



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Correlación entre la actividad de elastasa y el  
genotipo *MAT* de aislados de *Aspergillus  
fumigatus* sección *Fumigati***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Mayra Herrera de los Santos**



**MÉXICO, CDMX.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

**VOCAL:**               **Profesor: Ignacio Camacho Arroyo**

**SECRETARIO:**       **Profesor: María Guadalupe Frías De León**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. María Guadalupe Frías De León**

**SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):**

**M. en C. Erick Obed Martínez Herrera**

**SUSTENTANTE (S):**

**Herrera de los Santos Mayra**

## ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 El Género <i>Aspergillus</i>	2
2.2 Taxonomía	3
2.3 Morfología	4
2.4 Aspectos epidemiológicos	5
2.5 Patogenicidad	8
2.6 Elastasa	9
2.7 Reproducción sexual de <i>A. fumigatus</i>	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6. METODOLOGÍA	15
6.1 Aislados de <i>A. fumigatus</i> sección <i>Fumigati</i>	15
6.2 Cultivo de aislados de <i>A. fumigatus</i> sección <i>Fumigati</i>	17
6.3 Estandarización de la determinación de la actividad de elastasa	17
6.4 Determinación de la actividad de elastasa	19
6.5 Determinación del genotipo sexual	19
6.6 Análisis de datos	20
7. RESULTADOS	20
7.1 Estandarización de la determinación de la actividad de elastasa	20
7.2 Determinación de la actividad de elastasa	27
7.3 Determinación del genotipo sexual	35
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	42
10. PERSPECTIVAS	42
11. REFERENCIAS	43

## 1. RESUMEN

La aspergilosis es una infección que involucra diversas formas clínicas causadas por especies oportunistas del género *Aspergillus*; siendo la aspergilosis invasiva, el tipo más grave de infección pulmonar y *A. fumigatus* sección *Fumigati*, el principal agente etiológico. La virulencia de este hongo es multifactorial; dentro de los factores que se han descrito hasta el momento, la actividad de elastasa ha llamado la atención, ya que la elastina es una de las principales proteínas en las células del pulmón. Por otro lado, la presencia del ciclo sexual en *A. fumigatus* ha tenido implicaciones significativas médicas, ya que como resultado de la reproducción sexual puede haber un incremento en la virulencia o resistencia a antifúngicos, entre otros. Además se ha observado que de los genes involucrados en la compatibilidad de entrecruzamiento (*MAT1-1* y *MAT1-2*), el *MAT1-1* está relacionado con la aspergilosis invasiva, asimismo, este tipo sexual parece estar relacionado con la actividad de elastasa, siendo más prevalente entre los aislados que presentan una mayor habilidad para degradar la elastina. Considerando los antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar si existe correlación entre la actividad de elastasa y el genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) en 58 aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. El índice de actividad de elastasa, *in vitro*, se determinó en medios de cultivo con elastina; la determinación del genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) se realizó por PCR multiplex. El 86.2% mostró actividad de elastasa y el análisis estadístico mostró que la actividad de elastasa no depende del origen de los aislados; de manera que, todos tienen el potencial de causar infección. El genotipo sexual mostró que el 67.3% de los aislados fue *MAT1-1* mientras que el 32.7% presentó el genotipo *MAT1-2*. Asimismo, tanto en los aislados ambientales como en los clínicos, el genotipo predominante fue *MAT1-1*. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el índice de actividad de elastasa y el genotipo sexual *MAT1-1*, por lo cual, este genotipo podría ser utilizado como marcador del potencial patogénico de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las infecciones fúngicas se ha incrementado considerablemente durante las últimas décadas, siendo las formas invasivas las que presentan mayor morbimortalidad debido, entre otros factores, a los diversos mecanismos de patogenicidad que presentan los hongos. Dentro de las micosis invasivas causadas por hongos filamentosos, la aspergilosis, ocasionada por diversas especies del género *Aspergillus*, es la más prevalente, seguida de las producidas por otros hongos de los géneros *Mucor*, *Fusarium* y *Scedosporium* (Quindós, 2002; Méndez-Tovar *et al.*, 2012; Paramythiotou *et al.*, 2014).

### 2.1. El Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es considerado de gran importancia económica, ecológica y médica debido a su amplia biodiversidad biológica y metabólica (Klich, 2002). La palabra *Aspergillus* fue en su origen usada por Micheli a principios del siglo XVIII (1729), por la similitud microscópica que tiene con el *aspergillum* (del latín *asperjar*, que significa rociar o esparcir), o hisopo, instrumento que se emplea en las ceremonias religiosas para dar la bendición (Bonifaz, 2012). Las especies de este género son hongos ubicuos y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son termófilas, capaces de crecer a temperaturas de hasta 50°C, y en el laboratorio se desarrollan con facilidad y rapidez en medios de cultivo ordinarios, dando lugar a colonias de texturas y colores variados, según las especies. Su nicho ecológico es el suelo, donde crecen en la materia orgánica en descomposición, de manera que, juegan un papel importante en la degradación aeróbica de la vegetación en descomposición y en el reciclaje de las fuentes de carbono y nitrógeno. De las más de 250 especies que se incluyen en el género *Aspergillus*, sólo unas pocas se han descrito como causantes de patologías en el hombre; siendo *Aspergillus fumigatus* la especie de mayor interés médico (Latgé, 2001; Ausina *et al.*, 2006; Geltner *et al.*, 2016; Frisvad y Larsen, 2016).

