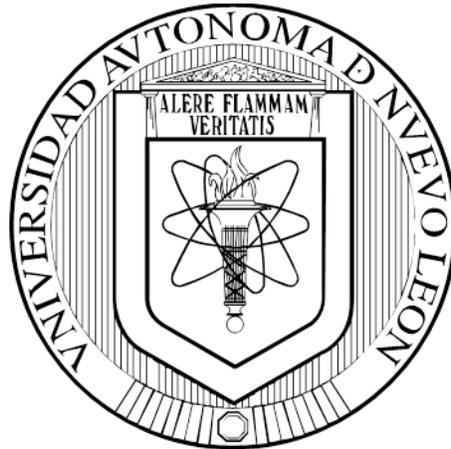


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA
EN UN MODELO MURINO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA**

POR

Q.F.B. KAREN SELENE MÉNDEZ GALOMO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
MÉDICA**

NOVIEMBRE, 2018

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA
EN UN MODELO MURINO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA"**

Aprobación de la tesis:



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel
Director de tesis



Dr. C. Gloria María González González
Co-director de tesis



Dr. C. Mariana Elizondo Zertuche
Comisión de tesis

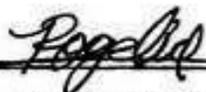


Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA
EN UN MODELO MURINO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA”**

Presentado por: Q.F.B. Karen Scelene Méndez Galomo

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) con el número de registro: MB16-00001. La ejecución experimental tuvo lugar en el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, así como en el bioterio del Laboratorio de Microbiología experimental (LME), todos pertenecientes al departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. El trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel y la co-dirección de la Dr. C. Gloria María González González.



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Director de Tesis

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico con mucho amor y todo el cariño que tengo a las personas que mas amo en mi vida. A mis padres maravillosos, que gracias a Dios he tenido buenos consejeros, los que desde pequeña me han formado como persona con su ejemplo y han logrado que llegue hasta aquí, en el que me han enseñado que los sueños se pueden hacer realidad, y en el que a veces no es fácil el camino, pero siempre está lleno de enseñanzas. Y a mi novio Luis que ha sido una pieza importante en el soporte emocional, con su comprensión y apoyo en todo momento, al que admiro y aprecio mucho. Ellos son la razón de que haya llegado tan lejos, siempre confiaron en mi hasta en los momentos más adversos, impulsándome a ser mejor y creer en mí misma.

Por ustedes siempre seguiré soñando y fijándome metas. ¡Los quiero mucho!

También dedico este trabajo de manera simbólica en honor a todos los ratones y animales de laboratorio que fueron sacrificados durante el proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a todos los que me apoyaron en este sendero de la investigación, y aportaron tanto intelectual, física o emocionalmente durante esta Maestría en Microbiología de la que me llevo grandes enseñanzas.

Primero que nada, quiero expresar mi gratitud a la **UANL** y al **Departamento de Microbiología** que me abrieron las puertas para desarrollar este proyecto en sus instalaciones. A la Dra. Gloria González por haberme otorgado la oportunidad de entrar al posgrado, y a los laboratorios, y quien es un ejemplo que seguir por su grande trayectoria y entusiasmo en la Micología. A mi asesor Dr. Rogelio Treviño al que estimo mucho por enseñarme el camino de la investigación, compartirme sus enseñanzas, amor por la micología y tenerme paciencia en todos los aspectos. Y a la comisión de tesis la Dra. Mariana Elizondo y el colaborador Dr. Hiram Villanueva por sus consejos durante el proyecto, así como a los Doctores pertenecientes al Departamento de Microbiología que aportaron con su valiosa retroalimentación en los seminarios de Investigación, y en las clases siempre dispuestos a compartir su conocimiento. A Elia Solís que fue un apoyo fundamental en el trabajo de investigación y que compartimos vivencias como equipo. En el que el reflejo de este trabajo es en conjunto las aportaciones de cada uno.

Al **CONACYT** que me dio la oportunidad de ser su becaria y me facilitó el apoyo económico el cual fue mi sustento de día con día y me permitió lograr una de mis metas: realizar investigación.

Quiero agradecer en especial a mi micro familia de amigos con los que compartí gran parte del tiempo en este trayecto: Rebeca Sánchez, Marcos Arroyo y Christian Campos con los que hice un lazo de amistad y me adoptaron como familia. Y a todos los micro compañeros del departamento con los que comparto el gusto por la microbiología Fernando, Vanesa, Orlando, Gerardo, Carolina, Martin, Alexandra, y el personal del CRCEI que me compartieron de su experiencia, así como tuve la oportunidad de tener convivencias muy amenas con todos.

A mis maravillosos padres, que desde lejos me acompañaban en las noches de laboratorio y siempre conté con su apoyo incondicional. Así como también amigos de San Luis, a mis “comaies” que, aunque no nos viéramos siempre, estuvieron alentándome. A mi novio Luis que es mi compañero de vida incondicional, que fue clave en mi estabilidad emocional y del que cada día aprendo algo nuevo con él.

Finalmente, y no por ello menos importante, a Dios que siempre estuvo presente, me cuidó y me brindó la fortaleza para seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Marco histórico	1
1.2 Generalidades del género <i>Aspergillus</i>	2
1.3 Características microbiológicas de <i>A. fumigatus</i>	4
1.4 Complejo Fumigati y caracterización a nivel molecular	5
1.5 Patogénesis	9
1.6 Espectro clínico de la infección por <i>A. fumigatus</i>	15
1.7 Epidemiología de la API	17
1.7.1 Factores de riesgo	17
1.7.2 Incidencia	19
1.7.3 Mortalidad	22
1.8 Diagnóstico micológico	24
1.9 Tratamiento de la aspergilosis	29
1.9.1 Tratamiento actual	29
1.9.2. Disponibilidad y costo de los antifúngicos	32
1.9.3. Estrategias en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas antifúngicas	35
1.9.4. Nuevas moléculas y re-propósito de medicamentos	36
1.9.5. Sertralina	39
1.9.5.1 Farmacocinética	39
1.10 Antecedentes	40
1.10.1 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de la sertralina	40
1.10.2 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> frente <i>A. fumigatus</i>	41
1.11 Modelos animales de aspergilosis	42
2. JUSTIFICACIÓN	46
3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	47
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo general	48
4.2 Objetivos específicos	48
5. MATERIAL Y MÉTODOS	49
5.1 Estrategia experimental	49
5.2 Declaración de ética	50
5.3 Microorganismo	51
5.3.1 Aislamientos clínicos de <i>A. fumigatus</i>	51
5.3.2 Identificación fenotípica	51
5.3.3 Confirmación molecular de los aislamientos clínicos	52
5.3.4 Cepa seleccionada de <i>A. fumigatus sensu stricto</i>	54
5.4 Drogas	54
5.5 Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	55

5.6 Preparación del inóculo de infección para los modelos <i>in vivo</i>	56
5.7 Modelos experimentales de aspergilosis	57
5.7.1 Modelo larvario	57
5.7.1.1 Establecimiento del modelo	57
5.7.1.2 Eficacia terapéutica	58
5.7.2 Modelo murino	59
5.7.2.1 Establecimiento del modelo	59
5.7.2.2 Evaluación de la eficacia terapéutica de la sertralina	61
5.7.2.2.1 Determinación de UFC	62
5.7.2.2.2 Antigenemia	62
5.7.2.2.3 Evaluación histopatológica	64
5.8 Análisis estadístico	65
6. RESULTADOS	66
6.1 Identificación	66
6.1.1 Identificación fenotípica	66
6.1.2 Confirmación molecular de aislamientos clínicos	66
6.1.3 Selección de la cepa para estudios <i>in vivo</i>	67
6.2 Perfil de susceptibilidad antifúngica de la cepa seleccionada	68
6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de la sertralina en modelos experimentales de aspergilosis	68
6.3.1 Modelo larvario de aspergilosis	69
6.3.1.1 Establecimiento del modelo larvario de aspergilosis	69
6.3.1.2 Eficacia terapéutica de la sertralina en el modelo larvario de aspergilosis	73
6.3.2 Modelo murino de API	77
6.3.2.1 Establecimiento del modelo murino de API	77
6.3.2.2 Evaluación de la actividad antifúngica de la sertralina en el modelo murino de API	80
6.3.2.2.1 La monoterapia con sertralina reduce la carga fúngica pulmonar	80
6.3.2.2.2 Los grupos experimentales tratados con sertralina presentan menores índices de galactomanano con respecto a los controles de infección	82
6.3.2.2.3 Histopatología pulmonar	84
7. DISCUSIÓN	88
8. CONCLUSIONES	94
9. PERSPECTIVAS	95
10. REFERENCIAS	96
11. APENDICES	107
Apéndice A. Preparación de reactivos y soluciones	107
Apéndice B. Técnicas histológicas	111
Apéndice C. Producción científica	112

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Características fenotípicas de algunas especies importantes clasificadas dentro de <i>Aspergillus</i> Sección Fumigati	8
2.	Ensayo de galactomanano <i>Aspergillus</i> en lavado broncoalveolar o biopsia tisular con un punto de corte de ≥ 1.0	26
3.	Manifestaciones radiográficas de la aspergilosis pulmonar invasiva al diagnóstico	28
4.	Criterios diagnósticos de API	29
5.	Régimen de dosis recomendadas por la guía práctica para el diagnóstico y manejo de la aspergilosis (2016).	30
6.	Países con acceso a anfotericina B.	32
7.	Descripción general de las condiciones de los modelos murinos publicados de aspergilosis invasiva por <i>A. fumigatus</i> .	44
8.	Sistema de puntaje de bienestar larvario.	58
9.	Escala semicuantitativa de estructuras fúngicas de <i>A. fumigatus</i> a nivel tisular	65
10.	Aislamientos clínicos de vías respiratorias identificados como <i>A. fumigatus</i> sensu stricto.	67
11.	Mortalidad y puntaje de bienestar larvario con el inóculo de 10^7 conidias/MI	72
12.	Supervivencia y puntaje de bienestar larvario frente a diferentes tratamientos para el día 3 post-infección.	75
13.	Semicuantificación histológica de estructuras fúngicas en cortes seriados de pulmón.	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Línea de tiempo del desarrollo de antifúngicos	2
2.	Características morfológicas de <i>A. fumigatus</i>	5
3.	Patogénesis de infección por <i>A. fumigatus</i> .	14
4.	El espectro clínico de la aspergilosis.	16
5.	Factores de riesgo en API	19
6.	Incidencia de API durante el periodo 1980-2003	20
7.	Disponibilidad de anfotericina B alrededor del mundo.	33
8.	Precio estimado en dólares de anfotericina B y voriconazol alrededor del mundo.	34
9.	Estructura química, nombre, uso clínico y objetivo molecular putativo de fármacos y moléculas pequeñas con potencial antifúngico	36
10.	Comparación del desarrollo de Novo y el re-propósito de un medicamento.	37
11.	Esquema general de trabajo.	50
12.	Cámara de inhalación.	61
13.	Imagen representativa de los grupos de infección (10^5 - 10^8 conidias/mL) de <i>G. mellonella</i> en el día 5 post-infección.	70
14.	Estandarización del modelo larvario de aspergilosis.	71
15.	Evaluación antifúngica de la sertralina en el modelo larvario de aspergilosis.	74
16.	Imagen representativa de los grupos de tratamiento de las larvas en el día 3 post infección	76
17.	Cinética de infección por el reto inhalatorio con <i>A. fumigatus</i> CRCEI-16007.	77
18.	Microfotografías representativas de la invasión fúngica pulmonar de los ratones infectados vía inhalatoria con la cepa <i>A. fumigatus</i> CRCEI-16007 en el día 7 post-infección.	79
19.	Carga fúngica pulmonar en el modelo murino de API.	81
20.	Índice galactomanano en el modelo murino de API.	83
21.	Histopatología del modelo murino de API.	87

LISTA DE ABREVIACIONES

ABPA	Aspergilosis broncopulmonar alérgica	µg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mL	Mililitros
AMB	Anfotericina B	µL	Microlitros
APC	Aspergilosis pulmonar crónica	mM	Concentración milimolar
APCN	Aspergilosis pulmonar crónica necrozante	µL	Microlitros
APD	Agar papa dextrosa	mM	Concentración milimolar
API	Aspergilosis pulmonar invasiva	NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
ASSH	Asma severo con sensibilidad al hongo	nm	Nanómetros
ATCC	Colección americana de cultivos tipo	NLR	Receptores tipo NOD
C	Complemento	PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute	PAS	Periodic acid schiff
CMI	Concentración mínima inhibitoria	pb	Pares de bases
CMF	Concentración mínima fungicida	PBS	Salina amortiguada de fosfatos
CMV	Citomegalovirus	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CVV	Candidiasis vulvovaginal	pH	Potencial de hidrógeno
ELISA	Enzimoimmunoensayo absorbente	PMN	Polimorfonucleares
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> (Latín: “y otros”)	PRR	Receptor de patrones de reconocimiento
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer	PTX	Pentrexina
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	RM	Resonancia magnética
ERO	Especies reactivas de oxígeno	rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramos	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
GM	Galactomanano	s	Segundos
GMS	Gomori metenamine stain	SRT	Sertralina
h	Horas	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
IFI	Infecciones fúngicas invasivas	SOD	Superoxido dismutasas
IL	Interleucina	T	Transmitancia
IP	Intraperitoneal	TC	Tomografía computarizada
ISRS	Inhibidor selectivo de recaptación de serotonina	TDPM	Trastorno disfórico premenstrual
ITS	Espaciador transcripcional interno	TLR	Receptores tipo Toll
IV	Intravenoso	TMS	Tiempo medio de supervivencia
L	Litros	TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
LBA	Lavado broncoalveolar	TOS	Trasplante de órgano sólido
LCR	Líquido cefalorraquídeo	UCI	Unidad de cuidados intensivos
M	Concentración molar	UFC	Unidad formadora de colonia
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	VCZ	Voriconazol
min	Minutos	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Q.F.B. Karen Selene Méndez Galomo
2018

Fecha de Graduación: Noviembre,

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del Estudio: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA EN UN MODELO MURINO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA**

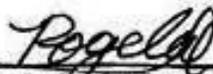
Número de páginas: 112

Candidata al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica

Área de estudio: **Micología Médica.**

Propósito y Método de estudio: La aspergilosis pulmonar invasiva es una enfermedad fúngica potencialmente mortal causada principalmente por el moho ubicuo *Aspergillus fumigatus*. Esta entidad clínica es una causa importante de morbi-mortalidad principalmente en individuos inmunocomprometidos. Escasa evidencia reciente sugiere actividad fungicida *in vitro* de la sertralina contra *Aspergillus* spp. Sin embargo, esta actividad aún no se ha investigado *in vivo*. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de la sertralina como monoterapia a tres distintas dosis (3, 10 y 15 mg/Kg) en la larva de *Galleria mellonella* y en un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva. Los parámetros de eficacia terapéutica que se determinaron fueron supervivencia e índice de bienestar larvario en *G. mellonella*, mientras que la carga fúngica tisular, galactomanano e histopatología pulmonar se evaluaron en el modelo murino.

Conclusiones y Contribuciones: Los tratamientos experimentales con sertralina mejoraron la supervivencia y el índice de bienestar larvario, especialmente a las dosis de 10 y 15 mg/Kg. Además, la sertralina a 10 mg/Kg fue capaz de reducir la carga fúngica pulmonar en los ratones infectados con una eficacia comparable, pero no superior, a la de la anfotericina B a 3 mg/Kg y voriconazol a 10 mg/Kg. Hasta el momento, este es el primer estudio *in vivo* que evalúa la actividad antifúngica de la sertralina contra *A. fumigatus* y pone de manifiesto una posible opción prometedora para el tratamiento adyuvante de la aspergilosis pulmonar.



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Marco histórico

El origen del término *Aspergillus* surge en 1729, cuando el sacerdote y biólogo italiano Pier Antonio Micheli nombra por primera vez el hongo con base en su similitud microscópica con la figura del *aspergillum*, un instrumento empleado en las ceremonias religiosas para esparcir agua bendita. El término proviene del latín ‘asperjar’, que significa rociar o esparcir [1,2]. Por otra parte, la aspergilosis pulmonar se describe en 1842 por el físico John H. Bennett en un paciente *post-mortem* con neumotórax [3,4] y, no es sino hasta 1856, que Virchow registró el primer caso comprobado de aspergilosis broncopulmonar [3]. En México el primer caso se reportó casi un siglo después, en 1951, por González Ochoa [1].

La especie *Aspergillus fumigatus* fue diferenciada de otras especies en 1863 por el médico Georg W. Fresenius debido a la pigmentación verde de sus esporas, y la designó como *fumigatus* por el término derivado del latín ‘fumigave’, que significa humo, haciendo referencia al micelio azul grisáceo humeante. Una vez descritas las especies, los casos posteriores de infecciones mostraron que la especie más frecuente de *Aspergillus* responsable de infección humana era *A. fumigatus* [5].

El primer tratamiento que se instauró para el manejo de la aspergilosis fue el yoduro de potasio desde el comienzo del siglo XX hasta finales de la Segunda Guerra Mundial. En la década de 1940 las sulfonamidas y las nuevas "drogas milagrosas" de los agentes antibacterianos se utilizaron para tratar las infecciones fúngicas con resultados

inconsistentes. El descubrimiento y la formulación de nistatina y anfotericina B en la década de 1950 condujeron a los primeros agentes antifúngicos eficaces contra la aspergilosis [3]. Desde entonces la anfotericina B sigue presente en las guías terapéuticas actuales para tratar diversas infecciones fúngicas sistémicas, incluyendo la aspergilosis, lo cual es reflejo del pobre avance en el desarrollo de nuevos tratamientos antifúngicos (Figura 1).

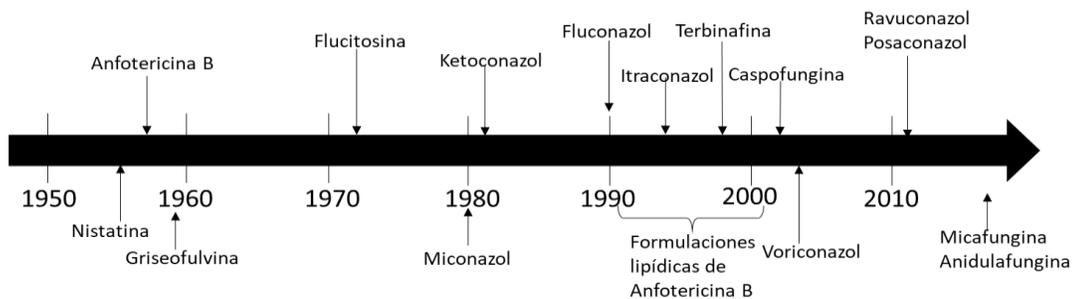


Figura 1. Línea de tiempo del desarrollo de antifúngicos [6,7].

1.2 Generalidades del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* comprende a un amplio conjunto de mohos conformado por aproximadamente 339 especies; establecido por las similitudes que presentan en cuanto a sus características morfológicas, fisiológicas y de carácter filogenético [8]. Estos hongos se encuentran distribuidos ampliamente en el ambiente de forma ubicua: en plantas, materia orgánica en descomposición, suelos, aire/bioaerosoles, hábitats marinos y de agua dulce; así como también en ambientes intradomiciliarios (superficies de edificios, hospitales, áreas domésticas) y el polvo [9–11]. Menos de 40 especies se asocian a enfermedad en el humano. Las especies más comúnmente aisladas en infección invasiva se encuentran relacionadas en un 95% de los casos a los miembros del complejo *A. fumigatus* [12], con tasas de aislamiento de hasta un 92%, seguidas por los complejos de

especies *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*; y, se encuentra descrito, que hasta un 36% de las infecciones son mixtas [13]. Sin embargo, la contribución real de las diferentes especies de *Aspergillus* en la causa de aspergilosis es variable de un país a otro y dependiente de la enfermedad subyacente [10]; un ejemplo es el reporte de Cadena et al. en 2016 en España, en el cual se reportaron porcentajes menores de aislamiento de *A. fumigatus*, con un 57%, seguido por *A. flavus* (12%), *A. niger* (10%), *A. terreus* (12%) y otros (9%) [11].

Dentro de las características morfológicas que distinguen al género se encuentran que estos microorganismos son hongos filamentosos, hialinos, que forman hifas septadas, ramificadas, que dan lugar a las clásicas cabezas aspergilaes. Cada cabeza aspergilar se compone de un conidióforo con una vesícula terminal que porta una o dos capas de fiálides. A su vez, las fiálides generan columnas de conidios esféricos pequeños que constituyen la forma infecciosa a partir de los cuales se desarrolla la fase micelial (filamentosa) del hongo. La disposición o arreglo de cada una de estas estructuras representa la morfología microscópica característica de cada especie para su identificación, además de su morfología colonial. Por ejemplo, el color verde azulado de las colonias de *A. fumigatus* es claramente distinto de las colonias verde amarillento, tostado, verde oscuro o negro de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* y *A. niger*, respectivamente y, aunque *A. nidulans* posee colonias color verde oscuro que podrían confundirse con el color verde azulado de *A. fumigatus*, los conidios de *A. nidulans* son producidos por fialides biseriadas y presenta células de Hülle [14]. El tamaño conidial también puede ayudar en la identificación de algunas especies, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. nidulans* tienen conidios que varían de 2 a 3.5 μm , mientras que los conidios de *A. flavus* y *A. niger* son más grandes (3-5 μm) [14]. Otra característica en común del género es la composición a nivel de pared celular, entrelazada por α -1,3-glucano (35-46%), β -

1,3-glucano (20-35%), β -1,6-glucano (4%), β -1,3/1,4-glucanos (10%), quitina, galactomananos (20-35%), mananos y proteínas [1,15,16].

1.3 Características microbiológicas de *A. fumigatus*

Algunas de las características microbiológicas particulares de *A. fumigatus* permiten distinguirlo fácilmente de otros hongos. Este hongo crece fácilmente en medios micológicos convencionales como el agar papa dextrosa (APD), agar dextrosa de Sabouraud y agar Czapek entre 25° y 37°C, desarrollándose colonias en 3-5 días. La especie *A. fumigatus* se puede observar a nivel microscópico con un micelio hialino septado de 2-4 μ m, con cabezas aspergilares que miden de 30-50 μ m de diámetro, compuestas de un conidióforo corto cenocítico de 20-30 μ m que termina en una vesícula ligeramente alargada o subclávica de 20-30 μ m y de la cual nace una sola serie de fialides de 20-30 μ m, con disposición en un ángulo de 180° (“pelos parados”), de la cual se desprenden conidios redondos pequeños de 2.5-3 μ m. En cuanto a la macromorfología el hongo da lugar a colonias planas, ilimitadas, polvosas, secas, aterciopeladas, de color verde grisáceo, que ocasionalmente presentan un halo micelial blanco a rosa en la periferia de la colonia y en el reverso sin pigmento o raras veces un color ocre café difusible (**Figura 2**). La fase telemórfica es llamada *Neosartorya fumigata* [1].

A. fumigatus crece de manera óptima a 37 °C y se puede aislar de suelos y vegetación que alcancen temperaturas entre 12°C y 65°C, así como pH entre 2.1 y 8.8 [14]. Por otra parte, este hongo posee numerosos genes que codifican glicosilhidrolasas y proteínas extracelulares en su genoma, cuyos productos favorecen su crecimiento mediante la degradación de polisacáridos de las células vegetales y la adquisición de

nitrógeno mediante la degradación de sustratos proteicos [17,18]. No solo *A. fumigatus* puede utilizar una amplia variedad de sustratos, sino que también puede tolerar las tensiones impuestas por la congelación o la deshidratación durante períodos prolongados [14]. Además, los conidios de *A. fumigatus* se dispersan más fácilmente que la mayoría de otras especies de *Aspergillus* debido a su notoria hidrofobicidad [19]. La ubicuidad de *A. fumigatus* también se debe en parte a su capacidad de producir metabolitos secundarios potentes y bombas de eflujo abundantes que sirven como sistemas de defensa medioambiental [20].

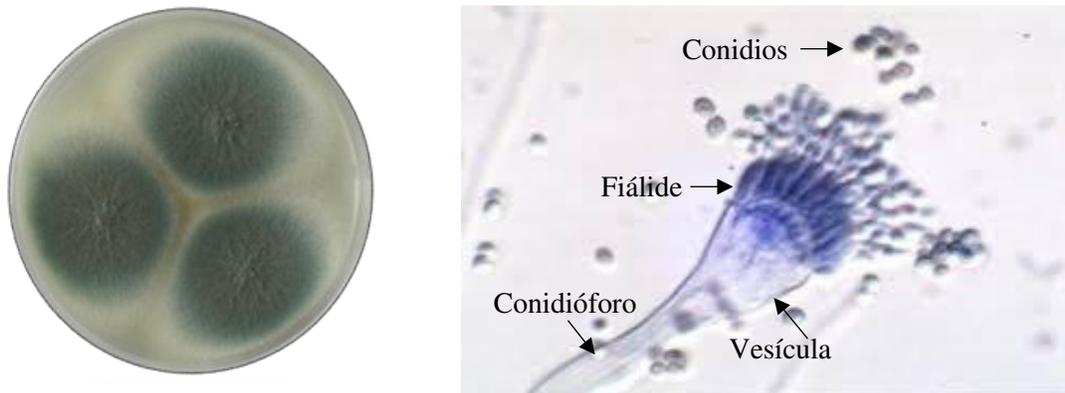


Figura 2. Características morfológicas de *A. fumigatus*. Fotografía de la a) morfología colonial de *A. fumigatus* en APD y b) clásica cabeza aspergilar microscópica teñida con azul de lactofenol [21,22].

1.4 Complejo Fumigati y caracterización a nivel molecular

En el momento en que la identificación a nivel de género y especie basada en las características morfológicas fue insuficiente para comprender el comportamiento de una misma especie que mostraba características fenotípicas heterogéneas como cepas inusuales con pobre esporulación, incluso resistencia, aislamientos anteriormente identificados como *A. fumigatus* tuvieron que ser re-identificados [23]. Estas especies son denominadas crípticas, debido a que no pueden distinguirse morfológicamente entre sí, y

son necesarios métodos moleculares para llevar a cabo una correcta identificación a nivel de especie [23,24]. Gracias al advenimiento de herramientas moleculares, el uso del análisis de secuencias multilocus ha conducido a la clasificación y descripción de estas especies crípticas, junto con otras pruebas como la PCR múltiple, análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica, microesferas luminex y, más recientemente, espectrometría de masas MALDI-TOF, que ha resultado ser una técnica prometedora para el análisis de estas especies, sin embargo es un método no estandarizado y carece de una base de datos completa [24].

El género *Aspergillus* se encuentra dividido en subgéneros y secciones. Hasta el momento la clasificación común consiste en 4 subgéneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*, y 20 secciones [8,24]. *A. fumigatus* pertenece al subgénero *Fumigati* y sección *Fumigati*, conformada por 63 especies [23]. A pesar de la reclasificación, *A. fumigatus* sensu stricto permanece como la especie que se aísla con mayor frecuencia dentro de esta sección, mientras que las especies crípticas se encuentran solo en un 10-15% de los casos. Existen 2 estudios con aislamientos clínicos a nivel de complejo: el de TRANSNET (Estados Unidos, n=208) [25] y el de FILPOP (España, n=323) [26], quienes reportaron una frecuencia de estas especies crípticas de 11% y 15% respectivamente con metodologías moleculares similares [24], por lo que el rol patogénico es limitado para estas especies; y algunas de las especies de relevancia clínica como *A. lentulus* generalmente se encuentran asociadas a infecciones mixtas junto con *A. fumigatus* [23].

