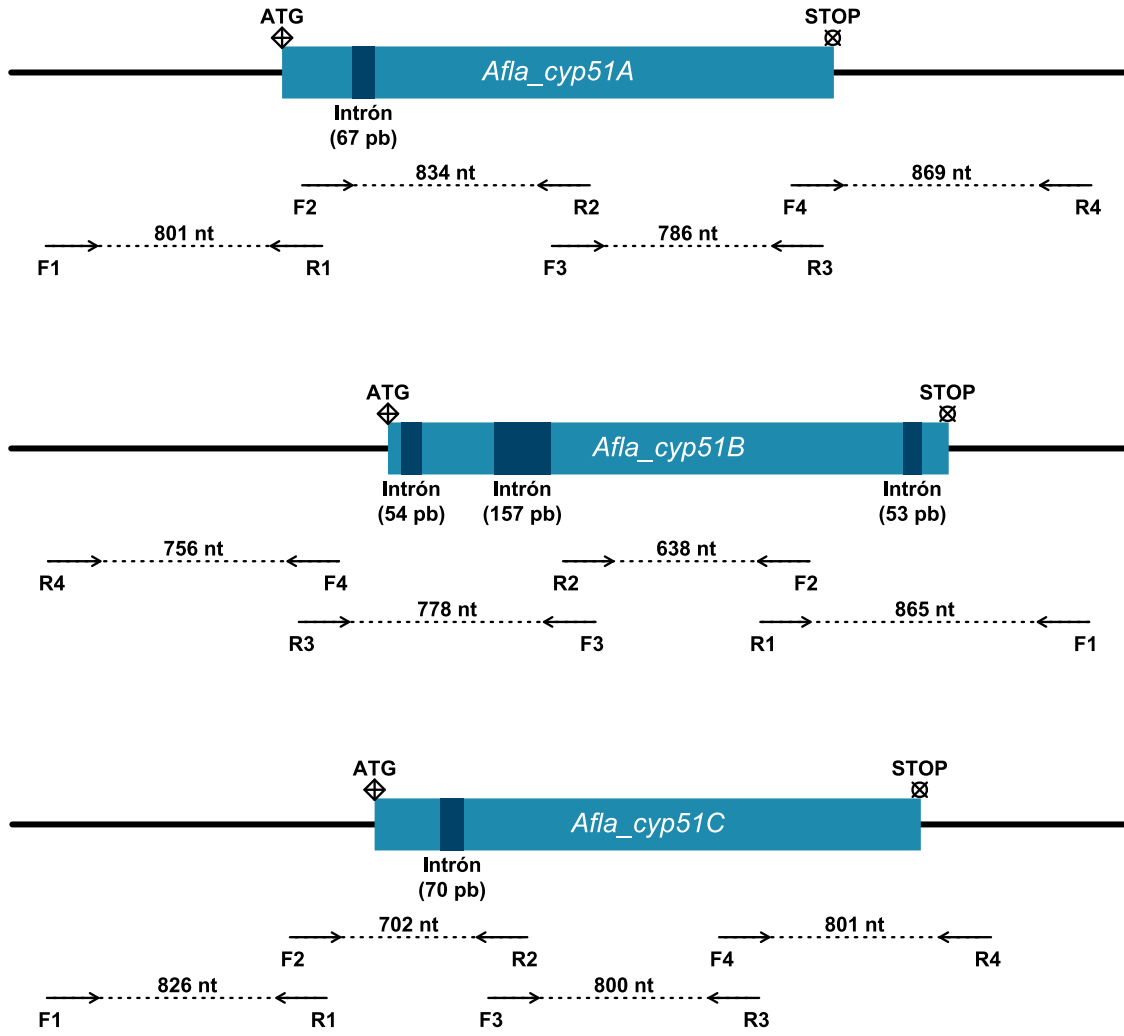


Figura 2.6 – Genoma de *A. flavus* con los primers *cyp51* h#k primers Forward 7 Reverse k in-silico upstream downstream

## 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 ...

-ch --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# ° 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	Porcentaje de identificación	Identificación de especies	Porcentaje de identificación
<i>P. aeruginosa</i>	100%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%
<i>pneumoniae</i>	100%	<i>B. cepacia</i>	100%
<i>Aspergillus</i>	100%	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100%
<i>Exophiala</i>	100%	<i>S. aureus</i>	100%
<i>Scedosporium</i>	100%	<i>C. albicans</i>	100%
<i>Aspergillus</i>	100%	<i>Moraxella catarrhalis</i>	100%
<i>Scedosporium</i>	100%	<i>Klebsiella</i>	100%
<i>Exophiala</i>	100%	<i>u</i>	100%
<i>Aspergillus</i>	100%	<i>Aspergillus</i>	100%
<i>Scedosporium</i>	100%	<i>Exophiala</i>	100%
<i>Trichosporon</i>	100%	<i>Rhodotorula</i>	100%
<i>Fusarium</i>	100%	<i>Alternaria</i>	100%
<i>Paecilomyces</i>	100%	<i>Curvalaria</i>	100%
<i>Rasamsonia</i>	100%		

O *Aspergillus*

*Fumigati*

@

O

*Flavi*

O

O

*Nigri*

O

O

*Terrei*

O

@

)

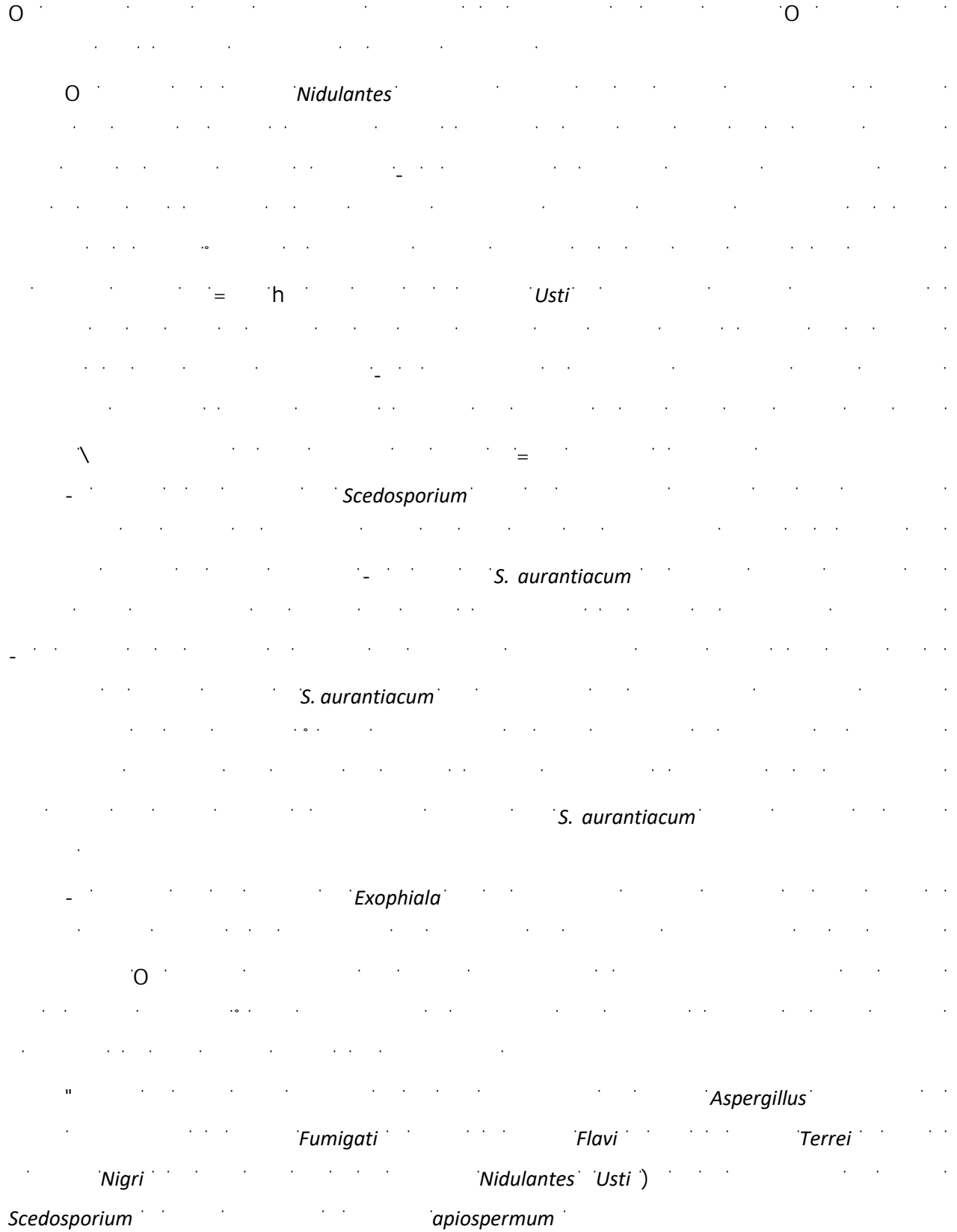


Tabla 3.1 –

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

7 7

# 7

)