## 2.2. Taxonomía

La taxonomía del género *Aspergillus* ha cambiado mucho desde que Virchow, en 1856, publicó la primera descripción microscópica completa del hongo. En 1926, Thom y Church clasificaron al género con 69 especies de *Aspergillus* en 11 secciones con base en la morfología colonial, las características del conidióforo y de la cabeza aspergilar. En 1965, Raper y Fennell hicieron un tratado, "The Genus *Aspergillus*", donde aceptaron 132 especies subdivididas en 18 grupos, a partir de este año, varios taxa comenzaron a ser descritos.

Dado que al asignar nombres a los hongos, los micólogos tienen que seguir las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica; en 1985, Gams *et al.* (1985) realizaron cambios en el tratado de Raper y Fennell, sustituyendo el término "grupos" por "subgéneros" y "secciones". Con el reciente uso de técnicas moleculares para la identificación de hongos patógenos, el género *Aspergillus* cuenta con más de 300 especies repartidas en 8 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi*, *Terrei*, *Nidulante*, *Warcupi*, y *Ornati*) las cuales son subdivididas en múltiples secciones y complejos de especies (Patterson, 2014). En este contexto, la clasificación del estado anamorfo de *A. fumigatus* está descrita de la siguiente manera: Reino *Fungi*, *Phylum Ascomycota*, *Subphylum Pezizomycotina*, Clase *Eurotiomycetes*, Orden *Eurotiales*, Familia *Trichocomaceae*, Subgénero *Fumigati*, Sección *Fumigati* (Klich, 2002; [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)).

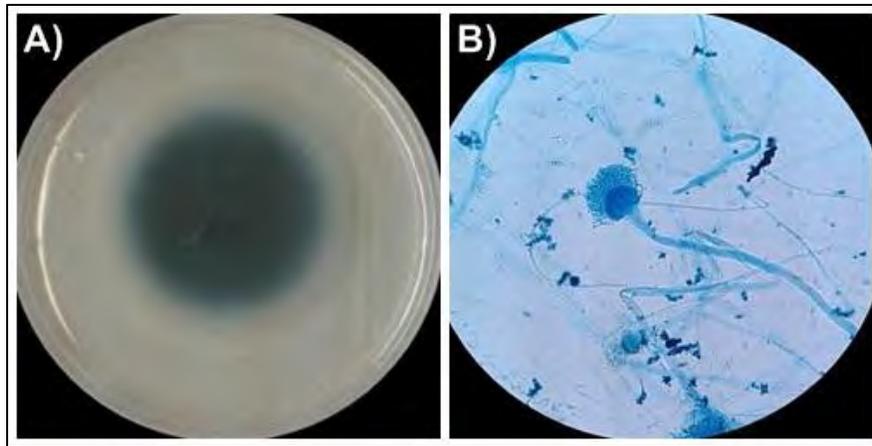
Cabe destacar que el aumento en el número de especies, no sólo se debe al hallazgo de nuevas especies, sino también a la reclasificación de muchas otras que antes se consideraban sinónimos con base en la morfología pero que filogenéticamente son distintas (Geiser *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2014; Samson *et al.*, 2014), tal es el caso de la sección *Fumigati*, la cual contempla 30 especies con 10 anamorfos y 20 teleomorfos. Dentro de esta sección, además de *A. fumigatus*, las especies *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. lentulus*, y *A. viridinutans* han sido reportadas como patógenas para el ser humano y se caracterizan por tener similitudes morfológicas pero que presentan patrones de

susceptibilidad a los antifúngicos distintos a los de *A. fumigatus*; mientras que *A. novofumigatus* aún no ha sido reportada como patógena (Samson, *et al.*, 2007; Guarro, 2012). Por esto, es importante que los aislados de *Aspergillus* sean correctamente clasificados a nivel taxonómico, ya que esto puede repercutir en la elección del tratamiento antifúngico.

La mayoría de las especies de *Aspergillus* se reproducen asexualmente; sin embargo, su estado sexual ha sido identificado en un gran número de especies, algunas de ellas patógenas como *A. fumigatus* (*Neosartorya fumigata*), *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*), *A. amstelodami* (*Eurotium amstelodami*), *A. udagawa* (*N. udagawae*). Hawksworth (2009) y Patterson (2014), sugieren que la nomenclatura taxonómica debería realizarse con base en la forma sexual, sin embargo; se sigue haciendo uso del nombre genérico *Aspergillus* con el fin de simplificar la nomenclatura, independientemente de sus estados sexuales.

### 2. 3. Morfología

El hongo *A. fumigatus*, puede crecer en medios ordinarios, como Sabouraud y PDA (Papa dextrosa agar), a 28°C, en donde las colonias se desarrollan entre 3 y 5 días, son planas, ilimitadas, pulverulentas o aterciopeladas, de color verde y en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia; al reverso raras veces se ve un pigmento de color ocre. Al microscopio se observan hifas tabicadas de 2 a 4 µm de diámetro, e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4 a 6 µm, que terminan en las clásicas cabezas aspergilaes que miden de 20 a 30 µm y terminan con una vesícula ligeramente alargada, piriforme o en forma de cuchara; de la que nace una solo serie de fiálides, con tendencia a disponerse hacia arriba ocupando la mitad o dos tercios de la vesícula; de las fiálides nacen microconidios verdes, redondos, de aproximadamente 2.5 a 3 µm de diámetro, algunos aislados de *A. fumigatus* llegan a presentar conidios sin pigmentación (**Figura 1**) (Latgé, 1999; Abarca, 2000; Samson *et al.*, 2007).



