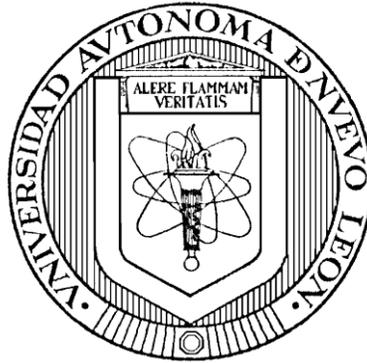


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁLOGOS DE *cyp51* CON LA RESISTENCIA A AZOLES EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE *Fusarium* spp.

Por

JOAN ENRIQUE RODRÍGUEZ GRIMALDO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Microbiología Médica

Agosto 2022

CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁLOGOS DE *cyp51* CON LA RESISTENCIA A AZOLES EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE *Fusarium* spp.

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Gloria María González González
Directora de Tesis



Dra. C. Alexandra Margarita Montoya Mendoza
Co-director de Tesis



Dr. C. Angel Andrade Torres
Miembro de la Comisión



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

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi madre por siempre darme su apoyo y cariño.

A Diana por estar a mi lado cuando más lo necesité, por ser mi mejor amiga, pareja y compañera de vida.

A la Dra. C. Gloria por brindarme su apoyo y siempre incentivarme a mejorar.

A la Dra. C. Alexandra por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista y enriquecer mi experiencia con sus grandes observaciones.

A la Q.B.P. Karen por siempre apoyarme en el laboratorio. Más que una compañera una gran amiga.

A los compañeros y amigos del laboratorio, así como a los integrantes de la comisión de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

DEDICATORIA

A mi madre:

Por su amor incondicional. “Tú eres la alfarera, yo tan solo barro entre tus manos.”

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Género <i>Fusarium</i>	1
1.2 Infecciones humanas asociadas a <i>Fusarium</i> spp.	2
1.2.1 Especies de <i>Fusarium</i> de importancia clínica.	2
1.2.2 Infecciones en pacientes inmunocompetentes.	5
1.2.3 Infecciones en pacientes inmunocomprometidos.	6
1.2.4 Tratamiento de las infecciones por <i>Fusarium</i> spp.	6
2. ANTECEDENTES.8
2.1 Identificación de <i>Fusarium</i> spp.	8
2.1.1 Características morfológicas	8
2.1.2 Identificación molecular	11
2.2 Susceptibilidad a azoles	12
2.3 Mecanismos de resistencia asociados a <i>cyp51</i>	13
2.3.1 Mecanismo de acción de 14 α -desmetilasa.	13
2.3.2 Mecanismos de resistencia asociados a <i>cyp51</i>	14
2.3.3 Mutaciones puntuales en <i>cyp51</i>	16
2.4 Mutaciones puntuales en parálogos de <i>cyp51</i> de <i>Fusarium</i> spp. asociados a resistencia a azoles.	17
2.4.1 Mutaciones en <i>cyp51A</i> de <i>Fusarium</i> spp. asociadas a resistencia	18
2.4.2 Mutaciones en <i>cyp51B</i> de <i>Fusarium</i> spp. asociadas a resistencia	18
2.4.3 Mutaciones en <i>cyp51C</i> de <i>Fusarium</i> spp. asociadas a resistencia	19

3	JUSTIFICACIÓN	20
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
4.1	Hipótesis	21
4.2	Objetivos	21
4.2.1	Objetivo general	21
4.2.2	Objetivos específicos	21
5	MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1	Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	22
5.1.1	Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp de procedencia ambiental	23
5.2	Identificación de aislamientos.	23
5.2.1	Identificación morfológica	23
5.2.2	Identificación molecular.	24
5.2.2.1	Extracción de ADN	24
5.2.2.2	Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y <i>TEF-1α</i>	26
5.2.2.3	Electroforesis de amplicones	27
5.2.2.4	Purificación de productos de PCR	27
5.2.2.5	Secuenciación	28
5.2.2.6	Identificación.	28
5.3	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> a azoles	29
5.3.1	Preparación de placas	29
5.3.2	Preparación de inóculo	30
5.3.3	Inoculación e incubación de placas	31
5.3.4	Lectura de placas	31
5.4	Parálogos <i>cyp51</i> de <i>Fusarium</i> spp.	32
5.4.1	Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los parálogos <i>cyp51</i> de <i>Fusarium</i> spp.	32
5.4.2	Amplificación de <i>cyp51</i>	32
5.4.3	Electroforesis de amplicones <i>cyp51</i>	34
5.4.4	Purificación y cuantificación de amplicones <i>cyp51</i>	35
5.4.5	Secuenciación y análisis de amplicones <i>cyp51</i>	35
5.4.6	Modelaje	36

Capítulo	Página
6 RESULTADOS	37
6.1 Información demográfica de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp . . .	37
6.2 Identificación de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	38
6.2.1 Identificación morfológica	38
6.2.2 Identificación molecular	39
6.3 Susceptibilidad <i>in vitro</i> a antifúngicos	44
6.4 Parálogos <i>cyp51</i> de <i>Fusarium oxysporum</i>	45
6.4.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los parálogos <i>cyp51</i>	45
6.4.2 Amplificación de los parálogos <i>cyp51</i>	46
6.4.3 Análisis de la secuencia y estructura de los parálogos <i>cyp51</i> de <i>F. oxysporum</i>	48
7 DISCUSIÓN	51
8 CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Complejos de especies de <i>Fusarium</i> de importancia clínica	3
2. Infecciones causadas por <i>Fusarium</i> spp., principales manifestaciones clínicas y factores de riesgo en humanos	4
3. Características representativas de los principales complejos de especies de <i>Fusarium</i> de importancia clínica.	9
4. Mutaciones puntuales que confieren resistencia a azoles.	17
5. Cepas clínicas y ambientales donadas por instituciones de México	22
6. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación de ITS1-5.8S-ITS2 y <i>TEF-1α</i>	26
7. Azoles y concentraciones a evaluar.	30
8. Secuencias de <i>Fusarium</i> spp. utilizadas para diseñar los oligonucleótidos de los parálogos <i>cyp51</i>	33
9. Condiciones de amplificación de los parálogos <i>cyp51</i> de <i>Fusarium</i> spp.	34
10. Comparación de la identificación fenotípica y molecular	43
11. Susceptibilidad <i>in vitro</i> a azoles de 116 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp..	44
12. Susceptibilidad <i>in vitro</i> a azoles de diferentes especies de <i>Fusarium</i>	45
13. Oligonucleótidos para amplificar los parálogos <i>cyp51</i> de <i>Fusarium</i> spp.	46
14. Cepas de <i>F. oxysporum</i> con CMI's altos y bajos	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principales estructuras microscópicas del género <i>Fusarium</i>	10
2. Reacción de la enzima estero 14 α -desmetilasa.	14
3. Esquema de síntesis de ergosterol y punto de acción contra la estero 14 α -desmetilasa.	15
4. Concentraciones de azoles en placas de 96 posillos.	30
5. Distribución geográfica de los 116 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp	37
6. Principales características de los complejos de especies de <i>Fusarium</i>	41
7. Identificación molecular de especies y complejos de especies de <i>Fusarium</i>	42
8. Identificación molecular de 84 cepas de origen clínico	42
9. Identificación molecular de 32 cepas de origen ambiental	42
10. Amplificación de los parálogos <i>cyp51A</i> (A), <i>cyp51B</i> (B) y <i>cyp51C</i> (C) de <i>F. oxysporum</i>	48
11. Mutaciones puntuales en <i>cyp51A</i> de <i>F. oxysporum</i>	49
12. Deleción en <i>cyp51A</i> en la cepa 66F	50
13. Modelaje de la proteína CYP51A de la cepa 66F de <i>F. oxysporum</i>	50

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Fusarium*

El género *Fusarium* son hongos filamentosos de hifas hialinas pertenecientes al filo de los Ascomycetes, (clase: Sordariomycetes, orden: Hypocreales, familia: Nectriaceae)¹.

Es un género de distribución cosmopolita con alrededor de 300 especies, las cuales son principalmente fitopatógenas, causantes de diversas enfermedades como pudrición de corona, tizón de la espiga y sarna. Además de que algunas especies producen micotoxinas que contaminan los productos agrícolas como tricotecenos y fumonisinas ¹⁻³.

El tamaño del genoma es muy variable entre especies, reportándose desde 36 Mb para *F. graminearum* y 61 Mb para *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*^{1,4}.

La primera descripción de *Fusarium* spp. fue realizada por Link en 1809. Su característica morfológica distintiva fue la forma de sus conidias con apariencia de canoa, plátano o media luna⁵.

En 1940 existía una gran cantidad de especies conformando el género *Fusarium*, por lo que Snyder y Hansen redujeron el número a nueve especies, demostrando que al realizar cultivos procedentes de una conidia la identificación de la especie resultaba más confiable⁶.

Entre los años 1950 – 1960 Gordon, consideró la forma reproductiva sexual (teleomorfo) de *Fusarium* spp., aumentando a 26 el número de especies del género⁵. La forma teleomorfa de *Fusarium* spp. se caracteriza por la formación de un cuerpo fructífero llamado peritecio, en el que se encuentran las esporas sexuales (ascosporas) contenidas en sacos denominados como ascas⁷.

Posterior, en 1960 – 1970 Booth demostró la importancia de la morfología de las células conidiógenicas de *Fusarium* spp., con las cuales se puede realizar la distinción entre especies⁵.

En 1990 el uso de la secuenciación del ADN introdujo más especies al género *Fusarium*, en especial especies que no pueden distinguirse morfológicamente⁸.

1.2 Infecciones humanas asociadas a *Fusarium* spp.

1.2.1 Especies de *Fusarium* de importancia clínica

Algunas especies de *Fusarium* poseen el potencial de ser patógenos para animales y humanos. Las principales especies identificadas en infecciones humanas por *Fusarium* son: *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Con el paso del tiempo, la secuenciación de múltiples genes de *Fusarium* spp. demostró que las especies más frecuentemente identificadas en realidad eran complejos de especies. Se han identificado 10 complejos de importancia clínica, en los cuales se agrupan alrededor de 70 especies, algunas de ellas sin nombre asignado, debido a que no se pueden distinguir fenotípicamente (ver Tabla 1)⁹⁻¹⁵.

Tabla 1. Complejos de especies de *Fusarium* de importancia clínica.

Complejo	Especies
Complejo de Especies <i>Fusarium solani</i> (CEFS)	<i>F. falciforme</i>
	<i>F. keratoplasticum</i>
	<i>F. lichenicola</i>
	<i>F. petroliphilum</i>
	<i>F. pseudensiforme</i>
	<i>F. solani</i>
	15 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium oxysporum</i> (CEFO)	<i>F. oxysporum</i>
	3 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium incarnatum/equiseti</i> (CEFIE)	<i>F. equiseti</i>
	<i>F. incarnatum</i>
	18 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium fujikuroi</i> (CEFF)	<i>F. acutatum</i>
	<i>F. ananatum</i>
	<i>F. andyazi</i>
	<i>F. fujikuroi</i>
	<i>F. globosum</i>
	<i>F. guttiforme</i>
	<i>F. musae</i>
	<i>F. napiforme</i>
	<i>F. nygamai</i>
	<i>F. proliferatum</i>
	<i>F. ramigenum</i>
	<i>F. sacchari</i>
	<i>F. subglutinans</i>
<i>F. temperatum</i>	
<i>F. thapsinum</i>	
<i>F. verticillioides</i>	
Complejo de Especies <i>Fusarium dimerum</i> (CEFD)	<i>F. delphinooides</i>
	<i>F. dimerum</i>
	<i>F. penzigii</i>
	2 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium tricinctum</i> (CEFT)	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. flocciferum</i>
	2 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium chlamydosporum</i> (CEFC)	<i>F. chlamydosporum</i>
	3 especies sin nombre
Complejo de Especies <i>Fusarium concolor</i> (CEFCO)	<i>F. anguioides</i>
	<i>F. austroafricanum</i>
	<i>F. concolor</i>
Complejo de Especies <i>Fusarium sambucinum</i> (CEFS)	<i>F. armeniacum</i>
	<i>F. brachygibbosum</i>
	<i>F. langsethiae</i>
	<i>F. sporotrichioides</i>
Complejo de Especies <i>Fusarium lateritium</i> (CEFL)	<i>F. cassiae</i>
	<i>F. lateritium</i>
	<i>F. magnoilae-champaca</i>
	<i>F. sarcochroum</i>
	<i>F. stilboides</i>

Las principales manifestaciones clínicas y factores de riesgo en humanos causadas por infecciones de *Fusarium* spp. se observan en la Tabla 2¹⁶⁻²⁷.

Tabla 2. Infecciones causadas por *Fusarium* spp., principales manifestaciones clínicas, factores de riesgo en humanos y tratamiento farmacológico.

Infeción	Principales agentes	Manifestaciones clínicas	Principales factores de riesgo y condiciones asociadas	Tratamiento
Queratitis	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. moniliformes</i> <i>F. dimerum</i> <i>F. chlamydosporum</i> <i>F. temperatum</i>	Dolor intenso, enrojecimiento del ojo, sensibilidad a la luz y disminución de la visión	Traumatismo, uso de lentes de contacto y corticosteroides	Natamicina Anfotericina B
Onicomycosis	<i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i>	Engrosamiento y descoloración de las uñas	Humedad y mala higiene	Itraconazol y Terbinafina
Endoftalmitis	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. moniliformes</i> <i>F. dimerum</i> <i>F. chlamydosporum</i> <i>F. temperatum</i>	Dolor intenso, enrojecimiento del ojo, sensibilidad a la luz y disminución de la visión	Complicación de queratitis	Fluconazol y Voriconazol
Fusariosis diseminada	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. verticillioides</i>	Fiebre, fungemia, lesiones cutáneas (pápulas, nódulos y lesiones necróticas) e invasión a órganos	Neutropenia y enfermedades hematológicas	Anfotericina B y Voriconazol

Las infecciones producidas por *Fusarium* spp. se catalogan dentro de las llamadas hialohifomicosis, debido a que es un género de hongos que posee hifas hialinas y septadas. Fusariosis o fusariomicosis son otros términos con los que se le conoce a las infecciones producidas por *Fusarium* spp.²⁸.

En el diagnóstico clínico de la fusariosis el estándar de oro es el cultivo del agente causal y observación microscópica, ya sea de la biopsia de lesiones cutáneas o en hemocultivo. A diferencia de la aspergilosis, *Fusarium* spp. puede aislarse de la fusariosis diseminada hasta en el 50% de los casos^{29,30}.