A. fumigatus A. flavus A.

fumigatus A. terreus A. fumigatus A. niger - A. fumigatus

7 "h

A. flavus A.

alabamensis T. mycotoxinivorans



### 3.1.1 Árboles filogenéticos

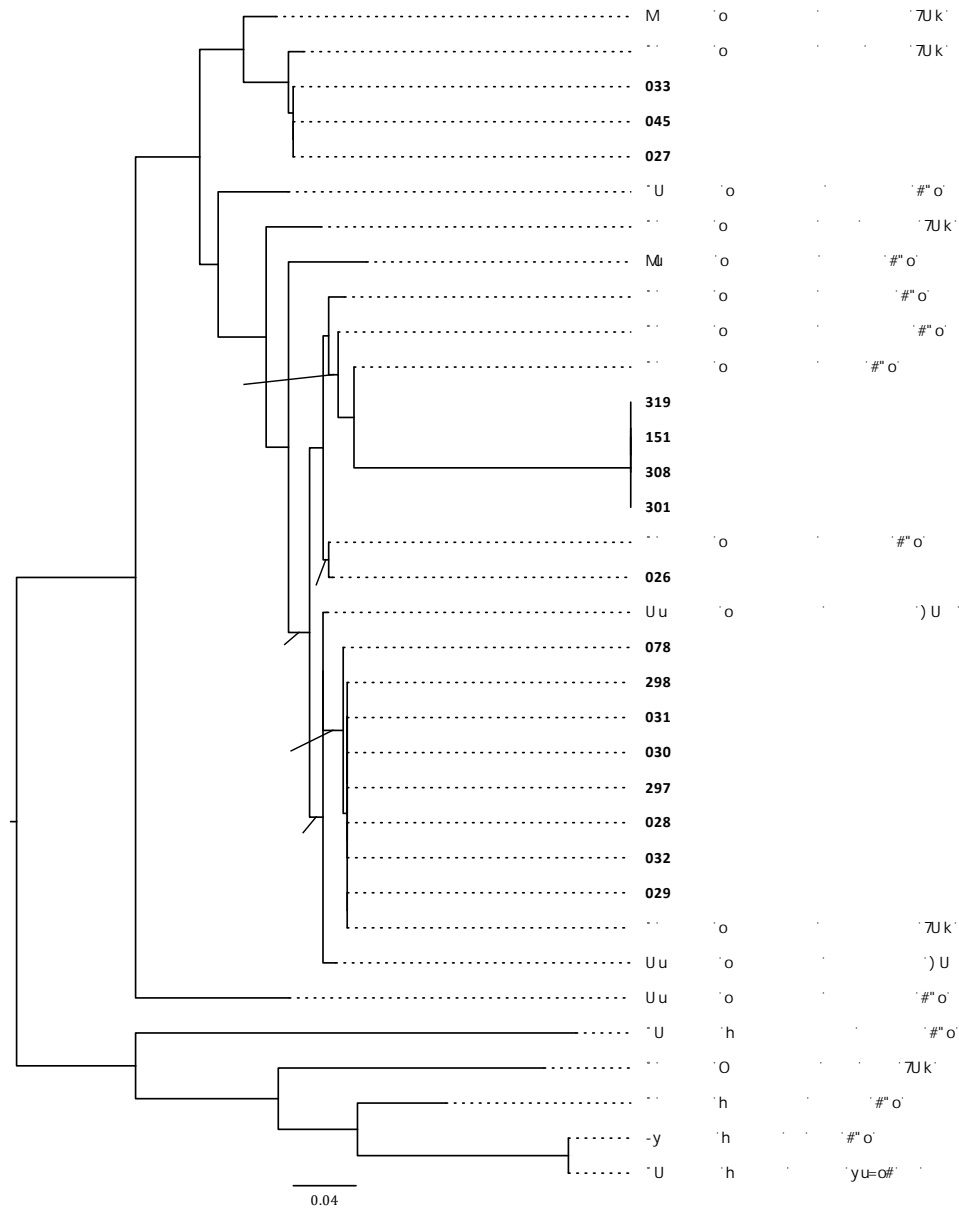
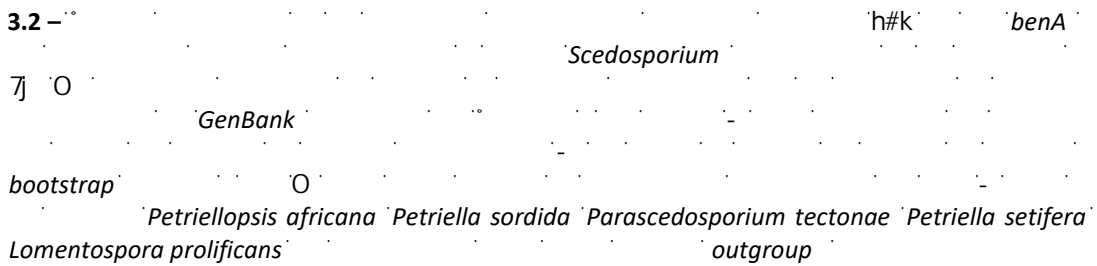


Figura 3.2 –



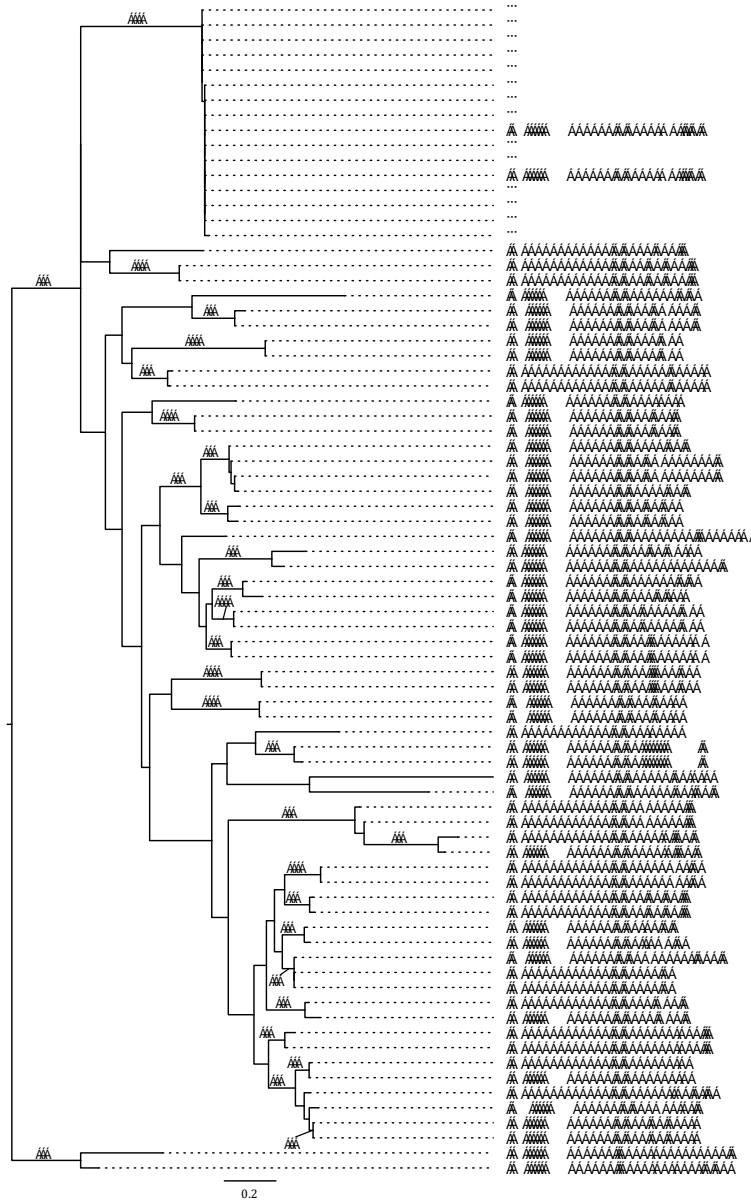
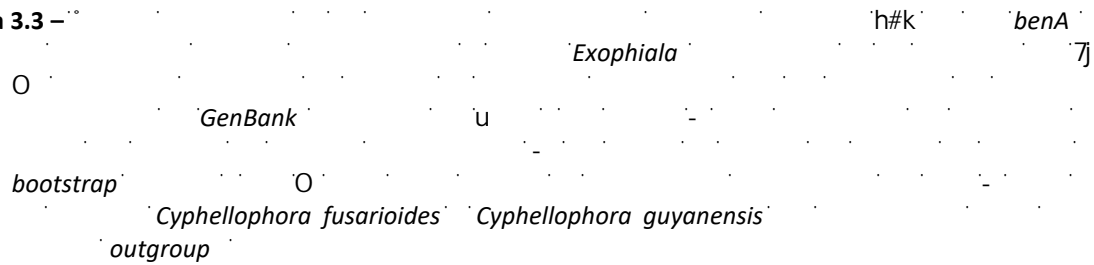


Figura 3.3 –



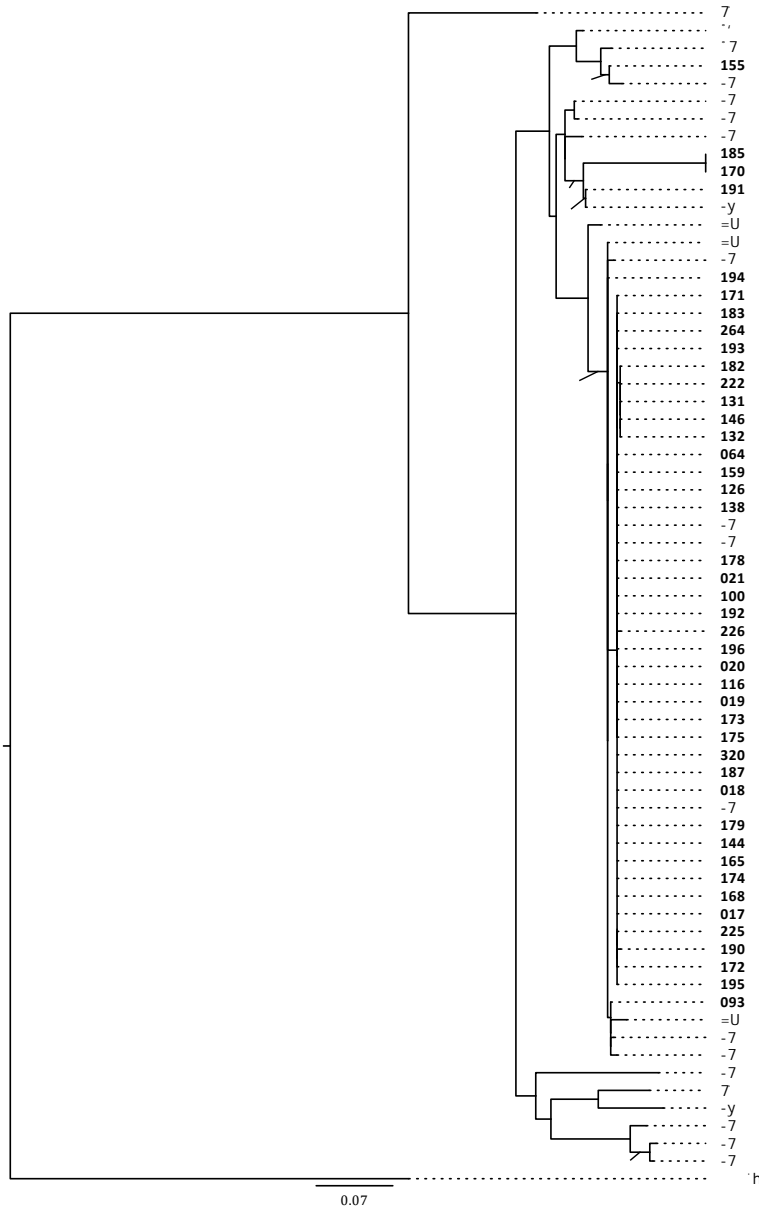
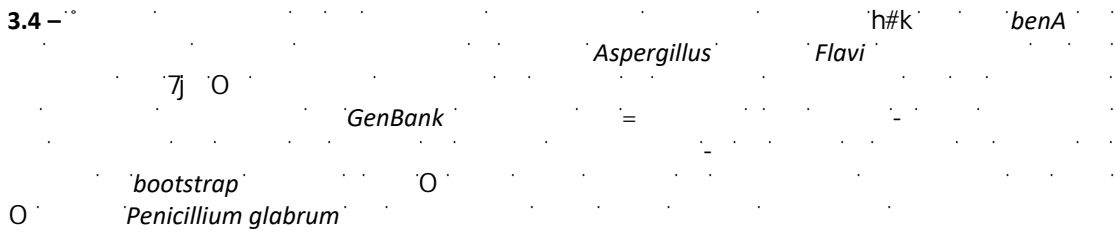