**Figura 1.** *Aspergillus fumigatus* A) Macromorfología y B) Micromorfología (Azul de algodón, 40X).

#### **2.4. Aspectos epidemiológicos**

La aspergilosis es una enfermedad cosmopolita, que se ha reportado en prácticamente todas las partes del mundo. Diversas especies oportunistas de *Aspergillus* son ubicuas, ocupan los primeros lugares dentro de los hongos contaminantes del ambiente; se aíslan con frecuencia del aire, tierra, plantas, materia orgánica en descomposición y en especial contaminan alimentos, sobre todo los que contienen carbohidratos y fibras. Cabe destacar que algunas especies forman parte de la microbiota habitual de diversas zonas del cuerpo como orofaríngea, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal (Latgé, 1999; Pontón, 2000).

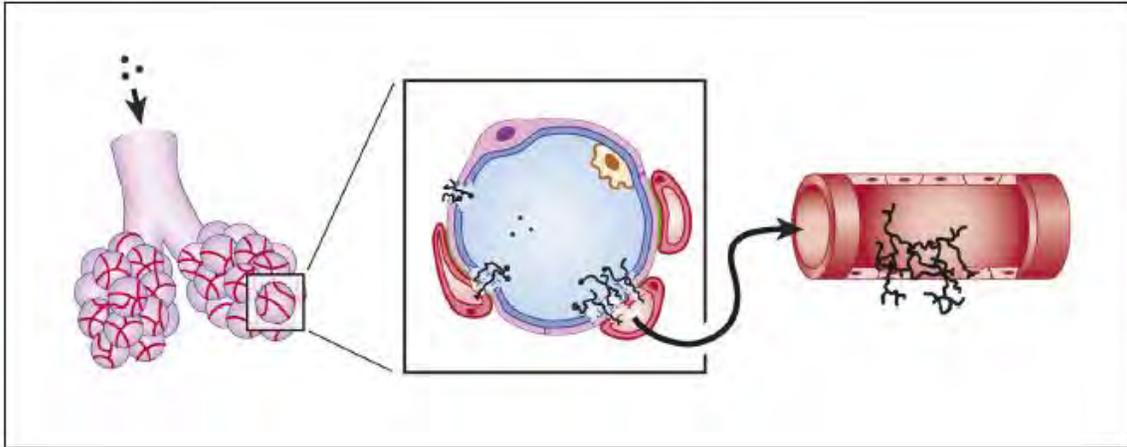
Una de las características del género *Aspergillus* es su habilidad de esporulación, lo cual conlleva a la presencia de altas concentraciones de conidios en el aire (1–100 conidios/m<sup>3</sup>). Los conidios de *A. fumigatus* son continuamente inhalados por los seres humanos pero raramente tienen un efecto adverso en ellos, ya que en individuos inmunocompetentes, los conidios son eliminados eficientemente por el sistema inmune innato. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos antibióticos, esteroides, citotóxicos, etc., así como la presencia de enfermedades hematológicas, metabólicas y el incremento de trasplantes de órganos; la exposición de los conidios en pacientes inmunosuprimidos es la causa de infecciones severas y fatales (Latgé, 2001; Barnes *et al.*, 2006).

El espectro de la aspergilosis abarca una amplia gama de entidades clínicas, entre las que se encuentran asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma y aspergilosis invasiva; siendo esta última el tipo más grave de infección pulmonar (Barnes *et al.*, 2006; Cadena *et al.*, 2015). Históricamente, *A. fumigatus* ha sido el agente etiológico del 90% de los cuadros clínicos de aspergilosis; sin embargo, otras especies no *fumigatus* también juegan un papel importante. En un estudio de aspergilosis invasiva en pacientes que fueron sometidos a trasplantes de células madre hematopoyéticas se observó que las especies causantes de la enfermedad fueron *A. fumigatus* (56%), *A. flavus* (18.7%), *A. terreus* (16%), *A. niger* (8%) y *A. versicolor* (1.3%) (Morgan *et al.*, 2005).

Dado que los conidios pueden permanecer en el aire por periodos prolongados y contaminar cualquier superficie en contacto con el aire, la transmisión del hongo es por vía aérea; así los brotes en instituciones, como los hospitales, pueden provocar epidemias con importante repercusión clínica, principalmente en pacientes de riesgo o expuestos a una gran cantidad de conidios. Las principales puertas de entrada para el *Aspergillus* son el pulmón y los senos paranasales, pero pueden afectar de forma primaria o secundaria otros órganos (Borgés, 2000; Rementería *et al.*, 2005).