Las manifestaciones clínicas y síntomas de la fusariosis suelen ser diversas, ya que dependen del estado inmunológico en el que se encuentra la persona, así como de la forma de inoculación del hongo. Las infecciones por *Fusarium* spp. pueden ser superficiales, localizadas o diseminadas, esta última se presenta principalmente en pacientes inmunocomprometidos^{31,32}.

1.2.2 Infecciones en pacientes inmunocompetentes

En personas inmunocompetentes la fusariosis se presenta de forma superficial y localizada, principalmente onicomicosis y queratitis, las cuales son las infecciones más frecuentes por *Fusarium* spp. y representan del 9-44% y 42-52.5% de las infecciones producidas por hongos no dermatofitos, respectivamente³³⁻³⁵. En la fusariosis se estima que la onicomicosis y queratitis representan aproximadamente el 91.6% y 5.6% de las infecciones producidas por *Fusarium* spp., respectivamente³⁶.

Otras infecciones que se llegan a presentar son la endoftalmitis consecuencia de la queratitis, lesiones cutáneas producto de traumatismos, peritonitis en pacientes que reciben diálisis, sinusitis, neumonía nodular o cavitaria, tromboflebitis, artritis, osteomielitis y en algunos casos se llega a presentar fungemia, consecuencia de lesiones en órganos y relacionada a diversos dispositivos médicos como catéteres³⁶⁻³⁹.

1.2.3 Infecciones en pacientes inmunocomprometidos

En personas inmunocomprometidas la fusariosis tiene una letalidad de hasta el 70%, encontrándose de forma diseminada, por lo que los hemocultivos son positivos en la mayoría de los casos. Así mismo, múltiples órganos se ven afectados como pulmones, piel, tubo digestivo, hígado, bazo, corazón, riñones y el sistema nervioso central. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la fungemia, fiebre, lesiones cutáneas como pápulas y nódulos que evolucionan a lesiones necróticas^{29,37}.

1.2.4 Tratamiento de las infecciones por *Fusarium* spp.

El tratamiento para la fusariosis aún no está del todo claro, ya que resulta complicado definir un tratamiento óptimo debido a la resistencia intrínseca que presenta *Fusarium* spp. a diversos antifúngicos como equinocandinas, polienos y azoles¹².

En el caso de fusariosis superficiales como onicomicosis, el itraconazol y terbinafina han mostrado resultados moderados, pero mejores que los tratamientos convencionales para la onicomicosis⁴⁰.

El tratamiento para la queratitis, una fusariosis localizada, suele ser natamicina tópica al 5% y anfotericina B tópica al 0.5%. Como segunda línea de tratamiento se utilizan azoles, principalmente voriconazol^{12,41}.

En el caso de la fusariosis diseminada, el tratamiento óptimo aun es difícil de determinar, aunque las Guías Europeas recomiendan el uso de voriconazol, polienos y como un tratamiento secundario posaconazol. Debido a los bajos resultados obtenidos con la monoterapia se ha sugerido una combinación de antifúngicos, principalmente un polieno más caspofingina, voriconazol, terbinafina, rifampicina o 5-fluorocitosina^{12,33,29,42}.

El fallo terapéutico en infecciones por *Fusarium* spp. se ha documentado en múltiples ocasiones como Dabas y cols. quienes reportan el caso de un varón de 65 años con linfoma cutáneo anaplásico de células grandes, el cual presentaba alteración sensorial, tos seca, disnea, neumonía bilateral y febrícula, recibió tratamiento profiláctico incluyendo fluconazol intravenoso y posteriormente anfotericina B intravenosa. Sin embargo, el paciente falleció y poco después se identificó al agente causal como *F. solani*⁴³.

Caso similar a lo reportado por Muhammed y cols. en 26 casos clínicos con pacientes que presentaban algún trastorno hematológico maligno, habían sido sometidos a trasplante pulmonar o presentaban quemaduras. A pesar de que todos los pacientes fueron tratados con voriconazol, anfotericina B liposomal o combinación de ambos, la letalidad para la fusariosis diseminada, cutánea y pulmonar en los 26 pacientes fue del 50%, 40% y 37.5%, respectivamente. Además, Muhammed y cols. también realizaron una revisión de literatura de casos de fusariosis de 2000 – 2013, encontrando que de 70 casos en 32 se tuvo que cambiar el tratamiento debido al fallo terapéutico o efecto secundario del mismo⁴⁴.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Identificación de *Fusarium* spp.

2.1.1 Características morfológicas

Fusarium spp. es un género de hongos con hifas hialinas y septadas, se caracteriza por la presencia de monofiálides o polifiálides, las cuales pueden ser simples o ramificadas y cortas o largas. Las macroconidias son septadas y tienen forma de canoa, plátano o media luna. Las microconidias, ausentes en algunas especies, pueden o no presentar septos y poseen formas diversas como fusiformes, ovales, clavadas, entre otras.

Otras estructuras secundarias son los esporodoquios, mesoconidias, que son similares a las macroconidias pero de un menor tamaño y no forman esporodoquios, clamidosporas, estructuras de resistencia a condiciones desfavorables que pueden ser lisas o rugosas y se pueden encontrar solas, en parejas o grupos⁴⁵⁻⁴⁸. En la Tabla 3 se describen las características más representativas de los principales complejos de especies de *Fusarium* de importancia clínica.

Tabla 3. Características representativas de los principales complejos de especies de *Fusarium* de importancia clínica^{47,49}.

Complejo	Colonia	Fiálides	Macroconidias	Clamidosporas	Características extra
CEFS	Color blanco a crema de rápido crecimiento.	Monofiálides largas.	Fusiformes, cilíndricas, ligeramente curvas con 3 – 5 septos.	Lisas, rugosas, se agrupan en pares o solas entre las hifas o laterales a ellas.	Microconidias abundantes con 0 – 2 septos y pigmentación color marrón azulado cuando se forman esporodoquios.
CEFO	Color blanco que con el tiempo se pigmenta color morado. Rápido crecimiento.	Monofiálides cortas o medianas.	Fusiformes, ligeramente curvas con célula apical y pie puntiaguda. Normalmente con 3 septos.	Lisas, rugosas, entre las hifas o terminales.	Microconidias abundantes, frecuentemente curvas y la mayoría no tienen septos.
CEFF	Color vino a violeta de rápido crecimiento.	Monofiálides y polifiálides.	Fusiformes, lanceoladas, delgadas, con una muy ligera curvatura, una célula de pie trunca o recta y con 3 – 5 septos.	No presenta.	Microconidias abundantes, agrupadas en cadenas o falsas cabezas.
CEFIE	Color blanco que con el tiempo se pigmenta color avellana, café o melocotón. Rápido crecimiento.	Monofiálides y polifiálides	Fusiformes a falcados, normalmente se producen en esporodoquios con 3 – 7 septos.	Lisas, rugosas, agrupadas en cadenas o solas entre las hifas. Suelen ser escasas.	Microconidias escasas o ausentes.
CEFD	Color naranja a albaricque. Crecimiento lento.	Monofiálides cortas. Normalmente hinchadas.	Pequeños en comparación con otros complejos, muy curvos con célula apical puntiaguda y con 1 – 3 septos.	Lisas, agrupadas en cadenas o solas entre las hifas o terminales.	Microconidias poco frecuentes.
CEFC	Color rosa a rojo de rápido crecimiento.	Monofiálides y abundantes polifiálides	Fusiformes a falcados con 3 – 5 septos, poco frecuentes, generalmente solo se presentan en esporodoquios	Lisas, frecuentemente rugosas, abundantes y se encuentran intercaladas entre las hifas.	Microconidias con 0 – 2 septos

* CEFS: Complejo de Especies *Fusarium solani*, CEFO: Complejo de Especies *Fusarium oxysporum*, CEFF: Complejo de Especies *Fusarium fujikuroi*, CEFIE: Complejo de Especies *Fusarium incarnatum/equiseti*, CEFD: Complejo de Especies *Fusarium dimerum* y CEFC: Complejo de Especies *Fusarium chlamydosporum*.

Fusarium spp. es de rápido crecimiento en la mayoría de los medios de cultivo, PDA (**P**otato **D**extrose **A**gar), es uno de los más utilizados para el crecimiento de *Fusarium* spp., ya que permite observar la morfología colonial, aterciopelada o algodonosa, así como también permite visualizar la pigmentación de la colonia. Los pigmentos son muy variados como rosa, lavanda, salmón, gris, entre otros⁴⁰.

El medio SNA (**S**pezieller **N**ahrstoffmarmor **A**gar) es otro de los medios más frecuentemente utilizados para el crecimiento de *Fusarium* spp., debido a que al ser un medio bajo en nutrientes promueve la esporulación y desarrollo de las células conidiogénicas, permitiendo analizar las estructuras microscópicas características del género: monofiálides: simples largas (A), simples cortas (B) y ramificadas (C), polifiálides: (D) y (E), macroconidias: (F), microconidias: (G) y clamidosporas: lisas entre las hifas (H), rugosas entre las hifas (I) y laterales a las hifas (J) (ver Figura 1)⁴⁵⁻⁴⁸.

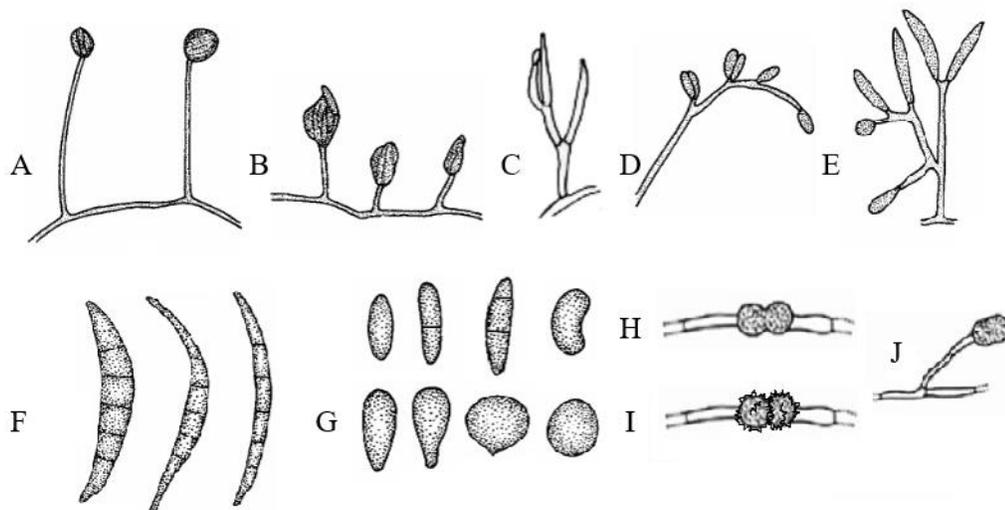


Figura 1. Principales estructuras microscópicas del género *Fusarium*^{47,50,51}.

2.1.2 Identificación molecular

El gran número de especies y complejos que conforman el género *Fusarium* complica en gran medida la identificación de las especies, por lo que la identificación morfológica resulta ser limitada en ese aspecto y debe acompañarse de otras herramientas que permitan discernir entre especies y complejos.

La aplicación de técnicas moleculares como PCR (**Polymerase Chain Reaction**) y secuenciación, han permitido esclarecer algunos problemas de identificación de especies en el género *Fusarium*. Existen múltiples genes que se han propuesto para la identificación de especies, sin embargo, en algunos casos el uso de un único gen para identificar la especie no llega a ser suficiente, como el gen de la β -Tubulina (β -tub2), el cual no permite diferenciar entre especies del CEFS⁴⁸. Motivos por los que se recomienda el uso de varios genes para poder realizar una adecuada identificación^{10,52}.

Los genes que han mostrado los mejores resultados para identificar las especies de *Fusarium* son el TEF-1 α (**Translation Elongation Factor 1 α**) y el ITS (**Internal Transcribed Spacer**). Como genes complementarios se puede hacer uso de β -tub2, IGS (**Intergenic Spacer**), CL (**Calmodulin**), entre otros⁵²⁻⁵⁴.

2.2 Susceptibilidad in vitro a azoles

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI; Clinical and Laboratory Standards Institute) y el Comité Europeo de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) son los organismos que establecen los métodos y puntos de corte de referencia para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos. Sin embargo, en el caso de *Fusarium* spp. no se han establecido puntos de corte que permitan categorizar a las cepas como Sensibles (S), Intermedias (I) o Resistentes (R), aunque si se han llegado a reportar Valores de Corte Epidemiológico (VCE) para las especies más frecuentes de *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*)⁵⁵⁻⁵⁷.

Las especies de *Fusarium* presentan una gran variabilidad en su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Efectiva (CME), por lo que resulta complicado conocer la susceptibilidad antifúngica de una cepa en específico⁵⁵. Por ejemplo, en el estudio más extenso hasta el momento de Al-Hatmi y cols. reportaron en 30 especies de *Fusarium* agrupadas en 8 complejos de importancia clínica, rangos de CMI que iban de 0.25 - >32 µg/mL, 0.5 - >16 µg/mL y 0.25 - >16 µg/mL para anfotericina B, voriconazol y posaconazol, respectivamente. En el estudio se incluyeron los complejos más frecuentes en las infecciones producidas por *Fusarium* spp., el complejo solani, oxysporum y la especie *F. verticillioides*. En el caso de fluconazol e itraconazol, todas las especies superaron la concentración evaluada >64 µg/mL y >16 µg/mL¹⁷.

Además, se sabe que las equinocandinas no poseen ningún efecto sobre *Fusarium* spp.^{58,59}.

Otro de los problemas con *Fusarium* spp. es que hasta el momento, los datos *in vitro* no se correlacionan con los datos *in vivo*, lo que repercute en el éxito terapéutico⁵⁵.

2.3 Mecanismos de resistencia asociados a *cyp51*

2.3.1 Mecanismo de acción de 14 α -desmetilasa

El gen *cyp51* (en hongos filamentosos) codifica para la enzima estero 14 α -desmetilasa (14DM o CYP51) que pertenece a la superfamilia citocromo P450. Esencial en la biosíntesis de esteroides que son fundamentales en la formación de membranas y para la supervivencia de los organismos. La CYP51 cataliza una reacción de 3 pasos, utilizando 3 moléculas de oxígeno molecular y 3 moléculas de nucleótido de piridina reducido, con el fin de eliminar el grupo 14 α -metilo en su sustrato, en el caso de hongos es el lanosterol (ver Figura 2), generando moléculas como colesterol en animales, ergosterol en hongos y otros microorganismos y el sitosterol en plantas. CYP51 está presente en todos los reinos biológicos, excepto en insectos y gusanos⁶⁰⁻⁶².