Figura 3.4 –



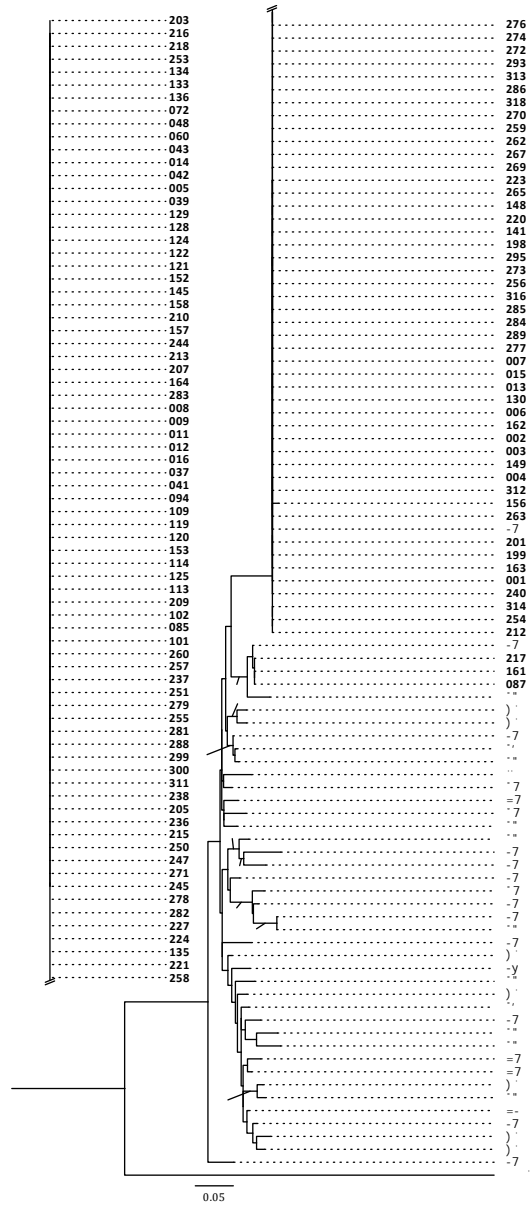
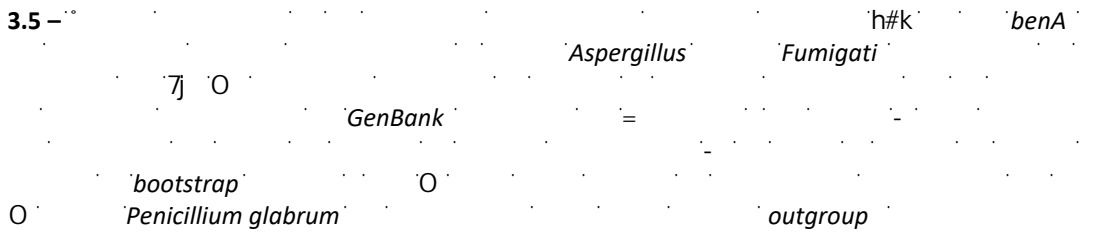


Figura 3.5 –



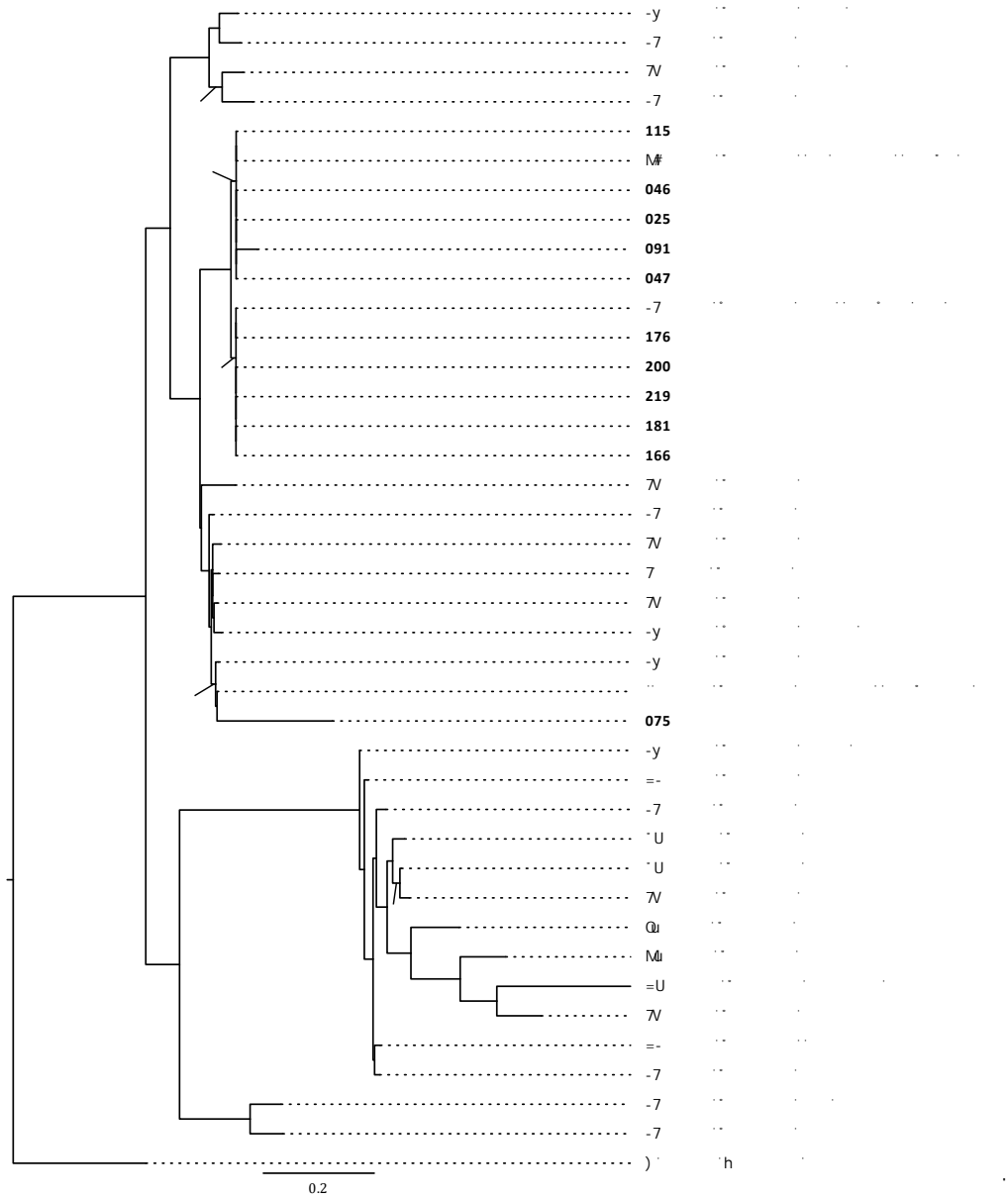
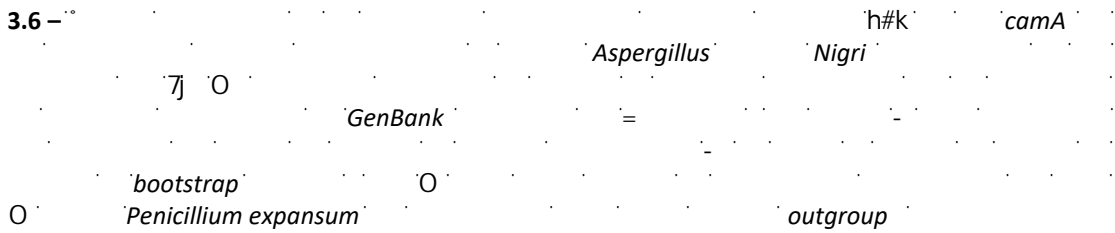


Figura 3.6 –



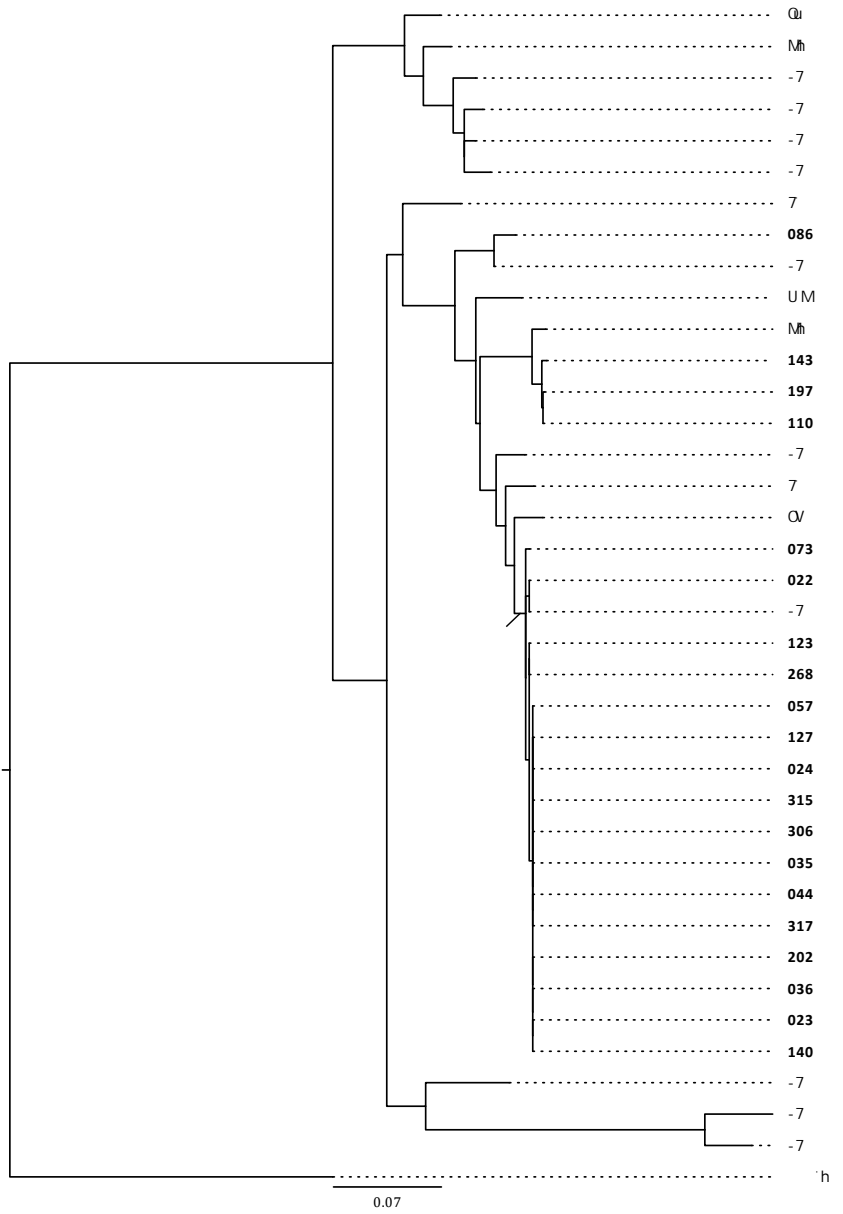
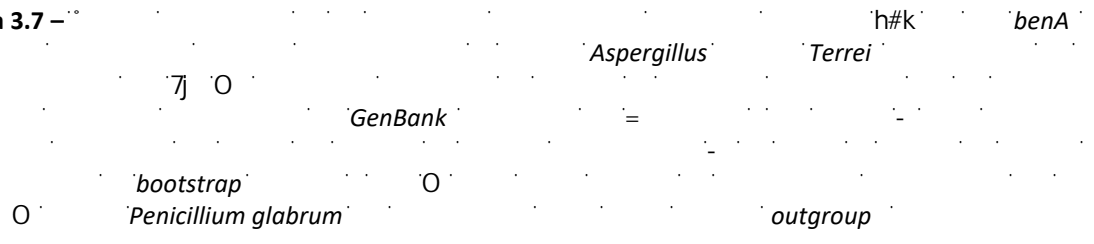