En la aspergilosis invasiva, cuando el hongo ingresa por vía respiratoria (**Figura 2**); invade el tejido pulmonar, los conidios se desarrollan hasta formar hifas tabicadas y ramificadas, generando lesiones crónicas que dan el aspecto de una neumonía necrosante o de abscesos pulmonares. La lesión presenta edema importante, con un centro necrótico, que contiene restos celulares, fibras reticulares e hifas. En los casos crónicos se ven numerosas hifas tabicadas, sin conidios; los alveolos se encuentran llenos de material fibrinoso; existe poca respuesta tisular a la infección, compuesta por escasos linfocitos y fibroblastos. Esta variedad clínica se disemina con gran facilidad a diversos órganos, por la

inmunosupresión del hospedero y por la invasividad del hongo (Askew, 2008; Cadena *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Patogénesis de la aspergilosis invasiva: Los conidios de *A. fumigatus* son lo suficientemente pequeños para llegar a vías respiratorias. Una sección transversal del espacio alveolar se amplía en el panel central mostrando la estrecha proximidad de vasos sanguíneos adyacentes en el septum interalveolar; en un huésped susceptible, los conidios son capaces de germinar y dañar la interfase aire-sangre. Esta barrera comprende una capa de surfactante (azul), células epiteliales pulmonares (rosa) y células endoteliales (rojo). Las hifas en crecimiento, eventualmente, penetran esta barrera y los fragmentos de hifas se liberan en la sangre, teniendo acceso a otros órganos por la invasión extravascular (Tomada de Askew D, 2008).

El desarrollo de una infección por *Aspergillus* spp. depende de la interacción de tres factores: virulencia del hongo, tipo y cantidad de la exposición y estado inmunológico del paciente. Los factores de riesgo para la infección invasiva por *Aspergillus* spp. están asociados a la alteración funcional de macrófagos y neutrófilos, afectando, principalmente, pacientes inmunocomprometidos por leucemias, trasplantes de médula ósea o de órgano sólido, o quienes han estado sometidos a tratamiento esteroideo. Otros grupos de riesgo son los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, sarcoidosis, adictos a drogas, alcohólicos, así como personas con VIH, en quienes la incidencia de la aspergilosis ha ido en aumento, probablemente debido a la mayor supervivencia y el uso de terapias que inducen neutropenia (Borgés, 2000; Barnes *et al.*, 2006; Bonifaz, 2012).

## 2.5. Patogenicidad

Al hablar de infecciones oportunistas, como la aspergilosis invasiva, se le relaciona directamente con factores de predisposición asociados al huésped; sin embargo, los agentes infecciosos también tienen un papel crucial para que la enfermedad se establezca. Diversos estudios han demostrado que la virulencia de las especies de *Aspergillus* es multifactorial; dado que *A. fumigatus* es el patógeno oportunista causante del 90% de las aspergilosis invasivas con un 50 – 95% de mortalidad, los estudios se han enfocado en determinar aquellos factores que sean relevantes en el desarrollo de la infección por este hongo (Abad *et al.*, 2010). Dentro de los numerosos factores que se han descrito hasta el momento, se encuentran los sistemas de adherencia, toxinas y enzimas extracelulares (Khosravi *et al.*, 2012).

La adherencia de *A. fumigatus* es un paso crucial para el establecimiento de la aspergilosis; mediante adhesinas, sustancias presentes en los conidios, el hongo posee la habilidad de adherirse específicamente a los tejidos del hospedero; la superficie de los conidios está cubierta por proteínas que le brindan un carácter hidrofóbico, el cual hace que se unan significativamente a proteínas del epitelio pulmonar como el fibrinógeno, laminina, albúmina, colágeno, entre otras (Tomee *et al.*, 2000; Latgé, 2001).

*A. fumigatus* produce metabolitos secundarios (toxinas) o extrolitos que secreta en el medio donde se desarrolla, también puede presentarlos en sus conidios y micelio; entre las sustancias que sintetiza se encuentran la fumigalina, el ácido helvólico y la gliotoxina, los cuales ejercen un efecto inmunosupresor al inhibir la fagocitosis y la expresión de citocinas por los macrófagos (Rementería *et al.*, 2005; Frisvad y Larsen, 2016).

Otro mecanismo de evasión del sistema inmune es la producción de melanina, un pigmento verde azulado de carácter hidrofóbico presente en los conidios, el cual

protege al patógeno contra especies reactivas de oxígeno y de la fagocitosis (Youngchim *et al.*, 2004; Tekaia *et al.*, 2005).

*Aspergillus* se caracteriza por la producción de una gran variedad de enzimas extracelulares como nucleasas, fosfatasas, peptidasas y proteasas que pueden degradar macromoléculas complejas con el fin de proveer nutrientes para el hongo. Uno de los factores necesarios para que *A. fumigatus* se disemine en los tejidos, es la degradación del sustrato donde se encuentra; dado que las membranas celulares del hospedero están compuestas de lípidos y proteínas, principalmente colágena y elastina en los pulmones, ha sido de gran interés el estudio de proteasas en especies de *Aspergillus* como posibles factores de virulencia (Tomee *et al.*, 2000; Abad *et al.*, 2010).