La sospecha de la presencia de estas especies crípticas es expuesta por algunas características fenotípicas inusuales en cultivo, en el que por lo general se observa una defectuosa esporulación, pérdida de pigmentación, una variable o menor termotolerancia,

y diferentes perfiles de metabolitos con disminución de la producción de micotoxinas como la gliotoxina (**Tabla 1**). En este sentido, *A. fumigatus* puede crecer a 50°C, pero no a 10°C; mientras que las especies crípticas pueden crecer a 10°C, pero no a 50°C. *A. lentulus* posee cabezas más pequeñas, *A. udagawae* exhibe pigmentación rosa púrpura y es menos virulento. La resistencia a azoles es otra de las características de algunas especies crípticas [23,27]. En un estudio realizado por van der Linden et al. se observó que de un 3.2% de cepas resistentes, un 78% correspondía a *A. fumigatus* sensu stricto debido a mutaciones en genes de Cyp51A, mientras que el 22% restante eran en realidad debido a estas especies relacionadas [23,28]. Son pocos y variables los resultados de los estudios sobre resistencia antifúngica, pero concuerdan en algunos puntos, conjuntamente destacan la relevancia de 2 especies consideradas multirresistentes: *A. lentulus* por su resistencia intrínseca (gen Cyp51A) y *A. fumigatiaffinis* por sus altas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para anfotericina B y azoles, mientras que *A. viridinutans* y *A. pseudofischeri* han mostrado CMI elevadas para los azoles y, ocasionalmente, se reportan CMI altas para anfotericina B por *A. viridinutans* [29]. Además, estas especies crípticas se han encontrado en aislamientos de casos refractarios al tratamiento, con un desenlace fatal [29]. Por lo anterior, resulta relevante sospechar de estas especies cuando hay una pobre respuesta al tratamiento.

Para la identificación a nivel molecular de estas especies se recomienda utilizar la secuenciación del espaciador transcripcional interno (ITS), que es el locus estándar para la correcta identificación a nivel de sección. Sin embargo, este fragmento génico no es lo suficientemente polimórfico, por lo que es conveniente el uso de una segunda diana molecular, como β -tubulina (*benA*, *tub-2*), actina, calmodulina (*caM*), y rodlet A o

1 **Tabla 1. Características fenotípicas de algunas especies importantes clasificadas dentro de *Aspergillus* Sección *Fumigati*.** Modificado de
 2 “Aspergillosis: From. Diagnosis to Prevention”, Pasqualotto. Springer 2010 [30].

Taxón	Colonia ^a	Forma conidial/ornamentación ^a	Ascosporas ^a (decoración/crestas ecuatoriales)	Máx. temperatura de crecimiento		
				45°C	48°C	50°C
<i>A. brevipes</i>	Restringida, aterciopelada, amarilla-verde olivo	Globosa, equinulada	NR ^b	-	-	-
<i>A. duricaulis</i>	Restringida, <i>lily</i> /verde olivo	Globosa, equinulada	NR	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	Aterciopelada a pulverulenta, azul-verde-gris	Globosa, lobular-reticulada	NR	+	+	+
<i>A. fumigati</i> affinis	Flocosa, blanca/verde mate; pobremente esporulada	Globosa, lisa	NR	-	-	-
<i>A. fumisynnematous</i>	Flocosa, gris/verde	Elipsoidal, microtuberculada	NR	+	-	-
<i>A. lentulus</i>	Blancuzca, aterciopelada; pobremente esporulada	Globosa, microtuberculada	NR	+	-	-
<i>A. novofumigatus</i>	Flocosa, verde oscuro/grisáceo	Elipsoidal, lisa	NR	-	-	-
<i>A. thermotutans</i> (<i>N. pseudofischeri</i>)	Blancuzca, aterciopelada; pobremente esporulada	Sub-globosa, lisa	Acanaladas, 2 crestas flexibles	+	(+) ^c	-
<i>A. turcosus</i>	Aterciopelada, gris-turquesa-verde	Sub-globosa, lisa	NR	+	+	+
<i>A. viridinutans</i>	Aterciopelada, verde salvia; vesículas inclinadas	Globosa, lisa/delicadamente rugosa	NR	-	-	-
<i>A. unilateralis</i>	Aterciopelada, verde olivo/pizarra	Globosa, groseramente equinulada	NR	-	-	-
<i>N. assulata</i>	Flocosa, blanca; abundantemente esporulada	Sub-globosa, lisa	Grandes aletas superficiales ovales, 2 crestas	ND ^d		
<i>N. aureola</i>	Flocosa, amarilla-naranja-ante	Globosa, lobular-reticulada	Equinuladas, 2 crestas prominentes	ND		
<i>N. denticulata</i>	Flocosa, blanca; pobremente esporulada	Globosa, lisa	Denticuladas, surco prominente	ND		
<i>N. fennelliae</i>	Flocosa, verde-azul	Globosa, finamente rugosa	Delicadamente rugosas, 2 crestas	ND		
<i>N. fischeri</i>	Flocosa, oliva oscura/verde grisáceo	Sub-globosa, finamente rugosa	Puntiagudas, crestas rizadas	+	+	? ^e
<i>N. galapagensis</i>	Funiculosa, blanca; esporulante	Globosa, usualmente lisa	Micro-tuberculadas, 2 crestas	ND		
<i>N. hiratsukae</i>	Restringida, blanca, aterciopelada; pobremente esporulada	Globosa, delicadamente rugosa	Reticuladas, 2 crestas comprimidas	?	-	-
<i>N. quadricinta</i>	Pulverulenta, gris mineral/olivo	Globosa, delicadamente rugosa	Espinosas/reticuladas, 4 crestas	-	-	-
<i>N. udagawae</i>	Flocosa, verde mate	Globosa, lobular-reticulada	Tuberculadas, crestas irregulares	(+)	-	-

^aSiempre que fue posible, las descripciones de la apariencia colonial y de la estructura/ornamentación de la superficie conidial y ascosporas se tomaron de la descripción original de la especie.

^bNR – no relevante. Ascomata y ascosporas no se han evidenciado para estos estados anamórficos.

^c(+) pobre crecimiento a esta temperatura o información discordante de diferentes autores.

^dND – información de máxima temperatura de crecimiento no disponible para esta especie.

^e? – desconocido.

hidrofobina (*rodA*) para la identificación precisa a nivel de especie [14,31]. El tratamiento y pruebas de diagnóstico de forma individualizada para estas especies de forma rutinaria en la clínica no es requerido, recomendándose sólo en casos especiales como especies emergentes, tomando como criterio la epidemiología local y de la clínica implicada [10].

1.5 Patogénesis

Ciclo de vida. Debido a que los conidios de *Aspergillus* se encuentran dispersos libremente en el ambiente dentro de propágulos en la interfase agua/aire (100 conidios por m³), la principal vía de ingreso de estos al hospedero es la inhalatoria [32,33]. Diariamente se inhalan aproximadamente de 200 a miles de conidios por día sin causar ningún daño [34,35]. Debido a su pequeño tamaño (2-3 µm) y propiedades aerodinámicas, estos conidios alcanzan fácilmente las vías respiratorias bajas y se depositan en los espacios interalveolares [33,34,36,37]. Es en este punto, cuando intervienen diferentes mecanismos de defensa por parte del hospedero, tanto barreras fisicoquímicas, como la propia respuesta inmune y estos conidios se eliminan de forma efectiva [33].

Respuesta inmune. La primera barrera de defensa por el hospedero es el transporte o removimiento mucociliar que se encuentra en las vías respiratorias altas, y este movimiento se utiliza para expulsar los conidios que son atrapados en la barrera epitelial [33,37]. Cuando estos conidios no son removidos debido al daño en la barrera mucociliar o debido a una exposición continua, puede tener lugar la colonización de las vías respiratorias bajas, en donde los conidios llegan y se alojan en los alveolos pulmonares [33]. Es en este punto en donde intervienen las células epiteliales y las células

inmunes efectoras, que son los responsables de eliminar cualquier conidio que haya evadido esta barrera [33,38].

Esta interacción comienza al ser sensados los PAMPs fúngicos por los PRRs, lo cual activa la transducción de una cascada de señales. Los principales PRRs que participan en esta interacción son los receptores tipo lectina C (Dectina-1, Dectina-2, receptor de manosa, DC-SIGN), receptores tipo Toll (TLR4, TLR2, TLR3) y los receptores tipo NOD (NLRP3), estos receptores desencadenan una respuesta de activación de macrófagos y proinflamatoria incluyendo TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8 [33,39]. Específicamente Dectina-2 reconoce galactomanano (GM), TLR2 a conidios e hifas, TLR4 solo hifas y Dectina-1 es específica para el carbohidrato fúngico β (1,3)-glucano, que es expuesto en los diferentes morfotipos del hongo [34]. La interacción con los PAMPs comienza a medida que ocurre la hinchazón conidial para la conversión a hifa. Durante este proceso la pared de la célula fúngica sufre una remodelación acompañada de la degradación de las capas de los conidios que contienen los rodlets, lo cual además de contribuir a la adherencia protege del reconocimiento inmune, resultando en la exposición de polímeros de β -glucanos en la superficie celular del hongo [35,40].

Los primeros componentes de la respuesta inmune que se encuentran en el fluido broncoalveolar son las proteínas surfactantes SP-A, SP-D (colectinas) con función de opsoninas y el complemento [38,41]; sin embargo, algunos factores como la melanina DHN de *Aspergillus* permite a los conidios pasar desapercibidos por la proteína C3 del complemento, así como la adquisición de inhibidores de la activación del complemento como el factor H, FHL-1 y la proteasa Alp1 [42]. Otros componentes que contribuyen a la defensa por parte del hospedero son la pentreoxina PTX3 que se une a GM, el plasminógeno como opsonina y las células epiteliales que secretan componentes solubles

antimicrobianos, como las defensinas que promueven la producción de citocinas y quimiocinas (los corticosteroides eliminan esta respuesta inflamatoria), atrayendo macrófagos alveolares y células dendríticas que resultan en la polarización hacia una respuesta inmune de tipo Th1 [41].

Los efectores de la respuesta innata son los fagocitos no especializados del epitelio pulmonar. Los neutrófilos y los macrófagos alveolares residentes del pulmón ingieren y destruyen los conidios en el fagolisosoma por hidrólisis y oxidación (NADPH oxidasa). Los macrófagos alveolares residentes del pulmón son los primeros fagocitos en participar en la fagocitosis y eliminación de los conidios; con esto comienza la respuesta proinflamatoria que desencadena el reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, también intervienen los mecanismos de defensa del hongo en la detoxificación, como en el caso de la melanina que interfiere con los mecanismos de fagocitosis [34]. Interesantemente, se ha observado que los morfotipos (conidia e hifa) del hongo tienen efectos inmunosupresores sobre la señalización de TLR en monocitos, y que la respuesta inflamatoria selectiva dependiente del morfotipo protege al huésped de la inflamación excesiva y potencialmente dañina, lo cual a su vez puede propiciar condiciones ventajosas que favorecen la invasión tisular fúngica [34,41,43].

En cuanto a la respuesta adaptativa, se sabe que a falta de células Th17 o células Th1 aumenta la susceptibilidad del hospedero para presentar una infección fúngica invasiva (IFI), pero las respuestas excesivas de las células Th pueden causar daño tisular severo [35]. Es poco lo que se sabe del sistema adaptativo en la respuesta antifúngica, siendo una de las razones principales que dificultan el diseño y desarrollo de una vacuna efectiva [35].

Oportunismo. En ausencia de una adecuada respuesta inmune en el hospedero, los conidios experimentan una serie de cambios morfológicos de forma transitoria comenzando con una hinchazón, germinación y una extensión polar de las hifas (**Figura 3**). Una vez germinadas las hifas, hacen contacto con las células epiteliales alveolares para invadir y diseminar los elementos fúngicos al cruzar la delgada membrana basal intersticial que lleva a los capilares endoteliales que el hongo necesita penetrar para su diseminación [33,34]. Además, surge una reprogramación del transcriptoma para la adaptación del hongo dentro del nuevo ambiente hostil a través de factores de virulencia que potencian el éxito en su establecimiento en el hospedero [33,44–46]. Por una parte, están los factores que favorecen la colonización a través de la lesión tisular y la unión a las células epiteliales o la membrana basal dañada, como el ácido siálico. Por otro lado, la participación de hidrolasas y proteasas juegan un papel preponderante en la invasión, diseminación y asimilación de nutrientes. Además, están los que contribuyen a la patogenicidad fúngica en hospederos inmunocomprometidos al evadir o modular las defensas del hospedero, evitando el daño de las hifas por estrés oxidativo y resistencia a estresores, como la termotolerancia, osmotolerancia, adaptación al pH y adaptación a hipoxia. La melanina y las enzimas detoxificadoras como las superóxido dismutasas (SOD) y la catalasa A (catA), ayudan a combatir las acciones de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) [33]. Por su parte, la fumagilina y la gliotoxina (gliZ, gliP), contribuyen a la hipoxia al inhibir la angiogénesis, evitando la neovascularización, además que esta última tiene efecto inmunosupresor e interfiere en la mucociliaridad. Otros como el verrucologeno modifican la resistencia transepitelial, hiperpolarización y la vacuolización citoplásmica del epitelio respiratorio, afectando en etapas tempranas de la infección [33–35].

En la clínica se presentan 2 panoramas que propician el desarrollo de la API ante la respuesta inmune inadecuada. El principal escenario es la neutropenia prolongada, del resultado de terapias citotóxicas como la ciclofosfamida, un alquilante del ADN que interfiere con la replicación celular. En esta situación la infección se presenta con poco infiltrado celular de PMN y niveles bajos de TNF- α , y el hongo invade rápidamente el pulmón de forma angioinvasiva. En contraparte, se encuentran los no neutropénicos, en especial los pacientes con terapia corticosteroide, en la que API no se desarrolla de forma angioinvasiva, y se caracteriza por una gran cantidad de infiltrado piro-granulomatoso, necrosis tisular y una inflamación excesiva. El efecto inmunosupresor de los corticosteroides no perturba el número de PMN, pero si tiene una repercusión en el funcionamiento caracterizado con un deterioro en los fagocitos, producción de citocinas y quimiocinas, así como en la migración celular, perjudicando la habilidad de eliminar conidios e hifas. Mientras que, los neutrófilos al ser reclutados, crean un ambiente inflamatorio que resulta en daño al tejido y es la responsable de la muerte en el hospedero [34,47].

Cuando las hifas atraviesan la barrera alveolar-capilar y penetran las células endoteliales para acceder a los lúmenes de la arteriola pulmonar, se produce una lesión endotelial; desencadenando la liberación de citocinas proinflamatorias, expresión del factor tisular en la superficie de las células endoteliales, activación de la cascada de coagulación y trombosis intravascular [48]. Se disminuye la perfusión del parénquima pulmonar infectado por *A. fumigatus*, lo que conduce a la necrosis coagulativa que consiste en una zona central de tejido necrótico que se encuentra fuertemente infectado con una maraña de hifas de *A. fumigatus* y una zona periférica de hemorragia alveolar [49]. Radiográficamente, esta lesión corresponde al macronódulo típico rodeado por un

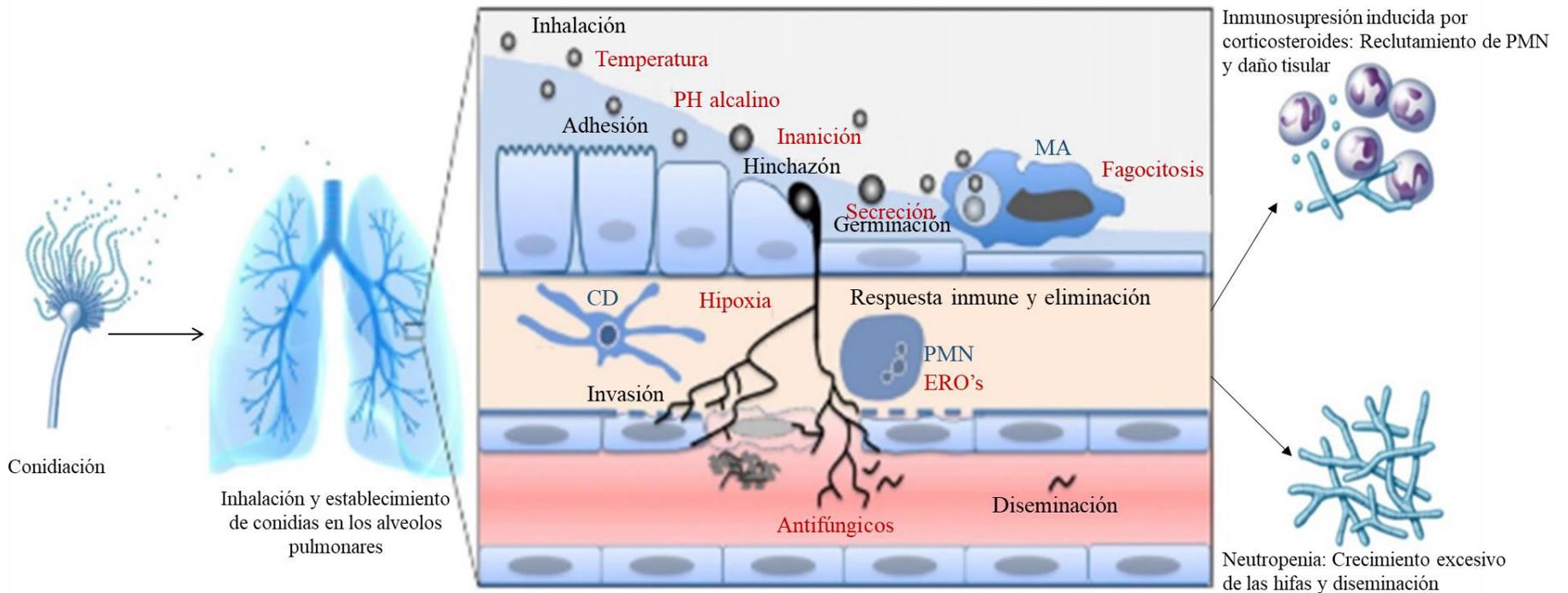


Figura 3. Patogénesis de infección por *A. fumigatus*. Eventos celulares de *A. fumigatus* (letras color negro); Células de respuesta inmune (letras color azul); Estresores (letras color rojo); MA: Macrófagos alveolares, CD: Célula dendrítica, PMN: Polimorfonucleares. Modificada de Krappmann et al., 2016 y Dagenais et al., 2009 [33,34]

infiltrado de vidrio esmerilado (el llamado "signo del halo"). La angioinvasión resulta en trombosis e infarto, creando un área necrótica en el tejido afectado [41].

1.6 Espectro clínico de la infección por *A. fumigatus*

La aspergilosis comprende aquellas enfermedades causadas por especies patógenas oportunistas del género *Aspergillus*. Dentro de sus variedades clínicas podemos encontrar a la aspergilosis cutánea, ocular y ótica; la aspergilosis alérgica, la aspergilosis diseminada y aspergilosis pulmonar. De la aspergilosis pulmonar o de vías respiratorias derivan: el aspergiloma o saprofitación pulmonar, los síndromes alérgicos no invasivos, como el asma severo con sensibilidad al hongo (ASSH) y la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), las aspergilosis pulmonares crónica necrozante (APCN) y no necrozante (APC) y, por último, la aspergilosis pulmonar invasiva (API) [1,50]. Esta última es la forma más severa de aspergilosis pulmonar y se asocia habitualmente a un mal pronóstico clínico. Las aspergilosis pulmonares son fácilmente distinguibles por sus manifestaciones clínicas, factores de riesgo e inmunología (**Figura 4**). Por ejemplo, una aspergilosis alérgica en realidad es causada por una reacción de hipersensibilidad, donde el hongo no parasita y se elevan los valores de eosinófilos e IgE, cursando con síntomas comunes de alergia como rinitis; mientras que la aspergilosis broncopulmonar alérgica afecta principalmente a individuos con padecimientos de base como asma o fibrosis quística. Por otra parte, el aspergiloma se presenta principalmente de forma saprofita en personas con antecedentes de tener alguna cavidad o espacio pulmonar formado por procesos patológicos como tuberculosis, abscesos, carcinomas, etc., en el que el hongo invade estas cavidades dando origen a las bolas fúngicas (en realidad, son micelio, moco y fibrina) sin

invasión aparente del tejido, cursando con un cuadro de tos discreta y mucopurulenta debido a la obstrucción mecánica. La APC afecta principalmente a aquellos individuos levemente inmunocomprometidos o que cursan con alguna enfermedad pulmonar crónica. Por su parte, la API es habitual en pacientes inmunosuprimidos, en quienes el hongo invade el parénquima pulmonar y genera lesiones con aspecto de neumonía necrosante, con una sintomatología más marcada en forma de bronconeumonía, es decir tos constante, expectoración mucopurulenta, hemoptisis, fiebre moderada persistente, dolor pleural, disnea, astenia y adinamia [1,9,35,50,51].

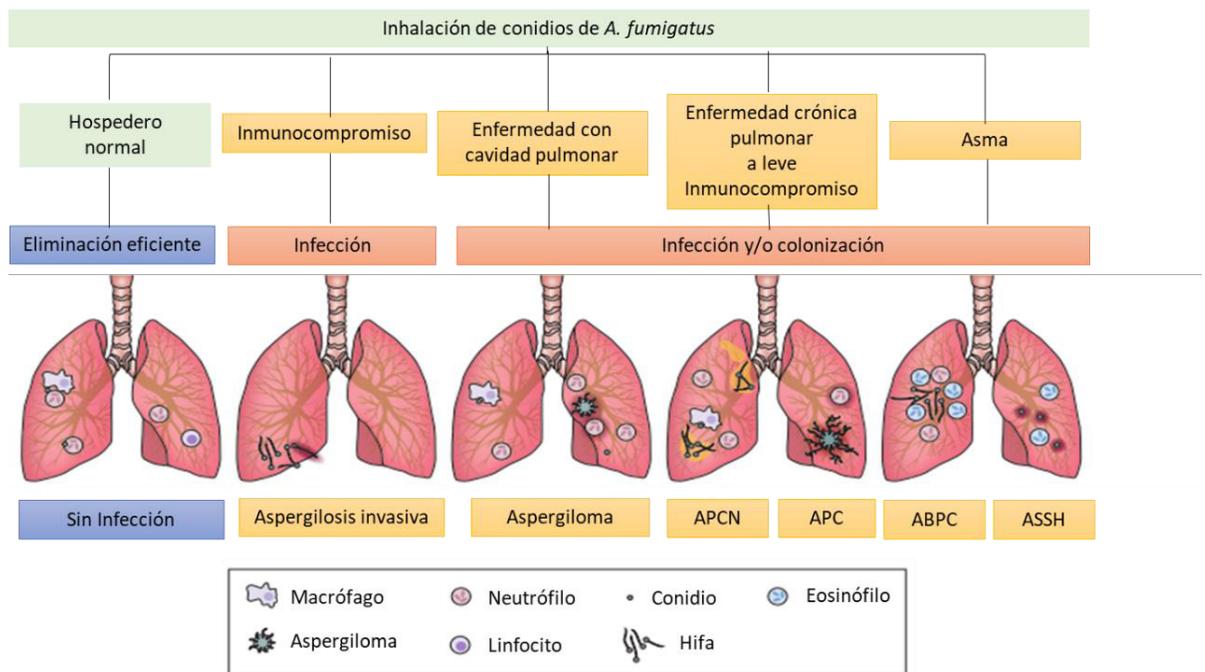


Figura 4. El espectro clínico de la aspergilosis. Modificada de Veerdonk et al., 2017 [35].

1.7 Epidemiología de la API

La aspergilosis se posiciona como la segunda micosis oportunista a nivel mundial, solo después de la candidosis. La API es la principal infección fúngica que destaca en severidad y que se asocia a IFI, seguida de mucormicosis y las levaduras [12,52], encontrándose asociada en primera instancia a enfermedades hematológicas y, en segundo lugar, a trasplante de órgano sólido (TOS) [13].

17.1 Factores de riesgo

La principal población susceptible de presentar API son los pacientes con inmunocompromiso, en quienes la enfermedad subyacente determinará el riesgo real de desarrollarla (**Figura 5**). Barberan et al. en un estudio de 960 individuos con API, un 48.3% presentó enfermedad hematológica, 29.2% fueron trasplantados de órgano sólido y un 27.9% correspondió a trasplantados de células madre hematopoyéticas [53][13].

La API se presenta principalmente en las siguientes situaciones:

- Neutropenia prolongada (<500 células/mm³), tal es el caso de diversos tipos de cáncer debido a la citotoxicidad del tratamiento. Son 3 los momentos críticos de neutropenia, el primero después del régimen, el segundo por la inmunosupresión exógena para GVHD y el tercero después de 100 días [9,50].
- Uso prolongado de corticosteroides (>3 semanas) [9,50].
- Empleo de medicamentos inmunosupresores (inhibidores de TNF- α) y/o citotóxicos [50].

- Receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas, es el principal factor asociado a esta infección y un 50.7% de las IFI's [54], con mayor riesgo en el trasplante alogénico que el autólogo [50,51].
- Enfermedades hematológicas como las leucemias, neoplasia maligna hematológica, síndrome mielodisplásico o anemia aplásica, especialmente aquellos que cursen con recaída o sean refractarios al tratamiento [50,51].
- Receptores de TOS, particularmente trasplante de pulmón, y aumentado el riesgo con infecciones oportunistas como el citomegalovirus (CMV9 [50,51].
- Enfermedad granulomatosa crónica grado III-IV, con defecto hereditario en la NADPH oxidasa [50,51] y aumenta el riesgo con uso de infliximab [9,50].
- Algunas inmunodeficiencias innatas o adquiridas como el SIDA en etapa avanzada, con bajo recuento de linfocitos T CD4⁺ <100 cel/mm³ [9,50,51].
- Otros como falla hepática, influenza, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes mellitus (DM), tuberculosis, u otros factores que aumentan el riesgo como el uso de antibióticos, nutrición parenteral, hospitalización, tabaquismo, entre otros [55].



Figura 5. Factores de riesgo en API. Adaptado de: Cadena, J., Thompson, G. R., & Patterson, T. F. (2016). Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics*, 30(1), 125-142 [11].

17.2 Incidencia

Más de 30 millones de personas se encuentran en riesgo de desarrollar API cada año debido a las quimioterapias y trasplantes por el uso de corticosteroides u otros agentes inmunosupresores, y más de 300,000 pacientes la desarrollan anualmente. En todo el mundo, al menos 125,000 de estos casos tienen EPOC y, al menos 30,000, SIDA [56]. Esta población representa un 76% de las IFI's, seguidas por las mucormicosis e infecciones por levaduras [52].

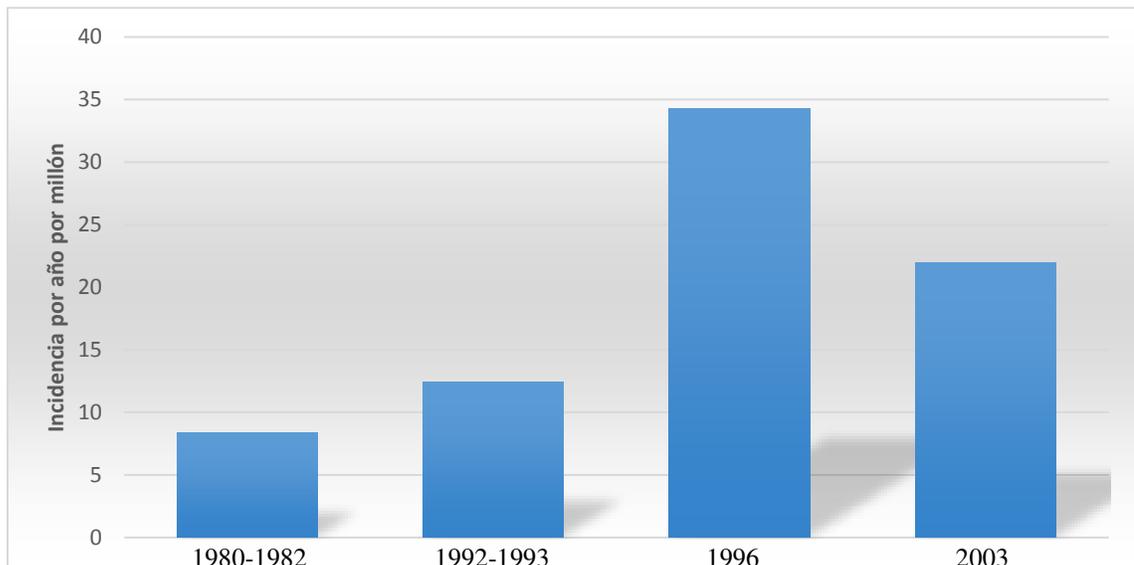


Figura. 6. Incidencia de API durante el periodo 1980-2003 [57].