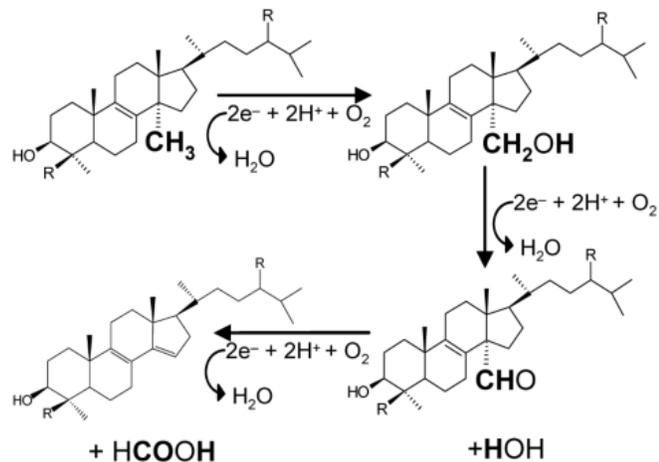


Figura 2. Reacción de la enzima estero 14 α -desmetilasa⁶⁰.

2.3.2 Mecanismos de resistencia asociados a *cyp51*

CYP51 resulta ser un buen blanco farmacológico para combatir microorganismos patógenos (ver Figura 3). Sin embargo, se ha documentado que algunos microorganismos como los hongos, han desarrollado resistencia a los azoles, antifúngicos que interactúan con CYP51 inhibiendo la síntesis de ergosterol, esto debido a diversos mecanismos de resistencia asociados al gen *cyp51* o *ERG11* (en levaduras): regulación del blanco del fármaco, plasticidad genética, repeticiones en tándem y mutaciones puntuales^{60,63,64}.

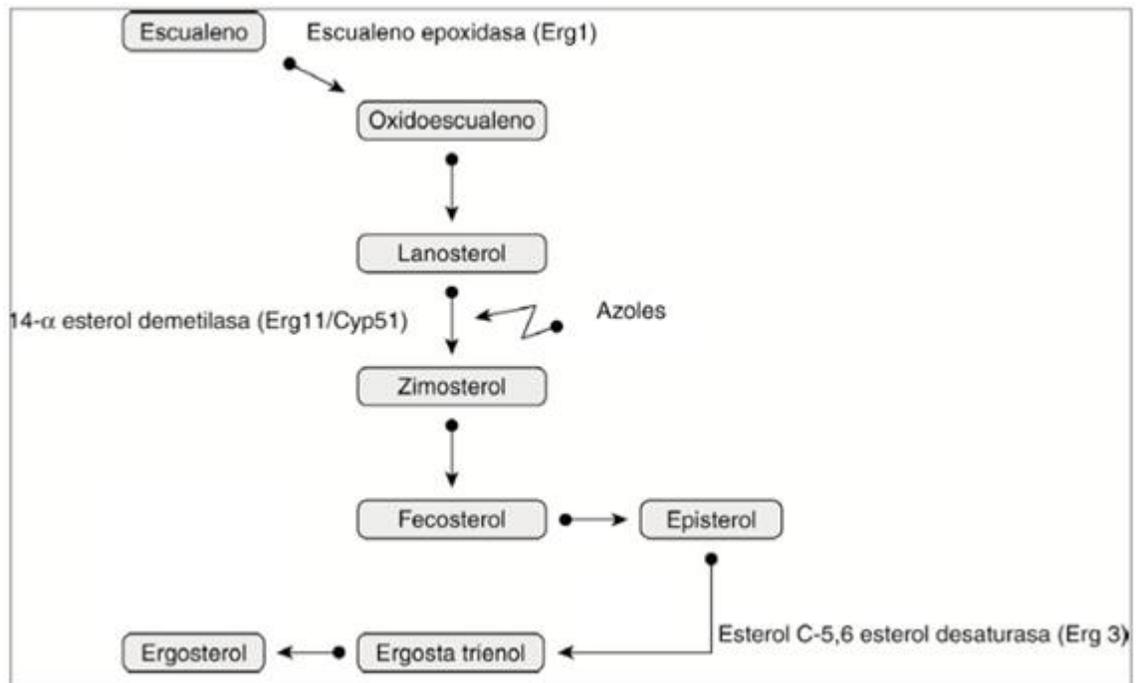


Figura 3. Esquema de síntesis de ergosterol y punto de acción contra la esterol 14 α -desmetilasa. Modificado de Mellado y cols.⁶⁵

En hongos, la plasticidad genómica se ha estudiado principalmente en levaduras y hace referencia a cambios genómicos como los reordenamientos cromosómicos, aneuploidía y la pérdida de heterocigosidad⁶⁶. En el género *Candida* se ha observado la aneuploidía debido al estrés con azoles. Por ejemplo, en *C. albicans* se observó que la duplicación del brazo izquierdo del cromosoma 5 generó múltiples copias y la sobreexpresión del gen *ERG11*, ganando resistencia a fluconazol^{66,67}. Algo similar se observó en *C. neoformans*, poblaciones disómicas para el cromosoma 1, donde se encuentra *ERG11*, que son resistentes a fluconazol⁶⁸.

En hongos filamentosos, las Repeticiones en Tándem (RT) se han asociado con el fenotipo de resistencia a azoles⁶⁴. En *A. fumigatus* se han documentado RT de 34 pb y 46 pb en el promotor de *cyp51A* confiriendo resistencia a voriconazol⁶⁹. También se ha reportado la combinación de RT de 34 pb en el promotor de *cyp51A* de *A. fumigatus* y una mutación puntual (L98H), que en conjunto confirieron resistencia a itraconazol, voriconazol y posaconazol⁷⁰.

Existen pocos reportes sobre las RT en *cyp51*, aunque los resultados publicados hasta el momento sugieren que las RT junto con las mutaciones puntuales confieren resistencia a múltiples azoles.

2.3.3 Mutaciones puntuales en *cyp51*

Las mutaciones puntuales en el CYP51 de hongos les confieren resistencia a los azoles al reducir la afinidad por su blanco⁷¹.

Los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* han sido los más estudiados respecto a las mutaciones puntuales. Becher y cols. recopilaron un número de mutaciones puntuales involucradas con la resistencia a azoles de algunos de los principales hongos patógenos humanos (ver Tabla 4)⁷².

Tabla 4. Mutaciones puntuales que confieren resistencia a azoles de uso clínico.

Microorganismo	Mutación puntual
<i>C. albicans</i>	Y33C, Y39C, P49R/T, W54Stop, A61V, Y79C, K99T, F105L, A107T, K108E, A114S, K119L, F126L, V130I, Y132F/H, N136Y, K143E/R, A149V, T199I, T229A, P230L, I253V, Y257H, R267H, D278E/N, S279F, H283D/R, K287R, G307S, F380S, V404I/L, S405G, D446N, Y447G/H, G448E/R/V, F449L/S/V/Y, G450E/V, V452A, V456I, G464S, G465S, R467I/K, I471T, Q474K, T486P, L491V, T494A, P503L, V509
<i>A. fumigatus</i>	N22D, S52T, G54E/K/V/R/W, Q88H, L98H, V101F, N125I, G138C/R, Q141H, H147Y, P216L, M220K/I/T/V, M236K/T/V, S297T, P394L, Y431C, G434C, T440A, G448S, Y491H, F495I
<i>C. neoformans</i> <i>H. capsulatum</i>	Y145F, G484S Y136F

2.4 Mutaciones puntuales en parálogos de *cyp51* de *Fusarium* spp. asociados a resistencia a azoles.

En plantas y hongos se ha documentado la presencia de múltiples copias del gen que codifica a CYP51 (parálogos). Por ejemplo, en arroz se han encontrado 10 parálogos, avena strigosa 2 parálogos, tabaco 2 parálogos, *Aspergillus fumigatus* 2 parálogos, *Fusarium graminearum* 3 parálogos, entre otros^{61,73}.

Los parálogos *cyp51* de *F. graminearum* fueron identificados por Yin y cols. al analizar su genoma. Determinaron la presencia de tres parálogo *cyp51*, los cuales denominaron *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C*, respectivamente⁷¹. Hasta el momento, el parálogo *cyp51C* solo se ha identificado en el género *Fusarium* y algunas especies de hongos filamentosos como *Penicillium digitatum*, *Calonectria pseudonaviculata*, *C. henricotiae* y *A. flavus*⁷³⁻⁷⁶.

2.4.1 Mutaciones en *cyp51A* de *Fusarium* spp. asociadas a resistencia

Al igual que en *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans* se han reportado mutaciones puntuales en *cyp51* de *Fusarium* spp. relacionadas con la resistencia a azoles.

En el caso del parólogo *cyp51A* de *Fusarium* spp. Duan y cols. documentaron en *F. graminearum*, una especie fitopatógena, que al cultivar cepas que toleran bajas concentraciones de metconazol en concentraciones crecientes del mismo, se presentaban diversas mutaciones que conferían resistencia a azoles de uso agrícola. Por ejemplo, observaron la sustitución de Glicina por Serina en la posición 443 (G443S) que confería resistencia al metconazol, difenoconazol, epoxiconazol y tebuconazol. Así como, la sustitución de Ácido aspártico por Asparagina en la posición 243 (D243N), Ácido glutámico por Glutamina en la posición 103 (E103Q) y Valina por Leucina en la posición 157 (V157L) que conferían resistencia a metconazol, difenoconazol, epoxiconazol, tebuconazol, ipconazol y procoloraz⁷⁷.

2.4.2 Mutaciones en *cyp51B* de *Fusarium* spp. asociadas a resistencia

En *cyp51B* Quian y cols. reportaron que al inducir la sustitución de Tirosina por Histidina en la posición 137 (Y137H) en *F. graminearum*, esta confería resistencia al tebuconazol⁷⁸. Fan y cols. observaron algo muy similar, ya que al cultivar una cepa de *F. verticillioides*, especie de importancia clínica, en

concentraciones crecientes de procloraz, se obtuvo una mutante resistente que presento la sustitución de Tirosina por Histidina en la posición 123 (Y123H)⁷⁹.

Por otra parte, Zhang y cols. demostraron que *F. fujikuroi*, presentaba resistencia al procloraz, azol de uso agrícola, debido a la sustitución de Serina por Treonina en la posición 312 (S312T) en *cyp51B*. Esto al inducir la sustitución aminoacídica mediante mutación sitio dirigida en cepas que toleraban bajas concentraciones al procloraz, las cuales, ya con la mutación toleraron concentraciones más altas del azol⁸⁰.

2.4.3 Mutaciones en *cyp51C* de *Fusarium* spp. asociadas a resistencia

En el caso del parólogo *cyp51C* la información de mutaciones puntuales es escasa. Sin embargo, Liu y cols. han reportado que al generar deleciones en *cyp51C* en *F. graminearum* se generaba resistencia a azoles de uso agrícola como tebuconazol, diniconazol, difenoconazol, flutriafol y procloraz⁸¹.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Fusarium spp. es uno de los hongos filamentosos más comunes en infecciones nosocomiales con alta mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. En los últimos años se han incrementado los reportes de casos de fusariosis humana asociada con fracaso terapéutico.

A nivel mundial, los reportes de susceptibilidad *in vitro* con cepas clínicas y/o ambientales de *Fusarium* spp. frente a diversos antifúngicos son limitados. En México, no hay información de la distribución de especies ni los perfiles de susceptibilidad de los miembros de este género.

De particular relevancia es la escasez de estudios sobre los mecanismos asociados a *cyp51* por los cuales se podría generar resistencia a azoles de uso clínico.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Existe una correlación entre los parálogos *cyp51* y la resistencia a algunos azoles en aislamientos clínicos y ambientales de *Fusarium* spp.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general

Correlacionar los parálogos de *cyp51* con los fenotipos de resistencia a azoles en aislamientos clínicos y ambientales de *Fusarium* spp.

4.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar las especies de *Fusarium* spp. de muestras clínicas y ambientales a partir de un cepario.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a azoles en los aislamientos clínicos y ambientales de *Fusarium* spp.
3. Identificar los parálogos *cyp51* presentes en los diferentes aislamientos clínicos y ambientales de *Fusarium* spp.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Aislamientos de *Fusarium* spp.

Se emplearon 116 aislamientos de *Fusarium* spp., de procedencia clínica y ambiental. Se almacenaron por duplicado en crioviales de 2 mL con agua destilada estéril y glicerol 10%, a temperatura ambiente y -20°C, respectivamente. Algunas cepas fueron donadas por diversas instituciones de México (ver Tabla 5).

Tabla 5. Cepas clínicas y ambientales donadas por instituciones de México.

Estado	Institución	Número de cepas	
		Clínicas	Ambientales
Nuevo León	Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	40	0
Ciudad de México	Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”	11	0
	Universidad Nacional Autónoma de México	1	3
	Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra	22	0
Jalisco	Universidad de Guadalajara	3	2
San Luis Potosí	Universidad Autónoma de San Luis Potosí	7	7
		84	12

Para los aislamientos ambientales se colectaron muestras de suelo y raíces en la región citrícola del estado de Nuevo León, México, en los municipios de Allende, Linares, Hualahuises y Montemorelos (19 aislamientos). Una aislado

ambiental se obtuvo de Guanajuato. Las muestras se colectaron en bolsas de plástico estériles y se conservaron a temperatura ambiente.

5.1.1 Aislamiento de *Fusarium* spp de procedencia ambiental

Se tomó una fracción de las muestras colectadas e inoculó en medios de aislamiento: Agar Verde Malaquita (AVM; peptona 15 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, oxalato de verde malaquita 2.5 mg, agar 20 g, agua destilada 1 L) y Agar Peptona Dicloran Cloranfenicol (APDC; peptona 15 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, agar 20 g, agua destilada 1L, dicloran 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cloranfenicol 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Se incubaron por 3 días a 30°C.

Solo se tomaron en cuenta aquellas colonias obtenidas en los medios de aislamiento con morfología colonial similar a *Fusarium* spp.: algodonosa o aterciopelada, con o sin pigmento. Posteriormente, se almacenaron por duplicado en crioviales de 2 mL con agua destilada estéril y glicerol 10%, a temperatura ambiente y -20°C, respectivamente.