Figura 3.7 –



### 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  
 †k# E. dermatitidis A. calidoustus A. lentulus u  
 O # @ # @  
 # @  
 ) Aspergillus A.  
*calidoustus* # @ # @ @k  
 h\o †k#  
 °U" #  
 A. calidoustus  
 °U" u h E. dermatitidis  
 # @ # @ °U"  
 # @ # @ Scedosporium  
 # @ # @ †k#  
 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* # @  
 †k#  
 †k# @k h\o  
 - Aspergillus # @  
 7j # A.  
*pseudoterreus* A. parasiticus # @ °U" A. calidoustus  
 A. lentulus # @ †k# h\o @k  
 °U" †k# @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 CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM<sub>90</sub>). 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 CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM<sub>90</sub>). 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 CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM<sub>90</sub>). 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>							—	<b>23</b>	=		
<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 CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, respectivamente (en caso de coincidir, solo se indica el percentilo CIM<sub>90</sub>). 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).

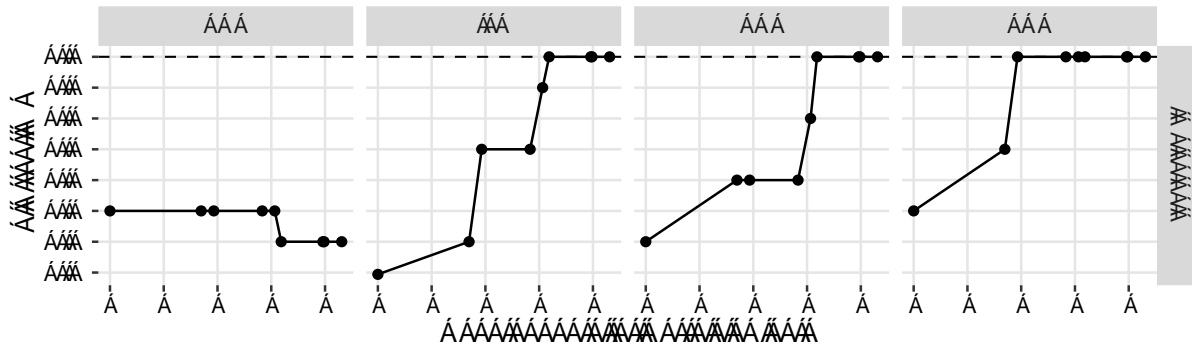


Figura 3.8 – † #Ⓞ *E. dermatidis* #Ⓞ

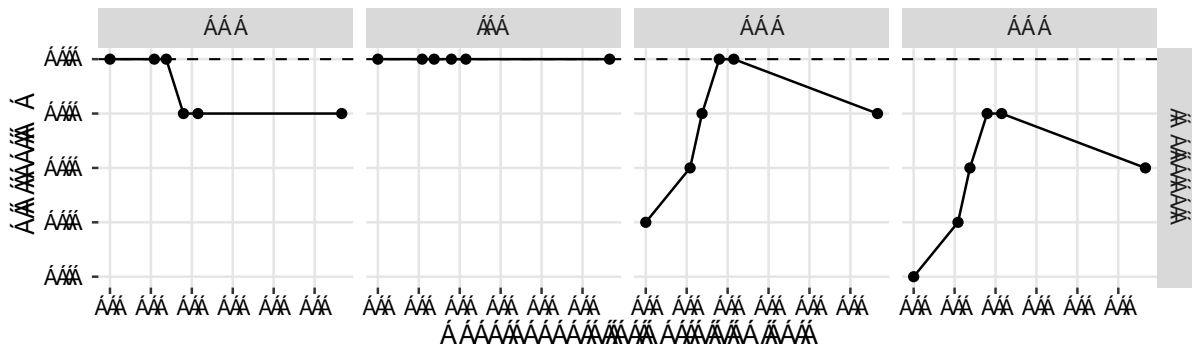


Figura 3.9 – † #Ⓞ *S. apiospermum* #Ⓞ

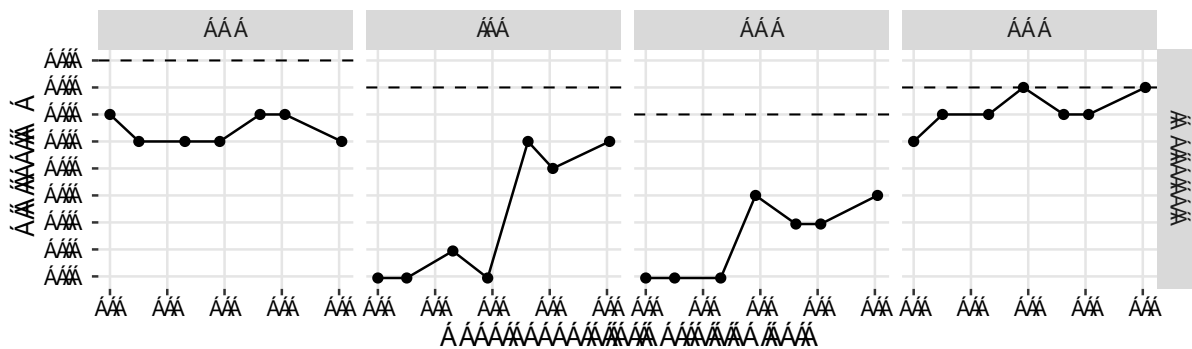


Figura 3.10 – † #Ⓞ *A. terreus* #Ⓞ -#†



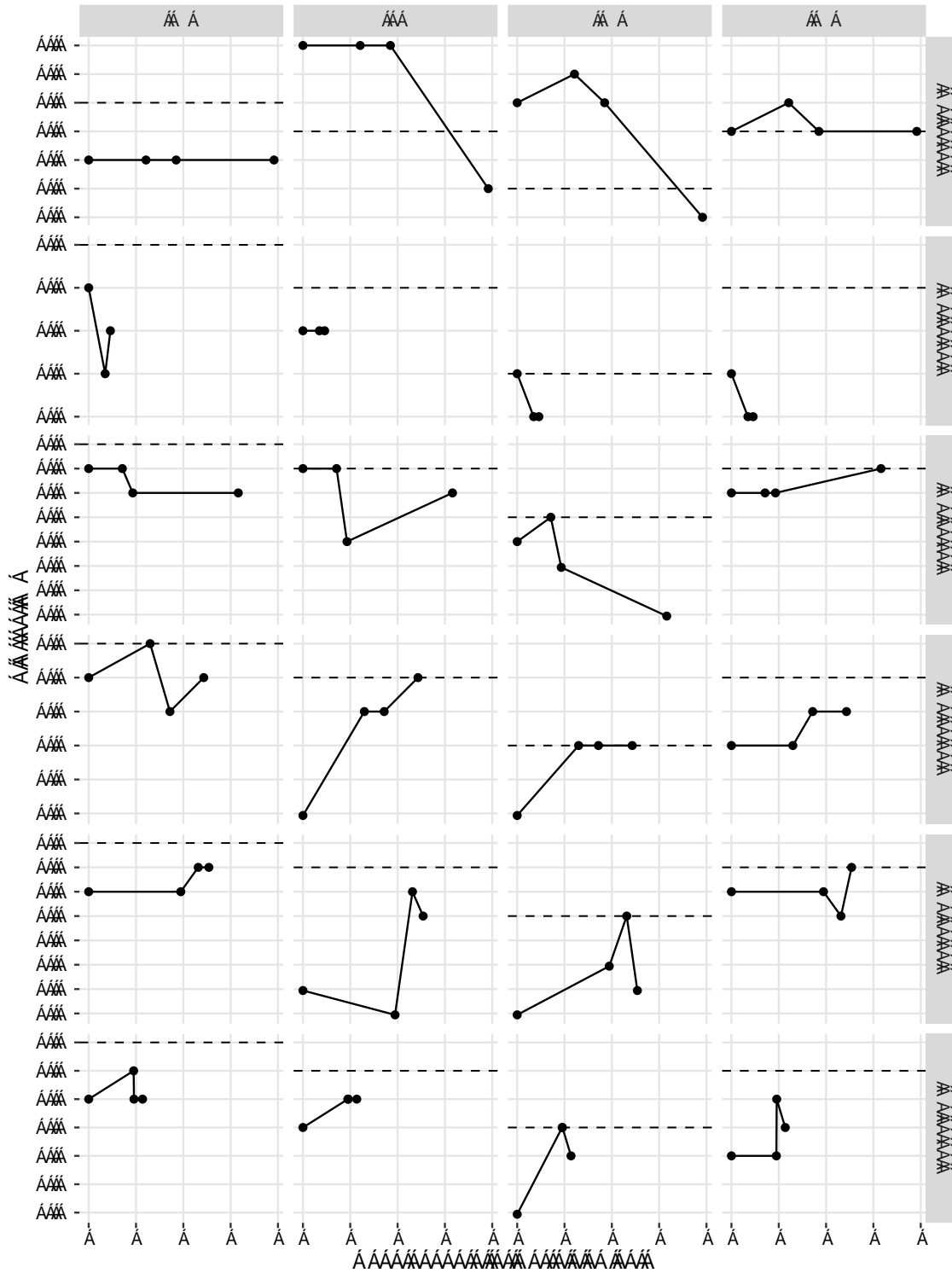


Figura 3.12 –  $\dagger$  # $\text{C}$   $\text{h}$   
 $\text{O}$   $\text{#C}$   $-\dagger$