## 2.6. Elastasa

La elastasa es una enzima proteolítica presente tanto en los humanos (gránulos azurófilos de los neutrófilos) como en algunos microorganismos. Esta proteasa cuenta con una amplia especificidad de sustrato y es una de las pocas enzimas que son capaces de degradar la elastina, proteína de la matriz extracelular del pulmón (Kimbél, 1980; Modelo *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que las elastasas están involucradas en infecciones pulmonares ocasionadas por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides nodosus*, *Staphylococcus epidermidis* y algunos dermatofitos (Kothary *et al.*, 1984; Khosravi *et al.*, 2012). Por lo que se ha considerado el estudio de esta enzima en *A. fumigatus* y su papel en el desarrollo de la aspergilosis invasiva. Kothary *et al.* (1984) estudiaron la patogenicidad de cepas productoras y no productoras de elastasa en aislados ambientales de *A. fumigatus* en un modelo de infección de ratones. Los aislados de *A. fumigatus* se obtuvieron de muestras del aire cercano de una planta de tratamiento de aguas residuales y monitorearon la producción de elastasa, posteriormente, compararon las cepas productoras y no

productoras de esta enzima con su capacidad para producir aspergilosis invasiva en ratones inmunocomprometidos con acetato de cortisona. Todos los ratones expuestos a las cepas productoras de elastasa murieron dentro de 48 – 96 h, presentando gran cantidad de hifas en los pulmones y necrosis de los alveolos; mientras que dos tercios de los ratones que fueron infectados por cepas no productoras sobrevivieron; de manera que la actividad de elastasa se encontró implicada en la invasión fúngica y su patogenicidad (Kothary *et al.*, 1984). En otro estudio, se investigó la producción de elastasa en aislados clínicos de *Aspergillus* spp., encontrando que los aislados involucrados en procesos invasivos producían elastasa, pero no todos los aislados que mostraron actividad de la enzima fueron asociados con enfermedades invasivas; mientras que Blanco *et al.* (2002) evaluaron la actividad de elastasa *in vitro* de aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* en un medio que contenía elastina y rosa de bengala (colorante biológico que retarda el crecimiento del hongo). Mediante el índice de actividad de elastasa, obtenido al dividir el diámetro del halo de lisis de la elastina entre el diámetro de la colonia, encontraron que los aislados provenientes de pacientes con aspergilosis invasiva presentaban valores altos, por lo que determinaron un punto de corte de 0.9, el cual mostró una sensibilidad del 97% y una especificidad del 83.3% en la tipificación de cepas patógenas o no patógenas, y en la predicción de la aspergilosis invasiva.

Con base en estos estudios, el interés por demostrar una correlación entre la actividad de elastasa y el desarrollo de la aspergilosis invasiva ha ido en aumento; sin embargo, hay autores que también se han enfocado al estudio de otras enzimas que posiblemente estén involucradas en esta infección, tales como la fosfolipasa o las proteasas ácidas (Tomee *et al.*, 2000; Alp *et al.*, 2008).

## **2.7. Reproducción sexual de *A. fumigatus***

El estudio de los estados sexuales o teleomorfos es la base de la taxonomía y nomenclatura fúngica; sin embargo, se estima que la quinta parte de las especies

de hongos descritas sólo son conocidas por sus estructuras asexuales. Hasta hace poco tiempo, *A. fumigatus* formaba parte de este grupo de hongos considerados exclusivamente asexuales (Álvarez *et al.*, 2010); sin embargo, O’Gorman *et al.* (2009) lograron reproducir en el laboratorio el ciclo sexual completo de esta especie y observaron la producción de cleistotecios y ascosporas. Por otro lado, con base en sus relaciones filogenéticas y en la morfología de sus estructuras sexuales, el teleomorfo de *A. fumigatus* ha sido asignado al género *Neosartorya* (*Phylum* Ascomycota, Orden eurotiales, Familia Trichocomaceae) y denominado como *N. fumigata*. No obstante, como se mencionó anteriormente, hay quienes consideran que para evitar confusiones en la nomenclatura debería prevalecer la denominación de *A. fumigatus* para referirse tanto a la fase asexual como a la sexual de este hongo, tal y como se ha hecho con otras especies del género *Aspergillus* (Hawksworth, 2009; O’Gorman *et al.*, 2009).

Durante el estudio del genoma de *A. fumigatus* se han identificado diversos genes asociados con diferentes etapas del ciclo sexual en los ascomicetos, entre éstos se encuentran los genes de tipo sexual o mating type (*MAT1-1* y *MAT1-2*), que codifican para un precursor de una feromona (*ppgA*) y para receptores de feromonas (*preA* y *preB*) (Álvarez *et al.*, 2010).

El descubrimiento del ciclo sexual de *A. fumigatus*, y otros hongos de importancia médica y veterinaria, ha generado cierta expectación entre la comunidad científica, de modo que en la actualidad ha surgido un gran interés en elucidar si existe alguna relación, directa o indirecta, entre la reproducción sexual y la patogenicidad del hongo. En este sentido, resulta especialmente inquietante la posibilidad de que, como resultado de los procesos de reproducción sexual, puedan aparecer nuevas cepas de mayor virulencia y/o resistencia a los antifúngicos (Abad *et al.*, 2010).