5.2 Identificación de aislamientos

5.2.1 Identificación morfológica

Para confirmar el género de las colonias obtenidas en los aislamientos ambientales y de los aislamientos clínicos, se subcultivaron en medios nutritivos Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) que permite observar colonias algodonosas o aterciopeladas, pigmentación y exudado, PDA y OA (Oatmeal Agar), que además

de las características que se observan en ASD, también permiten visualizar las hifas aéreas. Los cultivos se incubaron a 30°C de 3 – 5 días, se observó su morfología colonial y sus estructuras microscópicas (macroconidias, microconidias, fiálides y clamidosporas) haciendo uso de las técnicas cintilla, cardaje y microcultivo.

Con el fin de inducir una mayor esporulación y analizar más a detalle las estructuras microscópicas, los aislamientos ambientales y clínicos se subcultivaron en medio SNA (**Spezieller Nahrstoffmarmmer Agar**, KH₂PO₄ 1 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄•7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, glucosa 0.2 g, sacarosa 0.2 g, agar 20 g, agua destilada 1 L) y Agar Agua (AA; 20 g agar, agua destilada 1L) e incubaron a 30°C de 7 – 14 días. La Tabla 3 (pág. 9) y Figura 1 (pág. 10) se utilizó como guía para la identificación morfológica.

5.2.2 Identificación molecular

5.2.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por lisis enzimática al resuspender una muestra de micelio en un tubo de 2 mL con solución de lisis: Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA (**EthyleneDiamine Tetraacetic Acid**) 2 mM y triton x-100 1.2%. Una vez, se formó una suspensión cremosa, pero no espesa, se mezcló en vortex para homogenizar.

Se agregó a la mezcla un poco de lisozima (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) con un aplicador de madera estéril, se mezcló en vortex e incubó a 37°C con agitación de 800 rpm por 2 h. Posterior se agregó 390 µL de Tris-EDTA (TE) 1X / SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 1%, 4 µL de proteasa K (10 mg/mL) y 10 µL de quitinasa (1 U/mL). Se incubó a 55°C por 1 h.

Pasada la incubación se agregaron 100 µL de NaCl 5 M y se mezcló por inversión. Posterior, se agregó 80 µL de CTAB (CetylTrimethylAmmonium Bromide) 10%/ NaCl 0.7 M y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a 65°C por 10 min.

Se agregaron 250 µL de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), 250 µL de fenol saturado y 100 µL de TE 1X. Se mezcló en vortex y centrifugó a 14,000 rpm por 8 min. La fase superior se transfiere a un tubo nuevo de 2 mL. Este proceso se repitió una vez más.

Una vez se tuvo la fase superior en un tubo de 2 mL se agregaron 600 µL de 100% isopropanol y 160 µL de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), se mezcló por inversión e incubó a -20°C por 30 min.

Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min y se desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de 70% etanol. Se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 8 min y desecho el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más.

Se dejó secar el tubo a temperatura ambiente con la tapa abierta y una vez seco, se resuspendió la pastilla en 25 µL de agua miliQ estéril. Se incubó a 65°C por 15 min y almaceno a -20°C hasta su posterior uso.

5.2.2.2 Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y *TEF-1α*

El ADN extraído previamente se utilizó como templado. La amplificación se realizó con 25 µL de Crystal PCR Master, 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de ADN (50 ng/ µL) y agua libre de DNAsas a un volumen final de 50 µL utilizando Crystal Taq Master (2x) (Jena Bioscience, Jena, Alemania). También se utilizó Q-solution 1X (Qiagen, Hilden, Germany) como agente auxiliar. La amplificación se realizó en un termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

La amplificación de las regiones ribosomales ITS1-5.8S-ITS2 y el *TEF-1α* se realizó con los oligonucleótidos reportados por White y cols. y O'Donnell y cols.^{82,83}. Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación de ITS1-5.8S-ITS2 y *TEF-1α*.

Amplificado	Oligonucleótidos (5' – 3')	Condiciones	Tamaño esperado
ITS1-5.8S-ITS2	ITS4 – TCCTCCGCTTATTGATATGC ITS5 - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	95°C x 4 min 94°C x 1 min 55°C x 1:30 min 72°C x 1:30 min 72°C x 5 min	≈ 600 pb
<i>TEF-1α</i>	Fsp-EF1 – ATGGGTAAGGARGACAAGAC Fsp-EF2 - GGARGTACCAGTSATCATGTT	95°C x 4 min 94°C x 1 min 55°C x 1:30 min 72°C x 1:30 min 72°C x 5 min	≈ 700 pb

5.2.2.3 Electroforesis de amplicones

Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% . Se empleó buffer TAE 1X (Tris-base 40 mM. acetato 20 mM y EDTA 1 mM a pH 8.6) para la preparación del gel de agarosa y como solución de corrida. Los geles de agarosa se corrieron por 45 min a 90 volts.

El peso molecular del amplicón se determinó utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 – 2,000 pb (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

5.2.2.4 Purificación y cuantificación de productos de PCR

Los amplicones se purificaron con el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El amplificado colectado se cuantificó en el NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.2.5 Secuenciación

Los amplicones purificados se ajustaron a una concentración de 50 ng/μL y fueron enviados a servicio externo para ser secuenciados por el método de Sanger en un secuenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.2.2.6 Identificación

Una vez que se obtuvieron las lecturas de la secuenciación, estas fueron depuradas eliminando los extremos del cromatograma de mala calidad o indistinguibles en el programa BioEdit⁸⁴, para posterior ser alineadas en ISHAM Barcoding Database (<https://its.mycologylab.org/page/Alignment>) y en MYCO BANK (https://www.mycobank.org/page/Pairwise_alignment).

5.3 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a azoles

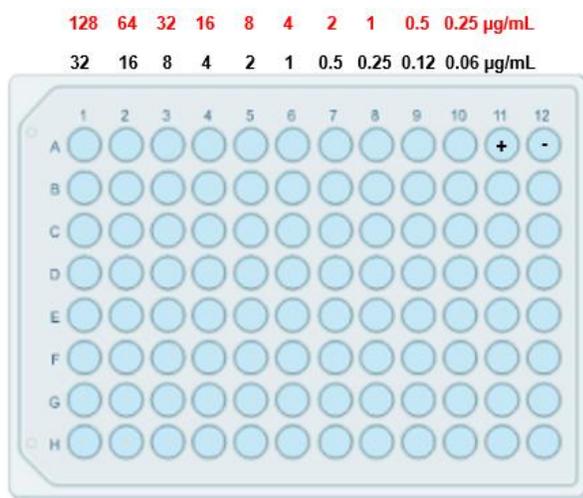
5.3.1 Preparación de placas

La preparación de las placas con antifúngico y el perfil de susceptibilidad a azoles de los 116 aislamientos de *Fusarium* spp. se realizó siguiendo el protocolo del manual M38-A3 para hongos filamentosos del CLSI⁸⁵.

Se realizó la preparación de la solución madre de los antifúngicos a una concentración de 1,600 µg/mL para Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol, Posaconazol, Difenoconazol, Propiconazol y Tebuconazol y una concentración de 6,400 µg/mL para Fluconazol. Los azoles fueron diluidos en DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA).

Para la preparación de las placas de 96 posillos, las soluciones madre de los antifúngicos fueron diluidas en DMSO, posterior se diluyeron en RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (1:50). En cada posillo de las primeras 10 columnas se agregaron 100 µL de la solución de antifúngico diluida en RPMI. La columna 11 y 12 fueron el control positivo (+) y de esterilidad (-), respectivamente. Por lo que solo se les agregaron 100 µL de RPMI/DMSO 2%.

Las placas de 96 posillos fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. La concentración de antifúngico en cada columna de las placas de 96 posillos se observa en la Figura 4. Los azoles y la concentración final de las placas de 96 posillos, una vez inoculadas, se detallan en la Tabla 7.



*En rojo: concentraciones para Fluconazol. En negro: concentraciones para Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol, Posaconazol, Difeniconazol, Propiconazol y Tebuconazol.

Figura 4. Concentraciones de azoles en placas de 96 posillos.

Tabla 7. Azoles y concentraciones a evaluar.

Aplicación	Azol	Concentraciones
Clínico	Fluconazol (FLU)	0.12 – 64 µg/mL
	Itraconazol (ITR)	0.03 – 16 µg/mL
	Ketoconazol (KET)	0.03 – 16 µg/mL
	Voriconazol (VOR)	0.03 – 16 µg/mL
	Posaconazol (POS)	0.03 – 16 µg/mL
Agrícola	Difeniconazol (DIF)	0.03 – 16 µg/mL
	Propiconazol (PRO)	0.03 – 16 µg/mL
	Tebuconazol (TEB)	0.03 – 16 µg/mL

5.3.2 Preparación de inóculo

Los 116 aislamientos de *Fusarium* spp. se subcultivaron en ASD por 72 hrs a 30°C. Una vez, pasadas las 72 hrs se agregó solución salina sobre las colonias con una micropipeta de 1 mL. Se raspó ligeramente la superficie de la colonia con la puntilla para desprender las conidias. Las conidias fueron recuperadas con la micropipeta de 1 mL y se colocaron en un tubo estéril de vidrio con solución salina.

Como control se utilizaron las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. Se subcultivaron en ASD por 24 h a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, con un aplicador de madera estéril se tocó ligeramente una colonia. El aplicador con el inóculo se agito dentro de un tubo estéril de vidrio con solución salina.

El inóculo se ajustó a $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ UFC/mL al medir la transmitancia (T) del inóculo en un rango de 67.6 - 70.7 % en el espectrofotómetro a 530 nm.

5.3.3 Inoculación e incubación de placas

El inóculo ajustado se diluyo en RPMI (1:50). Se homogenizo por inversión y se procedió a inocular 100 µL en las placas de 96 posillos con el antifúngico, excepto el control de esterilidad (columna 12). Al control de esterilidad se le agregaron 100 µL de RPMI/DMSO 2%. Las placas de 96 posillos inoculadas se incubaron a 35°C.

5.3.4 Lectura de placas

Mediante un espejo invertido se tomó la lectura de las placas de 96 posillos a las 24, 48 y 72 hrs de inoculación, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del 50% de inhibición.

5.4 Parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp.

5.4.1 Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp.

El diseño de los oligonucleótidos para los parálogos de *Fusarium* spp. (*cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C*) se realizó en Bioedit. Se tomó como base las secuencias reportadas en GenBank de los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp.: 15 *cyp51A*, 16 *cyp51B* y 19 *cyp51C* (ver Tabla 8). Las secuencias se alinearon para generar una secuencia consenso para cada parálogo, seleccionando las regiones con menos polimorfismos para generar los oligonucleótidos forward y reverse para la amplificación del gen y los oligonucleótidos internos para la secuenciación.

5.4.2 Amplificación de *cyp51*

La estandarización del protocolo de PCR se realizó al tomar como base el protocolo para amplificar la región ITS y se modificó la temperatura de alineamiento (55°C), realizando gradientes de temperatura hasta determinar la temperatura de alineamiento óptima (ver Tabla 9). Se usó como templado el ADN extraído previamente y utilizado en la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y *TEF-1 α* .

Tabla 8. Secuencias de *Fusarium* spp. utilizadas para diseñar los oligonucleótidos de los parálogos *cyp51*.

Parálogo	Microorganismo	Número de acceso
<i>cyp51A</i>	<i>F. graminearum</i>	HG970333.1
	<i>F. acaciae-mearnsii</i>	JN416605.1
	<i>F. asiaticum</i>	JN416617.1
	<i>F. austroamericanum</i>	JN416607.1
	<i>F. boothii</i>	JN416619.1
	<i>F. cerealis</i>	JN416614.1
	<i>F. culmorum</i>	JN416616.1
	<i>F. falciforme</i>	MN640610.1
	<i>F. keratoplasticum</i>	MN296719.1
	<i>F. meridionale</i>	JN416606.1
	<i>F. mesoamericanum</i>	JN416621.1
	<i>F. pseudograminearum</i>	JTGC01000238.1
	<i>F. oxysporum</i>	FOXG_11545
	<i>F. verticillioides</i>	KC527017.1
	<i>F. vorosii</i>	JN416608.1
<i>cyp51B</i>	<i>F. acaciae-mearnsii</i>	JN416627.1
	<i>F. asiaticum</i>	JN416643.1
	<i>F. austroamericanum</i>	JN416633.1
	<i>F. boothii</i>	JN416641.1
	<i>F. cerealis</i>	JN416638.1
	<i>F. culmorum</i>	JN416637.1
	<i>F. mesoamericanum</i>	JN416647.1
	<i>F. vorosii</i>	JN416629.1
	<i>F. vorosii</i>	JN416640.1
	<i>F. oxysporum</i>	FOXG_00394
	<i>F. falciforme</i>	MN640620.1
	<i>F. falciforme</i>	MN640621.1
	<i>F. keratoplasticum</i>	MN296722.1
	<i>F. keratoplasticum</i>	MN296723.1
	<i>F. verticillioides</i>	KC527018.1
<i>F. verticillioides</i>	KC527016.1	
<i>cyp51C</i>	<i>F. asiaticum</i>	GU785026.1
	<i>F. avenaceum</i>	GU785027.1
	<i>F. cereales</i>	GU785030.1
	<i>F. mesoamericanum</i>	GU785043.1
	<i>F. ussurianum</i>	KC020148.1
	<i>F. venenatum</i>	GU785061.1
	<i>F. vorosii</i>	GU785066.1
	<i>F. equiseti</i>	GU785067.1
	<i>F. equiseti</i>	GU785036.1
	<i>F. keratoplasticum</i>	MN296725.1
	<i>F. oxysporum</i>	FOXG_13138
	<i>F. proliferatum</i>	GU785047.1
	<i>F. sporotrichioides</i>	GU785051.1
	<i>F. sporotrichioides</i>	GU785052.1
	<i>F. subglutinans</i>	GU785055.1
<i>F. subglutinans</i>	GU785056.1	
<i>F. tricinctum</i>	GU785058.1	
<i>F. tricinctum</i>	GU785059.1	
<i>F. verticillioides</i>	KC527019.1	

La amplificación se realizó con 5 µL de 10x High Fidelity Buffer, 1 µL de dNTPs Mix, 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de ADN (50 ng/ µL), 0.5 µL de High Fidelity Pol y agua libre de DNasas a un volumen final de 50 µL utilizando High Fidelity Core Kit (Jena Bioscience, Jena, Alemania). También se utilizó Q-solution 1X (Qiagen, Hilden, Germany) como agente auxiliar.

Tabla 9. Condiciones de amplificación de los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp.