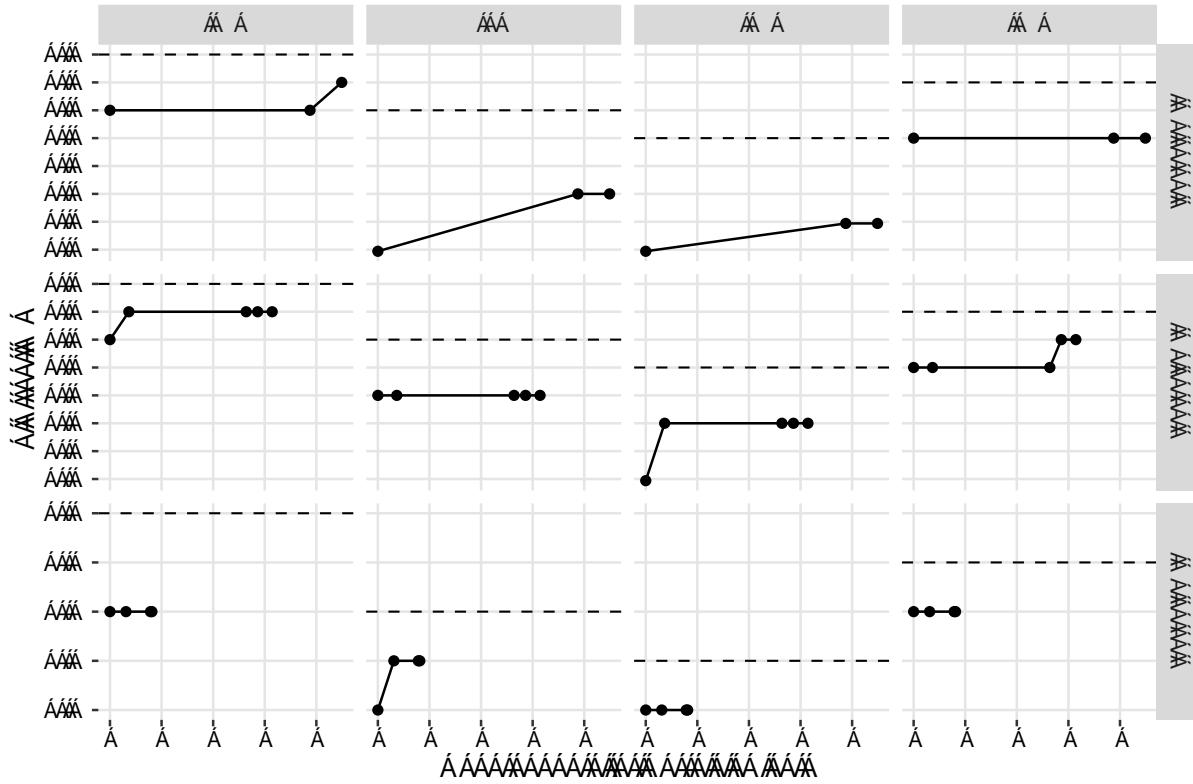


Figura 3.14 – † #Ⓞ -#† ○

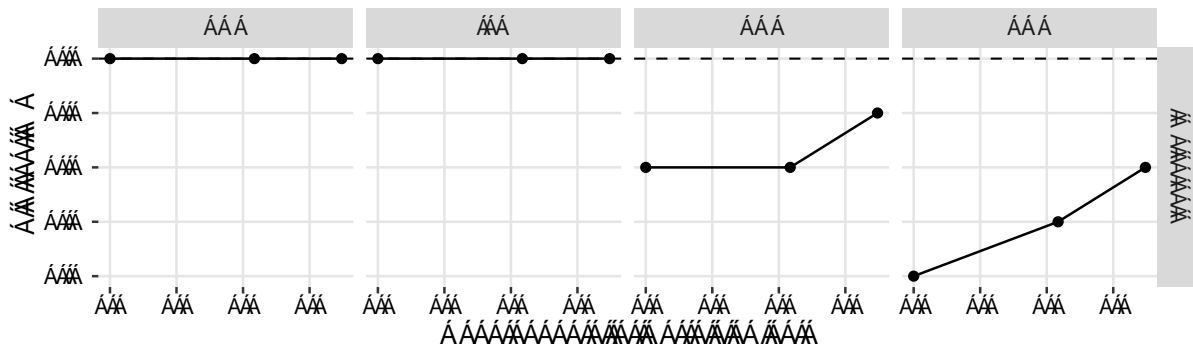


Figura 3.15 – † #Ⓞ #Ⓞ -#† ○

### 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.

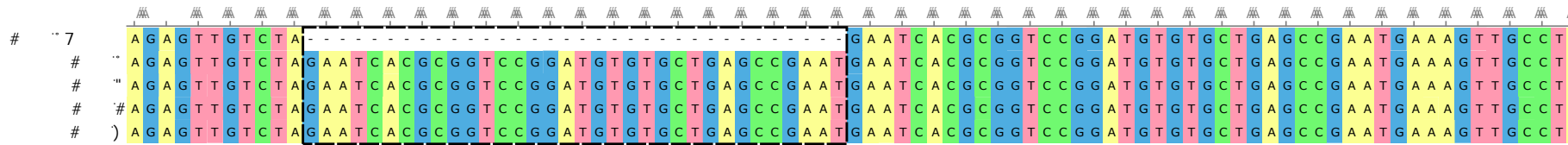


Figura 3.16 – *cyp51A* *A. fumigatus*  
*non-WT* *A. fumigatus* 7

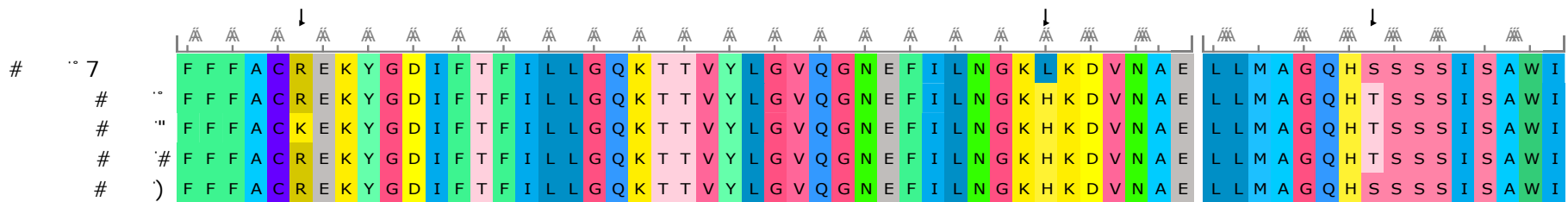


Figura 3.17 – *cyp51A* *A. fumigatus non-WT*  
*A. fumigatus* 7

k M  
 cyp51A  
 A. fumigatus Q) U akuB<sup>My</sup> Q) U Q) U  
 # h # o akuB<sup>My</sup>  
 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 ° ° #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