Son pocos los trabajos experimentales que se han realizado con el fin de relacionar la ocurrencia del tipo sexual con la patogenicidad en *A. fumigatus*; tampoco se han obtenido datos sobre las posibles diferencias entre los tipos *MAT1-1* y *MAT1-2*, asociados a su patogenicidad o resistencia a los agentes antifúngicos. Hasta hace poco sólo se había estudiado la distribución de los tipos sexuales en aislados ambientales y clínicos, observándose una relación 1:1 o una prevalencia ligeramente superior del tipo *MAT1-2* (Paoletti *et al.*, 2005; O’Gorman *et al.*, 2009). Esta distribución de tipos sexuales, no sugería una diferencia entre los tipos sexuales de *A. fumigatus* en cuanto a su virulencia. Sin embargo, Álvarez *et al.* (2010) han obtenido resultados que nos llevan a cuestionar esta afirmación, pues, tras caracterizar 102 cepas de *A. fumigatus* de diferente origen, tanto ambientales, como procedentes de pacientes colonizados, con aspergiloma o con aspergilosis invasiva, pudieron constatar que el tipo sexual *MAT1-1* no sólo fue el más prevalente entre los aislados clínicos, sino que, además, mostró una asociación estadísticamente significativa con el origen invasivo de los aislados. También observaron que el tipo sexual *MAT1-1* parece estar relacionado con la actividad de elastasa, siendo más prevalente entre los aislados que presentan una mayor capacidad para degradar la elastina (índice de actividad de elastasa  $\geq 1$ ) (Álvarez *et al.*, 2009, 2010a, 2010b).

Esta última observación nos sugiere nuevamente la importancia de la actividad de elastasa como posible factor de patogenicidad en *A. fumigatus*; por lo que resulta de gran interés llevar a cabo estudios que evalúen el tipo sexual y la actividad de elastasa con el fin de comprender las implicaciones que se tienen durante el desarrollo de la aspergilosis invasiva.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*A. fumigatus* es un patógeno oportunista causante del 90% de las aspergilosis invasivas con un 50–95% de mortalidad (Abad *et al.*, 2010). Este hongo posee múltiples factores de virulencia, algunos asociados a su estructura, otros a su

capacidad de crecimiento y adaptación a condiciones de estrés, a sus mecanismos de evasión del sistema inmune, así como a su capacidad de causar daños en el hospedero (Latgé, 2001; Askew, 2008; Abad *et al.*, 2010). Dentro de los factores que se han descrito hasta el momento, la actividad de elastasa ha llamado la atención, ya que la elastina es una de las principales proteínas en las células del pulmón (Kothary *et al.*, 1984), por lo que se han llevado a cabo algunos estudios para comprender mejor la implicación de la actividad de elastasa en el desarrollo de la aspergilosis invasiva (Blanco *et al.*, 2002; Alp *et al.*, 2008; Khosravi *et al.*, 2012).

Por otro lado, la identificación de diversos genes asociados con diferentes etapas del ciclo sexual en los ascomicetos, dentro de los cuales se ha detectado la expresión de los genes de tipo sexual o mating type (*MAT1-1* y *MAT1-2*), ha resultado de interés, dada la posibilidad de que, como resultado de los procesos de reproducción sexual, puedan aparecer cepas de mayor virulencia y/o resistencia a los antifúngicos (Álvarez *et al.*, 2010). Por lo que es necesario investigar la posible relación entre el genotipo *MAT* y la invasividad, a través de la actividad de la elastasa, de los aislados de *A. fumigatus*. Sin embargo, pocos son los trabajos experimentales que se han realizado con el fin de relacionar la ocurrencia del tipo sexual con la patogenicidad en *A. fumigatus* (Álvarez *et al.*, 2009, 2010b), además en ninguno de ellos se ha considerado que *A. fumigatus* es en realidad un complejo de especies, cuyos miembros poseen morfología similar, pero que pueden presentar diferente susceptibilidad a los antifúngicos y patogenicidad (Samson *et al.*, 2007, 2014; Fernández *et al.*, 2014; Giray *et al.*, 2016).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si existe correlación entre el índice de actividad de elastasa, *in vitro*, y el genotipo sexual (*MAT1-1* o *MAT1-2*) en aislados clínicos y ambientales, identificados con base en características feno y genotípicas como *A. fumigatus* sección *Fumigati* (Díaz Lomelí, 2015; Rosas de Paz, 2015).

## 4. HIPÓTESIS

Los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* de origen clínico, presentarán altos índices de actividad de elastasa y genotipo *MAT1-1*; mientras que los aislados de origen ambiental presentarán bajos índices de actividad de elastasa y genotipo *MAT1-2*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar si existe correlación entre la actividad de elastasa y el genotipo sexual en aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.

### 5.2. Objetivos Particulares

- Estandarizar el método para la determinación del índice de la actividad de elastasa en aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.
- Determinar el índice de la actividad de elastasa de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.
- Determinar, por PCR multiplex, el genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.
- Evaluar estadísticamente si existe una correlación entre el índice de la actividad de elastasa y el origen de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.
- Evaluar estadísticamente si existe una correlación entre el índice de actividad de elastasa y el genotipo sexual de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Se utilizaron 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*: 28 de origen ambiental, de los cuales, 10 fueron proporcionados por el Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP” y 18 por el Hospital Juárez de México; y 30 aislados clínicos, de los cuales 15 fueron obtenidos de pacientes con sospecha de aspergilosis invasiva del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y 15 de la colección de cultivos fúngicos del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI-ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”, Argentina (**Tabla 1**). Todos los aislados fueron previamente identificados como *Aspergillus* sección *Fumigati*, con base en características micro y macromorfológicas, así como mediante la secuenciación de fragmentos del gen  $\beta$ -tubulina (Díaz Lomelí, 2015; Rosas de Paz, 2015).