Amplificado	Condiciones	Tamaño esperado
<i>cyp51A</i>	95°C x 5 min 95°C x 1 min 55°C x 1:30 min 72°C x 1:30 min 72°C x 5 min	} X35 ≈ 1.5 Kb
<i>cyp51B</i>	95°C x 5 min 95°C x 1 min 60°C x 1:30 min 72°C x 1:30 min 72°C x 5 min	} X35 ≈ 1.5 Kb
<i>cyp51C</i>	95°C x 5 min 95°C x 1 min 50°C x 1:30 min 72°C x 1:30 min 72°C x 5 min	} X35 ≈ 1 Kb

5.4.3 Electroforesis de amplicones *cyp51*

Los amplificados *cyp51* se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% en electroforesis horizontal y buffer TAE 1X como solución de corrida (ver sección 5.2.2.3).

5.4.4 Purificación y cuantificación de amplicones *cyp51*

Los amplicados de *cyp51* se purificaron con el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver sección 5.2.2.4).

5.4.5 Secuenciación y análisis de amplicones *cyp51*

Los amplicados purificados se ajustaron a la concentración ya mencionada anteriormente y fueron enviados a un servicio externo para su secuenciación. Una vez que se obtuvieron las lecturas, estas fueron analizadas en el programa BioEdit (ver sección 5.2.2.5 y 5.2.2.6).

Los intrones de los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp. fueron removidos mediante Geneious Prime (<https://www.geneious.com>) y FGENESH (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>), utilizando como referencia los parálogos *cyp51A* (FOXG_11545), *cyp51B* (FOXG_00394) y *cyp51C* (FOXG_13138) de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 4287.

Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas y analizadas en Geneious Prime. Además de utilizar las secuencias referencia de los parálogos *cyp51* de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 4287. Para comparación se incluyó la secuencia *cyp51A* de una cepa susceptible y resistente de *F oxysporum* reportadas por Hudson y cols.⁸⁶

5.4.6 Modelaje

El modelaje proteico se realizó mediante SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), utilizando como base el cristal de la proteína CYP51B de *Aspergillus fumigatus*. Para resaltar las zonas de interés en el modelaje proteico se cambiaron los colores con PyMOL.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Información demográfica de aislamientos de *Fusarium* spp.

Las 116 cepas fueron aisladas en México: 59 de Nuevo León, 37 de Ciudad de México, 14 de San Luis Potosí, 5 de Jalisco, y 1 de Guanajuato. 84 aislamientos fueron de origen clínico y 32 de origen ambiental. (ver Figura 5).

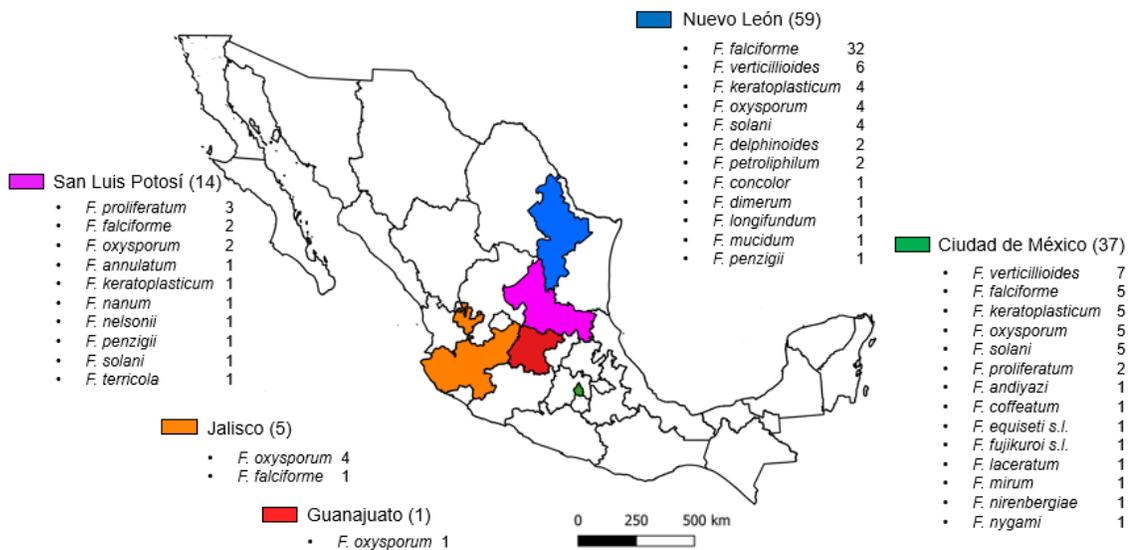


Figura 5. Distribución geográfica de los 116 aislamientos de *Fusarium* spp.

6.2 Identificación de aislamientos de *Fusarium* spp.

6.2.1 identificación morfológica

De los 116 aislamientos, 39 fueron agrupados en 5 complejos de especies de *Fusarium*, basado en las principales características macroscópicas y microscópicas de cada complejo. en la Figura 6 se muestran imágenes representativas de los hallazgos para cada uno de los complejos identificados.

CEFS (15) mostró colonias blancas/beige (1A), monofiálides largas (1B), macroconidias fusiformes ligeramente curvas con 3 – 5 septos (1C) y clamidosporas lisas entre las hifas (1D).

CEFO (6) presentó colonias blancas que con el paso del tiempo tomaron una pigmentación color violeta/morada (2A), monofialides cortas (2B), macroconidias fusiformes ligeramente curvas con célula apical en punta con 1 – 3 septos (2C) y clamidosporas lisas entre las hifas (2D).

CEFF (11) exhibió colonias violetas (3A), monofiálides y polifiálides, formación de falsa cabeza (3B), macroconidios rectos con 3 – 5 septos (3C) y microconidias agrupadas en cadenas (3D).

CEFIE (3) mostró colonias blancas que con el paso del tiempo tomaron una pigmentación color avellana/melocotón (4A), monofiálides (4B), macroconidias con célula de pie (4C) y microconidias (4D).

CEFD (4) presentó colonias de lento crecimiento con pigmentación color naranja/albaricoque (5A), monofiálides cortas (5B), macroconidios pequeños muy curvos con 1 – 3 septos (5C) y clamidosporas lisas entre las hifas (5D).

Los 77 aislamientos no pudieron ser identificados a nivel de especie o agrupados en alguno de los complejos de especies de *Fusarium*, debido a que carecían de una o varias características morfológicas como el tipo de monofiálides, polifiálides, macroconidias y clamidosporas.

6.2.2 Identificación molecular

Mediante la identificación molecular se identificaron 26 especies de *Fusarium* (*F. andiyazi*, *F. annulatum*, *F. coffeatum*, *F. concolor*, *F. delphinoides*, *F. dimerum*, *F. equiseti* s.l., *F. falciforme*, *F. flocciferum*, *F. fujikuroi* s.l., *F. keratoplasticum*, *F. laceratum*, *F. longifundum*, *F. mirum*, *F. mucidum*, *F. nanum*, *F. nelsonii*, *F. nirenbergiae*, *F. nygami*, *F. oxysporum*, *F. penzigii*, *F. petroliphilum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. terricola*, *F. verticillioides*) que se agruparon en 9 complejos. El complejo más frecuente fue el CEFS (52.6%) seguido del CEFF y CEFO (20% y 14.6%, respectivamente), mientras que la especie más frecuente fue *F. falciforme* (ver Figura 7). En los aislamientos clínicos se observó algo similar (ver Figura 8), mientras que en los aislamientos ambientales, el CEFO resultó ser el segundo complejo más frecuente (ver Figura 9).

Por otra parte, la identificación molecular mostró algunas discrepancias con los resultados de la identificación fenotípica. Además, se confirmó la especie de los 77 aislamientos que no se pudieron agrupar en alguno de los complejos de especies, excepto 2 aislamientos que se determinaron como *sensu lato* (s.l.). En rojo se observan los 8 aislamientos que no pertenecen al complejo de especies en el que se agruparon fenotípicamente (ver Tabla 10).

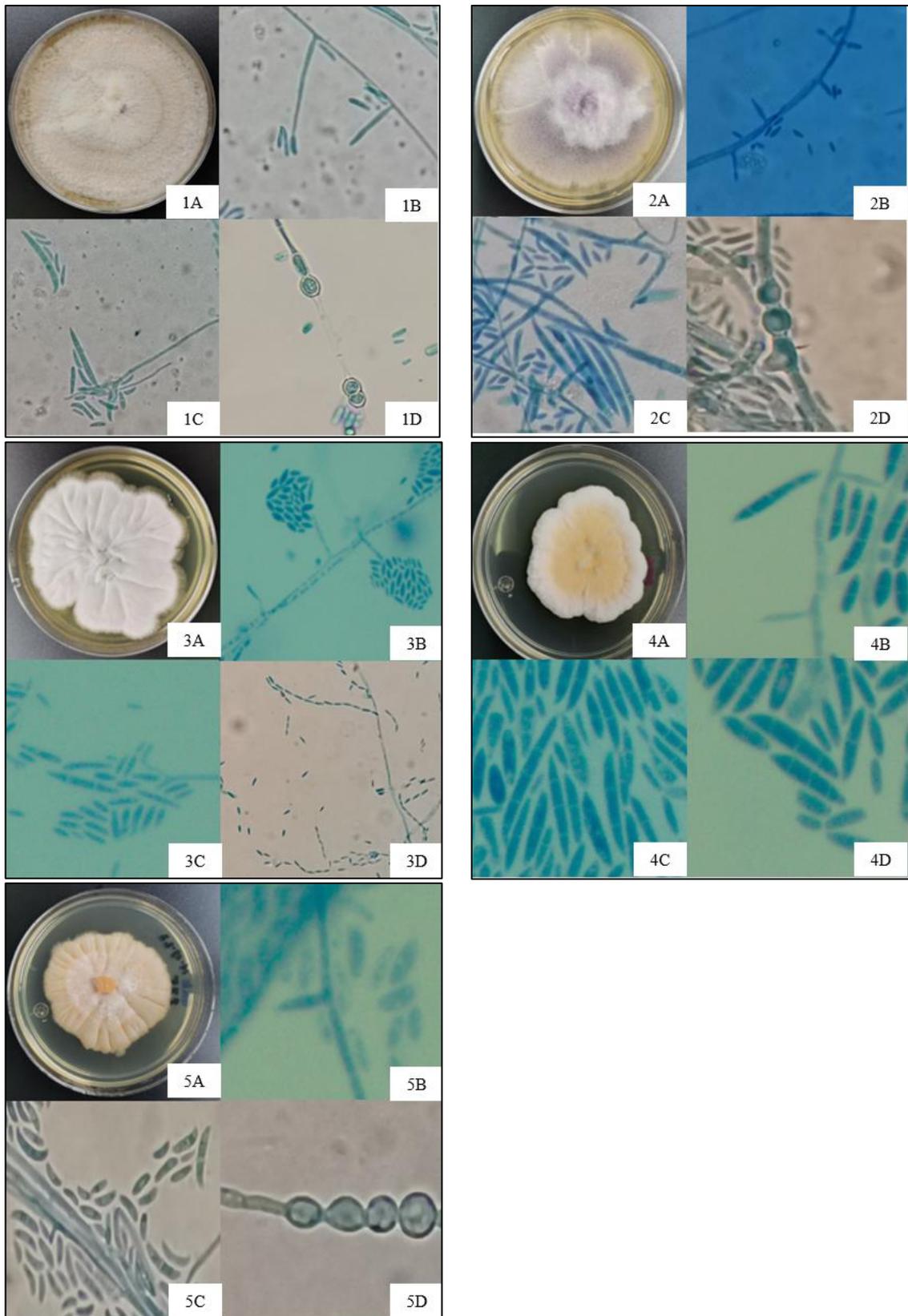


Figura 6. Principales características de los complejos de especies de *Fusarium*.

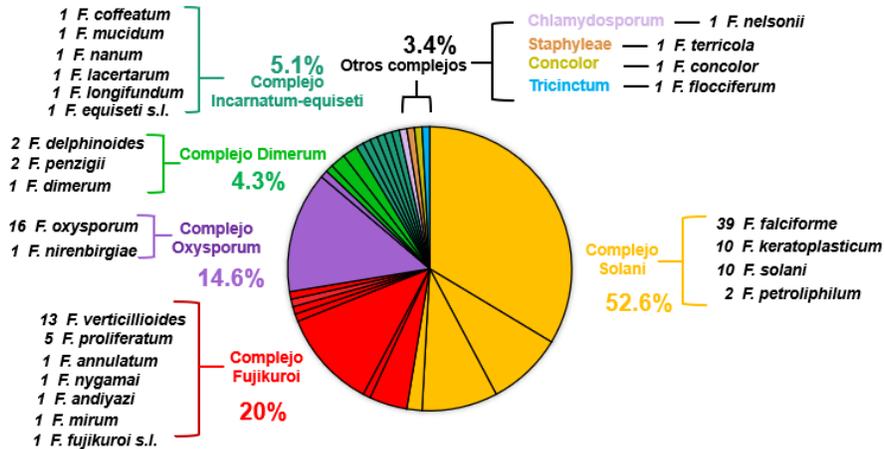


Figura 7. Identificación molecular de especies y complejos de especies de *Fusarium*.

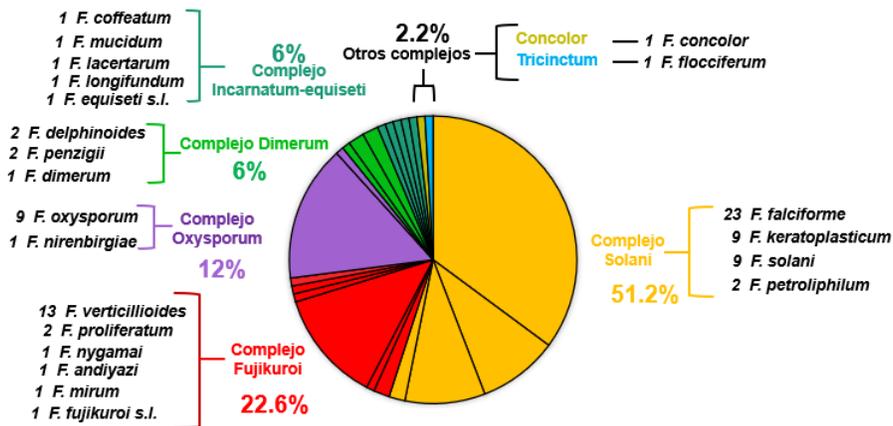


Figura 8. Identificación molecular de 84 cepas de origen clínico.