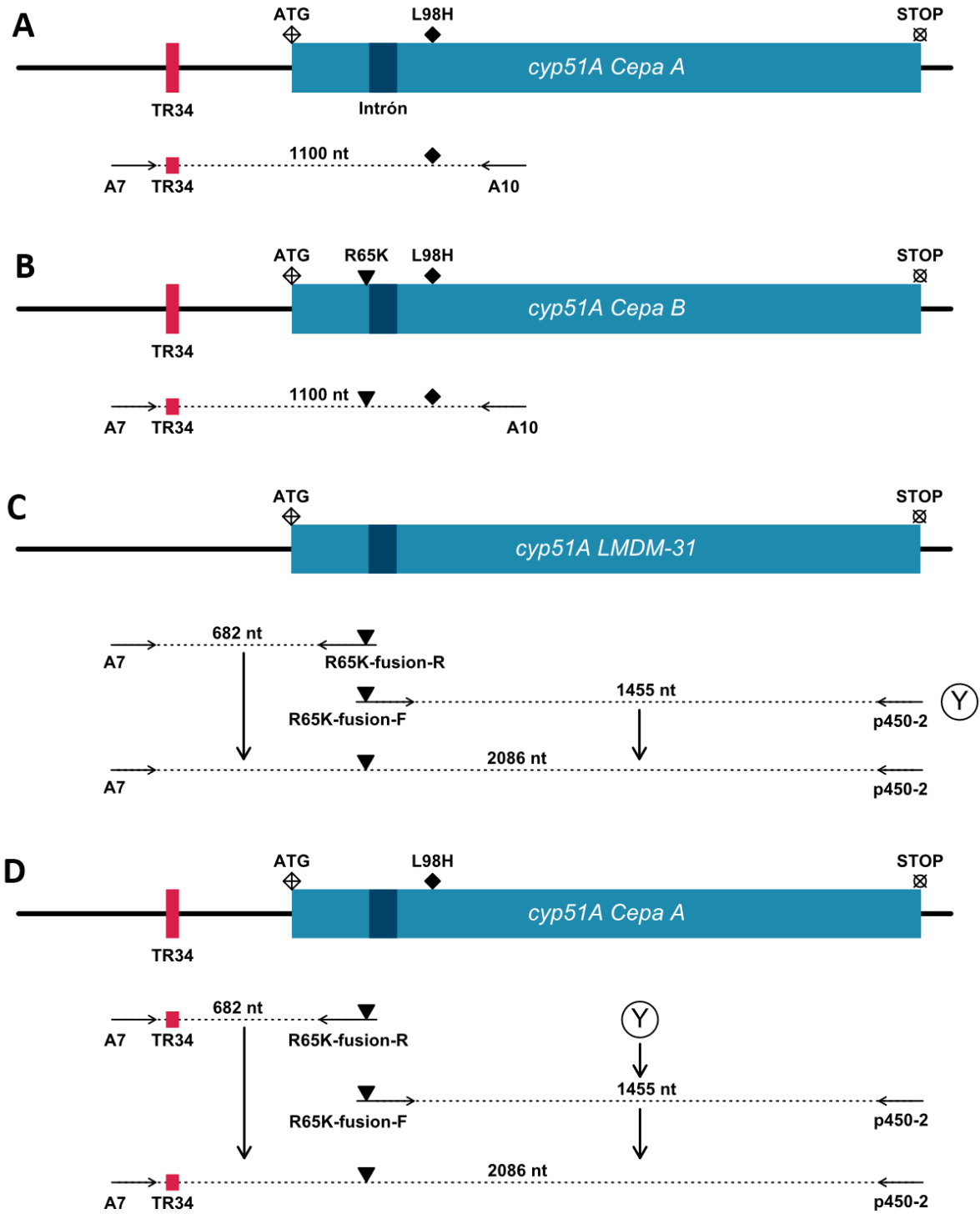


Figura 3.18 –) *Aspergillus fumigatus* (QJ) U ... # ) ° 7 uk O = " 7 uk k M

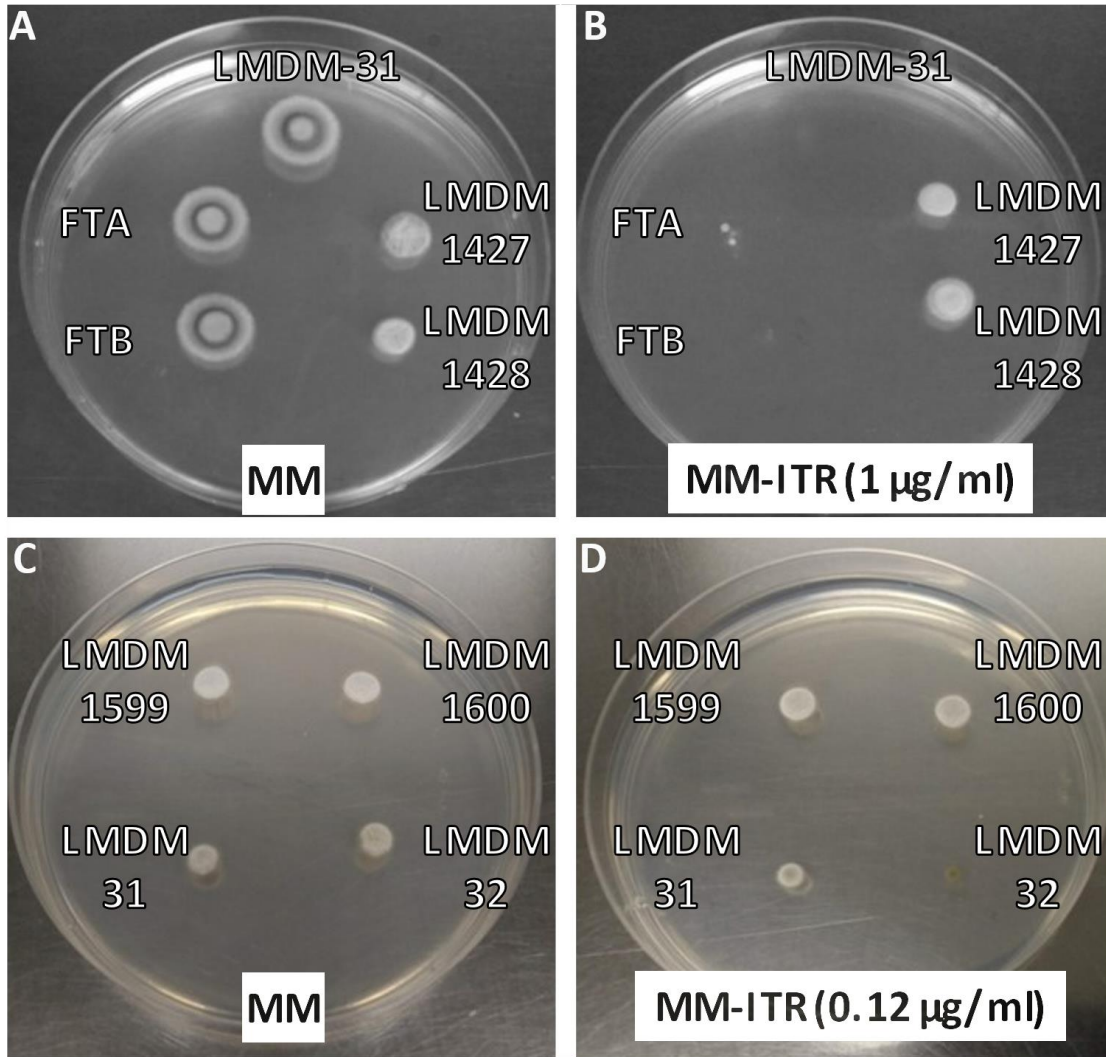


Figura 3.19 –)

# 7u 7u" 7

*A. fumigatus* UU UU @k

*A. fumigatus* akuB<sup>KU80</sup>Δ

ω)U ω)U ω)U ω)U # 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

@k ω)U O cyp51A

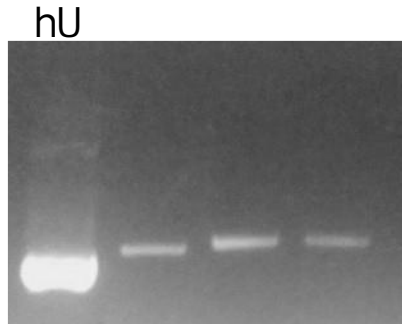


Figura 3.20 –  
 hU  
 A. fumigatus WildType cyp51A h#k  
 DNA Electrophoresis Marker  
 uk M =

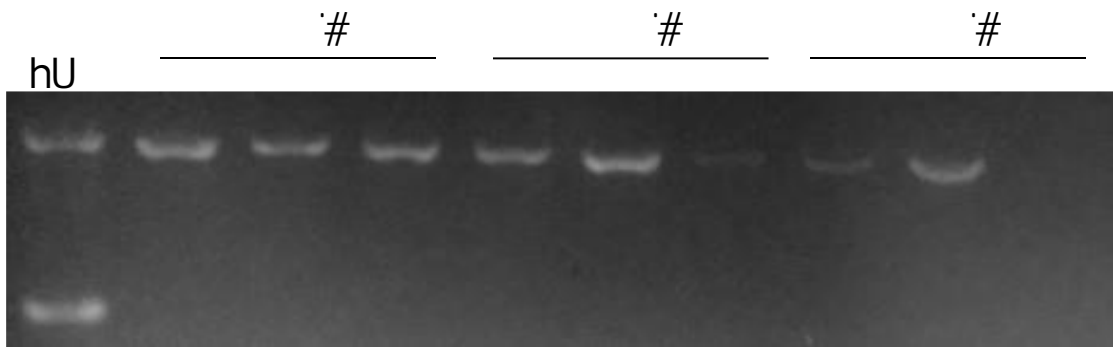


Figura 3.21 –  
 hU  
 A. fumigatus cassette wildtype primers  
 DNA Electrophoresis Marker  
 uk M = primer h#k u u #

h  
 cyp51A  
 A. fumigatus

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

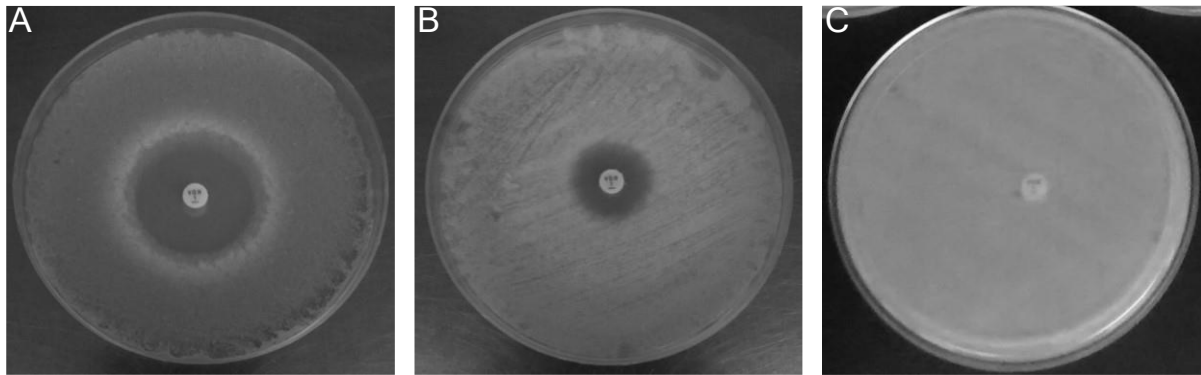


Figura 3.22 – *A. fumigatus* (U) U WT # *A. fumigatus* (U) U uk O = # # *A. fumigatus* (U) U uk k MO = #