En las últimas décadas se ha reportado un incremento en la incidencia de API, con algunas fluctuaciones que van de la mano del aumento en la población inmunocomprometida. En la **Figura 6** se observa la incidencia de 1980-2003 [58]. Un estudio de 10 años (2001-2010) en Francia reportó una incidencia de 4.4% por año, con una tasa de 1.1-1.8 por cada 100,000 habitantes, en el que se observó un incremento en incidencia respecto al tiempo [13,59]. A pesar de que la inclusión de profilaxis ha ayudado a que la incidencia disminuya, en un estudio con tratamiento profiláctico la incidencia persistió en un 4-12% [60].

Entre los principales grupos susceptibles, en los que se ha descrito que la incidencia ha ido en aumento, se encuentran las enfermedades hematológicas, el TOS y una estancia prolongada en la unidad de cuidados intensivos (UCI) [13]. Aproximadamente el 50% afecta a pacientes con malignidades hematológicas como

leucemia mieloide aguda o linfoblástica aguda y receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas.

Enfermedades hematológicas. La API ocurre en al menos 10% de los pacientes hematoncológicos [60]. Con una tasa de incidencia de 0.8-2.3 en las neoplasias malignas hematológicas [61,62], ocurre en un 20-30% de las leucemias mieloides agudas [52], un 13.4% en los síndromes mielodisplásicos y es la primera causa de IFI en los receptores de trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas, con un 2.3%-10% de los casos [63–66].

TOS. La API se presenta en un 2.4% de los trasplantados de órgano sólido. En un estudio en E.U.A. realizado durante 10 años se publicó una incidencia de 49% en trasplante de pulmón, 11% de hígado, 10% de corazón y 2% en trasplante de riñón [67] y más reciente incidencias de 8.3% en trasplante de pulmón , 7.1% de corazón, 2.6% de pulmón-corazón, 1.3%, de riñón y 1.2% en trasplante de hígado [68]. Esta disminución evidente puede ser debido a la recurrencia de estos trasplantes y al establecimiento de los nuevos criterios EORTC, en el que se descartaron aquellos casos que en realidad solo estaban colonizados.

UCI. La incidencia de API ocurre aproximadamente en 1.7-6.3 por cada 1000 admisiones de adultos [69,70] y un 0.4% en pediátricos en E.U.A [71].

Incidencia en México. Desafortunadamente, debido a que la API es una enfermedad no reportable, en México solo existen estimaciones de prevalencia establecidas en la población en riesgo a través de bases de datos de organizaciones mundiales y nacionales, extrapoliándolo con estudios de incidencia. Corzo et al. en el 2015 estimó una prevalencia de API de 4.56 individuos por cada 100, 000 habitantes, calculada de una población total mexicana en 2010 de 112, 336, 538, mientras que todas las IFI's

corresponden a un total de 2, 749, 159 personas afectadas en cualquier año (2.45%), con una probabilidad de muertes de 10,000. De la población con EPOC (346, 984) se estiman unos 4, 510 casos con API y al menos de 36% (1, 623) a 58% (2, 616) de estos no sobrevive a la terapia antifúngica. En las enfermedades hematológicas se estiman unos 506 casos por año de API, considerando 6,325 casos de leucemia por año. Con respecto a TOS y basados en que en México prevalecen los trasplantes de riñón, hígado y corazón, se estima una incidencia de 0.7%, con un total de 44 casos de IFI's y 20 casos para API [72].

Como se mencionó con anterioridad, gracias a los criterios de la EORTC establecidos en el 2008 para clasificar a la API como posible, probable y probada [73], los datos referidos son menos sobreestimados y descartan aquellos casos en los que no se encuentra probada la infección, por lo que la incidencia puede parecer que disminuye pero se ha visto que dependerá de cada país y de factores ambientales como el estado geoclimático y habitualmente asociada a trabajo de construcción cercano a hospitales, el tratamiento de las enfermedades subyacentes, así como polimorfismos genéticos que afectan la respuesta inmune innata [12].

1.7.3 Mortalidad

API se asocia con altas tasas de mortalidad, con exceso de duración y gastos de la hospitalización. En un estudio en E.U.A. se reportó una baja incidencia de API (0.2 a 13%) con mortalidades persistentemente altas, significando un promedio de 6 días más de hospitalización, lo cual representa un gasto excedente de 15, 542 dólares por persona, con costo total agregado atribuible de hasta \$ 600 millones de dólares anuales [74].

La tasa de mortalidad se ha encontrado desde un 20% hasta un 95%, dependiendo de la enfermedad subyacente y de un tratamiento oportuno [35,74]. La tasa de mortalidad

excede el 50% en neutropénicos y un 90% en trasplantados de células madre hematopoyéticas [12], con mortalidades atribuibles del 18 al 57.8% en enfermedades hematológicas malignas, en las que el riesgo de mortalidad aumenta con la co-infección con CMV, enfermedad granulomatosa crónica fase II-IV o severa, o con una edad >35 años [60]. En el TOS se atribuye una mortalidad de aproximadamente el 25% a las 12 semanas posteriores al diagnóstico, reportándose una mortalidad de 47.1% en trasplantados de hígado, 27.8% en trasplantados de riñón, 16.7% en trasplantados de corazón y finalmente un 9.5% en trasplantados pulmonares [67,68]. En un estudio de un año de API se encontró una mortalidad del 75% en las enfermedades hematológicas y 40% en el TOS. Una mortalidad atribuible 30 días después de haber ingresado a la UCI en adultos de 33.1% [75] y en niños de 37.5 % [76], pero que puede ser variable de 46% a 97% dependiendo de la enfermedad subyacente u otro factor de riesgo como el uso de corticosteroides, neutropenia, uso de antibióticos y/o ventilación mecánica. Además, se ha comunicado una mortalidad del 63-72% en individuos no neutropénicos, dada la dificultad de realizar un diagnóstico certero oportuno [12,70].

El diagnóstico oportuno y el inicio de la terapia antifúngica son factores que determinan la condición del progreso de API. La mortalidad incrementa de un 41 a un 90 % cuando el tratamiento antifúngico se instaura de manera tardía pasados 10 días después de iniciados los síntomas clásicos de neumonía [77]. Además, la mortalidad incrementa conforme a la evidencia clínica y microbiológica de API, con mortalidades de 38% en colonizados, 67% en aspergilosis probable y 79% en aspergilosis probada [60,70]. Si en la infección se presentara por una cepa resistente, la mortalidad asociada puede llegar a alcanzar casi un 90% [24].

1.8 Diagnóstico micológico

Un diagnóstico temprano está asociado a una mayor expectativa de vida para el paciente. Las herramientas actuales para el establecimiento del diagnóstico de API se detallan a continuación:

Técnicas directas:

Microscopía directa. Es el examen directo de las muestras o especímenes clínicos a través de la identificación microscópica en fresco con la adición de KOH al 10%, lo que permite la digestión parcial y aclaramiento de material proteico, dejando la pared celular fúngica intacta. Se pueden realizar tinciones de rutina como Gram, citológicas, específicas de hongos y fluorescentes (blanco de calcoflúor, uvitex 2B). La principal ventaja es que es una técnica rápida y sensible; sin embargo, tiene la desventaja de que otros hongos filamentosos como *Penicillium* y *Scedosporium* pueden confundirse con *Aspergillus* [78].

Cultivo. Este se puede llevar a cabo en medios micológicos convencionales, y se basa en la morfología colonial y posterior revisión de la micromorfología en microscopio. Una forma de distinguir a *Aspergillus* de otros hongos ambientales es su crecimiento a 37°C. Se recomienda la adición de antibióticos como cloranfenicol y gentamicina para la siembra de muestras procedentes de sitios no estériles, y ciclohexamida para inhibir hongos ambientales no patógenos. Se debe tener en consideración que en ocasiones se puede presentar un crecimiento y morfología atípica, la esporulación puede ser difícil o imposible de inducir. La desventaja del cultivo es que es lento (días) y poco sensible a comparación de otras técnicas, hay crecimiento de una infección activa hasta en un 34% de los casos cuando proviene de esputo y un 62% de lavado broncoalveolar (LBA),

además que se puede contaminar con la microbiota, dando como resultados falsos positivos [13,50,78].

Examen histopatológico. Se lleva a cabo acorde a la técnica histológica y se realiza una tinción que resalte o destaque los elementos fúngicos. Una de las tinciones es la hematoxilina-eosina (H-E), pero las hifas pueden resultar difíciles de visualizar si son dispersas, fragmentadas o si hay necrosis tisular sustancial. Se recomiendan tinciones fúngicas especiales como la tinción de metenammina de plata de Gomori (GMS) y el ácido periódico-Schiff (PAS). PAS tiene la ventaja de proporcionar una contratinción que revela el contenido celular de fondo a detalle, arquitectura tisular y respuesta inflamatoria. Por el contrario, GMS elimina ese ruido de fondo con los detalles de las células y tejidos del huésped, pero proporciona una tinción más sensible para detectar pequeños fragmentos de la pared celular fúngica, que de otro modo podrían estar ocultos por elementos de tejido circundante. PAS y GMS son tinciones complementarias y en ambas se suelen observar hifas delgadas, septadas, con ramificación dicotómica en ángulo agudo que son presuntivas de *Aspergillus* [78,79].

Pruebas serológicas:

Antigenemia

a) **Galactomanano (GM).** Es un heteropolisacárido termoestable presente en la pared celular del hongo. Actualmente existen dos ensayos comerciales para la determinación de este antígeno: el kit Pastorex (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Francia) y Platelia (BioRad, Marnes-La-Coquette, Francia). Este ensayo utiliza el anticuerpo EB-A2 y consiste en un ELISA tipo sándwich, con un límite de detección de 1 ng/L. Esta prueba se encuentra indicada idealmente en etapas tempranas de la aspergilosis, en las que la detección del GM se puede dar de 5-8 días antes de las

manifestaciones y es útil en pacientes con factores de alto riesgo, con una sensibilidad clínica variable (29-100%) dependiente del proceso patológico subyacente; por ejemplo, es recomendable en pacientes con inmunodepresión profunda, donde la sensibilidad es superior al 90% y la especificidad clínica >90% (**Tabla. 2**) [78]. Los falsos positivos se han reportado por el uso de hisopos de algodón para la recogida de muestra, terapia antimicrobiana, además de reactividad cruzada con otros hongos filamentosos como *Penicillium* y bacterias como *Bifidobacterium bifidum* [50]. El punto de corte positivo es >0.5, y >1 es indicativo de falla al tratamiento [80]. Es recomendable confirmar el resultado con una segunda determinación [13]. Las muestras para análisis son principalmente suero y LBA, aunque se puede detectar también en tejido y en varios líquidos corporales, incluidos líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido peritoneal, orina y líquido pericárdico [80]. Sin embargo, la evidencia relacionada a estas muestras es escasa. Una variante a ELISA es el ensayo de flujo lateral [13,81].

Tabla 2. Ensayo de GM *Aspergillus* en LBA o biopsia tisular con un punto de corte de ≥ 1.0 [82–90].

Población (pacientes)	Casos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
Hematología	26	100	100	[82]
TCMH	50	61	98	[83]
Hematología	67	87	96	[84]
TOS	5	100	91	[85]
TOS	67	67	98	[86]
Pacientes no-inmunosuprimidos	73	100	88	[87]
Hematología	65	98	97	[88]
Pacientes UCI	89	88	87	[91]
Hematología	200	100	88	[90]

b) (1→3)- β -D-glucano. Este componente antigénico se encuentra presente en la pared celular de la mayoría de los hongos (con excepción de *Cryptococcus* spp y los zigomicetos), por lo que se le considera una prueba panfúngica. Por lo anterior, el ensayo

desarrollado por los asociados de Cape Code-Fungitell se encuentra aprobado por la FDA en E.U.A. para el diagnóstico de IFI's. Este examen típicamente se realiza en suero. La prueba se considera positiva con lecturas superiores a 80 pg/mL y tiene una sensibilidad analítica de 1 pg/mL. Inconvenientes importantes que destacar con esta prueba es la cantidad considerable de falsos positivos en pacientes con hemodiálisis, bypass cardiopulmonar, tratamiento con productos de inmunoglobulina [13,78].

Anticuerpos. Otra prueba de utilidad para el establecimiento del diagnóstico puede ser el uso de anticuerpos. Sin embargo, solo es indicativo de exposición al hongo, a menos que se determinen los títulos. Una desventaja importante es que es un estudio muy tardado debido a que las muestras deben ser recolectadas cada 2-3 semanas para definir una infección activa [78].

Pruebas moleculares. La más común es la PCR en la que se amplifican y detectan por PCR punto final los genes: 18S rRNA, 28S rRNA e ITS, así como la PCR cuantitativa (LightCycler, TaqMan) con sensibilidad de 33-100%, hibridación *in situ* y otras pruebas que aún no cuentan con validación para su uso en diagnóstico clínico [50,78].

Imagenología. El papel de la imagen es identificar el sitio de la infección, evaluar el tipo, número y tamaño de las lesiones, y la extensión local (**Tabla 3**). Consiste en radiografías y tomografías computarizadas (TC) en busca de signos compatibles con neumonía que no son específicas para API. Las características típicas de API en imágenes de TC incluyen nódulos, lesiones e infartos en forma de cuña. Particularmente en pacientes neutropénicos, se puede observar un signo de halo, definido como un nódulo (> 1 cm de diámetro) rodeado por un perímetro de vidrio opaco que refleja la hemorragia. En ocasiones se observan fusiones pleurales. La presencia de nódulos y un signo halo son característicos de angioinvasión, y esta forma de aspergilosis ocurre típicamente en

pacientes severamente neutropénicos. La resonancia magnética (RM) es la modalidad de imagen preferida para identificar y caracterizar lesiones óseas, del seno paranasal o enfermedad del sistema nervioso central [50].

Tabla 3. Manifestaciones radiográficas de la API al diagnóstico [92].

Hallazgo de imagen	Porcentaje de pacientes con el hallazgo
Uno o más macronódulos (> 1.0 cm diámetro)	94
Dos o más macronódulos	79
Signo del halo	61
Consolidación	30
Macronódulo en forma de infarto	27
Lesión cavitaria	20
Broncogramas aéreos	16
Grupos de pequeños nódulos (< 1.0 cm diámetro)	11
Derrame pleural	11
Signo de la media luna	10
Opacificación de vidrio esmerilado no específico	9
Consolidación en forma de infarto	8
Lesiones en vías respiratorias pequeñas	7
Atelectasis	3
Lesión hilar/mediastinal	2
Derrame pericárdico	1

Otras. Espectrometría de masas MALDI TOF, detección de antimetabolitos, inmunohistoquímica (anticuerpos monoclonales WF-AF-117 o EB-A118) e inmunofluorescencia. Además de pruebas adicionales como el perfil de susceptibilidad antifúngica como guía para el tratamiento [13,78].

De acuerdo con la evidencia clínica y micológica, la API puede clasificarse como posible, probable o probada (**Tabla 4**). De acuerdo con la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group una aspergilosis es posible cuando el caso presenta suficientes factores del hospedero y evidencia clínica de sospecha, como hallazgos radiológicos en TC de alguna lesión pulmonar. La aspergilosis es probable cuando además exista evidencia micológica del hongo, como un biomarcador positivo. La forma probada será cuando se demuestren

los elementos fúngicos en el tejido, además de requerir el cultivo y microscopia positivos [73].

Tabla 4. Criterios diagnósticos de API [73].

Diagnostico final	Posible	Probable	Probado
Signos radiológicos y/o síntomas clínicos	Signos radiológicos en TC		No es considerado necesario
Resultados micológicos	Negativos	Prueba directa (citología, microscopía directa o cultivo). Antígeno GM detectado en plasma, suero, LBA o LCR	Estudio histopatológico, citopatológico o microscópico directo de una muestra obtenida por aspiración con aguja o biopsia en la que se observan hifas o formas similares acompañadas de evidencia de daño tisular asociado Análisis microscópico: material estéril y cultivo
Evidencia clínica	Sí	Si	Si
Evidencia micológica	No	Si	Si

1.9 Tratamiento de la API

1.9.1. Tratamiento actual

El tratamiento actual de primera línea para la API es el voriconazol. Como segunda elección se encuentra anfotericina B o isavaconazol. Por otra parte, como tratamiento profiláctico se recomienda el empleo de posaconazol y voriconazol y, cuando hay resistencia antifúngica, interacciones o reacciones adversas, finalmente se recurre a los fármacos antifúngicos de salvamento y a la terapia combinada (**Tabla 5**) [79].

Tabla 5. Régimen de dosis recomendadas por la guía práctica para el diagnóstico y manejo de la aspergilosis (2016). Modificada de Thomas F. Patterson et al., 2016 [79].

De elección primaria (1°)	Alternativa primaria (2°)	Salvamento (3°)
<ul style="list-style-type: none"> Voriconazol. 6 mg/kg IV cada 12 h por 1 d, seguido de 4 mg/kg IV cada 12 h; de forma oral 200–300 mg cada 12 h. Y también indicada como profiláctico. 	<ul style="list-style-type: none"> Anfotericina B liposomal (3–5 mg/kg/día IV) Isavuconazol 200 mg cada 8 h por 6 dosis, después 200 mg diariamente Anfotericina B deoxicolato es reservado cuando no están disponibles las otras anfotericinas Anfotericina B aerolizada indicada como profiláctico. 	<ul style="list-style-type: none"> Anfotericina B complejo lipídico (5 mg/kg/día IV) Caspofungina (70 mg/día IV × 1, luego 50 mg/día IV) Micafungina (100–150 mg/día IV). Y profiláctico Posaconazol (suspensión oral: 200 mg; tableta: 300 mg un día 1, después 300 mg diariamente, IV: 300 mg un día 1, luego 300 mg diariamente Itraconazol en suspensión oral (200 mg cada 12 h). Y profiláctico Terapia combinada: Polienos o azoles con equinocandinas

Voriconazol. Esta molécula antifúngica actúa bloqueando la conversión de la 14- α -lanosterol desmetilasa fúngica, esencial en la biosíntesis de ergosterol. La acumulación de 14- α -metil esteroides se correlaciona con la subsiguiente pérdida de ergosterol en la membrana celular fúngica. El voriconazol es metabolizado hepáticamente y exhibe una farmacocinética no lineal, es decir la concentración máxima en plasma y debajo de la curva incrementan de forma desproporcional cuando se incrementa la dosis. Es sustrato y un inhibidor de CYP2C19, así como de CYP3A4, por lo que un inconveniente importante en el caso de los triazoles (voriconazol, isavuconazol y posaconazol) es la

recomendación por parte de las guías clínicas de monitorear en suero los niveles terapéuticos de los fármacos una vez que el estado estacionario es alcanzado, esto con el objetivo de disminuir fallas al tratamiento por dosis subóptimas y minimizar toxicidades. Por otra parte, los azoles interactúan potencialmente con otros fármacos como la ciclosporina, tacrolimus, sirolimus y otras sustratos CYP3A4, así como inhibidores de tirosina cinasas, agentes inmunosupresores inhibidores de calcineurina y mTOR, corticosteroides, antirretrovirales, rifampin-rifabutin, agentes que causan intervalos QT prolongados como algunos antibióticos como fluoroquinolonas y macrólidos, antiarrítmicos, vincristina o agentes alcaloides, ciclofosfamida, que son agentes comúnmente administrados en estos individuos. Factores que afectan la farmacocinética del voriconazol incluyen la edad, la función hepática, la interacción de medicamentos con CYP2C19 y CYP3A4, dieta y antiácidos, inhibidores de la bomba de protones, peso y dosis. Las reacciones adversas incluyen disturbios visuales, toxicidad hepática, rash, eritrodermia, fotosensibilidad y excoiaciones orales, nausea, diarrea, alucinaciones visuales o auditivas y eventos cardiovasculares como taquiarritmias y QT prolongado. La toxicidad renal es incierta [50].

Anfotericina B. El mecanismo primario de esta molécula consiste en formar canales iónicos en la membrana, se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de los hongos como de células eucariotas humanas, deteriorando la integridad de estas. Lo anterior se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares, conllevando a una muerte celular inminente. La mayor afinidad de la anfotericina B es hacia el ergosterol, un esteroide encontrado en las membranas de los hongos; sin embargo, el fármaco se une también al colesterol, generando toxicidad, en particular a nivel renal, ya que se une preferentemente a proteínas (95%) del tejido de reticuloendotelial, por lo que

ha sido francamente asociada al desarrollo de nefrotoxicidad, así como a otras reacciones adversas importantes. Se presentan efectos adversos considerables, como reacciones a la infusión aguda (nausea, escalofríos y rigor), flebitis y nefrotoxicidad (azotemia, pérdida de potasio y magnesio y acidosis tubular renal). Más recientemente se han desarrollado formulaciones lipídicas de anfotericina B, con el propósito de reducir la nefrotoxicidad, pero los otros efectos adversos permanecen [79].

1.9.2. Disponibilidad y costo de los antifúngicos

De acuerdo con el Fondo de Acción Mundial para las Infecciones fúngicas o GAFFI (por sus siglas en inglés Global Action Fund for Fungal Infections), una de las problemáticas más serias de los antifúngicos es precisamente su disponibilidad a nivel mundial (**Figura 7**), ya que muchos países no cuentan en la actualidad con ningún antifúngico (**Tabla. 6**) o el precio es excesivamente elevado (**Figura 8**) [56].

Tabla 6. Países con acceso a anfotericina B. Modificada de Kneale et al (2016) [56].

Estatus	Solamente intravenoso
Antifúngico	Anfotericina B
Países que no tienen licencia	22/155 (14.2%)
Países en la que no está disponible	42/155 (27.1%)
Población sin acceso a los antifúngicos	480,963,000 (6.62%)

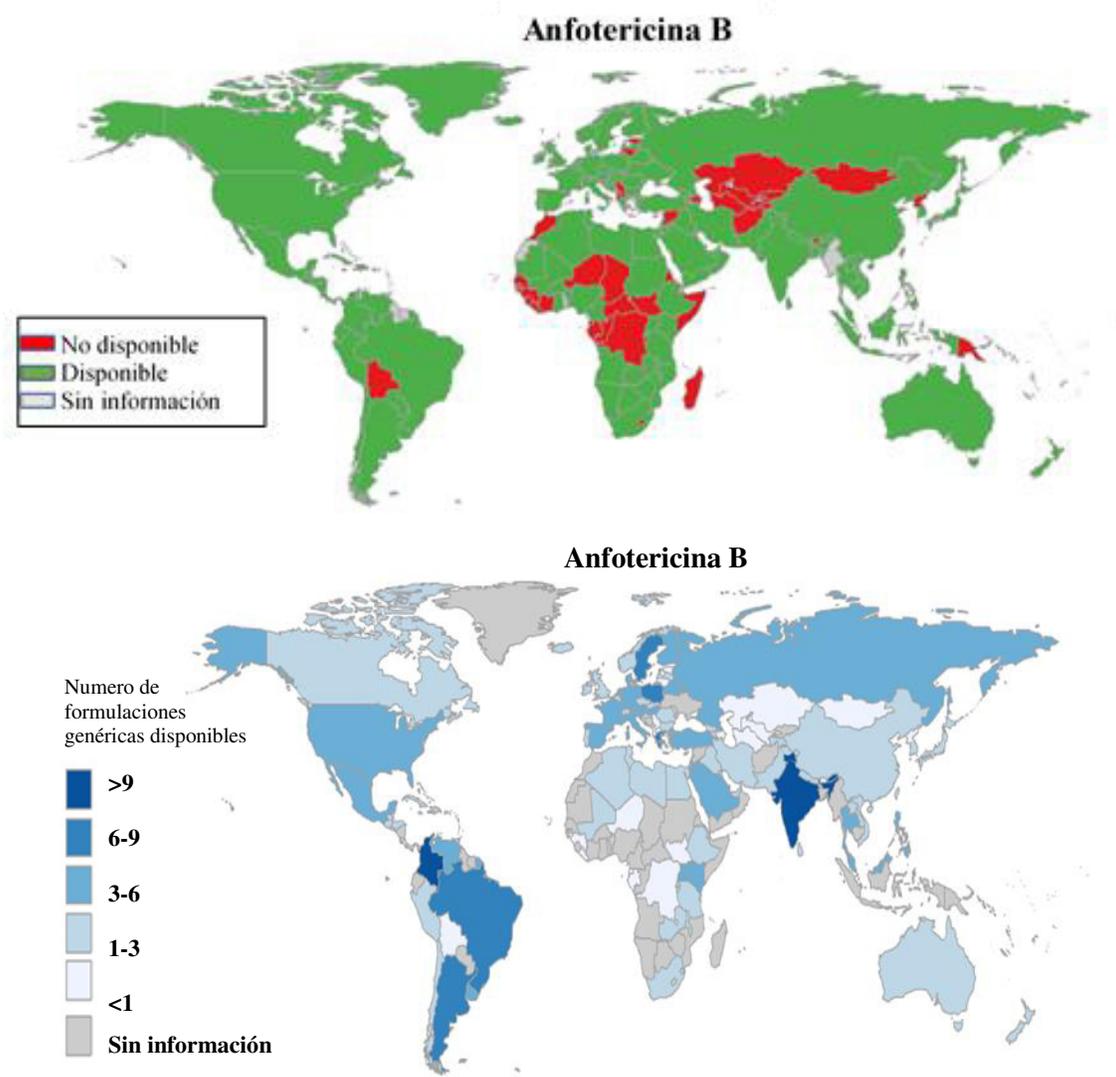
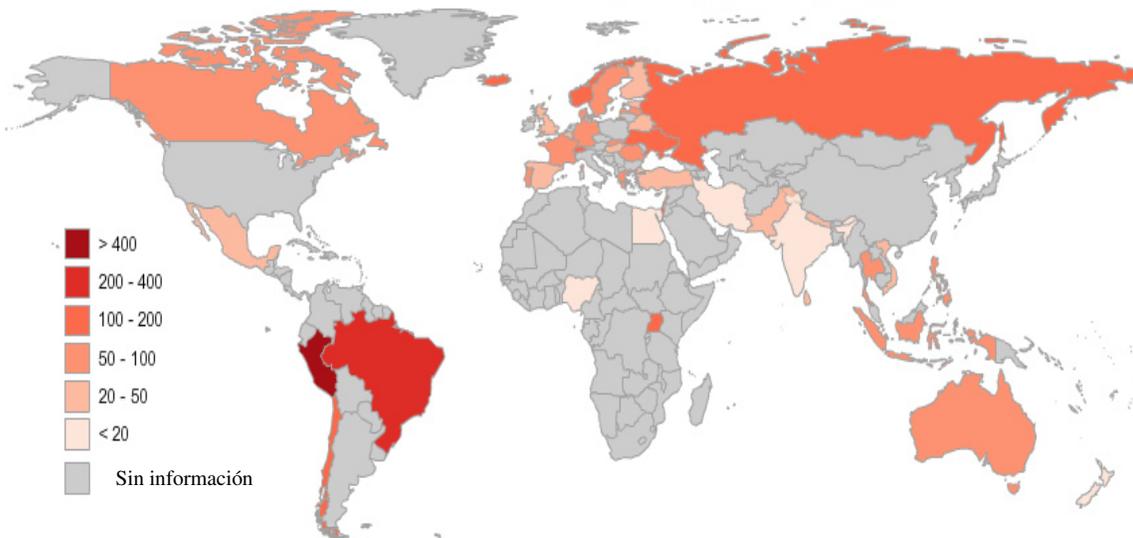


Figura 7. Disponibilidad de anfotericina B alrededor del mundo. Modificada de GAFFI (2018)

[56].