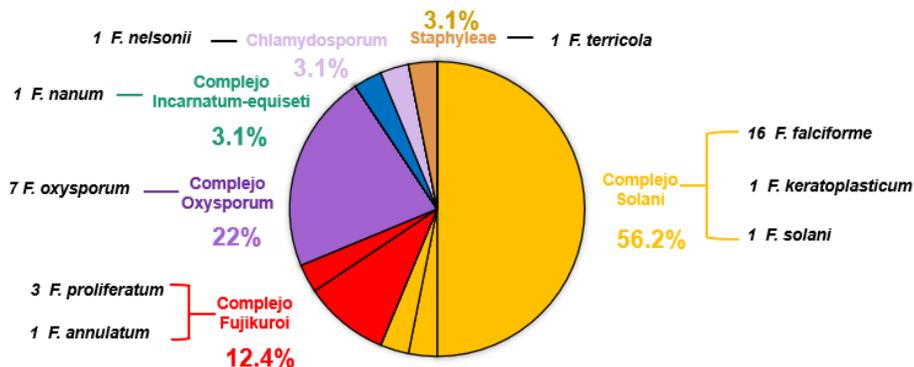


Figura 9. Identificación molecular de 32 cepas de origen ambiental.

Tabla 10. Comparación de la identificación fenotípica y molecular

Identificación fenotípica (n = 116)	Identificación molecular (n =116)
CEFS (15)	<i>F. falciforme</i> (6) <i>F. solani</i> (4) <i>F. keratoplasticum</i> (3) <i>F. coffeatum</i> (1) <i>F. oxysporum</i> (1)
CEFO (6)	<i>F. oxysporum</i> (5) <i>F. keratoplasticum</i> (1)
CEFF (11)	<i>F. verticillioides</i> (6) <i>F. proliferatum</i> (1) <i>F. oxysporum</i> (3) <i>F. falciforme</i> (1)
CEFIE (3)	<i>F. laceratum</i> (1) <i>F. longuifundum</i> (1) <i>F. flocciferum</i> (1)
CEFD (4)	<i>F. delphinoides</i> (2) <i>F. penzigii</i> (2)
<i>Fusarium</i> spp. (77)	<i>F. falciforme</i> (32) <i>F. adiyazi</i> (1) <i>F. verticillioides</i> (7) <i>F. concolor</i> (1) <i>F. oxysporum</i> (7) <i>F. dimerum</i> (1) <i>F. keratoplasticum</i> (6) <i>F. nanum</i> (1) <i>F. solani</i> (6) <i>F. mirum</i> (1) <i>F. petroliphilum</i> (2) <i>F. mucidum</i> (1) <i>F. proliferatum</i> (4) <i>F. terricola</i> (1) <i>F. annulatum</i> (1) <i>F. nirenbergiae</i> (1) <i>F. nelsonii</i> (1) <i>F. equiseti</i> s.l.(1) <i>F. nygamai</i> (1) <i>F. fujikuroi</i> s.l. (1)

*CEFS: Complejo de Especies *Fusarium solani*, CEFO: Complejo de Especies *Fusarium oxysporum*, CEFF: Complejo de Especies *Fusarium fujikuroi*, CEFIE: Complejo de Especies *Fusarium incarnatum/equiseti*, y CEFD: Complejo de Especies *Fusarium dimerum*.

6.3 Susceptibilidad in vitro a azoles

Para los azoles solo se reporta la CMI 50% de inhibición a las 48 hrs. En la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos de susceptibilidad a azoles de las 116 cepas. Se observan rangos de CMI amplios para la mayoría de azoles, excepto para FLU. Además, la moda y CMI₉₀ es igual en la mayoría de azoles, excepto para VOR y TEB.

Al analizar por especies, se puede observar como FLU no tuvo efecto sobre ninguna de las especies estudiadas, caso contrario al VOR, que fue el único azol que presentó un efecto inhibitorio sobre todas las especies. *F. verticillioides* presentó los rangos de CMI más bajos en todos los azoles evaluados (en morado), excepto FLU, mientras que las especies del CEFS (*F. solani*, *F. falciforme* y *F. keratoplasticum*) presentaron los rangos más altos (en amarillo) (ver Tabla 12).

Tabla 11. Susceptibilidad in vitro a azoles de 116 aislamientos de *Fusarium* spp.

Uso	Azol	Rango CMI (µg/mL)	Moda	CMI 90
Clínico	Fluconazol (FLU)	32 - >64	>64	>64
	Itraconazol (ITR)	0.5 - >16	>16	>16
	Ketoconazol (KET)	0.125 - >16	>16	>16
	Voriconazol (VOR)	0.25 - >16	4	8
	Posaconazol (POS)	0.125 - >16	>16	>16
Agrícola	Difenoconazol (DIF)	0.5 - >16	16	16
	Propiconazol (PRO)	0.25 - >16	>16	>16
	Tebuconazol (TEB)	0.5 - >16	8	16

*CMI₉₀: Concentración mínima inhibitoria del 90% de las cepas. Lectura 48 hrs (50% de inhibición).

Tabla 12. Susceptibilidad *in vitro* a azoles de diferentes especies de *Fusarium*.

Microorganismo (n = 116)	Rangos CMI (µg/mL)							
	ITR	KET	POS	VOR	FLU	TEB	PRO	DIF
<i>F. falciforme</i> (39)	16 - >16	8 - >16	0.5 - >16	1 - >16	>64	2 - >16	8 - >16	4 - >16
<i>F. oxysporum</i> (16)	1 - >16	2 - >16	0.5 - >16	1 - 4	32 - >64	4 - 16	2 - >16	2 - >16
<i>F. verticillioides</i> (13)	0.5 - >16	0.5 - 16	0.125 - 2	0.25 - 2	64 - >64	0.5 - 8	0.25 - 8	0.5 - 8
<i>F. keratoplasticum</i> (10)	>16	16 - >16	4 - >16	2 - 8	>64	8 - 16	16 - >16	16 - >16
<i>F. solani</i> (10)	>16	16 - >16	16 - >16	2 - 8	>64	8 - 16	16 - >16	8 - >16
* Otros (28)	0.5 - >16	0.12 - >16	0.25 - >16	0.06 - 8	>64	0.25 - 16	0.5 - >16	2 - >16

* *F. petroliphilum*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. concolor*, *F. penzigii*, *F. delphinoides*, *F. nelsonii*, *F. annulatum*, *F. flocciferum*, *F. laceratum*, *F. coffeatum*, *F. adiyazi*, *F. longuifundum*, *F. terricola*, *F. mirum*, *F. mucidum*, *F. nanum*, *F. dimerum*, *F. nirenbergiae*, *F. equiseti* s.l. y *F. fujikuroi* s.l.

6.4 Parálogos *cyp51* de *F oxysporum*

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los parálogos *cyp51*

En la Tabla 13 se muestran los oligonucleótidos diseñados para la amplificación y secuenciación de los parálogos *cyp51*, así como el tamaño aproximado del amplicón.

Para la amplificación del parálogo *cyp51A* de *F. oxysporum* se utilizó adicionalmente el oligonucleótido reverse reportado por Fan y cols.⁷⁹

Tabla 13. Oligonucleótidos para amplificar los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp.

Parálogos	Oligonucleótidos (5' – 3')	Tamaño esperado
<i>cyp51A</i>	CYP51AF – CCACTGGY TYCCY TTCTTYGG	≈ 1.5 kb
	CYP51AR – CGCTCCCATCG R ATAAA S GC	
	CYP51AIF – TCCAR VGCV ATGGCTGAG	
	CYP51AIR – AT KGT DATCTCAGCCAT B GC	
	* FvcypAR1 – CTAAGCCTTCCTGCGTTCC	
<i>cyp51B</i>	CYP51BF – AR TTYCAR GAR R CTTCCCCTGG	≈ 1.5 kb
	CYP51BR – GGTCG B GAGAA D AGCGAGGC	
	CYP51BIF – CTCATGGAR C AGAAGAAGG	
<i>cyp51C</i>	CYP51CF – ATCC CHA ARTTCGTCAAR GA AG	≈ 1 kb
	CYP51CRA – GTTCTC RCC MACACAGCGATG	
	CYP51CRM – GTTCTC NCCW AC R CAD C GATG	
	CYP51CIF – CT HGG HAACGAAGTY C GC	

* Oligonucleótido reportado por Fan y cols.

6.4.2 Amplificación de los parálogos *cyp51*

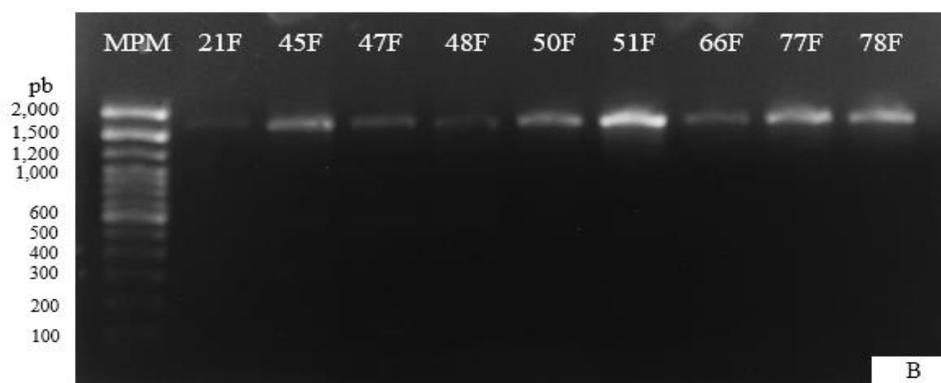
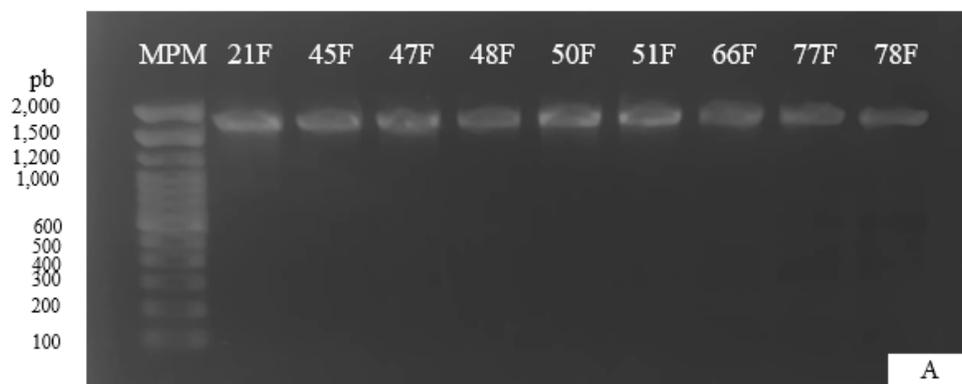
De las 29 especies identificadas de *Fusarium*, solo la especie *F. oxysporum* contaba con cepas que presentaban CMIs altos y bajos, motivos por los cuales, fue seleccionada para realizar la amplificación de los parálogos *cyp51*. Esto con el fin de poder realizar una comparación entre los parálogos de las cepas con CMIs altos y bajos.

Se seleccionaron 10 cepas de *F. oxysporum*, 5 con CMIs bajos (21F, 45F, 50F, 51F y 66F) y 5 con CMIs altos (47F, 48F, 77F, 78F y 79F) (ver Tabla 14). En la Figura 10 se observan imágenes representativas de la amplificación de los parálogos *cyp51A* (A), *cyp51B* (B) y *cyp51C* (C) de las cepas seleccionadas de *F. oxysporum*.

Tabla 14. Cepas de *F. oxysporum* con CMI's altos y bajos.

<i>F. oxysporum</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	ITR	KET	POS	VOR	FLU	TEB	PRO	DIF
21F	2	4	0.5	1	>64	4	2	8
45F	2	8	2	2	>64	8	2	4
50F	2	16	1	2	>64	16	4	4
51F	8	2	1	1	>64	8	4	2
66F	1	1	1	0.5	32	1	0.5	2
47F	>16	>16	>16	4	>64	16	>16	16
48F	>16	>16	>16	4	>64	16	>16	16
77F	>16	16	>16	4	>64	8	>16	16
78F	>16	16	>16	2	>64	8	16	4
79F	>16	>16	>16	8	>64	8	>16	>16

*En azul: Cepas con CMI's altos. En amarillo: Cepas con CMI's bajos.



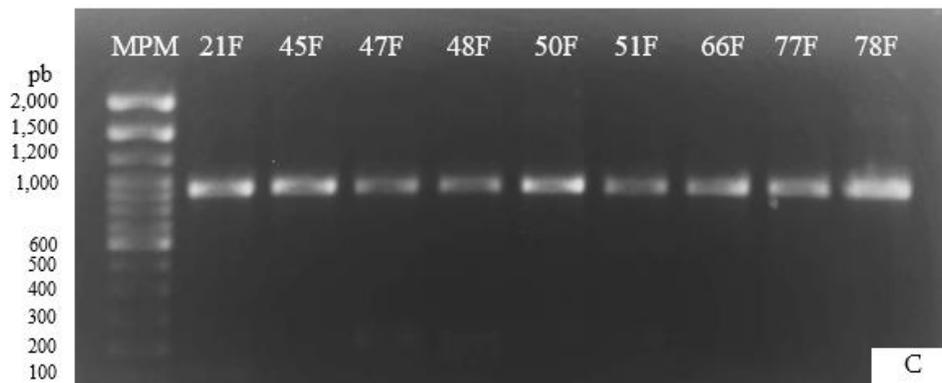


Figura 10. Amplificación de los parálogos *cyp51A* (A), *cyp51B* (B) y *cyp51C* (C) de *F. oxysporum*.

6.4.3 Análisis de la secuencia y estructura de los parálogos *cyp51* de *F. oxysporum*

Al alinear y analizar los parálogos *cyp51* de *F. oxysporum* de las cepas con CMI's altos y bajos, se observó en *cyp51A* una gran cantidad de mutaciones puntuales (marcado en rojo). En la mayoría de casos muy cercanas a los posibles sitios putativos de interacción con los azoles (resaltados en negro), principalmente en las cepas con CMI's bajos. Además, se observaron algunos patrones de cambios aminoacídicos en algunas cepas como alanina por valina en la posición 175 (A175V) en las cepas 47F, 48F y 77F. Igualmente, alanina por valina, pero en la posición 203 (A203V) y glicina por valina en la posición 253 (G253V) en las cepas 45F, 50F y 51F (ver Figura 11). En los parálogos *cyp51B* y *cyp51C* no se observaron cambios aminoacídicos destacables.