**Tabla 1.** Origen y fuente de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Clave del aislado	Origen	Fuente de aislamiento
9A	CV, México	Ambiental
A10	CV, México	Ambiental
A28	CV, México	Ambiental
A35	CV, México	Ambiental
A36	CV, México	Ambiental
176A	CV, México	Ambiental
222A	CV, México	Ambiental
233A	CV, México	Ambiental
235A	CV, México	Ambiental
257C	CV, México	Ambiental
B4	HJM, México	Ambiental
B11	HJM, México	Ambiental
B18	HJM, México	Ambiental
B20	HJM, México	Ambiental
B21	HJM, México	Ambiental
B23	HJM, México	Ambiental
B43	HJM, México	Ambiental
100A	HJM, México	Ambiental

<b>262A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>270B</b>	HJM, México	Ambiental
<b>312B</b>	HJM, México	Ambiental
<b>314A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>373C</b>	HJM, México	Ambiental
<b>385B</b>	HJM, México	Ambiental
<b>392A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>394A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>411A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>435A</b>	HJM, México	Ambiental
<b>19-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>141-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>205-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>636-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>380-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>918-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>149-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>576-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>154-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>21-M</b>	HIFG, México	Clínico
<b>2803267</b>	HIFG, México	Clínico
<b>2012</b>	HIFG, México	Clínico
<b>2013</b>	HIFG, México	Clínico
<b>128-12</b>	HIFG, México	Clínico
<b>48-12</b>	HIFG, México	Clínico
<b>MM-12</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-13</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-14</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-15</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-16</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-17</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-18</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-19</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-20</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-21</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-22</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-23</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-24</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-25</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico
<b>MM-26</b>	INEI-ANLIS-CGM, Argentina	Clínico

CV: Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP; HJM: Hospital Juárez de México; HIFG: Hospital Infantil “Federico Gómez”; INEI-ANLIS-CGM: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”.

## 6.2. Cultivo de aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* se sembraron en tubos estériles de 15 mL conteniendo agar Sabouraud (Bioxon, Becton Dickinson, MX), y se incubaron a 37°C durante tres días, o hasta observar crecimiento.

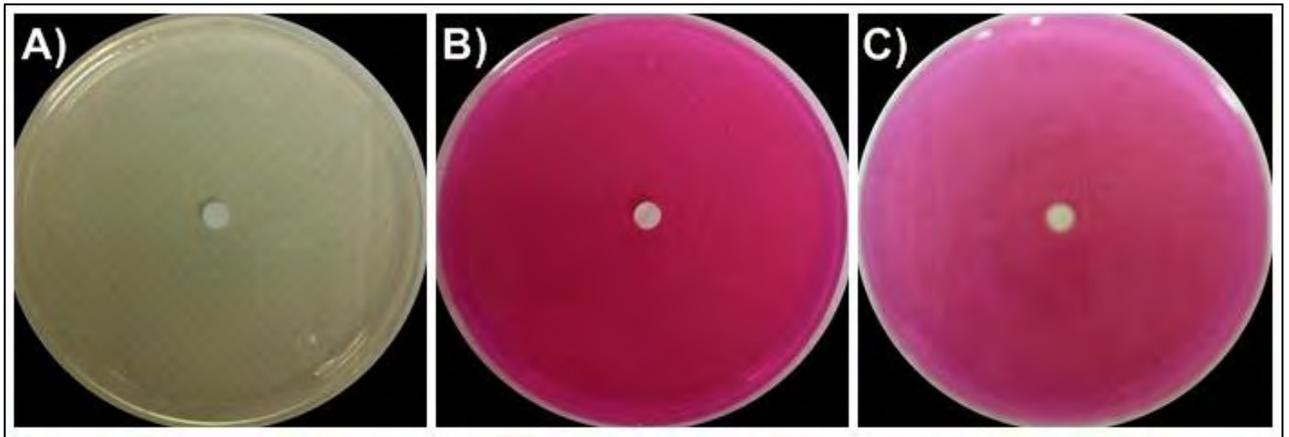
## 6.3. Estandarización de la determinación de la actividad de elastasa

La actividad de elastasa se evaluó en el medio de Kothary *et al.* (1984), el cual contiene: 0.05% de elastina, 0.05% de base de carbono para levaduras, 0.01% de rosa de bengala y 1.5% de agar, en amortiguador de boratos 0.05M pH 7.6. Durante la preparación del medio de cultivo, para evitar la desnaturalización de la elastina, primero se añadieron todos los componentes en el amortiguador, a excepción de ésta, y se esterilizó en autoclave; una vez estéril, el medio se dejó enfriar y posteriormente se añadió la elastina disuelta en agua estéril. El Índice de Actividad de Elastasa (IAE) se reportó de acuerdo con Blanco *et al.* (2002), usando la siguiente fórmula:

$$IAE = \frac{\text{diámetro del halo de lisis de elastina (DE)}}{\text{diámetro de crecimiento (DC)}}$$

Inicialmente, tomando en cuenta que *A. fumigatus* se caracteriza por tener una rápida velocidad de crecimiento, se realizaron curvas, para verificar que el rosa de bengala retardara el mismo; así como para seleccionar el inóculo adecuado que permitiera realizar las mediciones durante 15 días (Blanco *et al.*, 2002). Para el experimento, se seleccionaron cuatro aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* (9A, A10, B4 y 411A) y un aislado de *A. niger* como testigo negativo. A partir de cada aislado, se preparó una suspensión de conidios en 1 mL de solución salina isotónica-tween 20 al 0.05%; los conidios fueron cuantificados en una cámara de Neubauer y se ajustaron a  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  conidios/mL. Se inocularon 10  $\mu$ L de cada suspensión en tres medios de cultivo diferentes: agar Sabouraud, agar Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y medio de Kothary *et al.* (1984).