Precio de voriconazol (400mg/día)



Precio de anfotericina B (50mg/día)

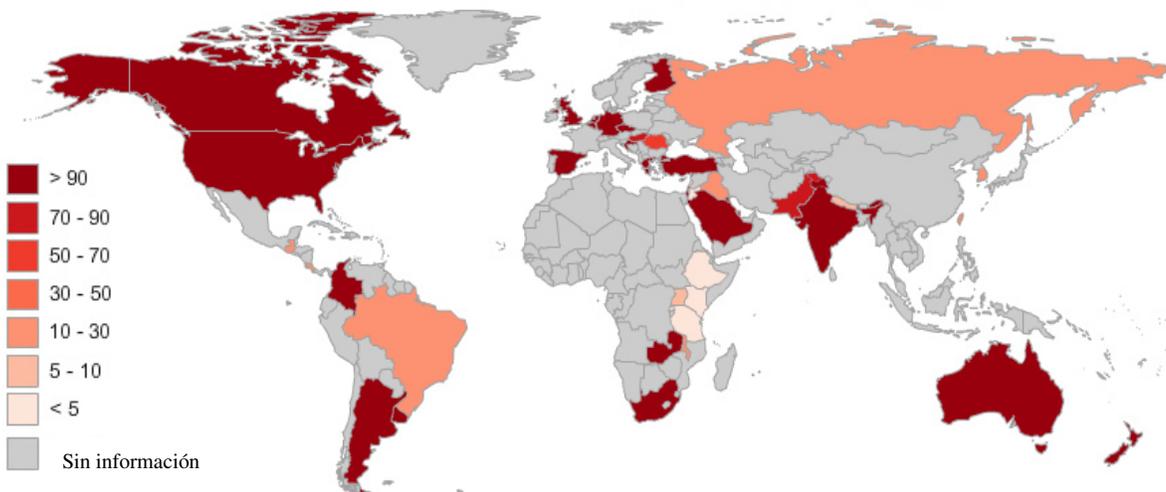


Figura 8. Precio estimado en dólares de anfotericina B y voriconazol alrededor del mundo. Modificada de GAFFI (2018) [56].

1.9.3. Estrategias para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas antifúngicas

El desarrollo de un nuevo fármaco implica un fuerte impacto económico que conlleva un prolongado tiempo de investigación, por lo que representa un elevado costo de inversión para la industria farmacéutica. Algunas estrategias en la implementación de nuevos medicamentos antifúngicos son el desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas, y las modificaciones de moléculas ya conocidas (**Figura 9**). Las rutas actuales, de acuerdo a Carrillo et al, se encuentran enfocadas en el desarrollo de nuevas moléculas poliénicas (KY-62, rustimicina, espongistatina y SPK-843) o nuevas formulaciones menos tóxicas de las ya conocidas como preparaciones nanoparticuladas (anfotericinas liposomal, lipídica, intralipídica, coloidal, permeabilizante, metil éster y nistatina liposomal), nuevos azoles derivados de los conocidos, con más potencia y mejor farmacocinética (voriconazol, Z-11679D, Z-11756, SCH-56592, D-0870, uR-9825, BMS-207147, SYN-2869, BAYw9279, etc.), algunos derivados de triazoles como el albaconazol, ruvaconazol y la búsqueda de antifúngicos con nuevas dianas en la pared o membrana plasmática (equinocandinas y neumocandinas, mulundocandinas, cilofungina, nikomicinas, polioxinas, aculeacinas, aureobasidinas), inhibidores de las proteínas como los derivados de las sordarinas (GR135402, GM160575, GM191519, GM222712A, GM19366 y otros), aspiroclorinas, análogos de precursores de ácidos nucleicos, pramidicinas (BMY28864) y derivados de amidoxima [6,93]. Por otra parte, el enfoque en el desarrollo de anticuerpos y vacunas ha tenido poco éxito, debido a la poca información de la respuesta humoral, y que por anticuerpos pasivos se han arrojado conclusiones inconcretas, presentando anticuerpos que funcionan como protectores y otros no protectores [35].

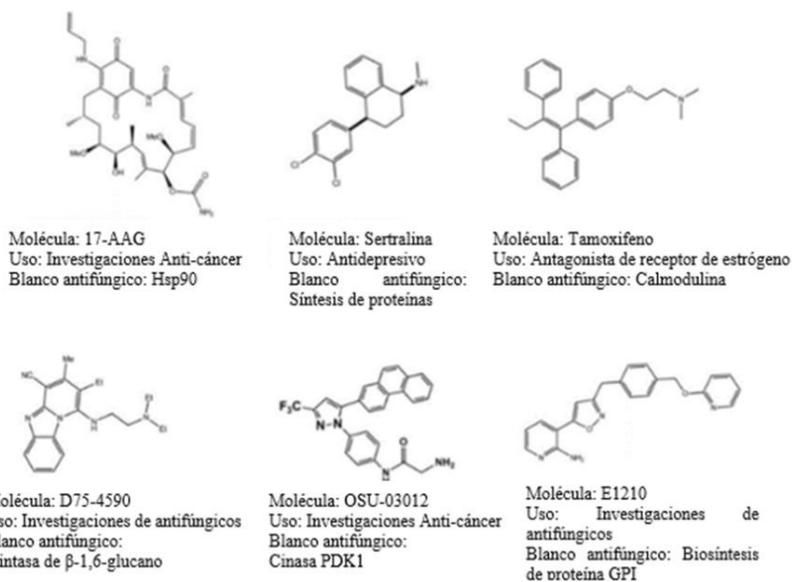


Figura 9. Estructura química, nombre, uso clínico y objetivo molecular putativo de fármacos y moléculas pequeñas con potencial antifúngico. Adaptado de Butts et al.2012 [94].

1.9.4. Nuevas moléculas y re-propósito de medicamentos

Una de las estrategias novedosas alternativa al desarrollo de Novo de un medicamento es el re-propósito de medicamentos, también conocido como redefinición, redirigir, replantear, reposicionar o volver a perfilar medicamentos [95]. Se trata de un concepto que se refiere al proceso de encontrar nuevos usos clínicos fuera del alcance de la indicación médica original para medicamentos existentes, por lo que estas drogas o moléculas conocidas de las cuales ya se encuentran establecidas sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, el perfil de seguridad así como la toxicología, efectos adversos y la formulación, al ser traducidos a una nueva indicación útil podrían llevarse rápidamente a una nueva indicación terapéutica, acelerando el desarrollo de medicamentos en general [94,96,97]. Esto ofrece grandes beneficios sobre el descubrimiento de Novo de medicamentos, evitando el largo proceso costoso y riesgoso, ya que actualmente de 5,000-10,000 moléculas que se prueban, solo sale una (<10% de

éxito) y tarda un proceso de mínimo 10 años en ser aprobada como medicamento y entre 13 y 17 años para salir al finalmente al mercado con un costo aproximado de inversión de \$ 2500 millones de dolares. En contraparte, reposicionar un medicamento cuesta en promedio \$ 300 millones de dolares y demora alrededor de 6.5 años (3-12 años), que representan la mitad de tiempo y la cuarta parte en costos de inversion [96,97]. Por lo que los investigadores pueden saltar la fase I de seguridad terapéutica, e ir directamente a la fase II [96]. No obstante, al presentar otra actividad terapéutica además de la ya conocida, el mecanismo de acción no es necesariamente el mismo. Cada vez es más utilizada y aceptada esta estrategia, por lo que ha expandido el interés por la búsqueda de moléculas conocidas con nuevas propiedades por parte de las industrias farmacéuticas (**Figura 10**) [95,97] .

Las ideas para el reposicionamiento pueden provenir de observaciones fortuitas (por ejemplo, sildenafil); desde conocimientos novedosos e informados (por ejemplo, duloxetina) o desde plataformas tecnológicas establecidas para identificar oportunidades



Figura 10. Comparación del desarrollo de Novo y el re-propósito de un medicamento.

de reposicionamiento (por ejemplo, el sistema cHTS de CombinatoRx26) [97]. Así como pueden provenir de medicamentos aprobados por la FDA, o de bibliotecas de aquellos que pasan los ensayos de fase I, pero no pasan la fase II porque no tienen el mismo efecto en los humanos que tenían en los animales. Algunas historias de éxito en este sentido es el sildenafil, un medicamento para angina desarrollado en 1989 que es actualmente comercializado como Viagra® y usado para tratar la disfunción eréctil. Otro es la azidotimidina, la cual falló como quimioterapéutico, pero emergió en los 1980s como antirretroviral para el manejo de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [97].

Algunos ejemplos prometedores del re-proposito de medicamentos con propiedades antifúngicas son descritos para los inhibidores de la calcineurina y la rapamicina (TOR) por Heitman et al., los inhibidores de Hsp90 como el derivado de geldenamicina 17-AAG por Cowen y Lindquist et al., [98] y la sertralina por Zhai et al [99]. Además, recientemente, varios grupos de investigación han dispuesto bibliotecas de medicamentos patentados para agentes con actividad antifúngica [94]. En este sentido, Breger et al. identificaron 15 compuestos que prolongaban la supervivencia de *C. elegans* infectados con *C. albicans* y demostraron que la enoxacina, una fluoroquinolona, era eficaz en un modelo murino de candidiasis diseminada [100]. Recientemente, Spitzer et al. identificaron 148 compuestos que potenciaron la actividad *in vitro* de fluconazol mediante el cribado de una biblioteca química similar contra *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *C. gattii* en presencia sub-inhibitoria de fluconazol [101].

1.9.5. Sertralina

La sertralina es una droga psicotrópica antidepresiva perteneciente a la familia de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) que comúnmente se emplea para tratar el trastorno obsesivo compulsivo, el trastorno de pánico y la depresión. El mecanismo de acción involucra el bloqueo selectivo de la recaptación de serotonina en la membrana neuronal, lo que mejora las acciones de la serotonina (5 - HT) [102].

1.9.5.1. Farmacocinética

La dosis administrada varía de 50 a 200 mg/día por vía oral. La concentración plasmática máxima (C_{max}) de sertralina se produce entre 4.5 a 8.4 h después de la dosificación. La dosis de 50 mg/día alcanza una concentración plasmática media a las 24 h de 0,006 mg/L, mientras que la dosis de 200 mg/día alcanza una concentración plasmática media de aproximadamente 0,107 mg/L. Sigue una farmacocinética lineal. Tiene una alta unión a proteínas (98%) y lipoficidad. La vida media de eliminación en plasma es aproximadamente de 26 h. El volumen de distribución (V_d) excede los 20 L/Kg, con una extensa unión inespecífica a tejidos. Sobre la base de este parámetro farmacocinético, los niveles plasmáticos en estado estacionario se presentan a los 7 días. [102–105]. Sin embargo, la concentración alcanzable en el cerebro es más de 20 veces superior a la del plasma y 65 veces superior en pulmón que en plasma [106]. A pesar de una tasa de recuperación de aproximadamente 28%, el uso a corto plazo de sertralina tiene efectos adversos manejables [105]. En un estudio de Nagy et al. en 2004, el efecto más significativo debido a la sertralina fue un caso adverso de eosinofilia en 17 voluntarios sanos. Entre los efectos adversos observados con frecuencia fueron náuseas y diarrea [105,107]. Cabe la pena señalar que la ventana terapéutica de la sertralina cuenta con un margen amplio de seguridad, con reportes de toxicidad mínima de 700 a 2100 mg [108].

1.10 Antecedentes

En 1993 se describió por primera vez la actividad antimicrobiana en fármacos psicotrópicos de los grupos fenotiazina y tioxanteno y, desde entonces, se han examinado varias sustancias y se ha informado que los ISRS influyen en la viabilidad *in vitro* de las bacterias principalmente Gram positivas y la resistencia a la cloroquina en *Plasmodium falciparum*. Una de estas moléculas es la sertralina, la cual además de su prescripción como antidepresivo ha demostrado tener actividad antibacteriana y antifúngica en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Además de otros efectos que comprenden actividad antiviral, espermicida, y antitumoral [109].

1.10.1 Actividad antifúngica *in vitro* de la sertralina

La actividad antifúngica de la sertralina fue descubierta por serendipia, al observar de manera accidental cuando tres pacientes con trastorno disfórico premenstrual (TDPM) y candidiasis vulvovaginal recurrente (CVV) se sometieron a terapia con sertralina para el manejo del TDPM, pero durante la intervención con sertralina, sorpresivamente las pacientes no tuvieron episodios recurrentes de CVV aguda. Al observar este fenómeno se comprobó que efectivamente la sertralina era la responsable de la actividad antifúngica mediante ensayos *in vitro* con especies de *Candida* [110]. Siguiendo esta misma línea de interés, se ha investigado esta actividad en otros ISRS y con otros hongos de importancia clínica como *Aspergillus*, evidenciándose de igual forma actividad antifúngicas *in vitro* [111]. Otros hongos, en el que la sertralina presenta actividad *in vitro* se encuentran *Cryptococcus* spp, *Trichosporon asahii*, *Fusarium solani* y *Coccidioides* spp [99,112–114]. Adicionalmente, se han evaluado otros parámetros como el efecto de este

psicotrópico en la virulencia de *Candida* [115], la sinergia que presenta en combinación con otros antifúngicos, así como en casos de resistencia a fluconazol [114].

Otro de los hongos en los que más se ha estudiado este potencial de la sertralina es *Cryptococcus* spp., en el que se han realizado ensayos de susceptibilidad antifúngica, sinergismo antifúngico, así como modelos animales de eficacia terapéutica [109] [116] y ensayos clínicos [117,118]. Adicionalmente, y de manera reciente, se llevó a cabo un estudio clínico en fase III, en el que se evaluó la seguridad y la eficacia microbiológica de la sertralina como tratamiento adyuvante para el manejo de la criptococosis meníngea en pacientes con VIH [119].

1.10.2 Actividad antifúngica *in vitro* frente *A. fumigatus*

De antecedentes se tiene que Lass Flörl y cols en 2001 evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de 5 frente a 11 aislamientos clínicos de *A. fumigatus*. Los investigadores encontraron que la sertralina fue la molécula con mejor actividad, reportando además que al exponer prolongadamente cepas de *Aspergillus* a sertralina ocurrían cambios irreversibles en el hongo, comprometiendo su viabilidad[111]. Por otra parte, Heller et al. en 2004 probaron la actividad antifúngica sinérgica de la sertralina en combinación con anfotericina B e itraconazol, disminuyendo las concentraciones mínimas efectivas para ambos fármacos[120]. Más recientemente, Ayaz et. al. en 2015 confirmaron la actividad antifúngica *in vitro* de la sertralina frente a diferentes cepas de microorganismos, incluido *A. fumigatus*[114]. No obstante, cabe señalar que hasta el momento no se cuenta con estudios *in vivo* que permitan comprobar la actividad antifúngica de la sertralina frente a *A. fumigatus*.

1.11 Modelos animales de aspergilosis

Actualmente se cuenta con diversos modelos *in vivo* para el estudio de la API, desde modelos invertebrados donde destaca *Galleria mellonella*, hasta los modelos mamíferos como el modelo murino. Estos modelos de aspergilosis han sido usados ampliamente en el estudio de varios aspectos de la enfermedad, como evaluación de herramientas diagnósticas, la respuesta inmune del hospedero, factores de virulencia, análisis de expresión *in vivo*, evaluación de componentes terapéuticos, genes de virulencia, patogénesis, comparación de virulencia entre cepas y eficacia terapéutica [121]. Algunas consideraciones importantes al momento de elegir un modelo experimental es escoger aquel que simule lo más cercano posible las condiciones que ocurren en el escenario clínico real de la enfermedad en humanos, además de consideraciones éticas, ser reproducible inter e intra laboratorio [122], costo razonable y fácil de adaptar y estandarizar [121].

Algunos de estos modelos son los siguientes:

Modelos invertebrados. Útiles en farmacológica, toxicología y estabilidad metabólica. Su principal desventaja es la simplicidad fisiológica que lo hace muy diferente a los humanos. Algunos ejemplos son: *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster* y *G. mellonella*. Destacándose *G. mellonella* por su valiosa utilidad desde estudios de potencial de virulencia fúngica hasta eficacia terapéutica. Dentro de sus grandes ventajas se encuentra la fácil manipulación, bajo costo, sobrevivencia a 37°C y no requerir aprobación ética, además de presentar similitudes en la respuesta innata en mamíferos, incluyendo la producción de péptidos antimicrobianos y fagocitos. Sin

embargo, su principal desventaja es que carece de estandarización y que no tiene actualmente el genoma completo secuenciado. Recientemente Champion et al. 2018 proponen las condiciones de estandarización en este modelo [123].

Aviarios. Ejemplos: codorniz japonesa, pavos, ave de corral y pollos. Útiles en el desarrollo de vacunas, ya que adquieren la infección de forma natural sin inmunosupresión [122].

Conejillos de indias. Han sido encontrados principalmente en modelos de endocarditis. Una ventaja es que el metabolismo es comparable con el bajo aclaramiento en humanos, pero son pocos los estudios que se han realizado con estos animales [122].

Conejos. Se han utilizado especialmente en queratitis, y en estudios de imagen [122].

Modelos murinos. Es el modelo experimental de aspergilosis más empleado, incluyen ratas 10.8%, pero en su mayoría destacan los ratones 86.1%. El modelo en ratones es el modelo de preferencia o *Gold* estándar. Dentro de sus ventajas se encuentran el gran número de animales que puede llegar a requerirse, fácil manejo, genéticamente definidos y más económico que otros modelos mamíferos, así como su similitud con el humano en los sistemas de órganos, la bioquímica, patologías, e incluso el genoma que contiene en número ~30,000 con menos del 1% sin homología al ser humano. No hay un protocolo estandarizado para el establecimiento de API en estos modelos, ya que se han desarrollado bajo a una variedad de condiciones y/o factores (**Tabla. 7**). Otra desventaja son las consideraciones éticas, logísticas y ciclos de reproducción que intervienen en las limitaciones del uso de mamíferos, en especial cuando se requiere un gran número de estos [121]. Inusualmente otros modelos como las vacas, borregos, monos han sido reportados.

Tabla 7. Descripción general de las condiciones de los modelos murinos publicados de API por *A. fumigatus*. Modificada de Desoubeaux & Cray, 2017 [124].

<p>➤ Condiciones y cepas de ratones BALB/c multipropósito, C57BL/6 para mutantes, o híbridos ICR/HaJ. Los ratones con una deficiencia inmunológica genética y ratones <i>knock-out</i> con genes específicos de citocinas facilita el estudio del papel de las células, citocinas y quimiocinas en el hospedero contra <i>Aspergillus</i>.</p> <p>➤ Procedimientos alternativos para crear un contexto específico de oportunismo; por ejemplo, la irradiación en orden de simular la eliminación de células sanguíneas en un trasplante de médula.</p>
<p>➤ Sexo y peso</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 21.7 g (±3.8), [21.4–22.0 g] ▪ 50.2% son machos
<p>➤ Régimen de inmunosupresión</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Con inmunosupresión (75%), el monitoreo de leucocitos es recomendado <ul style="list-style-type: none"> ❖ Esteroides (44.4%). Inyección subcutánea de cortisona (100–200 mg/Kg 2 o 3 veces por semana) o triamcinolona acetónida ❖ Neutropenia. Alquilantes de ADN: Ciclofosfamida 150 mg/Kg, 2 veces por semana (42.9%). En un 24.9% se administra junto con esteroides ❖ Otros. Otras drogas inmunosupresoras, irradiación, inmunoterapia, mutaciones o deleciones de genes. ▪ Sin inmunosupresión
<p>➤ Utilización de antibiótico profiláctico (27.7%)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ciclinas ▪ Quinolonas ▪ Ceftazidima
<p>➤ Ruta de infección</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sistémica o IV (31.4%). Inóculo 2.5×10^7 ($\pm 1.8 \times 10^8$). Es la ruta de infección más utilizada por la facilidad y rapidez, ya que en un 79.5% de los casos es sin inmunosupresión, pero esta vía se aleja de las condiciones de infección reales. • Intraperitoneal (0.6%). Inóculo 1.2×10^8 (43.7%). • Intranasal (43.7%). Inóculo 2.0×10^7 ($\pm 5.8 \times 10^7$). La desventaja es que solo 10% del inóculo alcanza los pulmones y hay mucha variación. Es menos homogénea la neumonía, encontrando las lesiones en las vías altas en vez de los alvéolos. • Intratraqueal (16.8%). Inóculo 2.2×10^7 ($\pm 3.9 \times 10^7$). Requiere incisión quirúrgica. • Inhalatoria (8.1%). Inóculo 1.8×10^9 ($\pm 3.4 \times 10^9$). Un inconveniente es que el reto respiratorio requiere un gran número de ratones para ser estadísticamente relevante <ul style="list-style-type: none"> ○ Cámara de acrílico Hinnert's Steinbach ○ Cámara Madison <p>Las rutas de infección intranasal, intratraqueal e inhalatoria (66.9%) simulan la bronconeumonía y son los que más semejan la forma natural de infección</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alternativa como las extrapulmonares, siendo más común en CNS
<p>Selección de la cepa de <i>A. fumigatus</i> y cantidad de inóculo. Tanto la selección de la cepa y la cantidad de inóculo determinarán la virulencia y severidad en la que se establezca la infección, por lo que se recomienda establecer la caracterización del modelo y su progresión, como colonización o infección, así como si es infección local o diseminada.</p> <p>➤ En un 19.5% de los casos es elegida Af293 (ATCC MYA-4609, FA/1153, FGSC A1100, CBS 101355, NCPF 7367 o IHEM18963)</p> <p>➤ Aislamientos clínicos</p>
<p>➤ Parámetros de evaluación</p>

- Histopatología es la prueba estándar
- Cultivo *in vitro* (UFC) que es la carga fúngica de los homogenizados tisulares o fluidos centrifugados. La desventaja es que una gran masa fúngica de hifas enmarañadas no se puede distinguir de las formas conidiales de células individuales cuando se cultivan. La alteración de los órganos puede comprometer la viabilidad del hongo y al haber una homogenización incompleta, llevar a una subestimación, o al contrario las hifas únicas pueden ser cortadas en la homogenización, lo cual incrementa la cuenta tisular, o estarán falsamente elevadas con los agentes antifúngicos que fragmentan el organismo[125].
- Antígeno GM o β -D-glucano
- PCR. Es muy sensible porque determina el ADN, pero cuantifica a todo el hongo que estuvo presente y no distingue al hongo viable, por lo que es menos recomendable en evaluar efecto terapéutico[125].
- Ensayo de quitina
- Expresión de genes.
- Mortalidad, pero es preferible otra medida por consideraciones éticas.
- Determinación de los puntos finales para la eutanasia por consideraciones éticas:
 - Función respiratoria
 - Cambios en la temperatura corporal [126]
 - Alteración del comportamiento o apariencia (escala grid)
 - Pérdida de peso

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La API es una micosis oportunista de creciente frecuencia, debido principalmente al importante incremento de la población inmunocomprometida, asociándose a un pobre pronóstico y elevadas tasas de mortalidad. El tratamiento de esta entidad clínica conlleva importantes inconvenientes. Por lo que surge la necesidad de plantear nuevas alternativas terapéuticas que resulten más seguras y accesibles a la población, mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

Evidencia reciente sugiere que la sertralina posee actividad antifúngica *in vitro* frente a aislamientos clínicos de *A. fumigatus*. Sin embargo, a la fecha no se ha comprobado esta actividad *in vivo*, por lo que proponemos su evaluación en dos modelos experimentales de aspergilosis.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

La sertralina exhibe actividad antifúngica cuando es administrada como monoterapia para el tratamiento de la aspergilosis en dos modelos experimentales.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de la sertralina en dos modelos experimentales de aspergilosis.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterización molecular y susceptibilidad antifúngica *in vitro* de un aislamiento clínico de *A. fumigatus*.
2. Evaluar la actividad antifúngica de la sertralina en un modelo larvario de aspergilosis.
3. Evaluar la actividad antifúngica de la sertralina en un modelo murino de API.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

En la **Figura 11** se muestra el esquema general de la estrategia experimental. A partir de una colección de 22 aislamientos clínicos identificados fenotípicamente como *A. fumigatus*, estos se reactivaron metabólicamente y se identificaron a nivel molecular. Con base en los resultados obtenidos en esta primera etapa del estudio se seleccionó una cepa de *A. fumigatus* sensu stricto, con la cual se llevó a cabo la evaluación *in vitro-in vivo*. En primera instancia se prepararon los inóculos deseados, con los cuales se llevó a cabo la determinación de susceptibilidad antifúngica y la infección en 2 modelos experimentales de aspergilosis. Para evaluar la eficacia terapéutica de la sertralina se administraron los tratamientos de anfotericina B, voriconazol y sertralina al modelo larvario de aspergilosis y al modelo murino de API y, finalmente, se evaluaron los parámetros de supervivencia y de estado de bienestar en el modelo larvario, mientras que en el murino de API se determinaron la carga fúngica a través de la cuantificación de las unidades formadoras de colonias, antigenemia mediante la determinación del índice de GM y el análisis

histológico para evidenciar estructuras fúngicas a nivel tisular.

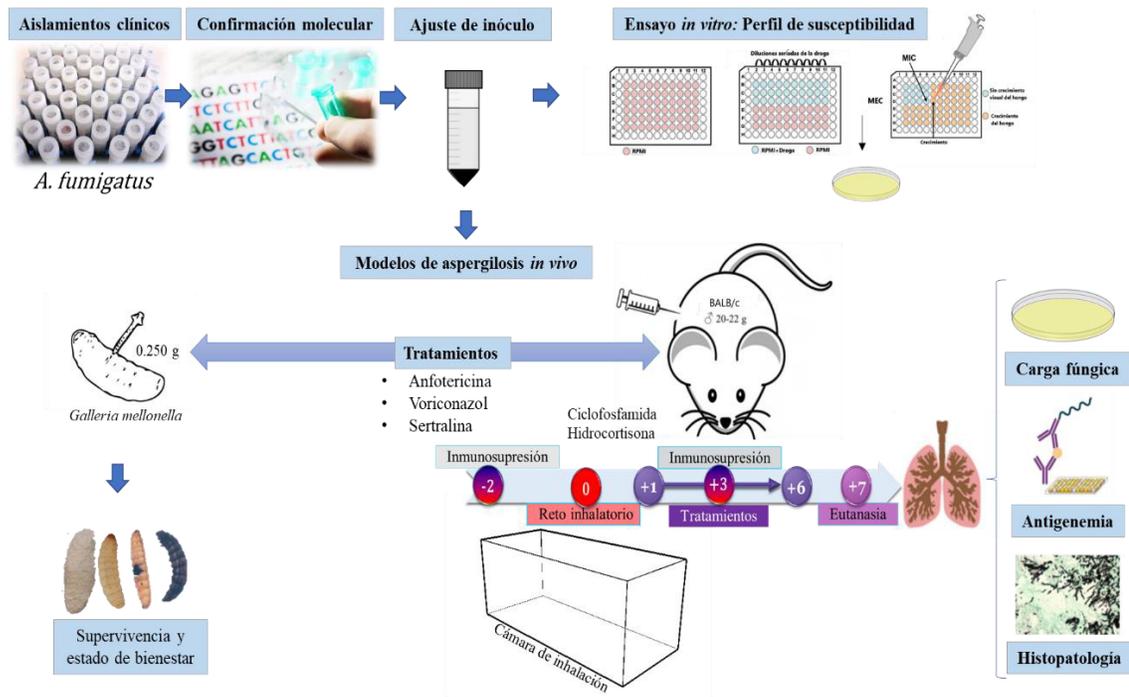


Figura 11. Esquema general de trabajo.

5.2 Declaración de ética

Todos los experimentos fueron realizados con la aprobación previa del Comité de Ética y de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (número de registro MB16-0001). El protocolo experimental fue diseñado en conformidad a la revisión de las regulaciones nacionales e internacionales y fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) siguiendo las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, así como del manual de buenas prácticas de laboratorio. El cuidado, mantenimiento y manejo de los animales se llevó a cabo en concordancia con la regulación mexicana vigente para la experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999). Todos los procedimientos realizados fueron efectuados bajo las normas establecidas en el Manual

de Procedimientos, Seguridad y Bioseguridad del Laboratorio de Microbiología Experimental (Documento: LME-MPSBS-997-MAN) y el procedimiento normalizado de operación para el Manejo de Animales de Experimentación (Documento: LME-PMA-997-PNO), bajo la certificación nacional (SAGARPA-SENASICA AUT-B-B-1216-029). La manipulación de las muestras y el manejo de los cultivos se trabajó en cabina de bioseguridad nivel II.