Por otra parte, la cepa 66F con los CMI's más bajos, presentó la mayor cantidad de mutaciones puntuales en *cyp51A*. Además, se observó una delección

muy relevante, ya que se encuentra en uno de los posibles sitios putativos de interacción con los azoles (ver Figura 12).

Al compararse la proteína CYP51A de la cepa 66F con la cepa de referencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (A), se observa como la delección repercute en el plegamiento y estructura de la proteína (B). Además, en la cepa de referencia se observan 2 hélices- α (marcadas en azul) que están ausentes en la cepa 66F (D) (ver Figura 13).

Consensus	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	180
FOXG_11545	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	180
Susceptible-Hudson	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	180
CONSENSO-CYP51A-21F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-45F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	125
CONSENSO-CYP51A-50F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-51F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-66F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	89
Resistente-Hudson	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	180
CONSENSO-CYP51A-47F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-48F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	122
CONSENSO-CYP51A-77F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-78F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
CONSENSO-CYP51A-79F	CPNSKLMQKQKFKVFGFLTQKALESHVQLIEREVLEIYQAVPSFSGKSGTVDVSKAMAEIT	115
Consensus	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	240
FOXG_11545	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	240
Susceptible-Hudson	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	240
CONSENSO-CYP51A-21F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-45F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	185
CONSENSO-CYP51A-50F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-51F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-66F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	149
Resistente-Hudson	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	240
CONSENSO-CYP51A-47F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-48F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	182
CONSENSO-CYP51A-77F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-78F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
CONSENSO-CYP51A-79F	IFTAARSLQGEVRRKLTAEFAALYHDDLGLGFTPVNLFPPWLPHPNRRRDAAHAKMREI	175
Consensus	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	300
FOXG_11545	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	300
Susceptible-Hudson	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	300
CONSENSO-CYP51A-21F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-45F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	245
CONSENSO-CYP51A-50F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-51F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-66F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	209
Resistente-Hudson	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	300
CONSENSO-CYP51A-47F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-48F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	242
CONSENSO-CYP51A-77F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-78F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
CONSENSO-CYP51A-79F	YMDIINGRRRGVGDLEKGTDMIANLMNCEYKNGQPIPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSAS	235
Consensus	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	360
FOXG_11545	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	360
Susceptible-Hudson	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	360
CONSENSO-CYP51A-21F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-45F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	305
CONSENSO-CYP51A-50F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-51F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-66F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	269
Resistente-Hudson	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	360
CONSENSO-CYP51A-47F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-48F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	302
CONSENSO-CYP51A-77F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-78F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295
CONSENSO-CYP51A-79F	SWIILHLASSTDIAEELYQEQLINLSADGVLPLPQYDLDKLPQLQNVVKTETLRVHSSIH	295

Figura 11. Mutaciones puntuales en *cyp51A* de *F. oxysporum*.

Consensus	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	120
FOXG_11545	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	120
Susceptible-Hudson	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	120
CONSENSO-CYP51A-21F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-45F	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	65
CONSENSO-CYP51A-50F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-51F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-66F	-CR Q KHG DV F F F LFG R KIVAC L -----SDVVYD	29
Resistente-Hudson	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	120
CONSENSO-CYP51A-47F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-48F	KCREKHG DVFTFILFGRKIV ACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	62
CONSENSO-CYP51A-77F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-78F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55
CONSENSO-CYP51A-79F	-----HGDVFTFILFGRKIVACLGVDGNDFVLSRIQDANA EEIYSPLTTPVFGSDVVYD	55

Figura 12. Delección en *cyp51A* en la cepa 66F.

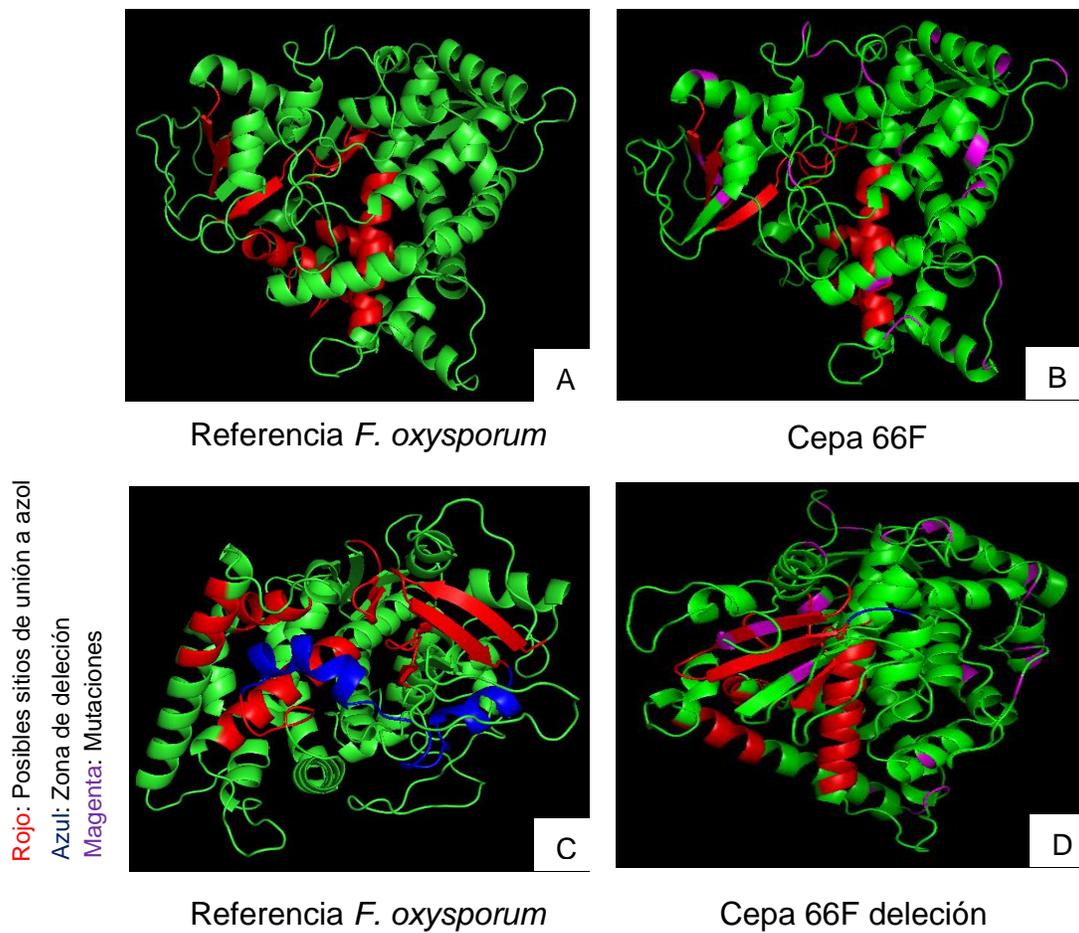


Figura 13. Modelaje de la proteína CYP51A de la cepa 66F de *F. oxysporum*

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Las especies que forman parte del género *Fusarium* son reconocidas como microorganismos fitopatógenos, sin embargo, existen diversas especies que han sido documentadas como patógenos oportunistas en humanos, siendo el principal grupo de riesgo las personas que presentan algún trastorno hematológico maligno, que se han sometido a algún trasplante o que tienen el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)⁴³.

En el presente trabajo se identificaron fenotípica y molecularmente 116 aislamientos de *Fusarium* spp., 84 fueron aislamientos clínicos obtenidos de diferentes pacientes y 32 fueron aislamientos ambientales. Estos se agruparon en 29 especies de *Fusarium* pertenecientes a 9 complejos: solani, oxysporum, fujikuroi, dimerum, incarnatum-equiseti, chlamydosporum, concolor, staphyleae y tricinctum. El complejo más frecuente, tanto en aislamientos clínicos como ambientales fue el complejo solani y dentro del complejo la especie más aislada fue *F. falciforme*. Seguido del complejo fujikuroi y oxysporum en los aislamientos clínicos y, oxysporum y fujikuroi en los aislamientos ambientales.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura, ya que las especies de *Fusarium* que se han reportado como patógenos oportunistas de humanos están agrupadas en 10 complejos: solani, oxysporum, incarnatum-equiseti, fujikuroi, dimerum, tricinctum, chlamydosporum, concolor, sambucinum

y lateritium. De los cuales, nosotros identificamos 8 de estos complejos, excepto sambucinum y lateritium. Las especies que se identifican con mayor frecuencia en infecciones humanas son las que comprenden los complejos solani, oxysporum y la especie *F. verticillioides* del complejo fujikuroi^{2,43,86}. Lo cual, es igual a lo que observamos en nuestros resultados.

Otras especies que suelen identificarse en las infecciones humanas producidas por *Fusarium* spp. son: *F. dimerum*, *F. proliferatum*, *F. chlamidosporum*, *F. sacchari*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. antophilum* y *F. vasinfectum*². De las cuales, nosotros identificamos a *F. dimerum*, *F. proliferatum* y *F. nygamai*.

En el caso de la susceptibilidad *in vitro* a azoles de los aislados, el perfil suele ser muy variado entre especies e incluso entre cepas^{12,55}. En las 116 cepas se observaron rangos amplios de CMI para la mayoría de azoles evaluados, exceptuando FLU. Mientras que VOR fue el único azol que tuvo un efecto significativo para todas las especies. La moda y CMI₉₀ resultó ser igual en todos los azoles, excepto para VOR (4 µg/mL y 8 µg/mL, respectivamente) y TEB (8 µg/mL y 16 µg/mL, respectivamente), donde el CMI₉₀ estuvo 1 log₂ por encima de la moda en ambos casos. Esto concuerda con lo reportado en literatura, debido a que se encuentra documentado que todas las especies de *Fusarium* suelen ser resistentes a FLU, además de presentar CMIs >4 µg/mL para VOR, lo que se observa en el CMI₉₀^{11,12}.

Una vez fue analizado el perfil de susceptibilidad *in vitro* por especies, se pudo observar que las especies del CEFS (*F. solani*, *F. falciforme* y *F. keratoplastikum*) eran las que presentaban los rangos de CMI más altos, mientras que las especies del CEFF como *F. verticillioides* presentaban los rangos más bajos de CMI. Muy similar a lo reportado por Dalyan y cols. quienes observaron que el CEFS tiene perfiles de susceptibilidad *in vitro* más altos que los del CEFF⁸⁰.

Para el análisis de los parálogos *cyp51* de *Fusarium* spp. solo se seleccionaron cepas de la especie *F. oxysporum*, debido a que fue la única especie en donde se observaron cepas con CMIs altos y bajos, lo que permitió realizar una comparación entre sus parálogos.

Se seleccionaron 10 cepas, 5 con CMIs bajos: 21F, 45F, 50F, 51F y 66F (de las 5 cepas, la 66F presento los CMIs más bajos) y 5 cepas con CMIs altos: 47F, 48F, 77F, 78F y 79F, y si bien, no existen puntos de corte que permitan categorizar a las cepas de *Fusarium* spp. como susceptibles (S), intermedias (I) o resistentes (R), si se han llegado a definir Valores de Corte Epidemiológico (VCE) para algunos complejos de especies como el CEFO (POS 8 µg/mL, VOR 16 µg/mL e ITR 32 µg/mL)⁸⁹. Por lo que, basados en los VCE se categorizó a las cepas con CMIs bajos como cepas WT (Wild-Type) y a las cepas con CMIs altos como NWT (Non-Wild-Type).

En el alineamiento y análisis de los parálogos *cyp51* de las 10 cepas de *F. oxysporum*, no se encontraron mutaciones puntuales significativas en *cyp51B* y

cyp51C, ya que las pocas mutaciones puntuales que se observaron en estos parálogos, no se encontraban dentro o cercas de los posibles sitios de interacción a azoles. Caso contrario del parálogo *cyp51A*, en donde se observó la mayor cantidad de mutaciones puntuales, muy cerca y dentro de los posibles sitios de interacción a azoles. Esto es muy similar a lo reportado por Hudson y cols. quienes al analizar los parálogos *cyp51* de una cepa WT y NWT de *F. oxysporum* solo encontraron mutaciones puntuales en *cyp51A*: cambio aminoacídico de la tirosina (Y) que se ubica en la posición 283 por histidina (H) (Y283H) y cambio de la serina (S) ubicada en la posición 432 por treonina (T) (S432T)⁸⁶.

Las mutaciones puntuales que Hudson y cols. relacionaron con la resistencia al protioconazol, azol de uso agrícola, contrastan con los resultados obtenidos en *cyp51A* en nuestras 10 cepas de *F. oxysporum*, puesto que Y283H se encuentra presente en todas nuestras cepas, incluyendo las 5 cepas WT. Además, S432T no se observó en ninguna de nuestras 10 cepas analizadas de *F. oxysporum*. La serina se mantuvo en la posición 432 en las 10 cepas, incluyendo las NWT.

Aunque se pudieron observar algunos patrones de mutaciones puntuales, en las cepas WT y NWT, estos no fueron muy claros como para realizar una correlación entre las mutaciones puntuales y un fenotipo de resistencia.

Motivos por los cuales, se podría buscar incrementar el número de cepas a analizar. Evaluar otras especies e inducir resistencia en aquellas cepas que presentaron CMI's bajos. Además, se deben evaluar otros mecanismos de

resistencia de *Fusarium* spp. como bombas de flujo, sobreexpresión, entre otras, ya que la resistencia a antifúngicos parece ser multifactorial como ya se ha sugerido en diversas publicaciones^{12,65,90}

Por otra parte, en la cepa 66F, la cual presentó los valores más bajos de CMIs, se observaron la mayor cantidad de mutaciones puntuales. Además de observar una delección muy considerable, ya que se deletaron 30 aminoácidos de la posición 84 a 113. Se conoce que la delección de *cyp51A* en *F. oxysporum* sensibiliza las cepas a los azoles, mientras que la delección de los otros parálogos *cyp51B* y *cyp51C*, no parecen repercutir en la sensibilización o resistencia⁹¹. Por lo que, el parálogo *cyp51A* parece ser el más relevante en *F. oxysporum*, lo que pudiera explicar porque la cepa 66F presenta los CMIs más bajos.