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

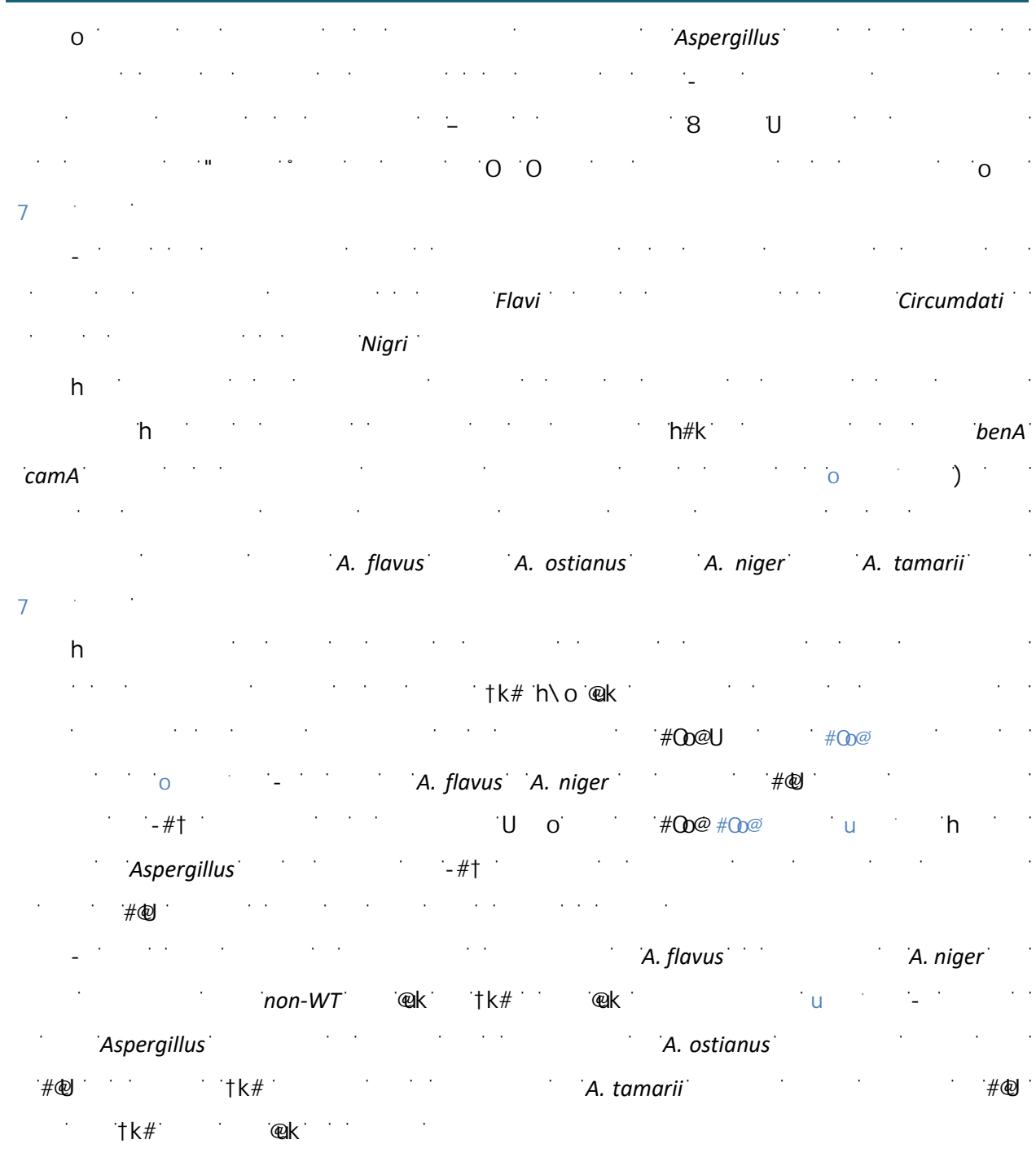




Figura 3.23 – O  
B

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

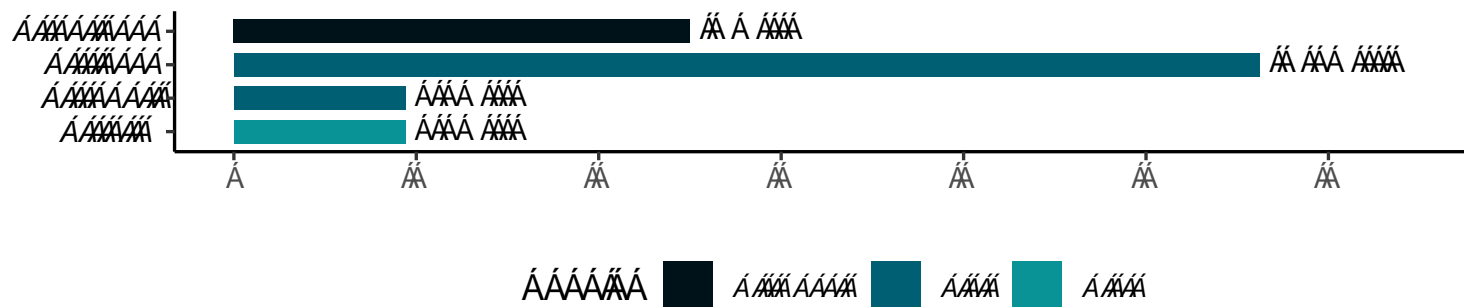


Figura 3.24 – h

*Aspergillus*

Tabla 3.9 – † #④ *Aspergillus*

Cepa	Sección	Especie	CIM (µg/ml)		
			ITR	POS	VRC
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	■
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	■
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	■	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	■
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	■	.	■
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	■
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	.	.	.
° .	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	■	.	.
° .	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	.	.	.
° .	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. tamarii</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<i>A. tamarii</i>	.	.	.
° .	<i>Flavi</i>	<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						
.	.	WT					CE					CE	
.	.	WT				CE						CE	
.	.	non-WT				CE	CE					CE	CE
.	.	non-WT				CE							
.	.	non-WT				CE	CE						
.	.	non-WT				CE						CE	
.	.	non-WT							CE			CE	
.	.	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). <sup>a</sup>: 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 10 rows. The table contains various symbols and text, including '#', '7', 'y', 'A. flavus', 'h', 'h)', '-#', 'o', 'O', 'u', 'k', 'non-WT', 'tk#', 'h', 'non-', 'WT', 'k', '-#', 'non-WT', 'tk#', '#', 'M', 'o', 'Mo', 'u', 'Student', 'V\ t', 'ANalysis Of VAriance', and 'Mo'. 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 <sub>50</sub> (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												

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). EC<sub>50</sub>: 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 entre los grupos 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*

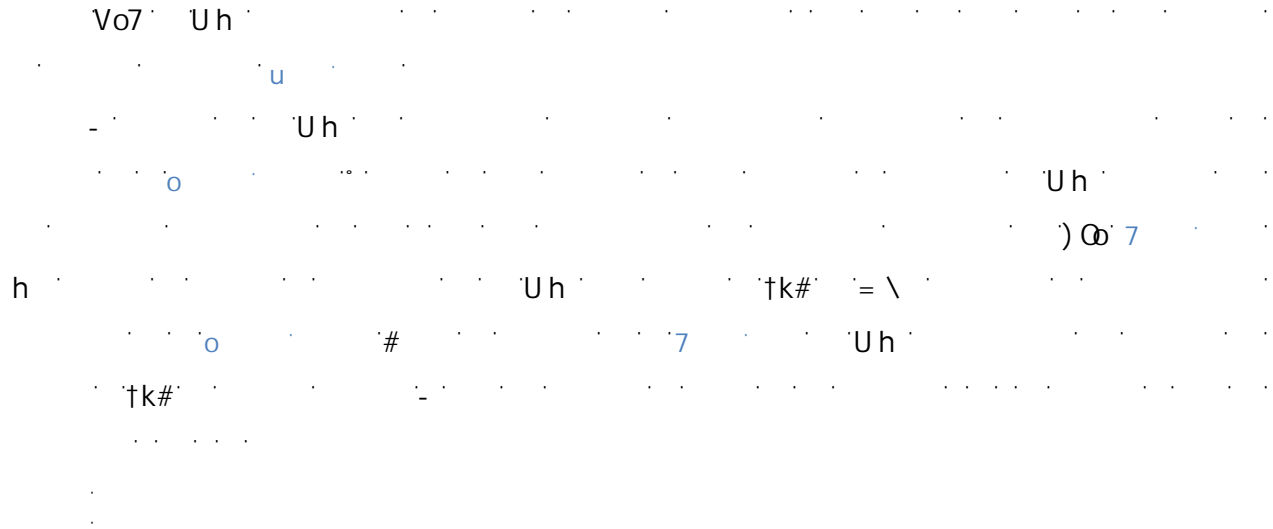
h

h)@ Uh o

Vo7 o

o Uh

u h



**Tabla 3.13** – u = \ # Uh o tk#

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).

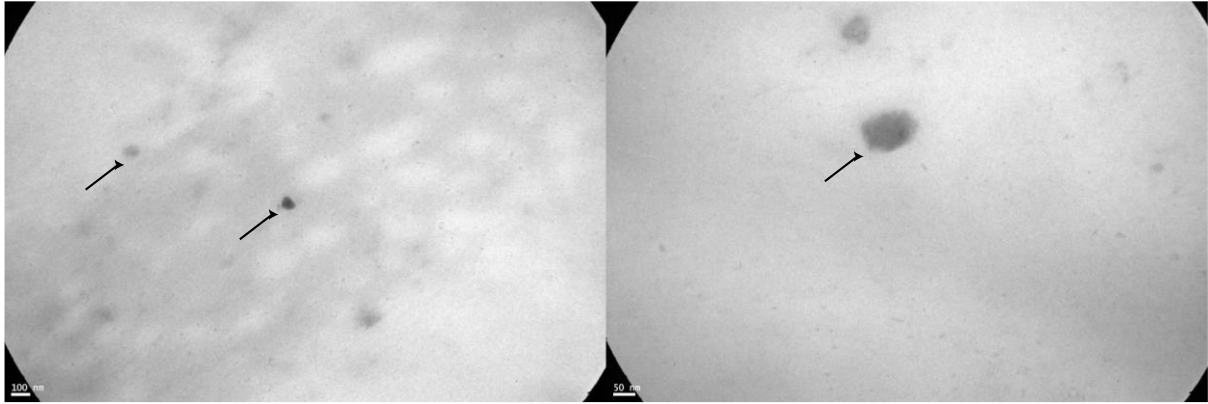


Figura 3.25 – U

o tk# O Uh = \ u @ )

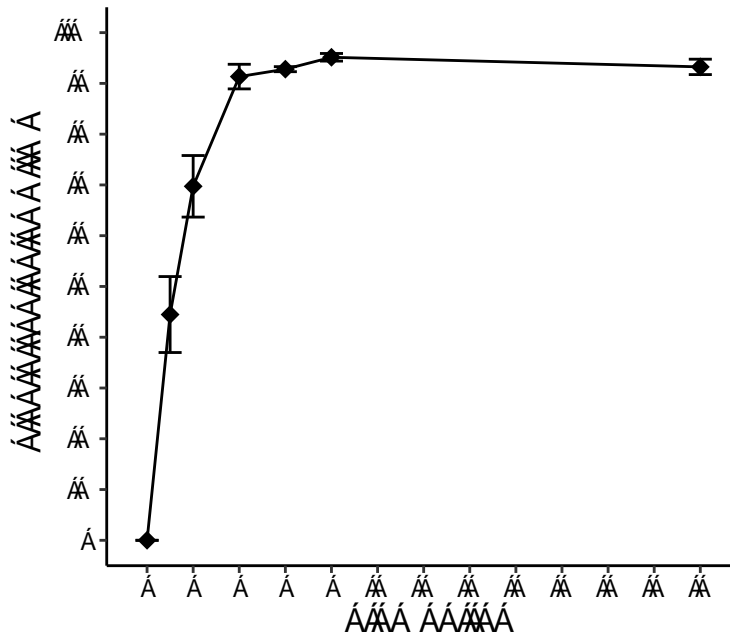


Figura 3.26 – -

o tk# Uh o # 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 <sub>MPs</sub>	VRC <sub>DMSO</sub>	VRC <sub>Suspensión</sub>	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<sub>MPs</sub>: MPs cargadas con VRC (5 mg/ml). VRC<sub>DMSO</sub>: VRC libre disuelto en DMSO. VRC<sub>Suspensión</sub>: VRC libre suspendido en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