5.3 Microorganismo

5.3.1 Aislamientos clínicos de *A. fumigatus*

Se partió de una colección de 22 cepas procedentes de aislamientos clínicos recuperados en su mayoría de vías respiratorias. Estas muestras fueron referidas de laboratorios locales en el estado de Nuevo León (**Tabla 10**) y fueron recolectados en un periodo aproximado de 10 años (2006-2016) en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas anexo al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.3.2 Identificación fenotípica

Los aislamientos se sembraron en agar Czapek y se incubaron (Incubadora American Gold Series, modelo IS-81) a 37° C por 48 h. Posteriormente, los aislamientos fueron identificados fenotípicamente como *A. fumigatus* con base en las características coloniales del cultivo y morfología microscópica. Estas cepas se almacenaron en crioviales con caldo Sabouraud adicionado con glicerol al 10% en ultracongelación (-70°C) hasta su posterior utilización.

5.3.3 Confirmación molecular de los aislamientos clínicos

Una vez identificadas fenotípicamente las cepas, se procedió a la confirmación molecular a nivel de complejo y especie. Las cepas se reactivaron metabólicamente en APD y, posteriormente, tomando una fracción del cultivo se llevaron a caldo Sabouraud y se incubaron por 5-7 días a 30°C en agitación para la generación de micelio húmedo. A partir de este micelio se efectuó la extracción de ADN genómico mediante la técnica de fenol-cloroformo acorde a la metodología propuesta por Green et al [127]. Brevemente, se transfirió el micelio a un microtubo estéril y se le realizó choque térmico consistente en calentamiento a 99°C por 3 min (baño maría) e inmediatamente se llevó a congelación con hielo seco durante 3 min. Se repitió este procedimiento 7 veces y se atemperó la suspensión celular. Enseguida, se agregaron 200 µL de buffer de lisis enzimática (20 mM Tris-HCL pH 8, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100), agregando lisozima y quitinasa a una concentración de 2 mg/mL, se mezcló y se incubó a 37°C en agitación por 12 h. Después se añadieron 300 µL de TE 1x con SDS 1% y 5 µL de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó por 1 h a 55°C. Luego, 100 µL de NaCl 5M y 80 µL de CTAB/NaCl fueron añadidos, se mezclaron e incubaron a 65°C por 1 h. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con 250 µL de fenol saturado, 300 µL de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1) y 10 µL de TE 1x, se mezclaron por 5 min y se centrifugaron por 8 min a 13,000 rpm. Para la precipitación del ADN se recuperó la fase acuosa (parte superior), se añadieron 900 µL de alcohol isopropílico (isopropanol) al 100% y 240 µL de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) 3 M, se mezclaron y dejaron a -20 °C durante toda la noche. Luego se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento (pastilla) obtenido se lavó con etanol al 70% en dos ocasiones. Posteriormente se dejó secando toda la noche a 55°C para finalmente resuspenderlo en agua libre de nucleasas y calentar a 65°C por 15 min. El

ADN genómico total se trató con RNasa I (Invitrogen, E.U.A.) por 30 min a 37°C para remover trazas de ARN y la calidad e integridad se evaluaron por estándares fotométricos y métodos electroforéticos, respectivamente. Se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). M: Marcador HyperLadder 500pb, Bioneer. Una vez obtenido el ADN y, con el objetivo de amplificar los genes de β -tubulina e hidrofobina, se estandarizó la PCR de punto final utilizando los oligonucleótidos reportados previamente por Van Pamel y cols [128], para β -tubulina (benA1 5'-AAT TGG TGC CGC TTT CTG G-3' y benA2 5'-AGT TGT CGG GAC GGA ATA G-3') e hidrofobina (rodA1 5'-GCT GGC AAT GGT GTT GGC AA-3' y rodA2 5'-AGG GCA ATG CAA GGA AGA CC-3'). La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador de punto final (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD). Las condiciones de amplificación estandarizadas fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 90 segundos a 68°C y finalmente un ciclo de elongación de 3 min a 68°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV (UVP BioImaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom UVP Inc., Upland, CA, E.U.A.). A continuación, estos amplicones se purificaron con un kit comercial de Promega (Madison, WI, E.U.A.) y se secuenciaron por el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador automatizado 3130 (Series Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Para el análisis de la identidad a nivel de especie, las reacciones fueron analizadas en el ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer utilizando el programa Sequencing Analysis Software versión 5.3 de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas de cada aislamiento fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL-W y GeneStudio Pro (GeneStudio, Inc., Suwanee, GA, E.U.A.), seguido por

correcciones manuales en caso de requerirse. Las secuencias fueron anotadas enseguida utilizando el software Sequin del NCBI y finalmente se depositaron en la base de datos de GenBank. Como cepa de referencia se utilizó en todo momento la cepa *A. fumigatus* MYA-3626.

5.3.4 Cepa seleccionada de *A. fumigatus* sensu stricto

A partir de las cepas confirmadas a nivel molecular como *A. fumigatus* sensu stricto (**Tabla 10**) de forma deliberada se eligió la cepa de *A. fumigatus* con registro CRCEI-16007 para la realización de los posteriores ensayos experimentales. Dicha cepa fue elegida con base en características fenotípicas, como su abundante esporulación, así como por su procedencia clínica. La cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007 fue aislada a partir de una muestra de lavado broncoalveolar de un hombre mexicano de 72 años con diagnóstico clínico de neumonía. La cepa fue conservada a 4°C como micelio húmedo para su próxima utilización en los ensayos experimentales posteriores.

5.4 Drogas

Voriconazol fue adquirido como VFEND de Pfizer Inc., México y anfotericina B como anfotericina B de Pisa, México. Sertralina (TCI, Tokio, Japón) fue obtenida como polvo puro grado reactivo. Voriconazol se reconstituyó con agua inyectable estéril y se ajustó a la dosis deseada. Anfotericina B se reconstituyó, de igual forma, con agua inyectable estéril y después se ajustó con dextrosa estéril al 5% a la dosis deseada. Por otra parte, la sertralina fue reconstituida con agua inyectable estéril a la dosis deseada y finalmente esterilizada (Merck Millipore. Tullagreen, Carrigtwohill, Ireland). La ciclofosfamida (Sanfer, México), hidrocortisona (Pisa, México) y ceftazidima (Pisa,

México) se reconstituyeron con agua inyectable estéril acorde a las recomendaciones del fabricante y se ajustaron a la dosis deseada.

5.5 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

En la caracterización del perfil de susceptibilidad antifúngica únicamente se utilizó la cepa seleccionada *A. fumigatus* CRCEI-16007, esto se hizo con el objetivo de complementar el perfil fenotípico de la cepa. El procedimiento se realizó de acuerdo con las especificaciones de la metodología del CLSI documento M38-A3 y documento suplementario M61[129,130]. Se partió de un cultivo joven de *A. fumigatus* en APD y se cubrió con 3 mL de solución salina 0.85% suplementada con Tween 80 al 0.1% estéril para facilitar la homogenización de las conidias. A partir de la suspensión conidial resultante se procedió para el ajuste del inóculo, se añadieron poco a poco gotas de este inóculo a un tubo con 3 ml solución salina al 0.85%, realizando la lectura espectrofotométrica a $\lambda=530$ nm (Unico S-1100RS Spectrophotometer) hasta ajustar la suspensión a 80-82 %T. Por otra parte, se utilizaron placas de 96 pozos a las cuales se le adicionaron los fármacos que fueron previamente preparados y diluidos con el disolvente DMSO a partir de un stock de 1600 $\mu\text{g/mL}$ de manera seriada con base 2 (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente, se realizó una dilución adicional en medio RPMI en una proporción 1:50, de tal forma que las concentraciones finales resultaran para anfotericina B en 0.125-16 $\mu\text{g/mL}$, voriconazol en 0.125-16 $\mu\text{g/mL}$ y sertralina en 0.5-32 $\mu\text{g/mL}$. En cada pocillo correspondiente de la placa se colocaron 50 μL de los fármacos diluidos y se adicionaron 100 μL del inóculo ajustado de *A. fumigatus*, en una proporción 1:2 (equivalente a $0.2-4 \times 10^4$ UFC/ml), así como también se contó con el control de crecimiento (RPMI+ hongo), control de esterilidad (RPMI) y control

vehículo/toxicidad (RMPI+DMSO). Las microplacas se incubaron por 48 h a 37° C y se realizó la lectura de CMI correspondiente a un 100% de inhibición, correspondiendo a la concentración más baja encontrada del fármaco probado que causa una reducción evidente en el crecimiento visible del hongo en el medio en estas condiciones, reduciendo visiblemente la formación de micelio. Este procedimiento se llevó a cabo bajo estándares de control de calidad utilizando la cepa *A. fumigatus* ATCC MYA-3626. La interpretación de los resultados se realizó conforme a los puntos de corte establecidos por el CLSI, los cuales definen a una cepa como susceptible frente los antifúngicos convencionales en un rango de concentraciones entre 0.5-4 µg/mL y 0.25-1 µg/mL para anfotericina B y voriconazol, respectivamente. De manera adicional se realizó la determinación de CMF, que consistió en sembrar por duplicado en APD 100 µL del contenido de los pocillos que no presentaban un crecimiento aparente y se llevaron a incubación a 30°C por 24h para posteriormente realizar la lectura, interpretándose como la concentración de droga en la cual el número de colonias no mostró crecimiento o que fue menor a tres colonias, lo cual representa aproximadamente el 99 a 99.5% de la muerte del hongo.

5.6 Preparación del inóculo de infección para los modelos *in vivo*

Para la preparación de los inóculos de infección del modelo larvario y el modelo murino, próximo a cada ensayo se sembraron suficientes placas de APD con micelio húmedo de la cepa *A. fumigatus* CRECEI-16007. Después de 7 días de incubación a 37°C, las conidias se cosecharon con un raspado suave de las colonias de la placa entera con un aplicador estéril procurando solo remover las conidias sin rasgar el agar utilizando como vehículo solución salina 0.85% + Tween 80 al 0.1% estéril. La suspensión conidial se recolectó por aspiración lenta y concentró por centrifugación a 14000 rpm por 15 min y

se decantó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta ajustar el inóculo deseado. El pellet final se lavó 2 veces con solución salina 0.85% + Tween 80 al 0.1% estéril. Las cuentas celulares se efectuaron realizando diluciones seriadas 1:10 de cada inóculo, contando en cámara de Neubauer (cuadrantes del recuento leucocitario) y verificando su cuenta viable sembrando por duplicado las diluciones en APD a 37°C por 24 h, realizando la cuenta de las UFC [131].

5.7 Modelos experimentales de aspergilosis

5.7.1 Modelo larvario

5.7.1.1 Establecimiento del modelo

Para establecer este modelo, primero se probó la virulencia de la cepa clínica de *A. fumigatus* CRECEI-16007 con varios inóculos de infección. Se utilizaron larvas de *G. mellonella* ≥ 2 cm de largo en su estadio final larvario de desarrollo. Estas larvas se distribuyeron en grupos de 10 y se alojaron en placas Petri, con papel filtro en el fondo, en condiciones de temperatura a 25 ° C, en oscuridad y privadas de alimento 24 h previas a la infección [132]. Para el ensayo solo se seleccionaron las larvas sin melanización, que presentaran movimiento rápido y que formaran capullo, ya que son características que se relacionan con una larva sana [133] y se formaron los distintos grupos experimentales de 20 larvas cada uno. Estos grupos experimentales consistieron en los 4 grupos de infección a las concentraciones de 1×10^5 conidias/mL, 1×10^6 conidias/mL, 1×10^7 conidias/mL y 1×10^8 conidias/mL, y los diferentes grupos control que fueron el grupo control de manipulación (sham) en el que solo se reprodujeron las condiciones experimentales sin inoculación y el grupo control vehículo al que se le administró solución salina 0.85% + Tween 80 al 0.1%. Además, se aseguró, en estudios piloto, que la manipulación por

picadura o con los tratamientos no afectaran a la larva. Posteriormente, los grupos correspondientes de las larvas fueron infectadas experimentalmente, para lo cual se inyectaron 10 μ L de los inóculos ajustados a través del hemocele. Las larvas se incubaron a 37°C y se supervisaron diariamente durante 5 días, analizándose 2 parámetros: la supervivencia larvaria y el puntaje de bienestar, este último evaluó la melanización, formación de capullo, movimiento y supervivencia [133]. Los resultados se interpretaron como un puntaje de 10 como máximo bienestar (**Tabla 8**). A partir del comportamiento mostrado en la gráfica de supervivencia de Kaplan-meier y del estado de bienestar se determinó la virulencia de la cepa, así como la concentración ideal del inóculo de infección para el estudio de eficacia terapéutica.

Tabla 8. Sistema de puntaje de bienestar larvario. Tabla adaptada de Tsai et al., 2016 que describe los parámetros de actividad, formación de capullo, melanización y supervivencia con la asignación de puntaje conforme al estado de bienestar larvario [133].

Sistema de puntaje de bienestar larvario		
Parámetro	Descripción	Puntaje
Actividad	Sin movimiento	0
	Mínimo movimiento con estimulación	1
	Se mueve cuando es estimulada	2
	Se mueve sin estimulación	3
Formación de capullo	Sin capullo	0
	Parcial	0.5
	Capullo completo	1
Melanización	Larva negra	0
	Manchas negras en larva café	1
	≥ 3 manchas en larva beige	2
	< 3 manchas en larva beige	3
	Sin melanización	4
Supervivencia	Muerta	0
	Viva	2

5.7.1.2 Eficacia terapéutica

Como parte complementaria de la evaluación *in vivo* de la actividad antifúngica de la sertralina contra *A. fumigatus*, se utilizó en primera instancia el modelo larvario de

aspergilosis. Una vez establecida la concentración del inóculo de infección, se adoptaron las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas. Las larvas se pesaron y se le administraron los diferentes tratamientos acordes a su peso promedio. Se formaron 8 grupos experimentales de 30 larvas cada uno: voriconazol 10 µg/g, anfotericina B 3 µg/g, sertralina 3 µg/g, sertralina 10 µg/g y sertralina 15 µg/g, el grupo control infectado sin tratamiento y los grupos control no infectados que fueron el control (sham) y control vehículo. Las larvas correspondientes se infectaron como se describió previamente con el inóculo de 2×10^7 conidias/mL y a las 2 h post- infección se administraron 10 µL de los tratamientos como única dosis [132] a través del hemocele. Las larvas se incubaron a 37°C y se evaluaron los parámetros de supervivencia larvaria y de índice de bienestar durante 5 días diariamente como se describió en la estandarización del modelo.

5.7.2 Modelo murino

5.7.2.1 Establecimiento del modelo

En todos los experimentos del modelo murino se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad con un peso de 22-25 g (Harlan, México). Los animales fueron alojados en cajas de policarbonato con lecho de viruta de aserrín irradiado con luz UV (5 ratones por caja), bajo condiciones específicas libres de patógenos en el equipo LAB&Bio (ProBio-Tech) que funciona bajo presión negativa, y en el que se controlaron las condiciones de temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad $50 \pm 10\%$. A los animales de experimentación se les proporcionó alimento irradiado y agua purificada estéril *ad libitum*. Después de la inmunosupresión de estos, en todo momento la manipulación, infección y encamado de los ratones se realizó dentro de la cabina de bioseguridad nivel II. Además, durante la experimentación, los animales se monitorearon diariamente con el peso y temperatura (I/R Thermometer Gun 8:1, Sper Scientific LTD), determinando como

puntos finales de eutanasia la pérdida rápida y progresiva de peso temperatura inferior a 30 ° C; también fueron supervisados algunos signos de sufrimiento y comportamiento del ratón como: respiración inconsistente, sangrado, diarrea, piloerección, deterioro de la deambulaci3n o cualquier signo de alerta f3sico o mental. Los animales moribundos fueron inmediatamente sacrificados.

Para la infecci3n experimental del modelo murino de API se adopt3 la metodolog3a establecida por Sheppard y cols en 2006 [134], quienes propusieron un modelo muy cercano a las condiciones naturales de infecci3n de *A. fumigatus*. En primera instancia, para la estandarizaci3n del modelo con la cepa de *A. fumigatus* CRECEI-16007 se utiliz3 un total de 50 ratones, distribuidos en 5 grupos de 10 ratones cada uno. El volumen administrado de los f3rmacos por inyecci3n fue ajustado a 0.2 mL por rat3n. El esquema de trabajo consisti3 en realizar una doble inmunosupresi3n consistente en ciclofosfamida v3a intraperitoneal a una dosis de 250 y 200 mg/Kg para el d3a 2 previo y d3a 3 posterior a la infecci3n, respectivamente, e hidrocortisona v3a subcut3nea a una dosis de 200 mg/Kg en ambos d3as. El d3a del reto inhalatorio los animales se introdujeron en grupos menores a 30 ratones en una c3mara de inhalaci3n (**Figura 12**). Se utilizaron 12 mL de un in3culo ajustado a 4×10^9 conidias/mL y posteriormente se procedi3 a la aerosolizaci3n del mismo con un nebulizador de part3culas peque1as impulsado por aire comprimido a 100 psi. El nebulizador estaba conectado a un canal que corri3 a lo largo de la parte superior de la c3mara y ventilaba el aerosol desde el centro del techo de la c3mara. Se us3 un tiempo total de exposici3n est3andar de 1 h para todos los experimentos. El dispositivo completo siempre permaneci3 dentro de una cabina de bioseguridad nivel II en una sala de presi3n negativa. Pasado el tiempo establecido, los ratones se regresaron a sus respectivos alojamientos. A partir del primer d3a post-exposici3n y hasta el d3a del

sacrificio se administró a los animales ceftazidima para prevenir infecciones bacterianas oportunistas. Los sacrificios de los diferentes grupos fueron realizados en los siguientes tiempos posteriores al reto: 1h, 1 día, 3 días, 5 días y 7 días. Inmediatamente después de la eutanasia de los animales se removieron quirúrgicamente y de manera aséptica los pulmones de cada ratón, estableciéndose la cinética de infección de la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007 en términos de la carga fúngica pulmonar.



Figura 12. Cámara de inhalación. El panel de inserción muestra el nebulizador impulsado por aire comprimido conectado a un canal en la parte superior de la cámara. Este canal conduce a una abertura ubicada en el centro del techo de la cámara. Los conidios nebulizados ingresan a la cámara a través de este orificio y se dispersan por toda la cámara. Una puerta en el extremo derecho de la cámara permite el acceso. El aire es impulsado a través de la tubería que está conectada al nebulizador y luego al tanque de aire.

5.7.2.2 Evaluación de la eficacia terapéutica de la sertralina

En el ensayo de eficacia terapéutica se utilizaron 100 ratones con las características anteriormente mencionadas y se formaron 6 grupos experimentales aleatorizados de 15 ratones por grupo, conformados por el grupo infectado sin tratamiento, los grupos infectados con tratamiento con voriconazol 10 mg/Kg, anfotericina B 3 mg/Kg y sertralina

a tres diferentes dosis: 3 mg/Kg, 10 mg/Kg y 15 mg/Kg, además de un grupo adicional de 10 ratones sanos que no se les aplicó ningún procedimiento. Para establecer el modelo murino de API se siguió con la metodología del esquema de inmunosupresión y de infección ya descrito previamente. Posterior a la infección de los animales, los tratamientos se administraron intraperitonealmente durante el día 1 al día 6, con la siguiente posología: anfotericina B a 3 mg/Kg cada 48 h, voriconazol a 10 mg/Kg cada 24 h, sertralina a 3 mg/Kg, 10 mg/Kg o 15 mg/Kg cada 24 h. Finalmente, el día 7 posterior al reto inhalatorio se sacrificaron la totalidad de los ratones mediante dislocación cervical bajo anestesia por inhalación de isoflurano al 2% (Boise, ID, USA), minimizando al máximo el sufrimiento animal. Después de la eutanasia se extrajeron quirúrgicamente.

5.7.2.2.1 Determinación de UFC

Una vez removidos los pulmones, fueron pesados y colocados en 2.5 ml de solución salina 0.85% con Tween 80 al 0.1% estéril. Los órganos fueron homogenizados mecánicamente (Polytron-Aggregate, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) utilizando un tren de limpieza con alcohol al 70% y solución salina estéril secando con gasa estéril entre cada muestra. Posteriormente, alícuotas de 0.1 ml de los homogenizados tisulares concentrados se sembraron por duplicado en APD y la cuenta colonial se efectuó pasadas 48 h de incubación a 37°C. Los alícuotas restantes fueron recuperadas y almacenadas para la determinación de antigenemia. El cálculo para la determinación de la carga fúngica se realiza con la siguiente fórmula: $UFC/g = (\text{Número de colonias UFC} \times \text{Factor de dilución sembrado en mL}) / (\text{Volumen de la alícuota en mL}) / \text{peso en g del pulmón homogenizado}$.

5.7.2.2.2 Antigenemia

La determinación del índice de GM se llevó a cabo a partir de 10 muestras de homogenizado tisular de pulmón de cada grupo experimental, utilizando la técnica de

ELISA sándwich (Platelia Aspergillus EIA; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia). Las muestras se pre-trataron para obtener una muestra homogénea en solución. Se partió de alícuotas de 1 ml del homogenizado, se mezclaron durante 30 segundos en vórtex y se centrifugaron a 1000 g durante 5 min para remover los fragmentos pesados del homogenizado. El sobrenadante pre-tratado se recuperó y se prosiguió a la determinación de GM acorde a las recomendaciones del fabricante del kit. Brevemente, en microtubos se colocaban 300 μ L de muestras o controles, se agregaron 100 μ L de la solución de tratamiento R7 y se agitaban. Los tubos se calentaron a baño maría a 100°C por 3 min y, posteriormente, se centrifugaron a 10,000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante tratado. Por otra parte, a los pocillos de placa se añadió 50 μ L del conjugado R6 y enseguida se añadieron 50 μ L del sobrenadante tratado. Estas muestras se incubaron a 37°C durante 90 min. Después de este tiempo se llevaron a cabo 5 veces los lavados con la solución de lavado R2 diluida 1:20 en agua destilada. Rápidamente se añadieron 200 μ L del cromógeno TMB (R9) evitando a todo momento la exposición de la luz y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Pasado este tiempo se añadieron 100 μ L de la solución de parada (R10). Finalmente se realizó la lectura en el lector de microplacas iMark (Bio-Rad, Japón) a λ 450 nm dentro de los 30 min de haber añadido la solución de parada. La presencia o ausencia del antígeno GM fue determinado por el cálculo del índice de cada muestra.

$$I = \frac{\text{DO muestra}}{\text{media DO del control de corte}}$$

$I < 0.5$: muestra negativa para el Ag GM

$I \geq 0.5$: muestra positiva para el Ag GM

5.7.2.2.3 Evaluación histopatológica

Una sección de los pulmones extraídos durante las necropsias de los animales fue destinada para análisis histopatológico. Las muestras se trataron acorde a la técnica histológica hasta la obtención de bloques de parafina. La primera parte consistió en fijar los pulmones inmediatamente de la remoción, en formalina amortiguada al 10% por lo menos 48 h. La segunda parte de la técnica fue la inclusión, que consistió en 3 etapas que fueron la deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina de los tejidos. Este procesamiento de los tejidos se llevó a cabo con un histoprocador de microondas (Milestone, KOS Tissue Processor 67050), en el que previamente para poder utilizar este equipo los pulmones se seccionaron con un grosor <5mm y se colocaron en cassettes de plástico en el histomodulo. Los solventes y tiempos que se manejaron en el histoprocador fueron los siguientes: la deshidratación se realiza con etanol absoluto durante 25 min, el aclaramiento con un solvente orgánico (isopropanol) durante 55 min y, por último, la inclusión en parafina líquida a 60°C durante 1 h y 15 min, esta parafina fue previamente calentada y disuelta para el procesamiento de tejidos. Adicionalmente y, de forma manual, se prepararon 2 baños de parafina, embebiendo los tejidos durante 1h y 30 min, respectivamente. Posteriormente, los tejidos fueron colocados y orientados en un molde de metal y fueron embebidos en parafina (Leica, HistoCore Arcadia H), estos bloques se dejaron solidificar en la placa de enfriamiento, se retiró del molde y se almacenaron en congelación a -20°C. Los bloques obtenidos se seccionaron con el micrótopo en secciones de 5 mm de grosor (Leica, RM2125), se extendieron en el baño de flotación, se adhirieron con un portaobjetos pre-tratado con una película adherente de gelatina y se dejaron secar. Posteriormente se llevó a cabo tinción por la técnica de Grocott-Gomori (Apéndice B).

Esta técnica histoquímica permite detectar fácilmente hifas y elementos fúngicos en color negro o café oscuro, teniendo un fondo de contraste en color verde claro. El análisis de los resultados se realizó de manera descriptiva, estableciendo de manera general la siguiente escala semicuantitativa:

Tabla 9. Escala semicuantitativa de estructuras fúngicas de *A. fumigatus* a nivel tisular

Estructuras fúngicas en tejido por campo	
+	Ausencia de estructuras fúngicas
++	Conidias
+++	Escasas hifas (<50 hifas)
++++	Moderadas hifas (50-100 hifas)
+++++	Abundantes hifas (>100 hifas)

5.6. Análisis estadístico

En el modelo larvario de *G. mellonella*, la determinación de diferencias entre los distintos tratamientos fue analizada por la prueba de Log Rank test (Mantel-Cox), mientras que para el modelo murino se analizaron las diferencias en la carga fúngica y GM mediante la prueba estadística de Anova, con una prueba post hoc de Tukey's de comparaciones múltiples. El análisis estadístico y las gráficas fueron realizadas con el programa estadístico Prism versión 7.0 para Windows (Software Graphpad, Inc, La Jolla, CA, USA). Se consideraron estadísticamente significativos todos los valores de $P < 0.05$.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Identificación

6.1.1 Identificación fenotípica

Se estudiaron 22 aislamientos clínicos, recolectados en el período 2006-2014, todos referidos al CRCEI. Las cepas fúngicas se aislaron a partir de muestras de vías respiratorias de pacientes con sospecha o diagnóstico de aspergilosis. Los cultivos en agar Czapek presentaban colonias planas, polvosas o aterciopeladas, de color verde grisáceo, en algunos casos con halo micelial blanco en la periferia de las colonias. Al microscopio se apreció micelio septado con presencia de conidióforos cortos y cabezas aspergulares con vesículas piriformes y una sola serie de fialides con tendencia a disponerse hacia arriba, de la que se generaban conidios pequeños. El conjunto de características anteriormente mencionadas permitió la identificación fenotípica de estas cepas como *A. fumigatus*.

6.1.2 Confirmación molecular de aislamientos clínicos

A las cepas identificadas fenotípicamente como *A. fumigatus*, se les realizó la confirmación molecular para la identificación a nivel de especie.

Todos los productos amplificados de los aislamientos clínicos de *A. fumigatus* correspondieron a los genes de β -tubulina e hidrofobina con un peso molecular aproximado de 500 pares de bases, lo cual corresponde con el tamaño teórico esperado para β -tubulina (492 pb) e hidrofobina (488 pb) [128].

La mayoría de los aislamientos identificados fenotípicamente como *A. fumigatus* fueron confirmados a nivel molecular como *A. fumigatus* sensu stricto, quien pertenece a

la sección Fumigati subgénero *Fumigati* (Tabla 10), a excepción de 3 resultados que pertenecieron a especies distintas y que en común procedían de muestras de exudado nasal, estas especies correspondieron a *A. fumigatiformis*, clasificado dentro de la sección Fumigati y *A. unguis*, ubicado en la sección Nidulantes, subgénero *Nidulantes* [24].

Tabla 10. Aislamientos clínicos de vías respiratorias identificados como *A. fumigatus* sensu stricto.