El modelaje de la proteína CYP51A de la cepa 66F, permite observar el cambio en el plegamiento y estructural de la proteína al eliminarse las 2 hélices- α con respecto a la proteína CYP51A de una cepa de referencia. Lo que muy probablemente repercute en que la cepa sea muy susceptible a los azoles, aunque para dilucidar exactamente los motivos por los cuales. Esta delección repercute en la sensibilización es necesario realizar más estudios. Además, esta sensibilización a los azoles de la cepa 66F pudiera estar involucrada con otros mecanismos de resistencia y no solamente a la delección observada.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

- Se identificaron morfológica y molecularmente 26 especies de *Fusarium* que se agruparon en 9 complejos.
- Los complejos más frecuentes tanto en aislamientos clínicos y ambientales fueron solani, oxysporum y fujikuroi.
- Solo voriconazol mostró tener efecto sobre todas las especies de *Fusarium*.
- Las especies del complejo solani presentan CMI's más altos mientras que las especies del complejo fujikuroi presentan CMI's más bajos.
- No se encontró un patrón constante que permitiera correlacionar las mutaciones puntuales de los parálogos *cyp51* con la resistencia a azoles.

REFERENCIAS

1. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K. *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*. 2013;67:399-416.
2. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(4):695-704.
3. Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. *Current opinion in infectious diseases*. 2000;13(2):121-128.
4. King R, Urban M, Hammond-Kosack MC, Hassani-Pak K, Hammond-Kosack KE. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC genomics*. 2015;16(1):1-21.
5. Wang MM, Crous PW, Sandoval-Denis M, Han SL, Liu F, Liang JM, Duan WJ, Cai L. *Fusarium* and allied genera from China: species diversity and distribution. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2022;48:1-53.
6. Snyder WC, Hansen HN. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*. 1945;32(10): 657-666.
7. Ireta J, Gilchrist S. Roña o tizón de la espiga de trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). Ed. CIMMYT, México, 1994.
8. Babadoost M. *Fusarium*: Historical and continued importance. *Fusarium—Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. 2018.
9. Forero-Reyes CM, Alvarado-Fernández AM, Ceballos-Rojas AM, González-Carmona LC, Linares-Linares MY, Castañeda-Salazar R, Pulido-Villamarín A, Góngora-Medina ME, Cortés-Vecino JA, Rodríguez-Bocanegra MX. Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium* spp. en modelos vegetal y murino. *Revista argentina de microbiología*. 2018;50(1):90-96.
10. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(1):33-39.
11. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013;32(12):1491-1500.
12. Al-Hatmi AM, Meis JF, de Hoog GS. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS pathogens*. 2016;12(4):e1005464.
13. Jacobs-Venter A, Laraba I, Geiser DM, Busman M, Vaughan MM, Proctor RH, McCormick SP, O'Donnell, K. Molecular systematics of two sister clades, the *Fusarium concolor* and *F. babinda* species complexes, and the discovery of a novel microcycle macroconidium-producing species from South Africa. *Mycologia*. 2018;110(6):1189-1204.
14. Perera RH, Hyde KD, Maharachchikumbura SSN, Jones EBG, McKenzie EHC, Stadler M, Lee HB, Samarakoon MC, Ekanayaka AH, Camporesi E, Liu JK, Liu, ZY. Fungi on wild seeds and fruits. *Mycosphere*. 2020;11(1):2108–2480.
15. Sandoval-Denis M, Swart WJ, Crous PW. New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *MycKeys*. 2018;(34):63.
16. Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(3): 210-220.

17. Al-Hatmi A, Bonifaz A, de Hoog GS, Vazquez-Maya L, Garcia-Carmona K, Meis JF, van Diepeningen AD. Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC infectious diseases*. 2014;14(1):1-9.
18. Pérez-Balbuena AL, Vanzzini-Rosano V, de Jesús Valadéz-Virgen J, Campos-Möller X. (2009). *Fusarium* keratitis in Mexico. *Cornea*. 2009;28(6):626-630.
19. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004; 10:67-75.
20. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(4):695-704.
21. Mendoza N, Palacios C, Cardona N, Gómez LM. Onicomicosis: afección común de difícil tratamiento. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 2012; 20(2): 149-158.
22. Ranawaka RR, Nagahawatte A, Gunasekara TA. *Fusarium* onychomycosis: prevalence, clinical presentations, response to itraconazole and terbinafine pulse therapy, and 1-year follow-up in nine cases. *International Journal of Dermatology*. 2015;54(11): 1275-1282.
23. Durand ML. Bacterial and fungal endophthalmitis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30(3):597-613.
24. Thakkar R, Patil A, Mehraj T, Dudhipala N, Majumdar S. Updates in ocular antifungal pharmacotherapy: formulation and clinical perspectives. *Current Fungal Infection Reports*. 2019;13(2): 45-58.
25. Fariñas MC, Fernández-Sampedro M, Armiñanzas C. Formas clínicas y tratamiento de las infecciones causadas por otros hongos filamentosos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2012;30(7):414-419.
26. López-Cerero L, Etxebarria J, Mensa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(9):531-535.
27. Mansilla EC, Moreno RC, Garrote FG, López MDD, Palacios IP, Martín PP. 31a. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2019.
28. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Vol 4ta ed. México, DF: McGraw Hill/Interamericana; 2012.
29. Pemán J, Salavert M. Enfermedad fúngica invasora por *Scedosporium*, *Fusarium* y *Mucor*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014;31(4):242-248.
30. Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodríguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. *Clinics in Dermatology*. 2012;30(6):633-650.
31. Maquera-Afaray J, Pérez-Lazo G, Rodríguez R, Illescas R, Rodríguez L, Hidalgo J, Busatamante B, Herrera C, Díaz A. Fusariosis invasiva: reporte de tres casos en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2018;35:523-526.
32. Lozano TG, Oroval EA. Fusariosis: infecciones por *Fusarium* spp. Una breve nota. *Revista del laboratorio clínico*. 2013;6(4):185-186.
33. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:67-75.
34. Hoffman JJ, Burton MJ, Leck A. Mycotic keratitis—A global threat from the filamentous fungi. *Journal of Fungi*. 2021;7(4):273.
35. Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onicomicosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:6-10.

36. Thomas B, Audonneau NC, Machouart M, Debourgogne A. *Fusarium* infections: Epidemiological aspects over 10 years in a university hospital in France. *Journal of Infection and Public Health*. 2020;13(8):1089-1093.
37. Nucci F, Nouer SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. Fusariosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2015;36(5):706-714).
38. Dananché C, Cassier P, Sautour M, Gautheron N, Wegrzyn J, Perraud M, Bienvenu AL, Nicolle MC, Boibieux A, Vanhems P. Fungaemia caused by *Fusarium proliferatum* in a patient without definite immunodeficiency. *Mycopathologia*. 2015;179(1):135-140.
39. Kang Y, Li L, Zhu J, Zhao Y, Zhang Q. Identification of *Fusarium* from a patient with fungemia after multiple organ injury. *Mycopathologia*. 2013;176(1): 151-155.
40. Uemura EVG, Barbosa MDS, Simionatto S, Al-Harrasi A, Al-Hatmi AM, Rossato L. Onychomycosis Caused by *Fusarium* Species. *Journal of Fungi*. 2022;8(4):360.
41. Mellado F, Rojas T, Cumsille C. Queratitis fúngica: revisión actual sobre diagnóstico y tratamiento. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2013;76(1):52-56.
42. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, Van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana ZD, Lackner M, Verweij P, Freiberger T, Cornely OA, Arikian-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikos G, Lass-Flörl, C. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20:27-46.
43. Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. Fatal cases of bloodstream infection by *Fusarium solani* and review of published literature. *Mycopathologia*. 2016;181(3): 291-296.
44. Muhammed M, Anagnostou T, Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Carneiro HA, Glavis-Bloom J, Coleman JJ, Mylonakis E. *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine*. 2013;92(6):305-316.
45. Tapia C, Amaro J. Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*. 2014;31(1):85-86.
46. Watanabe T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. Vol 2da ed. EUA, Washington D.C.:CRC press; 2002.
47. Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Vol. 1ra ed. EUA, Iowa: Blackwell Pub; 2008
48. Ochoa Fuentes YM, Cerna Chávez E, Gallegos Morales G, Landeros Flores J, Delgado Ortiz JC, Hernández Camacho S, Rodríguez Guerra R, Olalde Portugal, V. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de micología*. 2012;36:27-32.
49. *Fusarium*. (2021, 21 octubre). Mycology | University of Adelaide. Recuperado 15 de agosto de 2022, de <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/fusarium#fusarium-dimerum-complex>.
50. Hatai K. *Diseases of fish and shellfish caused by marine fungi*. Vol. 53 ed, Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
51. Monzón A, Rodríguez JL. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda*. 2000.
52. Chandra NS, Wulff EG, Udayashankar AC, Nandini BP, Niranjana SR, Mortensen CN, Prakash HS. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;90(5):1625-1639.

53. Thomas B, Audonneau NC, Machouart M, Debourgogne A. Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice?. *Journal de Mycologie Medicale*. 2019;29(1):56-58.
54. Velarde Félix S, Valdez Rubio N, Zamora Galván F, López Molina R, Melgoza Villagómez CM, Garzón Tiznado JA. Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2018;9(8):1675-1689.
55. Al-Hatmi A, Curfs-Breuker I, De Hoog GS, Meis JF, Verweij PE. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a practical approach. *Journal of Fungi*. 2017;3(2):19.
56. Taj-Aldeen SJ, Salah H, Al-Hatmi AM, Hamed M, Theelen B, van Diepeningen AD, Boekhout T, Lass-Flörl, C. *In vitro* resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;85(4):438-443.
57. Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S, Dufresne PJ, Fuller J, Ghannoum M, Gonzalez GM, Guarro J, Kidd SE, Meis JF, Melhem TMS, Pelaez T, Pfaller MA, Szesz MW, Takahaschi JP, Tortorano AM, Wiederhold NP, Turnidge, J. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(2):1079-1084.
58. Cortés JA, Russi JA. Equinocandinas. *Revista chilena de infectología*. 2011;28(6):529-536.
59. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista iberoamericana de micología*. 2006;23(1):39-49.
60. Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2011;1814(1):88-93.
61. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects*. 2007;1770(3):467-477.
62. Waterman MR, Lepesheva GI. Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(1):418-422.
63. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2002;20(9):462-470.
64. Zhang J, Li L, Lv Q, Yan L, Wang Y, Jiang Y. The fungal CYP51s: Their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:691.
65. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2002;20(10):523-530.
66. Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*. 2010;9(7):991-1008.
67. Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*. 2006;313(5785):367-370.
68. Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-Chung, KJ. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000848.

69. Trabasso P, Matsuzawa T, Arai T, Hagiwara D, Mikami Y, Moretti ML, Watanabe A. Development and validation of LAMP primer sets for rapid identification of *Aspergillus fumigatus* carrying the *cyp51A* TR46 azole resistance gene. *Scientific reports*. 2021;11(1):1-8.
70. Mellado E, De La Camara R, Buendía B, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Breakthrough pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection with multiple triazole resistance in a Spanish patient with chronic myeloid leukemia. *Revista iberoamericana de micología*. 2013;30(1):64-68.
71. Parker JE, Warrilow AG, Price CL, Mullins JG, Kelly DE, Kelly SL. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology*. 2014;7(4):143-161.
72. Becher R, Wirsal SG. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;95(4):825-840.
73. Song J, Zhang S, Lu L. Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: What we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. *Fungal Biology Reviews*. 2018;32(3):131-142.
74. Zhang Y, Zhang B, Luo C, Fu Y, Zhu F. (2021). Fungicidal actions and resistance mechanisms of prochloraz to *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*. 2021;105(2): 408-415.
75. Stravoravdis S, LeBlanc NR, Marra RE, Crouch JA, Hulvey JP. Widespread occurrence of a CYP51A pseudogene in *Calonectria pseudonaviculata*. *Mycobiology*.2020;48(1):44-50.
76. Liu W, Sun Y, Chen W, Liu W, Wan Z, Bu D, Li R. The T788G mutation in the *cyp51C* gene confers voriconazole resistance in *Aspergillus flavus* causing aspergillosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2598-2603.
77. Duan Y, Li M, Zhao H, Lu F, Wang J, Zhou M. Molecular and biological characteristics of laboratory metconazole-resistant mutants in *Fusarium graminearum*. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2018;152:55-61.
78. Qian H, Du J, Chi M, Sun X, Liang W, Huang J, Li B. The Y137H mutation in the cytochrome P450 FgCYP51B protein confers reduced sensitivity to tebuconazole in *Fusarium graminearum*. *Pest management science*. 2018;74(6), 1472-1477.
79. Fan J, Chen F, Diao Y, Cools HJ, Kelly SL, Liu X.. The Y123H substitution perturbs Fv CYP51B function and confers prochloraz resistance in laboratory mutants of *Fusarium verticillioides*. *Plant pathology*.2014;63(4): 952-960.
80. Zhang Y, Mao CX., Zhai XY, Jamieson PA, Zhang CQ. Mutation in *cyp51b* and overexpression of *cyp51a* and *cyp51b* confer multiple resistant to DMIs fungicide prochloraz in *Fusarium fujikuroi*. *Pest Management Science*. 2021;77(2): 824-833.
81. Liu X, Yu F, Schnabel G, Wu J, Wang Z, Ma Z. Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology*. 2011;48(2):113-123.
82. White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990;18(1):315-322.
83. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(5):2044-2049.
84. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 1999; 41: 95-98.

85. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi M38; Approved Standard - Third Edition*. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
86. Hudson O, Waliullah S, Ji P, Ali ME. Molecular characterization of laboratory mutants of *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* resistant to prothioconazole, a demethylation inhibitor (DMI) fungicide. *Journal of Fungi*. 2021;7(9): 704.
87. Lockhart SR, Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Seminars in diagnostic pathology*. 2019; 36 (3): 177-181).
88. Dalyan Cilo B, Al-Hatmi AM, Seyedmousavi S, Rijs AJ, Verweij PE, Ener B, Hoog GS, van Diepeningen AD. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(8):1683-1691.
89. Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S, Dufresne PJ, Fuller J, Ghannoum M, González GM, Guarro J, Kidd SE, Meis JF, Melhem TMSC, Pelaez T, Pfaller MA, Szeszs MW, Takahaschi JP, Tortorano AM, Wiederhold NP, Turnidge J. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(2):1079-1084.
90. Zhao B, He D, Wang L. Advances in *Fusarium* drug resistance research. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2021; 24:215-219.
91. Zheng B, Yan L, Liang W, Yang Q. Paralogous Cyp51s mediate the differential sensitivity of *Fusarium oxysporum* to sterol demethylation inhibitors. *Pest management science*. 2019;75(2):396-404.