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

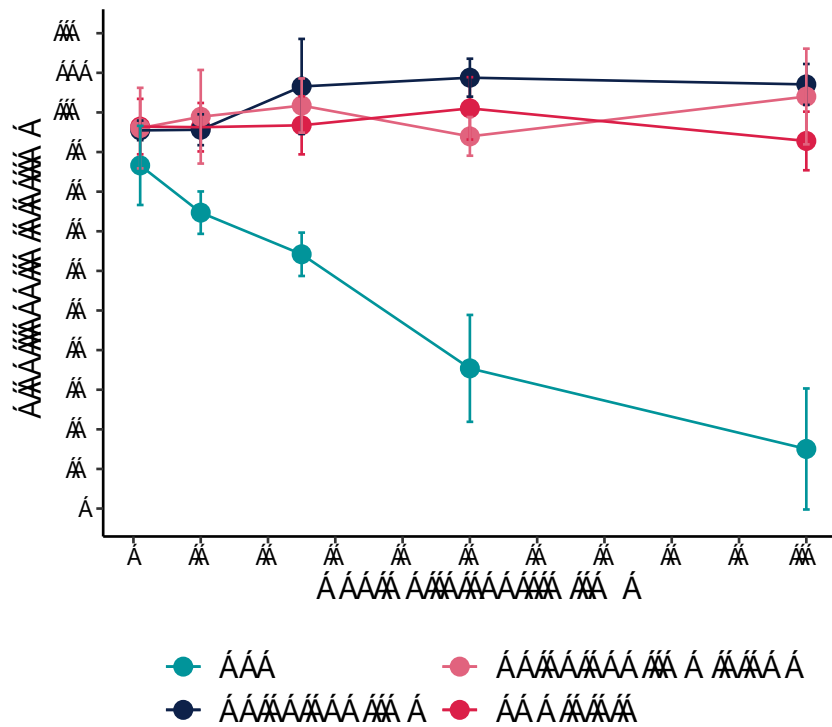
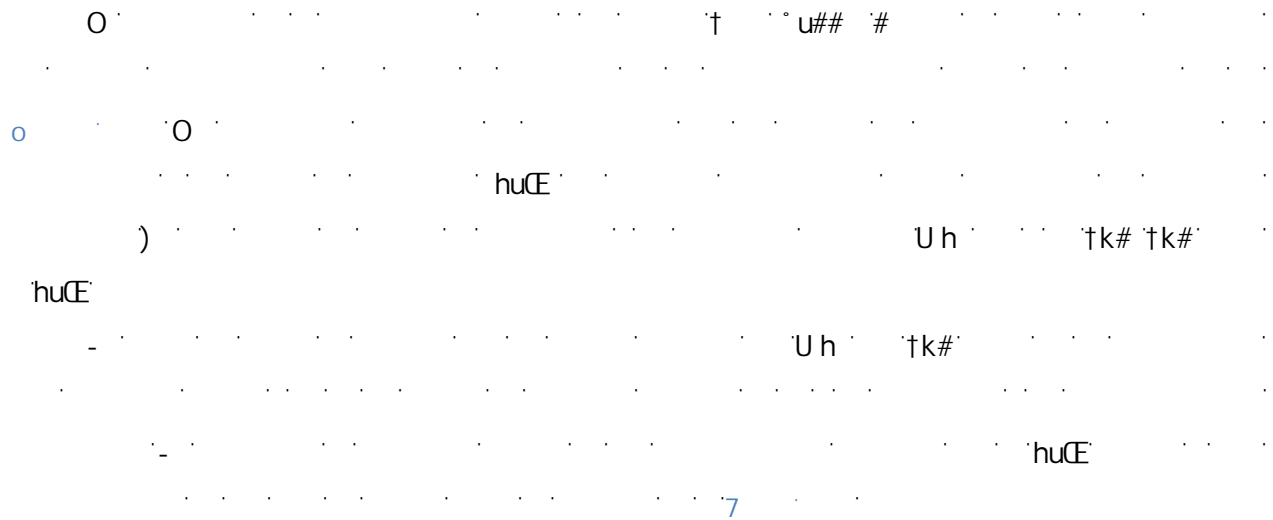


Figura 3.27 – *In-vitro* citotoxicidad de las formulaciones obtenidas en una línea celular de mamífero (huCE) a las 0h, 2h, 4h, 6h y 8h.

## **4. Discusión**

U . . . . . 7j . . . . .

o . . . . . 7j . . . . .

o . . . . .

A. fumigatus

= . . . . .

- . . . . . 7j . . . . .

"h" . . . . . y . . . . .

- . . . . . "h" . . . . . O . . . . .

A. fumigatus

# . . . . . # . . . . . U . . . . .

† . . . . . A. fumigatus . . . . .

# . . . . . = . . . . .

naïve . . . . .

cyp51A . . . . .

uk O = uk u ° ' 7' o . . . . . † . . . . .

- . . . . . 7j . . . . . A. fumigatus . . . . .

A. fumigatus . . . . .

h " . . . . . A. fumigatus . . . . .

O . . . . .

uk O = uk u ° ' 7' U . . . . . 8 † . . . . .

uk O = . . . . . o . . . . .

- O . . . . .

7j . . . . .

# ..... *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



O *Scedosporium*  
*S. apiospermum* *S. apiospermum*  
*sensu stricto S. aurantiacum*  
*S. apiospermum*  
 O *S. angustum*  
*apiospermum* 7  
 M  
 - *E. dermatitidis*  
 7  
 " k y = O U  
 o M 7 *Exophiala* h  
 y Oh  
 ) 8 O  
 7  
 h  
 = M h  
 7  
 =  
 7 *E. dermatitidis*  
 A.  
*fumigatus* o  
 7 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  
*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"

o

non-wildtype

A.

fumigatus

uk O =

E. dermatitidis

#

dermatitidis

u )

tk#

# @k h\o u

tk# 7

A. fumigatus

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 A. fumigatus A. terreus  
 Á o A. fumigatus A. flavus A. alabamensis T. mycotoxivorans  
 Á o Scedosporium  
 Aspergillus E. dermatitidis  
 # @ - # † # @  
 Á - # @ " U " # @ @k  
 h \ o †k#  
 Á ) Scedosporium  
 E. dermatitidis # @ S. aurantiacum S. angustum  
 # S. apiospermum # @ " U " @k -  
 E. dermatitidis †k# # @  
 # @ †k# @k h \ o - Aspergillus  
 # @ †k#

5. CONCLUSIONES

Á o tk# h\o @k - non-WT tk# uk # h non-WT O =

Á U k M uk O = cyp51A A. fumigatus

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

Á - # h # A. flavus non-WT # h # WT non-WT 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# #@ tk# delivery tk# h Uh tk# = \ #@

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

" \ 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 )

# " 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 U " h " h

# k " k# o UK 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 V -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  
 # K' U ) M MO U 8 u h K U o #7uk =#\n  
 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 K7 - U \ =  
 # o # = 7 U K7  
 # " # K † K7 # Kh # ) " Kh # 7U" o )  
 K U @ )  
 # @ - # † U - uk @ o u - # O o  
 @ U o  
 # @ h 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  
" # o U \ Q = ° k U ° # - y u " oyhhO 7@ U h " o@ h) 7

) ) † V - K U

) o # h V V U V # M 8 M o oo V U V u U  
h @

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

) u" = M h 8 7 KO 8 - 8 # U O

) u" = M h 8 7 O 8 - 8 # U O = U

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

) 8 u U U - # - U k u KO " h U o ) 8  
# @ k " Vu @ # k \ " @ O 8 - Vu o 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

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

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

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

- K # 7 u K o

- ) u 8 h o O K # U † K 8 = 7 † h - U h U K 7 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 o K ) 8 O @ # # U O o  
o #

- K U U



= 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 # 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 0 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

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

M U " U h h

M - = = o k 80 \ K k 00 O = ° O - K U t K 8 t  
 h- t = o t k # K

# # U O  
 #

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

# 7 o KK#7

M KV o 00 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-u 8k h=@ - °# Kk-8

O 7 u O V 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 U K U U ° " - # ) # U O u #

U o - #

O U K u 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 K V O V 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 K U ‡ h K= M ‡ 8 o - o \ U U h ) )

K U h °oo-u @ ° 8-o O k8- 7@yk- Kk-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



h ) o U V o

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

h u 8 o o 8 k " Kh o o @  
 U U

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

h M = - M K = U U h U M K " " ) 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 @

h † † # U O 8 ) - U # u U  
 @ U K

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

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

k " " † K U O - K - o ) h O K K 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

k K K U - j - O ) 7  
 uk 7 u K = U

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

k Kk k K U M " o V \ k k 8 - - K O o @ h V # K O )  
 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 K O k u K O " 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  
 =yUy  
 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  
 V-KUk°  
 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 o y o hV° o  
 o U h " O 7 # #  
 U  
 o - † " - " Kk # M# K# )# # k 7 MM # M o U u U "  
 " O # O o O - u V 7 U u h Oo " u u † K † k u  
 " † h M) o ou )  
 ) ) V  
 o # = ) - \ = " # ) @° 8 o U #- " hK h  
 ) h u 7 @ # 7 U  
 o † O # 7 # o u # - # 7 @ o @ #7uk8  
 ) 8  
 o O8 " o # 7 h o † " † o M U " = 8 O 8 M "  
 o o o U u M' h o K #  
 7 o KK#7  
 o ) U " O U h - o 8 K o U U o = " 8 O) M  
 h # U h ) K # @# K h ) O O @° U U † U u # 8 U U  
 u K y † U K8 u † KK ) k 7 = k † = # \  
 h o O  
 7 o # k U oJ h)7  
 CE oyhhO 7@ @"° oJ h)7  
 o k o OM " = U = " = 8 8 7 = " 8 = o U #k -  
 h U o K h o M ) o ) - V o - " K = 7 U K7 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  
 o V) o † † # V) h ) ) " h " K " h o  
 K ho  
 o M = k OK = O' O O K K # " h-h-8  
 K # k  
 o # M k M V U 8 ) # @ U k U  
 † k " # @ # = o ) @  
 # °°#  
 o ) " M8 # 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

y " K " KU " o ) ) † 8 " = O M O 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 " K O # O u O K O \ U

K U \ U K 7 h O k h k U k - k U o U o ) # o K

o " † U K 8 u † # # \ " )

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

† K 8 o 8 ° @ U

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

@

)

oyhhO 7@ @k) ° oU ) \ #Æ

† - O M † h - #

† h - # U † K 8 U K 7 # @ )

† h - = o K U † K 8 ) ) † h

† h - o - M 8 = U - U † K

† U k k U u U K " K h o U #

† # 8 k U @ - 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 "

† O 7 U O j j # # k " u U

† j " M u " M " k K - U ) ) o # V

h

† Æ # j - Æ k Æ - Æ U O O = o Æ 7 Æ U @ K V

† " M Æ † - Æ " oo O " # 8 o O o † o \ o \ M Ko " " - h Ok

† " " 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 # -

8

' 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  
 - KK OO o - ) " KU k " 8 - " K t h- o o- ) U  
 - " 7 # h t V  
 - K O O O j " O t K " u # h u  
 - O - h # - # o K u 7 = U 7 - K O k h  
 " Uh-8h#O h-@ # @ K  
 V t @U o  
 - o o o o O 7  
 - " V U " o " @ # ) )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 Mg<sup>2+</sup> (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>pseudoviridinutans</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>viridinutans</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>	MT813170	
	<i>apiospermum</i>	<i>boydii</i>	AJ889590	
		<i>ellipsoideum</i>	AJ889595	
		<i>fusoideum</i>	AJ889601	
<i>Scedosporium</i>			MT813192	
		<i>americanum</i>	MT813171	
		<i>aurantiacum</i>	AJ889597	
		<i>cereisporum</i>	KJ599659	
		<i>dehoogii</i>	KT163401	
		<i>desertorum</i>	AM409106	
		<i>minutisporum</i>	AJ889592	