Reg. CRCEI	Especimen	No. acceso GenBank	
		β -tubulina	Hidrofobina
G-3117	Lavado broncoalveolar	KX165398.1	KX165411.1
07-1867	Expectoración	KX165397.1	KX165410.1
(07) 2196	Biopsia de Pulmón	KX165389.1	KX165402.1
(08) 22	Exudado bronquial	KX165399.1	KX165412.1
(08) 914	Lavado broncoalveolar	KX165394.1	KX165407.1
(08) 773	Lavado broncoalveolar	KX165396.1	KX165409.1
(08) 1712	Seno maxilar	KX165390.1	KX165403.1
(10) 391	Absceso cerebral	KX165388.1	KX165401.1
(11) 356	Líquido pleural	KX165395.1	KX165408.1
14-2176	Lavado broncoalveolar	KX165392.1	KX165405.1
16007	Lavado broncoalveolar	KX165391.1	KX165404.1

6.1.3 Selección de la cepa para estudios *in vivo*

La selección de la cepa se llevó a cabo bajo criterios fenotípicos, procedencia clínica, así como confirmación molecular. Se seleccionó a conveniencia la cepa de *A. fumigatus* CRCEI-16007 por ser una cepa con abundante esporulación, aislada de una muestra de lavado broncoalveolar de un paciente masculino mexicano de 72 años con diagnóstico de neumonía.

6.2 Perfil de susceptibilidad antifúngica de la cepa seleccionada

El perfil fenotípico obtenido para la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007 frente a los antifúngicos convencionales resultó en una CMI de 1 µg/mL (0.5 µg/mL-4 µg/mL) y CMF de 4 µg/mL para anfotericina B, así como CMI de 0.06 µg/mL(0.25µg/mL-1 µg/mL) y CMF de 0.12 µg/mL para voriconazol, las lecturas de CMI de ambos antifúngicos se consideran susceptibles, acorde a los puntos de corte del CLSI, documento M38-A2 [129]. Con respecto a la sertralina, se presentó la inhibición del crecimiento visual de la cepa probada con una CMI de 16 µg/mL y una CMF de 32 µg/mL.

6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de la sertralina en modelos experimentales de aspergilosis

En primera instancia, como ensayo preliminar, la actividad antifúngica de la sertralina se evaluó en un modelo larvario de *G. mellonella* y, posteriormente se realizó la evaluación de eficacia terapéutica en un modelo murino de API.

6.3.1 Modelo larvario de aspergilosis

6.3.1.1 Establecimiento del modelo larvario de aspergilosis

Las larvas de *G. mellonella* fueron sometidas a la infección fúngica a través del hemocele con la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007, empleándose cuatro diferentes inóculos en un rango de concentración entre 1×10^5 - 1×10^8 conidias/mL y fueron supervisadas diariamente durante 5 días con los parámetros de supervivencia e índice de bienestar. Como resultado de la evaluación de los parámetros de supervivencia y de índice de bienestar fue evidente que el potencial de virulencia de *A. fumigatus* CRCEI-16007 incrementó de manera dependiente de la concentración infecciosa y del tiempo en las larvas de *G. mellonella*. Como resumen, en la **Figura 13** se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos para cada grupo experimental en el día 5 post-infección, en el que se observa que conforme aumenta la concentración del inóculo de infección, la mortalidad se incrementa y el estado de bienestar larvario disminuye considerablemente. La infección con el inóculo de 10^8 conidias/mL resultó 100% letal dentro de las primeras 12 h post-infección, con un índice de bienestar 0, mientras que los inóculos de 10^5 y 10^6 conidias/mL presentaron para el día 5 post infección una supervivencia del 90% y un índice de bienestar de 7.7 y 7.4 respectivamente, por lo que estas concentraciones no se utilizaron para el posterior estudio de eficacia terapéutica (**Figura 14**).

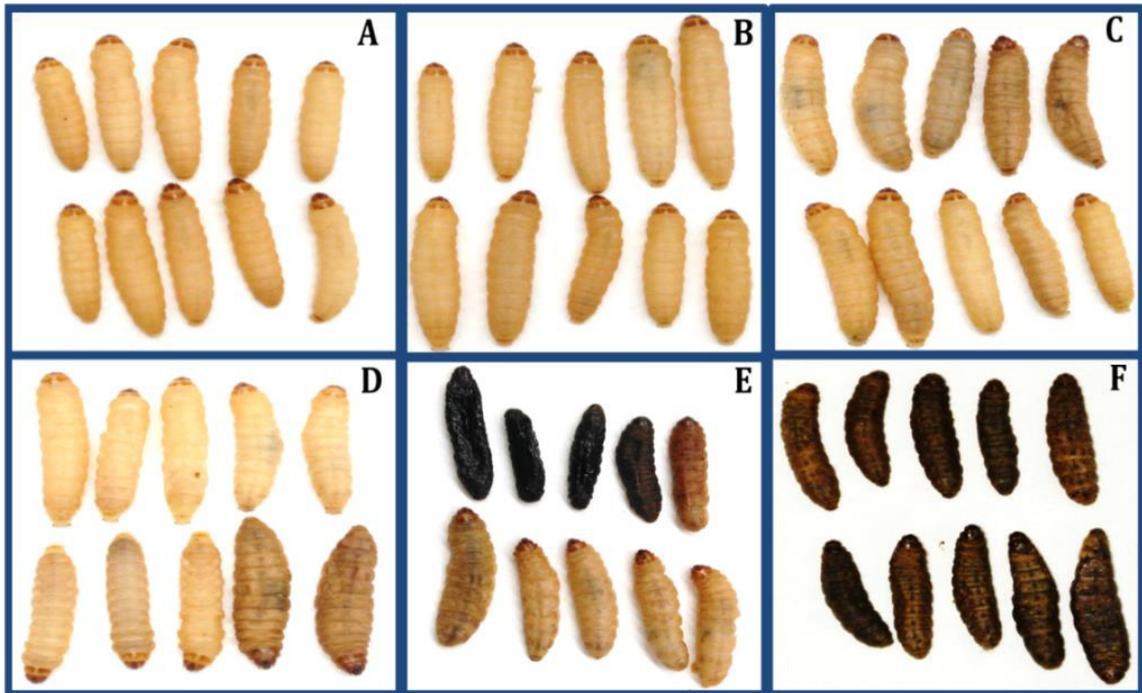


Figura 13. Imagen representativa de los grupos de infección (10^5 - 10^8 conidias/mL) de *G. mellonella* en el día 5 post-infección. A) Control sham, B) Control vehículo, C) Infección con 10^5 conidias/mL, D) Infección con 10^6 conidias/mL, E) Infección con 10^7 conidias/mL y F) Infección con 10^8 conidias/mL.

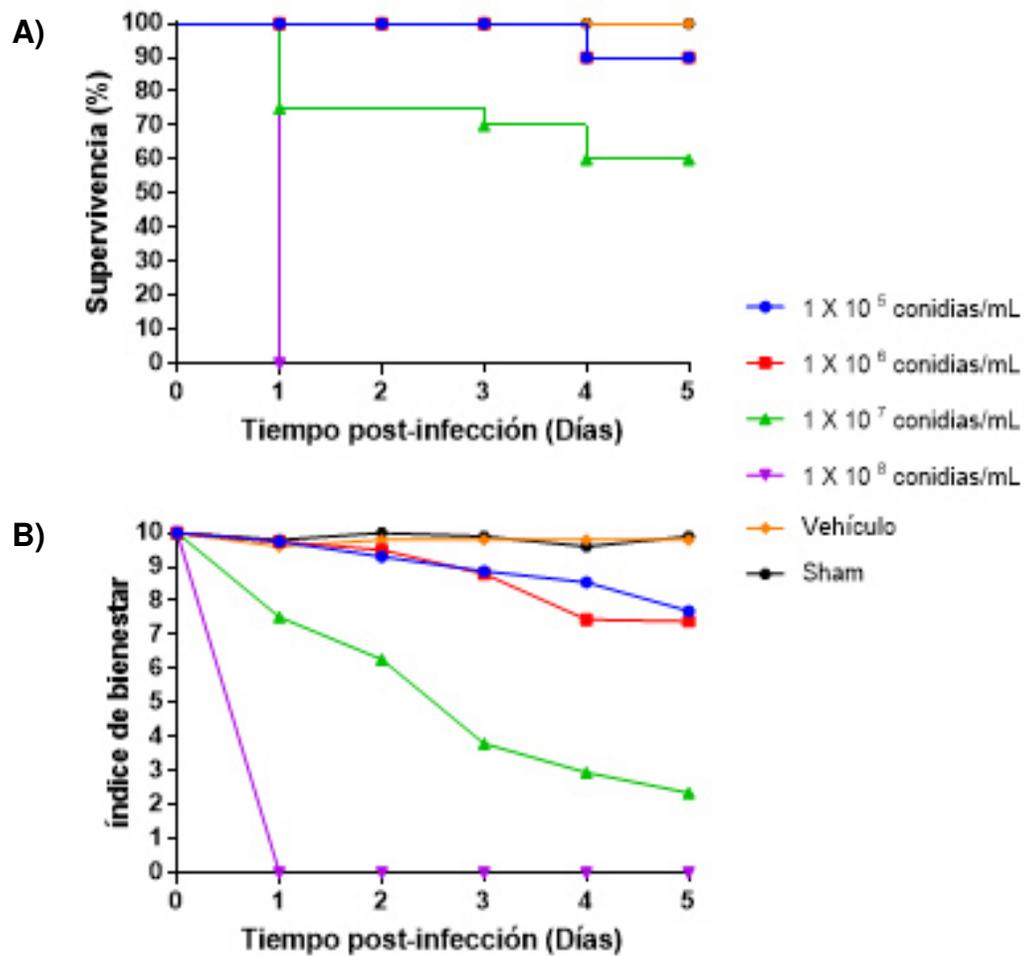


Figura 14. Estandarización del modelo larvario de aspergilosis. A) curva de supervivencia Kaplan-Meier B) índice de bienestar larvario. Los resultados obtenidos de cada grupo son producto de 2 ensayos independientes (n=20).

Por otra parte, el inóculo de 10^7 conidias/mL originó una mortalidad gradual (**Tabla 11**), encontrándose una supervivencia del 60% para el día 5 post-infección y un descenso considerable del puntaje de bienestar, el cual resultó de utilidad como un indicador del progreso de la infección en las larvas.

Tabla 11. Mortalidad y puntaje de bienestar larvario con el inóculo de 10^7 conidias/mL

DÍA	Mortalidad	Puntaje de bienestar
1	0	10
2	25	7.525
3	25	6.275
4	30	3.8
5	40	2.95

En contraparte, todas las larvas sin infectar utilizadas para control de manipulación y del vehículo administrado presentaron una supervivencia del 100% hasta la finalización del estudio y un índice de bienestar cercano a 10, que es el máximo puntaje de una larva sana. Los controles adicionales de los estudios piloto como la picadura, y administración de los fármacos sin la infección no presentaron alguna alteración en mortalidad o índice de bienestar.

Los parámetros de supervivencia e índice de bienestar larvario resultaron útiles en el estudio de virulencia de la cepa. Se determinó que el inóculo de 10^7 conidias/mL resultó ser el inoculo que mostró un margen útil de sobrevida y bienestar larvario para su empleo en estudios de eficacia terapéutica.

6.3.1.2 Eficacia terapéutica de la sertralina en el modelo larvario de aspergilosis

La determinación de la eficacia antifúngica de la sertralina contra la infección por *A. fumigatus* CRECEI-16007 a una concentración de 2×10^7 conidias/mL en el modelo larvario de aspergilosis se llevó a cabo por la evaluación de la supervivencia y el índice de bienestar de las larvas bajo los siguientes tratamientos: voriconazol 10 $\mu\text{g/g}$, anfotericina B 3 $\mu\text{g/g}$, y sertralina a las dosis de 3 $\mu\text{g/g}$, 10 $\mu\text{g/g}$ y 15 $\mu\text{g/g}$, en comparación con aquellas que no recibieron tratamiento (grupo control) durante 5 días.

Los resultados obtenidos de supervivencia y puntaje de bienestar larvario de los grupos experimentales se muestran en la **Figura 15**. En resumen, cuando los tratamientos fueron administrados, la supervivencia larval mejoró considerablemente dependiente de la droga y de la dosis inyectada en la larva infectada, en el que todos los grupos presentaron una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia con respecto al control sin tratamiento. Se aprecia que el 80% de las larvas sin tratar murieron entre el tercer y cuarto día de la infección (TMS=2), presentando una mortalidad del 100% para el final del estudio, acompañado con una disminución progresiva del índice de bienestar con el paso del tiempo.

En cuanto a los tratamientos experimentales, se alcanzó una supervivencia >50% con voriconazol y >80% con anfotericina B en el día 5 post-infección. Con la administración de sertralina la supervivencia larvaria mejoró, especialmente hacia el tercer día (TMS=3), con una supervivencia >50% para las tres dosis probadas y con un descenso considerable para el día 5 post-infección con una supervivencia final de 25% para sertralina 10 mg/Kg y 15 mg/Kg. Por lo que el efecto terapéutico de la sertralina en el aumento de la

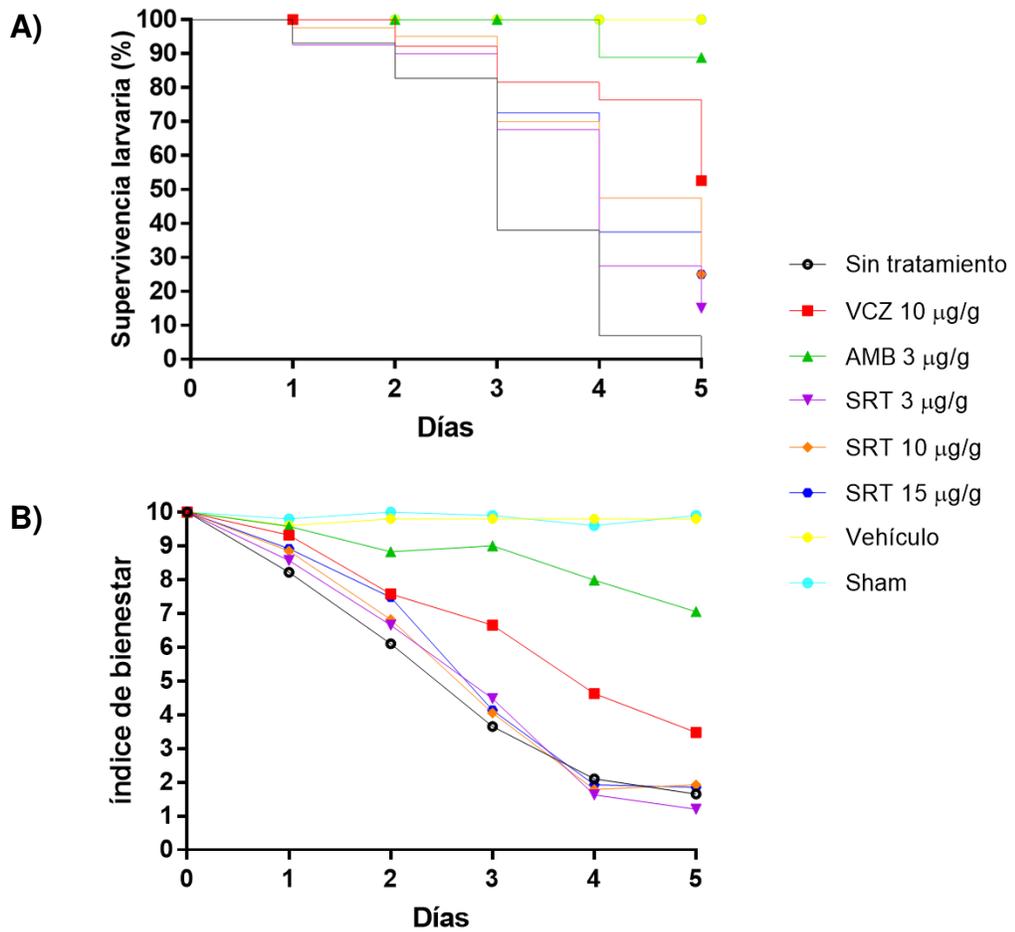


Figura 15. Evaluación antifúngica de la sertralina en el modelo larvario de aspergilosis.A) curva de supervivencia Kaplan-Meier B) gráfica del índice de bienestar. Prueba estadística log Rank (Mantel-Cox) para la curva de supervivencia. VCZ10, AMB 3, SRT10 ($p < 0.0001$); SRT15 ($p = 0.0001$); SRT3 ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos de cada grupo son producto de 3 ensayos independientes ($n = 30$).

supervivencia es especialmente evidente a partir de la dosis de 10 mg/Kg ($p \geq 0.0001$), en el que la supervivencia levemente aumenta a 1 día más en el tiempo de vida media que los controles sin tratamiento, pero esta actividad no se acerca a la supervivencia presentada con los antifúngicos convencionales hacia el término del estudio.

Estos hallazgos fueron vistos a la par con lo obtenido en el índice de bienestar, que de igual manera el efecto terapéutico de la sertralina fue especialmente percibido hasta el tercer día, en el que todos los grupos con tratamiento permanecieron por encima del índice de bienestar hasta ese día. Los grupos de tratamiento convencional se mantuvieron por encima de cualquier grupo hasta la finalización del estudio, y los grupos tratados con sertralina después del día 3 a pesar de aumentar la supervivencia de las larvas infectadas, se aprecia que el índice de bienestar no es comparable con el efecto de los antifúngicos convencionales. Estos hallazgos de supervivencia y estado de bienestar larvario en el día 3 post-infección se muestra en la **Figura 16** y la **Tabla 12**.

Para los grupos control sham y vehículo la supervivencia fue de 100% durante todo el estudio, mientras que el índice de bienestar se mantuvo entre 9-10 que representaba el máximo bienestar larvario.

Tabla 12. Supervivencia y puntaje de bienestar larvario frente a diferentes tratamientos para el día 3 post-infección.

Grupo	Supervivencia	Puntaje de bienestar
Sin tratamiento	37.9	3.65
VCZ 10	81.6	6.65
AMB 3	100	9
SRT 3	67.5	4.475
SRT 10	70	4.055
SRT 15	72.5	4.1375
Vehículo	100	9.8
Sham	100	9.9

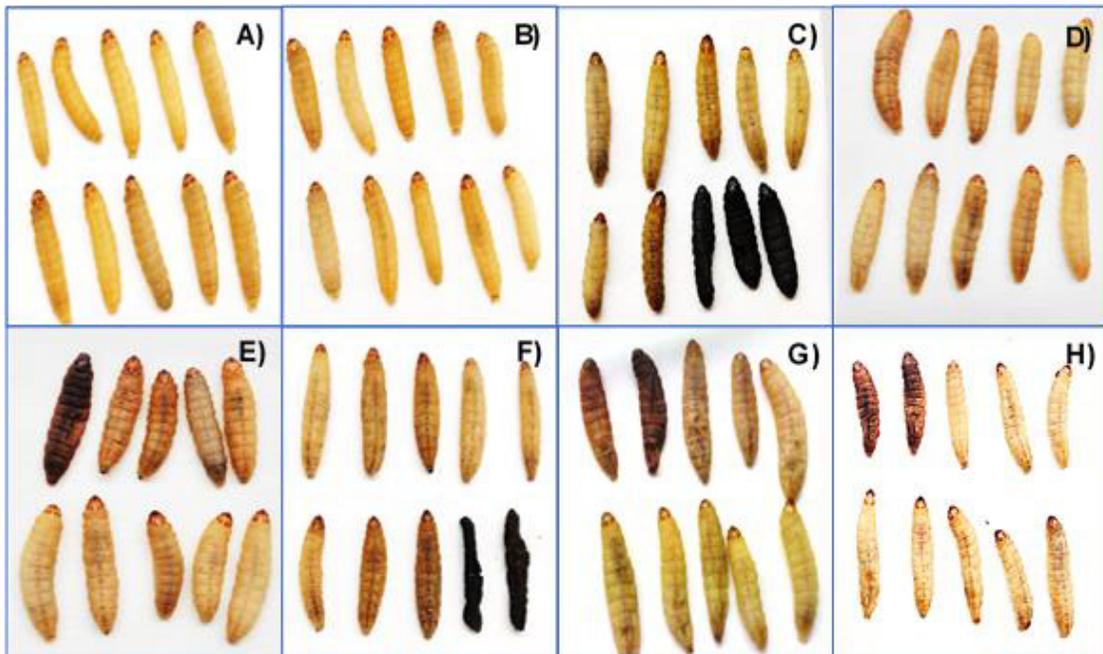


Figura 16. Imagen representativa de los grupos de tratamiento de las larvas en el día 3 post infección. A) Control sham, B) Control vehículo, C) Control de infección, D) Anfotericina B, E) Voriconazol, F) Sertralina 3 $\mu\text{g/g}$, G) Sertralina 10 $\mu\text{g/g}$, H) Sertralina 15 $\mu\text{g/g}$.

6.3.2 Modelo murino de API

6.3.2.1 Establecimiento del modelo murino de API

Se realizó una cinética de infección por el reto inhalatorio con la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007 a los siguientes tiempos: 1 h, 1 día, 3 días, 5 días, y 7 días post-exposición, determinando la carga fúngica presente en los homogenizados tisulares de pulmón, así como análisis histopatológico que evidenciara invasión fúngica en el parénquima pulmonar. En la **Figura 17** se muestran los resultados obtenidos de la carga fúngica pulmonar con respecto al tiempo post-infección.

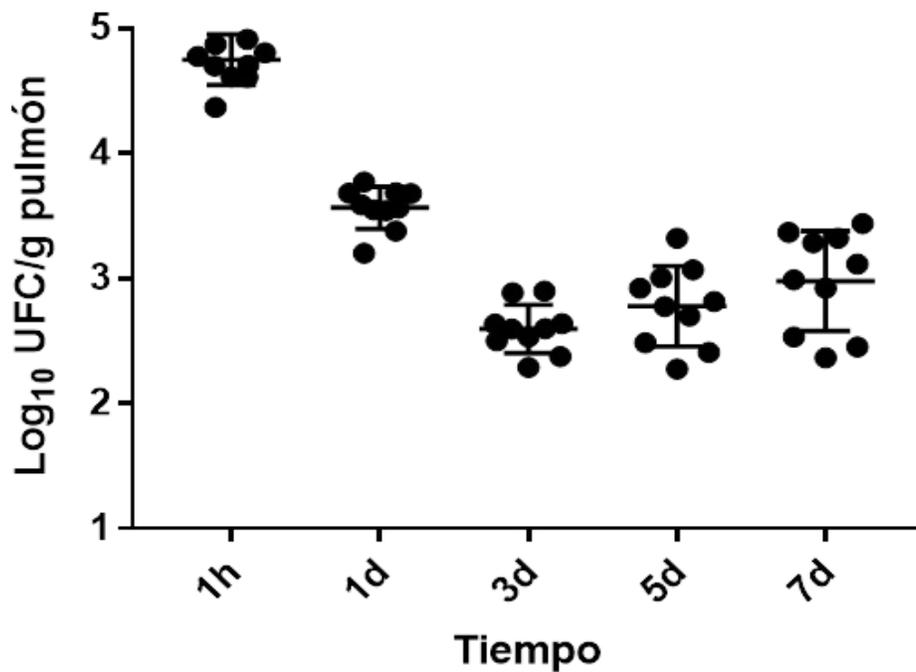


Figura 17. Cinética de infección por el reto inhalatorio con *A. fumigatus* CRCEI-16007. La carga fúngica corresponde a cada punto representado en la gráfica (n=10 ratones por grupo). Las barras indican las medias de las cargas fúngicas. h= horas; d= días.

Brevemente, se encontró que a la hora post-exposición corresponde una carga fúngica tisular en pulmón de Log_{10} 4.7 UFC/g, la cual desciende y a partir del día 5 ocurre un repunte para el día 7 cercano a Log_{10} 3 UFC/g. que este comportamiento es bastante similar al comportamiento descrito previamente por Sheppard [134]. Adicionalmente para confirmar la invasión fúngica se realizó el análisis histopatológico del pulmón. Como resultado efectivamente se generó la invasión de las hifas dispuestas en grandes cúmulos en el parénquima pulmonar. Estos focos de invasión presentaban las hifas características de *A. fumigatus* como se muestra en la **Figura 18**, de este modo logrando la validación del modelo de API para este trabajo.

Por otra parte, en el monitoreo diario de los ratones, el peso disminuyó considerablemente después de cada inmunosupresión, con un peso inicial \bar{X} =22.8 g y peso final de \bar{X} =18.46 g. La temperatura corporal de los animales se mantuvo estable, oscilando entre 31-35°C. El principal signo que se detectó en los ratones durante el transcurso del estudio fue la piloerección.

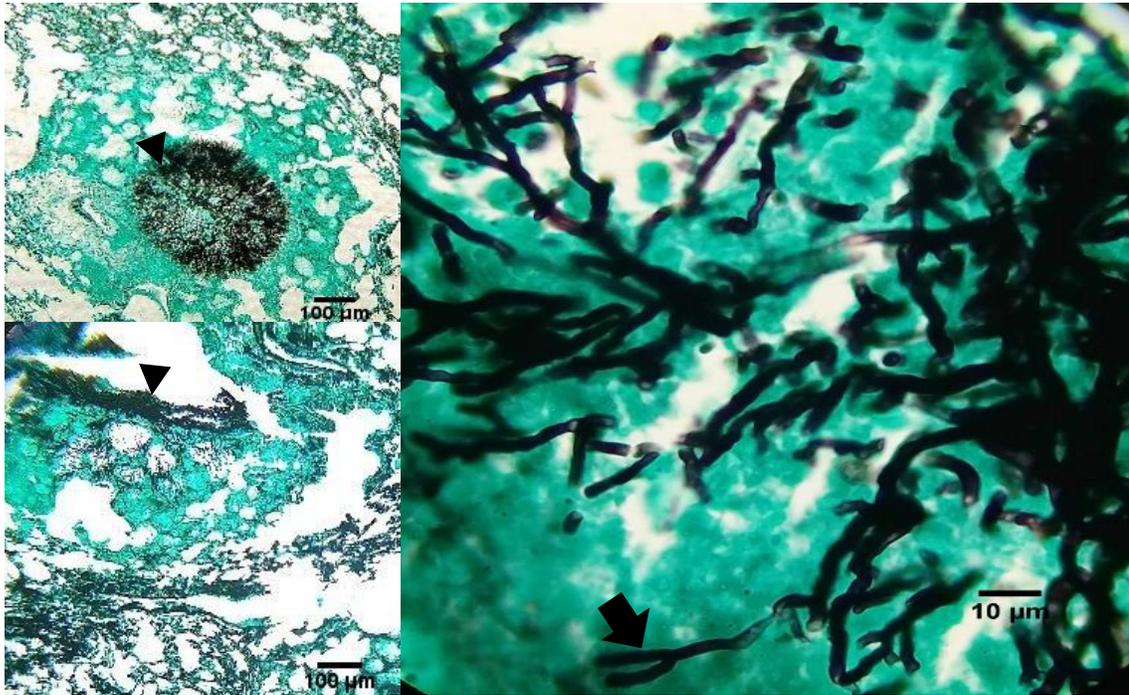


Figura 18. Microfotografías representativas de la invasión fúngica pulmonar de los ratones infectados vía inhalatoria con la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007 en el día 7 post-infección. A) y B) muestran las lesiones focales de invasión del parénquima pulmonar (100X), C) se muestra un acercamiento (1000X) en el que se observan las hifas con ramificación dicotómica angular características de *A. fumigatus*. Las secciones de pulmón fueron teñidas con la tinción especial de metenamina de plata de Gomori: Hifas de color negro y coloración de contraste verde. Los triángulos indican los focos de invasión y la flecha las hifas características de *A. fumigatus*.

6.9.2.2 Evaluación de la actividad antifúngica de la sertralina en el modelo murino de API

6.9.2.2.1 La monoterapia con sertralina reduce la carga fúngica pulmonar en el modelo murino de API

En la **Figura 19** se muestran los resultados de la cuantificación del hongo en pulmón de ratones infectados con 1×10^9 conidias/mL de *A. fumigatus* CRCEI-16001. La carga fúngica pulmonar en el día 7 de los controles sin tratamiento osciló entre Log_{10} 2.49 a 3.63 UFC/g y para los grupos de tratamiento se presentó una reducción estadísticamente significativa en la carga fúngica pulmonar en los animales infectados tratados con voriconazol ($p < 0.0001$), anfotericina B ($p < 0.0001$) y sertralina a 10 mg/Kg ($p < 0.0001$) y 15 mg/Kg ($p < 0.05$), con una reducción para los tratamientos de aproximadamente 1 log. Como se muestra, la monoterapia con sertralina reduce la carga fúngica pulmonar de manera significativa a partir de la dosis de 10 mg/Kg ($p < 0.0001$), con una carga fúngica pulmonar que oscila entre Log_{10} 2 y 3 UFC/g ($\bar{X} = 2.37$), esto de manera equiparable a la reducción de las cargas encontradas para los antifúngicos convencionales: voriconazol ($\bar{X} = 2.38$) y anfotericina B ($\bar{X} = 2.4$), en las cuales no se encontró diferencia significativa entre grupos.

Durante el transcurso de la infección, los ratones con tratamiento al igual que los controles mostraron una pérdida de peso, más notoria posterior a cada inmunosupresión, perdiendo un total entre 3-5 g hasta la finalización del estudio. La temperatura de los animales se mantuvo estable ($\bar{X} = 29.86$). No se encontró una diferencia en la disminución de peso y temperatura entre grupos. No se detectaron alteraciones motoras ni del

comportamiento, pero si piloerección y una ligera disminución de la temperatura en los ratones enfermos 28°C.

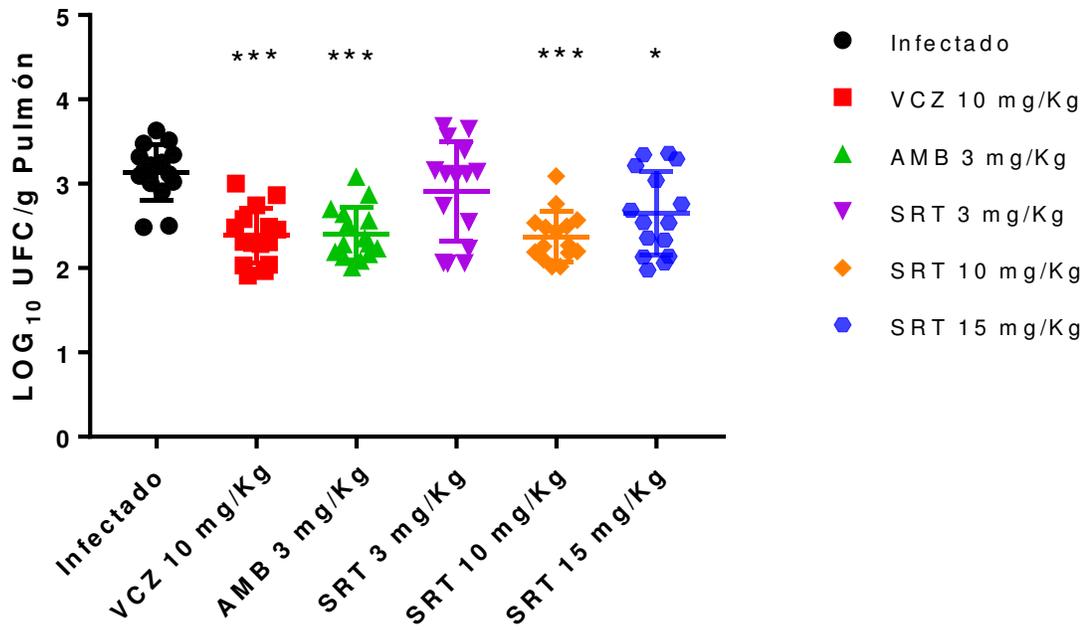


Figura 19. Carga fúngica pulmonar en el modelo murino de API. Cada grupo experimental se conformó de 15 ratones cada uno. Los puntos indican las cargas obtenidas del pulmón de cada ratón y los asteriscos representan las diferencias significativas encontradas con respecto al control por ANOVA de un factor seguido por la prueba post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$.

6.9.2.2.2 Los grupos experimentales tratados con sertralina presentan menores índices de GM con respecto a los controles de infección

Los resultados de la antigenemia son presentados en la **Figura 20**. Los índices de GM fueron más bajos para los homogenizados pulmonares de los animales que recibieron cualquier esquema terapéutico con respecto a los controles sin tratamiento. Esta reducción en los niveles de antígeno GM fue especialmente evidente y estadísticamente significativo en los ratones tratados con voriconazol ($p < 0.0001$), anfotericina B ($p < 0.0001$) y sertralina a 10 mg/Kg ($p < 0.01$) y 15 mg/Kg ($p < 0.0001$). A pesar de que se redujeron los niveles de antígeno GM, la mayoría de las muestras no disminuyó hasta resultar negativo a la infección en el día 7 post-infección. Todos los grupos de sertralina permanecieron por encima del punto de corte positivo establecido para el índice GM en suero de 0.5. Al igual que en la carga fúngica, de todos los tratamientos experimentales probados, la anfotericina B fue el que presentó un mayor efecto en la disminución de la cantidad del antígeno GM seguido de voriconazol. La dosis de la sertralina con mayor efecto en la reducción de índice GM fue la de 15 mg/Kg; sin embargo, no superó ni fue semejante al efecto exhibido por los antifúngicos convencionales, aunque entre las medias no se presentaron diferencias significativas entre los grupos.

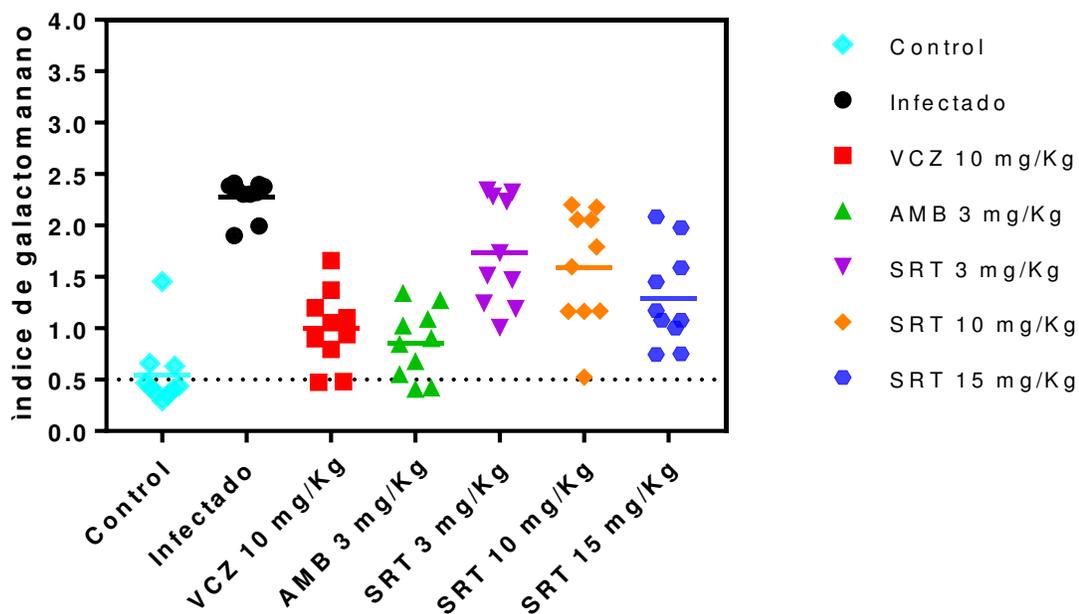


Figura 20. Índice GM en el modelo murino de API. Cada grupo experimental se conformó de 10 ratones cada uno. Cada punto indica el índice de GM obtenido del pulmón de cada ratón y la línea punteada indica el punto de corte de positividad (0.5). Con respecto al control se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los grupos de tratamiento: AMB3, VCZ10, SRT15 ($p < 0.0001$) y SRT 10 ($p < 0.01$) por ANOVA de un factor seguido por la prueba post hoc de Tukey.

6.9.2.2.3 Histopatología pulmonar

En la **Tabla 13** se muestran los resultados de la semicuantificación de estructuras fúngicas encontradas en los pulmones del modelo murino de API con los diferentes grupos de tratamiento.

Tabla 13. Semicuantificación histológica de estructuras fúngicas en cortes seriados de pulmón. Los resultados mostrados son producto del análisis de 20 campos representativos de los hallazgos histopatológicos por medio de la técnica de Gomori Grocott.

Grupo	Estructuras fúngicas en pulmón
Sano	+
Sin tratamiento	+++++
Voriconazol 10 mg/Kg	+++
Anfotericina B 3 mg/Kg	++
Sertralina 3 mg/Kg	++++
Sertralina 10 mg/Kg	+++
Sertralina 15 mg/Kg	+++

+ Ausencia de estructuras fúngicas
 ++ Conidias
 +++ Escasas hifas (<50 hifas)
 ++++ Moderadas hifas (50-100 hifas)
 +++++ Abundantes hifas (>100 hifas)

La cantidad de hifas o presencia de conidias fueron menores en los tratamientos experimentales en comparación con el control de infección. Los animales bajo tratamiento con sertralina presentaron esta disminución de manera dosis dependiente, pero especialmente a partir de la dosis de 10 mg/kg fue más evidente la disminución de los cúmulos de hifas, presentándose en menor frecuencia y con escasas hifas en comparación con los que no se les administró tratamiento. Estos hallazgos fueron muy similares a lo encontrado para voriconazol, con el cual se disminuyeron estas estructuras fúngicas de

manera muy similar al efecto exhibido por la sertralina a partir de 15 mg/Kg. En cambio, la anfotericina B fue la única en la que no se encontraron hifas, en el que el aclaramiento de las estructuras fue más evidente y por lo tanto más efectiva; sin embargo, el tejido pulmonar no estaba libre de estructuras ya que presentaba conidias.

En la **Figura 21** se muestran microfotografías de cortes de pulmón representativos de cada grupo de tratamiento en el modelo murino de API del día 7 post-infección. La mayoría de los grupos de tratamiento, a excepción de anfotericina B, se presentaron con hifas invadiendo el parénquima pulmonar. La diferencia radicó en la cantidad, así como en la frecuencia en la que estos focos de invasión aparecían. Además, las hifas presentes en los cortes histológicos de animales que recibieron los tratamientos con sertralina y voriconazol eran más cortas, es decir no estaban tan elongadas y no presentaban tantas ramificaciones a comparación con el control de infección.

El grupo sin tratamiento se caracterizó por la presencia de múltiples focos de invasión por el hongo, cursando con neumonía y con evidencia de lesiones severas, así como ocasionalmente invasión vascular, trombosis e infartación cuando se encontraban estas hifas cercanas a algún vaso sanguíneo. Desde del momento de la obtención de los órganos se detectaron lesiones nodulares visibles en el pulmón, estas lesiones se caracterizan por ser zonas necrozadas debido a la invasión del hongo. Además, se notó que algunas zonas del tejido del parénquima pulmonar en donde se encontraba invadiendo el hongo presentaban una morfología distinta a la del tejido pulmonar normal, las cuales podrían haber correspondido a infiltrado celular como células epitelioides de granulomas o mucosidad.

En cualquier tratamiento experimental probado se encontraron menos signos de invasión tisular, en los que los cúmulos de hifas eran menos frecuentes y la cantidad de

hifas era menor. Además, también se encontraba afectada la longitud o extensión de las hifas, por lo que la reducción en el área comprendida fue evidente al compararlas con el control sin tratamiento. En el tratamiento con anfotericina B solo se encontraron conidios hinchados o germinando, con tejido pulmonar integro. Mientras que voriconazol presentó algunas áreas de invasión, pero en el que las hifas se encontraban en menor medida y presentaban algunas alteraciones morfológicas. La sertralina exhibió cierto efecto en la disminución de la invasión y elongación de las hifas, encontrándose hifas más cortas y dispersas en comparación con el control de infección.

Como resultado global, en conjunto los tres parámetros analizados nos indican que hay actividad antifúngica por la sertralina, la cual está actuando de tal manera que reduce la cantidad de hongo presente e induce cambios morfológicos de manera evidente a partir de la dosis de 10 mg/Kg.

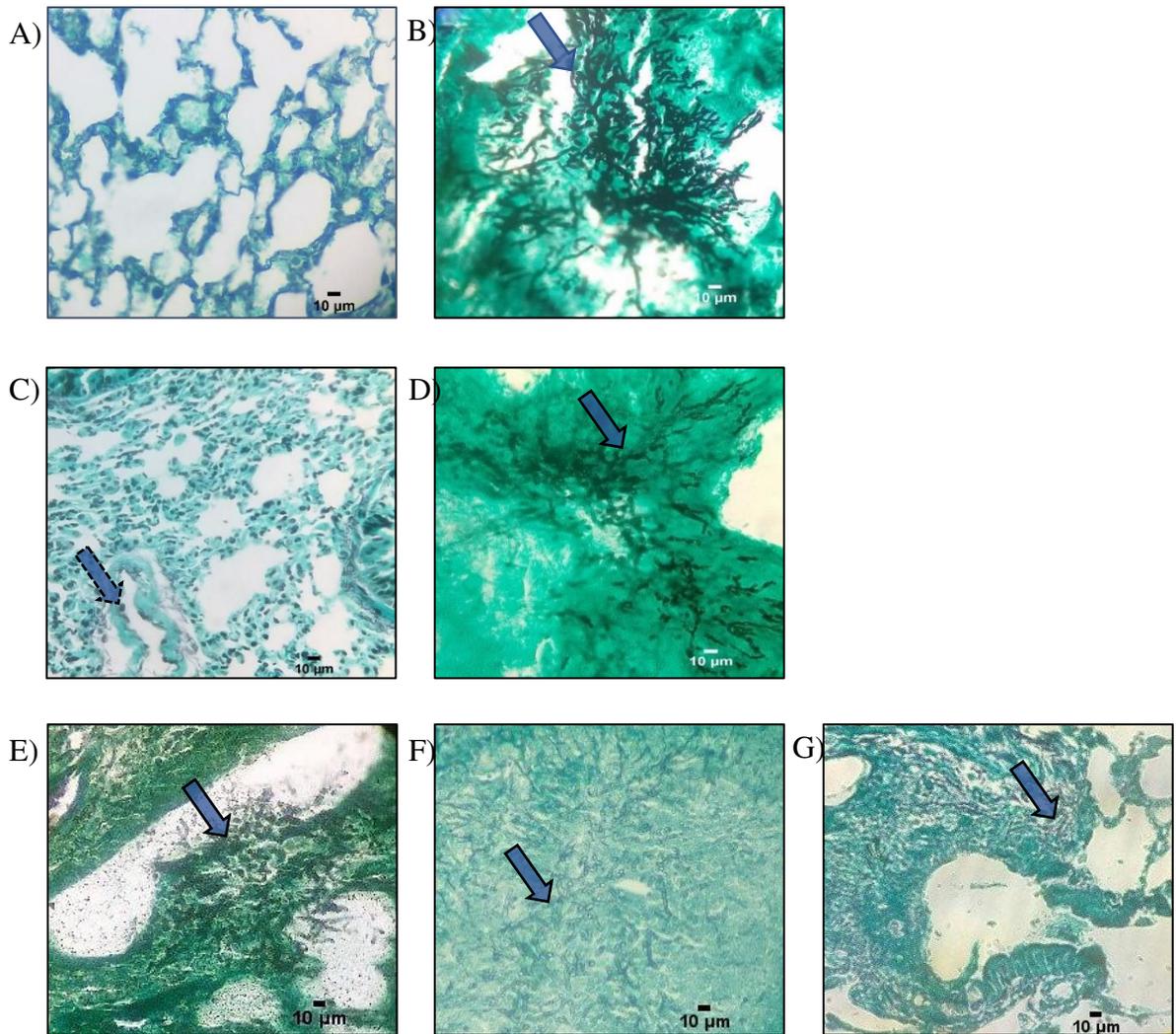


Figura. 21. Histopatología del modelo murino de API. Cortes histológicos representativos de pulmón teñidos con metenamina de plata de Gomori de los diferentes grupos de tratamiento en el modelo murino de API en el día 7 post infección: A) Control sano, B) Control de infección, C) AMB 3 mg/Kg, D) VCZ 10 mg/Kg, E) SRT 3 mg/Kg, F) SRT 10 mg/Kg, G) SRT 15 mg/Kg. Las flechas con línea continua indican las hifas y con línea punteada las conidias. Magnificación original 400 X, barra métrica: 10 µm

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Existen diversos antecedentes que han puesto de manifiesto la actividad *in vitro* de la sertralina frente a cepas fúngicas [99,105,110–116,118,120,135–137]. En el caso particular de *A. fumigatus*, en 2001 Lass-Flörl et al. evaluaron la actividad fungicida *in vitro* de cinco ISRS contra aislamientos clínicos de *A. fumigatus*. Ellos reportaron que la sertralina fue el fármaco más activo, con una CMF de 7-118 $\mu\text{g} / \text{mL}$ [111]. Más tarde, Ayaz et al. confirmaron el efecto fungicida de la sertralina contra *A. fumigatus*, reportando una CMF de 80-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un pequeño subconjunto de cepas clínicas [114]. La CMF de la sertralina frente a *A. fumigatus* CRCEI-16007 resultó ser menor a lo previamente reportado para esta especie fúngica; sin embargo, esta discrepancia puede deberse a que las metodologías empleadas no son las mismas [114,138] y por lo tanto los resultados no son comparables.

El primer modelo de aspergilosis utilizado en este estudio fueron las larvas de *G. mellonella* (gusano de cera), un insecto del orden Lepidópteros, ampliamente utilizado en estudios de patogenicidad y/o virulencia de infecciones fúngicas, y de eficacia terapéutica de fármacos antifúngicos [133,139,140]. Este modelo resultó interesante porque estos estudios refieren que se muestra buena correlación de los resultados de este modelo con los datos de susceptibilidad *in vitro*, así como a la eficacia en modelos murinos [139,141,142]. No obstante el principal inconveniente es que el modelo no está estandarizado, los estudios que se han realizado hasta el momento en este modelo lo han adaptado de diferentes formas obteniendo resultados inconsistentes, ya que existen

variables y condiciones que influyen severamente en el resultado del curso de la infección y la mortalidad larvaria, algunas de ellas son las variaciones intraespecies, el tamaño y preparación del inóculo, condiciones experimentales (temperatura de incubación, alimentación de larvas), edad y peso de la larva, entre otras [139]. Se encuentra descrito en la literatura que, de los modelos larvarios de aspergilosis, el inóculo más utilizado es el de 1×10^7 conidias/mL, presentándose una mortalidad a 1-2 días y, en general, exponen que la mortalidad larvaria es dependiente de la dosis [98,143,144]. Recientemente, Forastiero et al. recurrieron al uso de este modelo de mini hospedador para predecir el perfil de susceptibilidad a azoles de cepas de *A. fumigatus*, en el que establecieron como inoculo ideal aquel que generara una mortalidad > 80% [132]. Por otro lado, el estado de bienestar es un parámetro que adaptamos en este trabajo a partir de una escala utilizada para infecciones larvarias de origen bacteriano [133,145], por lo que este estudio es el primero que evalúa este parámetro como factor predictivo del estado de las larvas en un modelo en infecciones fúngicas, en el que se encontró una relación inversamente proporcional del índice de bienestar con el progreso de la infección de forma concentración y tiempo dependiente, en el que conforme la concentración aumentaba el índice de bienestar disminuía. Además, a diferencia de otros parámetros, permitía distinguir detalles del estado general de la larva, pudiendo relacionar que entre mayor actividad y mayor formación de capullo correspondía a un mejor estado de bienestar larvario, y la producción de melanina era resultado de la respuesta inmune a la infección, ya que se sabe que en *G. mellonella* ante el reconocimiento inmune de cuerpos extraños existe respuesta por parte de los plasmotocitos, un tipo de fagocito, que responde generando melanina para cubrir la superficie de estos cuerpos extraños, ayudando así a atrapar y eliminar patógenos [145], por lo que a mayor melanización nos indicaba un

progreso de la infección y la melanización completa se relacionaba con la muerte de la larva.

En el estudio de eficacia terapéutica de la sertralina en el modelo larvario encontramos que la sertralina como monoterapia demostró tener una actividad antifúngica significativa a partir de la dosis de 10 mg/Kg ($p < 0.0001$). Hasta el momento, el presente trabajo representa el único estudio de eficacia terapéutica de la sertralina en una infección fúngica empleando las larvas de *G. mellonella*. Previamente, Adamson, et al, utilizaron este modelo para estudiar el efecto de la sertralina como antimicrobiano en una infección experimental con *Pseudomonas aeruginosa*. En ese estudio, la sertralina se administró como monoterapia en dosis repetidas y la supervivencia incrementó ligeramente, pero sin resultados significativos, y esta resultó ser más efectiva cuando se combinó sinérgicamente con otro antimicrobiano [146]. A pesar de ser un modelo barato, sencillo y de relativamente fácil establecimiento y mantenimiento, presenta la importante desventaja de la poca similitud que tiene con humanos y el modo de infección en que se presenta se aleja considerablemente de las condiciones naturales de infección en las que se produce la aspergilosis en el ser humano.

Por otro lado, los modelos animales de API se han desarrollado para establecer un vínculo entre los experimentos *in vitro* y los ensayos clínicos. El modelo murino es el modelo experimental con mayor similitud tanto genética como fisiológicamente al humano, y existen diversas adaptaciones estandarizadas de modelos murinos de API con diferentes rutas de infección. En este sentido, los modelos inhalatorios, como el realizado en este estudio, son los preferidos debido a que recapitulan de una mejor manera el curso de la enfermedad frente a la exposición natural al hongo en un estado de inmunosupresión semejante al humano, además de que exhiben una buena correlación histopatológica con

la enfermedad humana y reproducibilidad de cargas fúngicas en tejido. Un modelo murino de API estandarizado y que ha mostrado tener un alto nivel de reproducibilidad intra e interlaboratorio es el propuesto por Sheppard et al. en 2004 [125,134,147]. En el presente trabajo se adoptó el modelo establecido por estos autores utilizando la cepa *A. fumigatus* CRCEI-16007, obteniendo una carga fúngica y evidencia de invasión pulmonar de manera semejante a lo reportado por estos autores con la cepa de referencia *A. fumigatus* Af293 [125,134].

La sertralina a partir de la dosis de 10 mg/Kg fue capaz de reducir significativamente la carga fúngica pulmonar de manera comparable, mas no superior, a anfotericina B 3 mg/Kg y voriconazol 10 mg/Kg. Las cargas fúngicas encontradas en el grupo control, así como en el grupo tratado con anfotericina B y voriconazol fueron similares a las reportadas previamente por otros autores [125,134] En cuanto al índice del antígeno GM, el cual se utiliza como un biomarcador en el diagnóstico temprano y seguimiento terapéutico de la aspergilosis [11,148], se presenta una disminución por la sertralina de manera dosis dependiente, en el que a partir de la dosis de 10 mg/Kg este se reduce significativamente. La literatura señala que la producción de GM es proporcional a la carga de hongos en el tejido, por lo que pareciera tener importancia pronóstica [125]. Sin embargo, la interpretación de GM es aún complicada en roedores, ya que hasta el momento el punto de corte de positividad en suero (>0.5) solo se ha validado en humanos, con falla al tratamiento >1 [80], tomándose estos valores como puntos de referencia en modelos animales. Además, estos valores varían entre muestras clínicas humanas, por lo que es necesario validar un punto de corte en estos modelos animales, que pueda utilizarse en la correlación de los datos con los resultados clínicos.

A nivel histopatológico, en los grupos de ratones infectados tratados con sertralina se observaron alteraciones morfológicas en las hifas, apreciándose hifas más delgadas y de forma irregular, con un cambio aparente dependiente de la dosis, lo que nos hace especular que el modo en que actúa la sertralina como antifúngico se podría deber a la alteración de algún componente estructural fundamental del hongo.

Este trabajo se suma a hallazgos previos que han evidenciado el efecto antifúngico *in vivo* de la sertralina frente a otros hongos de importancia clínica, como *C. neoformans* [99,116] y *Candida* spp [110]. Zhai et al. en 2013 en un modelo murino de criptococosis sistémica y Treviño et al. en 2016 en un modelo murino de meningoencefalitis criptocócica reportaron una potente actividad *in vivo* de la sertralina a la dosis de 15 mg/kg, disminuyendo la carga fúngica cerebral de forma comparable con la actividad de fluconazol. Por otro lado, Lass Flörl en 2001 evidenció por primera vez la actividad antifúngica de la sertralina en casos de vulvovaginitis candidiásica, y en 2003 demuestra que además la sertralina tiene una implicación en la disminución de las propiedades de virulencia de *Candida* spp, entre estas la elongación de las hifas [115]. Algunos posibles mecanismos antifúngicos de la sertralina han sido discutidos por diferentes grupos de investigación para hongos levaduriformes, surgiendo algunas evidencias e hipótesis razonables. Rainey et al. 2010 demostraron que la sertralina altera las membranas vesiculogénicas de fosfolípidos intracelulares, inhibe algunas fosfolipasas (A1,D, C,A2) en hongos y produce una fosfolipidosis parecida a la inducida por fármacos anfifílicos catiónicos, causando expansión y estrés en membrana, lo cual conlleva a cambios estructurales de la membrana que conducen a la muerte celular programada irreversible del organismo [149]. Por otra parte, Spitzer et al., 2011 demostró que la sertralina puede

perturbar la permeabilidad de la membrana celular e inhibir la biosíntesis de esfingolípidos en hongos, relacionándolo principalmente con un gen que codifica para una translocasa necesaria para el tráfico de membrana y biogénesis vacuolar (NEO1), así como otros genes que causan perturbación general de membrana, tráfico vesicular y de biosíntesis de lípidos (ergosterol y esfingolípidos) [101]. Más recientemente, Zhai et al. en 2012, sugirió un posible efecto antifúngico de la sertralina mediante la inhibición de la traducción y, por ende, de la síntesis proteica en hongos, principalmente inhibiendo el factor de iniciación de la traducción *Tif3* [99]. Lo anterior podría causar alterar otros procesos que causen muerte fúngica después de dañar la membrana, activando las vías de señalización apoptóticas y conduciendo a la pérdida de viabilidad celular en el hongo [150].

Los resultados del presente estudio son alentadores al mostrar a la sertralina como una posible opción terapéutica para la API, con un potencial antifúngico de bajo costo, fácilmente disponible y menores efectos adversos que los tratamientos actuales que a pesar de ser efectivos hasta cierta medida, repercuten negativamente en la calidad de vida del paciente. La evidencia presentada en este trabajo da pie a la realización de estudios posteriores que pueden trasladarse rápidamente al escenario clínico.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

En el modelo larvario de aspergilosis la sertralina aumentó la supervivencia y mejoró el estado de bienestar larvario, especialmente para el día 3 post-infección. El estado de bienestar larvario resultó ser un buen indicador del progreso de la infección fúngica, así como para el estudio de eficacia terapéutica.

En el modelo murino de API, la sertralina a partir de la dosis de 10 mg/Kg redujo de manera significativa la carga fúngica pulmonar en los animales infectados con *A. fumigatus* CRCEI-16007. La evaluación histopatológica de los pulmones se correlacionó con lo encontrado cuantitativamente en la carga fúngica pulmonar y antígeno GM, evidenciándose una disminución significativa de estructuras fúngicas en los pulmones de ratones infectados y tratados con sertralina a partir de la dosis de 10 mg/Kg.

La hipótesis inicialmente planteada se aceptó, ya que la sertralina exhibió actividad antifúngica *in vivo* cuando fue administrada como monoterapia para el tratamiento de la aspergilosis en un modelo murino de API, así como en el modelo larvario.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

Algunas perspectivas que podrían desprenderse de este trabajo son:

- Realizar estudios con un mayor número de aislamientos clínicos
- Estudiar el efecto antifúngico de la sertralina en otras especies de *Aspergillus*, así como frente a otros hongos de importancia clínica
- Probar cepas resistentes a los antifúngicos de primera línea empleados para el tratamiento de la aspergilosis
- Evaluar el efecto de la sertralina como tratamiento adyuvante a la terapia convencional
- Investigar la actividad antifúngica de la sertralina como terapia profiláctica
- Extrapolar el estudio al escenario clínico
- Elucidar el mecanismo de acción antifúngico de la sertralina

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

1. Bonifaz Trujillo. Alejandro. *Micología Médica Básica*, 5ta edición, México, D.F., McGraw-Hill Interamericana, 2015.
2. Lee J. Discovery of *Aspergillus* as a Human Pathogen. 1965;
3. Barnes E. *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 2004;42:1376–8.
4. JH B. On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 1842;
5. Brakhage AA SAGW. Fresenius and the Description of the Species *Aspergillus fumigatus*. *Contrib. to Microbiol.* 1999
6. Ostrosky-zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond. 2010;9.
7. H TB. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev. Chil. infectología* 2004;21:13–9.
8. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hubka V, Perrone G, Seifert KA, et al. *Studies in Mycology*. 2014;141–73.
9. Zmeili OS, Soubani AO. Review Pulmonary aspergillosis : a clinical update. 2018;317–34.
10. Paulussen C, Hallsworth JE, Nierman WC, Alvarez-p S, Hamill PG, Blain D, et al. *Microbial Biotechnology Special Issue Invitation on ‘ Biotechnological Potential of Eurotiale Fungi ’ – minireview Ecology of aspergillosis : insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species.* 2017;10:296–322.
11. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* [Internet] 2016;30:125–42.
12. Lass-flo C. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. 2018;5–11.
13. Lion et al. No Title. Human Fungal Pathogens Identification. *Methods in Molecular Biology*, 2017;1508.
14. Sugui JA, Kwon-chung KJ, Juvvadi PR, Latge J, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and Related Species. 2015;1–17.
15. Henry C, Fontaine T, Heddergott C, Robinet P, Aïmanianda V, Beau R, et al. Biosynthesis of cell wall mannan in the conidium and the mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 2016;18:1881–91.
16. Lee MJ, Sheppard DC. Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. 2016;54:232–3.

17. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, et al. ¿Qué hace que *Aspergillus fumigatus* sea un patógeno de éxito? Genes y moléculas involucrados en la aspergilosis invasora. *Rev. Iberoam. Micol.* 2010;27:155–82.
18. Tekaia F, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* 2005;8:385–92.
19. Bayry J, Aïmanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* 2012;8:6–9.
20. Kwon-chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus* — What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen ? 2013;9.
21. Pillows: A Hot Bed Of Fungal Spores. Science Daily, Imagen A. *fumigatus* University of Manchester. 2005. Recuperado de: <https://www.sciencedaily.com/releases/2005/10/051015093046.htm>.
22. ESIAB. Imagen de morfología colonial de *Aspergillus*. Recuperado de: <http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les%2Bfiches%2Bpratiques/aspfumig>.
23. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus* -Related Species in Clinical Practice. 2016;7:1–8.
24. Gautier M, Normand A, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016;22:662–9.
25. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:3138–41.
26. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:3380–7.
27. Lamoth F, Chung SJ, Damonti L, Alexander BD. Changing epidemiology of invasive mold infections in patients receiving azole prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* 2017;64:1619–21.
28. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21:1041–4.
29. Alcazar-fuoli AAL, Cuenca-estrella M. Antifungal Susceptibility Profile of Cryptic Species of *Aspergillus*. 2014;427–33.
30. Pasqualotto AC. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Springer 2010;427.
31. Nedel WL, Pasqualotto AC. Treatment of Infections by Cryptic *Aspergillus* Species. 2014;441–5.
32. Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:35–54.
33. Krappmann S. ScienceDirect How to invade a susceptible host : cellular aspects of aspergillosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016;34:136–46.

34. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. 2009;22:447–65.
35. Veerdonk FL Van De, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé J. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. Nat. Publ. Gr. 2017.
36. Reponen T, Grinshpun SA, Conwell KL, Wiest J, Anderson M. Aerodynamic versus physical size of spores: Measurement and implication for respiratory deposition. Grana 2001;40:119–25.
37. Thomas RJ. Particle size and pathogenicity in the respiratory tract. Virulence 2013;4:847–58.
38. Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. FEMS Microbiol. Rev. 2015;39:670–87.
39. Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. Semin. Immunopathol. 2015;37:107–16.
40. Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature 2009;460:1117–21.
41. Ben-ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Enemy of the (immunosuppressed) state : an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. 2010;406–17.
42. Heinekamp T, Schmidt H, Lapp K, Pätz V. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. 2015;141–52.
43. Chai LYA, Kullberg BJ, Vonk AG, Warris A, Cambi A, Latgé JP, et al. Modulation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 2009;77:2184–92.
44. Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: An essential role for AtfA in conidial dormancy. BMC Genomics 2016;17.
45. Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis JP, Henry C, Lacroix C, Glaser P, et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Genomics 2008;9:1–15.
46. McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, et al. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS Pathog. 2008;4.
47. Balloy V, Huerre M, Latgé J, Latge J, Chignard M. Differences in Patterns of Infection and Inflammation for Corticosteroid Treatment and Chemotherapy in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis Differences in Patterns of Infection and Inflammation for Corticosteroid Treatment and Chemotherapy in Exp. Infect. Immun. 2005;73:494–503.
48. Kamai Y, Chiang LY, Lopes Bezerra LM, Doedt T, Lossinsky AS, Sheppard DC,

- et al. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. *Med. Mycol.* 2006;44:115–7.
49. Shibuya K, Ando T, Hasegawa C, Wakayama M, Hamatani S, Hatori T, et al. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Chemother.* 2004;10:138–45.
 50. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;63:e1–60.
 51. Challa S. Pathogenesis and Pathology of Invasive Aspergillosis. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 2018;12:23–32.
 52. Lien M-Y, Chou C-H, Lin C-C, Bai L-Y, Chiu C-F, Yeh S-P, et al. Epidemiology and risk factors for invasive fungal infections during induction chemotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia: A retrospective cohort study. *PLoS One* 2018;13:e0197851.
 53. Barberan J, Sanz F, Hernandez J, Merlos S, Malmierca E, Garcia-perez F, et al. Clinical features of invasive pulmonary aspergillosis vs . colonization in COPD patients distributed by gold stage. *J. Infect.* 2012;65:447–52.
 54. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2001;32:358–66.
 55. Chakrabarti A, Chatterjee SS, Das A, Shivaprakash MR. Invasive aspergillosis in developing countries. *Med. Mycol.* 2011;49:35–47.
 56. Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). 2018. Recuperado de: <https://www.gaffi.org/why/treatment-deficiencies/>
 57. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. 2010.
 58. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20:133–63.
 59. Bitar D, Lortholary O, Strat Y Le, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections ., 2014;20:1149–55.
 60. van de Peppel RJ, Visser LG, Dekkers OM, de Boer MGJ. The burden of Invasive Aspergillosis in patients with haematological malignancy: A meta-analysis and systematic review. *J. Infect.* 2018;76:550–62.
 61. Montagna MT, Giglio O De, Napoli C, Lovero G. Invasive Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies (Aurora Project): Lights and Shadows During 18-Months Surveillance. 2012;774–87.
 62. Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, Tanaka J, Nishio M. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. 2012;748–57.
 63. Satlin MJ, Soave R, Shore TB, Corzo-le DE, Schuetz AN, Jacobs SE, et al. emerging pathogens. 2015;325–36.

64. Racil Z, Weinbergerova B, Kocmanova I, Muzik J, Kouba M, Drgona L, et al. International Journal of Infectious Diseases Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics : Fungal Infection Database (FIND) analysis , 2005 – 2009. *Int. J. Infect. Dis.* 2013;17:e101–9.
65. Herbrecht R, Caillot D, Cordonnier C, Auvrignon A, Thie A, Michallet M, et al. Indications and outcomes of antifungal therapy in French patients with haematological conditions or recipients of haematopoietic stem cell transplantation. 2018;2731–8.
66. Dg C. Aspergilosis invasiva en el paciente que recibe trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas : epidemiología , diagnóstico , profilaxis y tratamiento Invasive aspergillosis in patients given allogeneic stem cell transplants : *Epidemiology* . 2016;17:262–7.
67. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang C, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. 2010;220–9.
68. Neofytos D, Chatzis O, Nasioudis D, Boely Janke E, Doco Lecompte T, Garzoni C, et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients in the Swiss Transplant Cohort Study. *Transpl. Infect. Dis.* 2018;0–1.
69. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, Giglio O De, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit : results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). 2013;645–53.
70. Taccone F, Van den Abeele A-M, Bulpa P, Misset B, Meersseman W, Cardoso T, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit. Care [Internet]* 2015;19:7. Available from: <http://ccforum.com/content/19/1/7>
71. Steinbach WJ. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. *Clin. Microbiol. Infect* 2010;16:1321–7.
72. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses* 2015;58:34–44.
73. Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, William E, Marr KA, et al. NIH Public Access. 2009;46:1813–21.
74. Zilberberg MD, Nathanson BH, Harrington R, Spalding JR, Shorr AF. Epidemiology and Outcomes of Hospitalizations With Invasive Aspergillosis in the United States , 2009 – 2013. 2018;2009–13.
75. Baddley JW, Stephens JM, Ji X, Gao X, Schlamm HT, Tarallo M. Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients : epidemiology and economic outcomes. 2013;
76. Piens M, Pondarre C, Hadden R, Crassard N, Basset T, Berthier J, et al. Invasive aspergillosis in a paediatric haematology department : a 15-year review. 2007;109-16.
77. Eiff V. Pulmonary Aspergillosis: Early Diagnosis Improves Survival. *Respiration*.

- 1995;62:341-347
78. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet. Infect. Dis.* 2005;5:609–22.
 79. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;63:e1–60.
 80. Mercier T, Guldentops E, Lagrou K, Maertens J. Galactomannan, a surrogate marker for outcome in invasive aspergillosis: Finally coming of age. *Front. Microbiol.* 2018;9:1–10.
 81. Heldt S, Hoenigl M. Lateral Flow Assays for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Current Status. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 2017;11:45–51.
 82. Becker, M. J., Lugtenburg, E. J., Cornelissen, J. J., Van Der Schee, C., Hoogsteden, H. C. & De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based bronchoalveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003;121.
 83. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. Aspergillus Galactomannan Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid. 2004;42:5517–22.
 84. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. *J. Infect. Dis.* 2004;190:641–9.
 85. Clancy CJ, Jaber RA, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1759–65.
 86. Husain, S., Paterson, D. L., Studer, S. M., Crespo, M., Pilewski, J., Durkin, M., Wheat, J. L., Johnson, B., Mclaughlin, L., Bentsen, C., Mccurry, K. R. & Singh N. Aspergillus galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 2007;83:1330–6.
 87. Nguyen MH, Jaber R, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:2787–92.
 88. Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, et al. The Value of Computed Tomography-Guided Percutaneous Lung Biopsy for Diagnosis of Invasive Fungal Infection in Immunocompromised Patients. *Clin. Infect. Dis.* 2007;45:e101–4
 89. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S,

- et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: A tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;177:27–34.
90. Penack O, Rempf P, Graf B, Blau IW, Thiel E. Aspergillus galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: Implications for clinical management. *Ann. Oncol.* 2008;19:984–9.
 91. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Wijngaerden E Van. *Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients without Malignancy.* 2004;
 92. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann J-W, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin. Infect. Dis.* 2007;44:373–9.
 93. A.J. Carrillo-Muñoz JP y MG. A.J. Carrillo-Muñoz, J. Pemán y M. Gobernado. 1999;
 94. Butts A, Krysan DJ. *Antifungal Drug Discovery : Something Old and Something New.* 2012;8:9–11.
 95. Langedijk J, Mantel-teeuwisse AK, Slijkerman DS. Drug repositioning and repurposing : terminology and definitions in literature. 2015;00.
 96. Thomas J. *New tricks for old drugs.* 2010;
 97. Ashburn TT, Thor KB. *Drug repositioning : identifying and developing new uses for existing drugs.* 2004;3.
 98. Cowen LE, Singh SD, Kohler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106:2818–23.
 99. Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56:3758–66.
 100. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* 2007;3:0168–78.
 101. Spitzer M, Griffiths E, Blakely KM, Wildenhain J, Ejim L, Rossi L, et al. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. *Mol. Syst. Biol.* 2011;7:1–14.
 102. *Pharmacology C. Sertraline.* 2016;2–9.
 103. Devane CL, Liston HL, Markowitz JS. *Clinical Pharmacokinetics of Sertraline.* 2002;41:1247–66.
 104. Hiemke C, Härtter S. *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors.* 2000;85:11–28.
 105. Nayak R, Xu J. Effects of sertraline hydrochloride and fluconazole combinations on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycology* 2010;1:99–105.
 106. Lewis RJ, Angier MK, Williamson KS, Johnson RD. *Analysis of Sertraline in*

- Postmortem Fluids and Tissues in 11 Aviation Accident Victims *. 2018;208–16.
107. Nagy CF, Kumar D, Perdomo CA, Wason S, Cullen EI, Pratt RD. Concurrent administration of donepezil HCl and sertraline HCl in healthy volunteers: assessment of pharmacokinetic changes and safety following single and multiple oral doses. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2004;58:25–33.
 108. McEvoy. Sertraline (Zoloft): Drug Whys, 2009. Recuperado de: <https://www.emsl.com/medical-clinical/articles/486173-Sertraline-Zoloft-Drug-Whys/>.
 109. Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56:3758–66.
 110. Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Ledochowski M. Antifungal activity against *Candida* species of the selective serotonin-reuptake inhibitor, sertraline. *Clin Infect Dis* 2001;33:E135-6.
 111. Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Jenewein I, Ledochowski M. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001;48:775–9.
 112. Paul S, Mortimer RB, Mitchell M. Sertraline demonstrates fungicidal activity *in vitro* for *Coccidioides immitis*. *Mycology* 2016;7:99–101.
 113. Cong L, Liao Y, Yang S, Yang R. In Vitro antifungal activity of sertraline and synergistic effects in combination with antifungal drugs against planktonic forms and biofilms of clinical *Trichosporon asahii* Isolates. *PLoS One* 2016;11:1–12.
 114. Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, Khan A, Ullah F, Ullah I, et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. *J. Biol. Res.* 2015;22:4.
 115. Lass-Flörl C, Ledochowski M, Fuchs D, Speth C, Kacani L, Dierich MP, et al. Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence *in vitro*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003;35:11–5.
 116. Treviño-Rangel RDJ, Villanueva-Lozano H, Hernández-Rodríguez P, Martínez-Reséndez MF, García-Juárez J, Rodríguez-Rocha H, et al. Activity of sertraline against *Cryptococcus neoformans*: In vitro and in vivo assays. *Med. Mycol.* 2016;54:280–6.
 117. Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA, et al. *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59:7197–204.
 118. Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel R de J, González GM, Hernández-Rodríguez PA, Camacho-Ortiz A, Castillo-Reyna L, et al. Clinical evaluation of the antifungal effect of sertraline in the treatment of cryptococcal meningitis in HIV patients: a single Mexican center experience. *Infection* 2018;46:25–30.
 119. Rhein J, Morawski BM, Hullsiek KH, Nabeta HW, Kiggundu R, Tugume L, et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal

- meningitis: An open-label dose-ranging study. *Lancet Infect. Dis.* 2016;16:809–18.
120. Heller I, Leitner S, Dierich MP, Lass-Flörl C. Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2004;24:401–4.
 121. Patterson TF. The future of animal models of invasive aspergillosis. 2005;115–9.
 122. Clemons K V, Stevens DA. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis , therapy and virulence. 2005;101–10.
 123. Champion O, Titball R, Bates S. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. *J. Fungi* 2018;4:108.
 124. Desoubeaux G, Cray C. Rodent Models of Invasive Aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* : Still a Long Path toward Standardization. 2017;8:1–31.
 125. Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Eur. Soc. Clin. Infect. Dis.* 2006;12:376–80.
 126. Adamson TW, Diaz-arevalo D, Gonzalez TM, Liu X, Kalkum M. Hypothermic Endpoint for an Intranasal Invasive Pulmonary Aspergillosis Mouse Model. 2013;63:477–81.
 127. Green MR, Sambrook J. Isolation of high molecular weight DNA using organic solvents. In: Green MR (ed) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed, 2012. CSH Press, New York.
 128. Van Pamel E, Daeseleire E, De Clercq N, Herman L, Verbeken A, Heyndrickx M, et al. Restriction analysis of an amplified *rodA* gene fragment to distinguish *Aspergillus fumigatus* var. *ellipticus* from *Aspergillus fumigatus* var. *fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012;333:153–9.
 129. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd. ed. Approved standard M38-A3. Wayne, PA: CLSI, 2008.
 130. Clinical and Laboratory Standards Institute.. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 1st. ed. CLSI supplement M61. Wayne, PA: CLSI, 2008.
 131. Models NA, Aspergillosis I, This P, Operating S, Sop ST, Sop RT, et al. Standard Operating Procedure for Preparation of *Aspergillus fumigatus* Test Strains for Inhalational Pulmonary Aspergillosis Animal Studies. :1–6.
 132. Forastiero A, Bernal-Martínez L, Mellado E, Cendejas E, Gomez-Lopez A. In vivo efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015;46:511–7.
 133. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016;7:214–29.
 134. Sheppard DC, Graybill JR, Najvar LK, Chiang LY, Doedt T, Kirkpatrick WR, et

- al. Standardization of an Experimental Murine Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. 2006;50:3501–3.
135. Costa Silva RA, da Silva CR, de Andrade Neto JB, da Silva AR, Campos RS, Sampaio LS, et al. In vitro anti-Candida activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. *Microb. Pathog.* 2017;107:341–8.
 136. Rossato L, Loreto ÉS, Zanette RA, Chassot F, Santurio JM, Alves SH. In vitro synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2016;61:399–403.
 137. Oliveira AS, Martinez-de-Oliveira J, Donders GGG, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A. Anti-Candida activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. *Med. Microbiol. Immunol.* 2018;207:195–200.
 138. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:314–9.
 139. Binder U, Maurer E, Lass-Flörl C. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biol.* 2016;120:288–95.
 140. Krishnendu Mukherjee, Eugen Domann and TH. *Biologically-Inspired Systems*. 2011;
 141. Slater JL, Gregson L, Denning DW, Warn PA. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med. Mycol.* 2011;49:107–13.
 142. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002;34:153–7.
 143. Jackson JC, Higgins LA, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 2009;4.
 144. Liu H, Gravelat FN, Chiang LY, Chen D, Vanier G, Ejzykowicz DE, et al. *Aspergillus fumigatus* AcuM regulates both iron acquisition and gluconeogenesis. *Mol. Microbiol.* 2010;78:1038–54.
 145. Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013;4:419–28.
 146. Adamson DH, Krikstopaityte V, Coote PJ. Enhanced efficacy of putative efflux pump inhibitor/antibiotic combination treatments versus MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Galleria mellonella* in vivo infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015;70:2271–8.

147. Sheppard DC, Rieg G, Chiang LY, Filler SG, Edwards JE, Ibrahim AS. Novel Inhalational Murine Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. 2016;48:1908–11.
148. Koo S, Bryar JM, Baden LR, Marty FM. Prognostic features of galactomannan antigenemia in galactomannan-positive invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:1255–60.
149. Rainey MM, Korostyshevsky D, Lee S, Perlstein EO. The antidepressant sertraline targets intracellular vesiculogenic membranes in yeast. *Genetics* 2010;185:1221–33.
150. Costa Silva RA, da Silva CR, de Andrade Neto JB, da Silva AR, Campos RS, Sampaio LS, et al. In vitro anti-Candida activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. *Microb. Pathog.* 2017;107:341–8.

APENDICE

Apéndice A. Preparación de reactivos y soluciones

Acetato de sodio 3M pH 5.3 ± 1

Pesar 20.415 g de $C_2H_3NaO_2$ y aforar a 50 mL con H_2O /DEPC.

Ácido clorhídrico 1N

Diluir 8.35 mL de HCl en 91.65 mL de H_2O destilada.

Ácido crómico al 5%

Diluir 5 g de H_2CrO_4 en 100 mL de H_2O destilada.

Agua/DEPC (H_2O /DEPC)

Agregar 1 mL de DEPC. Aforar a 1L con H_2O destilada estéril a $37^\circ C$ por 12 h.

Alcohol ácido

Diluir 1 ml de HCl concentrado en 99 ml de etanol al 70%.

Bisulfito de sodio al 1%

Disolver 1 g de $NaHSO_3$ en 100 mL de H_2O destilada.

Borato de sodio (bórax) al 5%

Diluir 5 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ en 100 mL de H_2O destilada.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de H_2O ultrapura y aforar a 50 mL. Almacenar a $4^\circ C$ protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar. Para preparar la solución de trabajo (2 $\mu g/mL$) se efectúa una dilución 1:250 de la solución stock (1 mL del stock + 249 mL de H_2O ultrapura).

Caldo dextrosa Sabouraud

Disolver 20 g de dextrosa y 10 g de peptona en 1 L de agua destilada. Esterilizar.

Cloruro de oro al 0.1%

Abrir cuidadosamente una ampolla de 0.1 g de $AuCl_3$ y permitir disolución completa en 100 ml de H_2O destilada. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

CTAB/NaCl (CTAB 10%/NaCl 0.7 M)

Disolver 4.1g de NaCl en 80 mL de H_2O destilada, agregar lentamente 10 g de CTAB y calentar a $65^\circ C$ mientras se mezclan. Ajustar a un volumen de 100 mL.

EDTA 500 mM pH 8.0

Disolver 9.306 g de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ en 40 mL de H_2O ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30 mL de H₂O destilada estéril.

Etanol al 95%

Diluir 95 mL de etanol absoluto con 5 mL de H₂O destilada estéril.

Fenol saturado

1.- Pesar 500g de fenol y fundir en baño maría a 65°C.

2.- Agregar 8-hidroxiquinoleína (antioxidante) a una concentración final de 0.1%.

3.- Añadir un volumen de Tris-HCl 0.5M pH 8.0, mezclar con agitador magnético y ajustar con lentejas de NaOH el pH hasta que este sea mayor de 7.8 en la fase fenólica (medir con papel indicador).

4.- Agitar durante 24 h en cuarto frío, posteriormente dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando pipeta.

5.- Repetir la misma operación, pero utilizando Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.

6.- Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 pH 8.0 conteniendo β-mercaptoetanol a una concentración de 0.2%.

7.- La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C y las alícuotas en uso se deberán almacenar a 4°C.

Formalina amortiguada (fijador tisular)

Disolver 8.1 g de NaCl en 900 mL de H₂O destilada y adicionar 100 mL de formaldehído (37% grado reactivo).

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 1.5 g de agarosa grado biología molecular en 100 mL de TBE 0.5x, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 10 µL de bromuro de etidio 2 µg/mL, mezclar y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 6x (Buffer de carga para electroforesis)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1x pH 8.0 y aforar a 10 mL. No esterilizar.

Metabisulfito de sodio al 10%

Disolver 10 g de Na₂S₂O₅ en 100 mL de H₂O destilada.

Metenamina al 3%

Diluir 3 g de metenamina en 100 mL de H₂O destilada

Nitrato de plata al 5%

Diluir 5 g de AgNO₃ en 100 mL de H₂O destilada.

PBS (solución amortiguadora de fosfatos) 10x (Stock)

Pesar 80.6 g de NaCl, 2.2 g de KCl, 11.5 g de Na₂HPO₄ y 2 g de KH₂PO₄, y aforar con H₂O destilada a 1L. Esterilizar en autoclave.

Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 estéril y hacer alícuotas de 100 μ L, las cuales deberá almacenarse a -20°C.

SDS (dodecilsulfato sódico) al 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de H₂O destilada. Esterilizar en autoclave.

SEVAG

Diluir 1 mL de alcohol isoamilico en 24 mL de CHCl₃.

Solución de descontaminación de áreas contaminadas con bromuro de etidio

Diluir 10 mL de H₃PO₂ en 10 mL de H₂O destilada y con el volumen resultante disolver 4.2 g de NaNO₂.

Solución de incubación/trabajo (Grocott-Gomori)

Añadir 3 mL de AgNO₃ 5% en 40 mL de metenamina 3%, se forma un precipitado blanco que desaparece con agitación, enseguida se agregan 3 mL de Na₂B₄O₇·10H₂O 5% y finalmente se adicionan 35 mL de H₂O destilada.

Solución de “lisis enzimática”

Mezclar 20 mL de Tris-HCl 100 mM, 0.4 mL de EDTA 500 mM y 60 mL de Tritón X100 2%, llevar a 100 mL con H₂O destilada estéril y almacenar a 4°C. Al momento de su utilización, se deberá agregar lisozima (grado biología molecular) 2 mg/mL, para evitar degradación enzimática.

Solución salina al 0.85%

Disolver 0.85 g de NaCl en 100 mL de H₂O destilada. Esterilizar en autoclave.

Solución salina al 0.85% + 0.1% Tween 80

Disolver 0.85 g de NaCl en 100 mL de H₂O destilada y adicionar 0.1 mL de Tween 80. Esterilizar en autoclave.

TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 10x (Stock)

Disolver 54 g de Tris-base y 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 500 mM y en H₂O ultrapura, aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave. Para preparar la solución de trabajo (0.5x) se mezclan 50 mL del stock en H₂O destilada estéril y se afora a 1L.

TE (Tris-EDTA) 1x pH 8.0

Mezclar 500 μ L de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 μ L de EDTA 500 mM en H₂O destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave.

Tiosulfato de sodio al 3%

Pesar 3 g de Na₂S₂O₃ y disolver en 100 ml de H₂O destilada. Almacenaje a temperatura ambiente.

Tris-HCl 10 mM pH 7.5

Disolver 1.58 g de Tris-HCl en H₂O destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y finalmente aforar a 1 L.

Tris-HCl 100 mM pH 8.0

Disolver 15.76 g de Tris-HCl en H₂O destilada, ajustar pH a 8.0 y aforar a 1 L.

Tris-HCl 500 mM pH 8.0

Disolver 30.3 g de Tris-base en 300 mL de H₂O ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Tritón X-100 2%

Pesar 2 g de Tritón y disolver en 100 mL de H₂O destilada estéril.

Verde brillante 5%

Disolver 0.5 g del colorante en 10 mL de agua destilada

Apéndice B. Técnicas histológicas

Técnica histoquímica con plata metenamina de Grocott

Procedimiento:

Debe evitarse durante todo el proceso el uso de instrumentos metálicos, ya que la plata precipitaría sobre ellos.

1. Desparafinar e hidratar:
 - Xilol 8 min
 - Etanol 100% 5 min
 - Etanol 100% 5 min
 - Etanol 96% 5 min
 - Etanol 70% 5 min
 - Etanol 70% 5 min
 - Agua destilada 5 min
 2. Oxidación en ácido crómico al 5% por 15 min.
 3. Lavar con agua corriente con 3 cambios.
 4. Enjuagar en bisulfito sódico al 1%.
 5. Lavar con agua corriente por 3 min. y enjuagar bien en 3 cambios de agua destilada.
 6. Pasar los cortes en solución de incubación a 60°C en oscuridad por 1 h.
 7. Lavar bien en 3 cambios con agua destilada.
 8. Dar tono en 0.1% de cloruro de oro por 4 min.
 9. Pasar las secciones en tiosulfato de sodio al 3% por 5 min.
 10. Lavar bien en agua corriente.
 11. Contrastar claramente en la solución de verde brillante por 3 min.
 12. Lavar en agua corriente.
 13. Deshidratar, aclarar, montar.
 - Etanol 70% sumergir 5 veces
 - Etanol 96% 1 min
 - Etanol 100% 1 min
 - Xilol 1 min
- Preparar montaje con resina

Apéndice C. Producción científica

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

In vivo evaluation of the antifungal activity of sertraline against *Aspergillus fumigatus*

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID	JAC-2018-1587.R1
Manuscript Type:	Brief report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Treviño-Rangel, Rogelio; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Villanueva-Lozano, Hiram; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Méndez-Galomo, Karen; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Solís-Villegas, Elia; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Becerril-García, Miguel; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Montoya, Alexandra; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología Robledo-Leal, Efren; Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Microbiología e Inmunología González, Gloria; Facultad de Medicina, UANL, Microbiología
Keywords:	<i>Aspergillus fumigatus</i> , Aspergillosis, sertraline, voriconazole, Amphotericin B

SCHOLARONE™
Manuscripts

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: under review