**(Figura 3).** Dado que a nivel fisiológico la concentración de sales es de fosfatos y no de boratos, los ensayos se realizaron utilizando medios de Kothary *et al.* (1984) preparados con amortiguador de boratos y con amortiguador de fosfatos. Las suspensiones de conidios se inocularon sobre un disco de papel filtro, colocado en el centro de cada medio de cultivo, para obtener un crecimiento radial. Los cultivos se incubaron a 37°C y la lectura de su crecimiento y del halo de lisis se realizó a los días 7, 10 y 15.



**Figura 3.** Medios de cultivo sin inóculo: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala y C) Medio de Kothary *et al.* (1984).

Con el fin de determinar que el testigo negativo no ocasionara falsos positivos, se llevó a cabo la repetición del experimento anterior. De igual manera, se probaron tres muestras ambientales (9A, A10 y B4) y se incluyeron tres muestras clínicas (205-M, MM-16, MM-20), para ver si en éstas el halo de lisis de elastina era mayor. De cada una de las muestras se prepararon inóculos de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, colocándose 7  $\mu$ L de éste sobre un círculo de papel filtro colocado en el centro de cada medio de cultivo: Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (testigo positivo de crecimiento), medio de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de fosfatos y medio de de Kothary *et al.* (1984). con amortiguador de boratos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 6.4. Determinación de la actividad de elastasa

Con base en las condiciones estandarizadas, se determinó el IAE de los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. El IAE se calculó de acuerdo con la fórmula previamente mencionada (Blanco *et al.*, 2002). El experimento se realizó por triplicado.

#### 6.5. Determinación del genotipo sexual

Se utilizó la técnica de PCR múltiple para identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2*, de acuerdo con las condiciones reportadas por Paoletti *et al.* (2005) y Rosas de Paz (2015). Se utilizaron los oligonucleótidos *MAT1-1*, *AFM1-F* (5'-CCTTGACGCGATGGGGTGG-3'), y *MAT1-2*, *AFM2-F* (5'-CGCTCCTCATCAGAACAACACTCG- 3'), junto con un oligonucleótido común, *AFM3-R* (5'-CGGAAATCTGATGTCCGACG-3'), que amplifican un fragmento de 834 pb en el genotipo *MAT1-1* y de 438 pb en el genotipo *MAT1-2*. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, conteniendo: 20 ng de DNA, 200 µM dNTPs (Applied Biosystems, USA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, regulador 1X, 1 U de *Taq polimerasa*, 50 pmoles de los oligonucleótidos *AFM1* y *AFM2*, y 100 pmoles del oligonucleótido *AFM3*. La amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72 °C.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA y pH de 8.3) 0.5X teñido con GelRed™ (10,000X, Biotium, EUA). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE en una cámara de electroforesis. El marcador de tamaño molecular empleado fue 100 bp DNA Ladder (Gene ruler Thermo Scientific). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador MultiDoc-It™ (UVP, EUA).

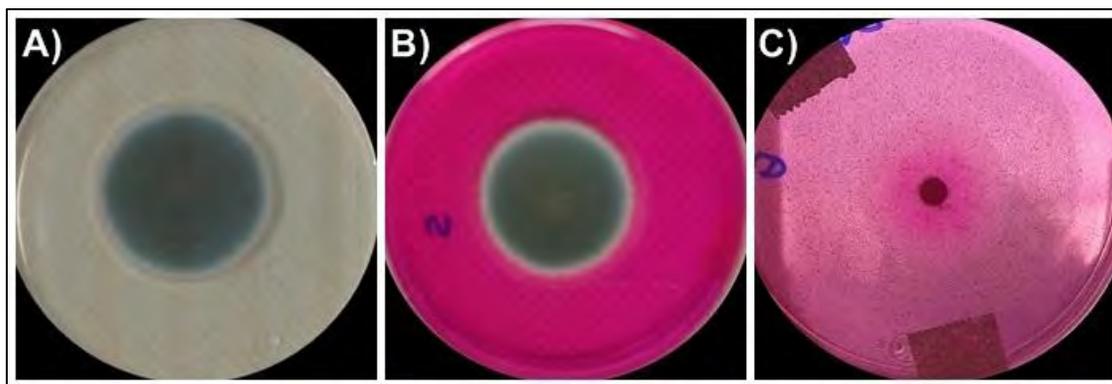
## 6.6. Análisis de datos

Con los valores obtenidos de IAE, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia significativa entre la media de la actividad de elastasa de los aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. Por otro lado, para determinar si existe diferencia significativa entre el genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) y los valores de IAE de los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, se realizó una prueba de Chi-cuadrada.

## 7. RESULTADOS

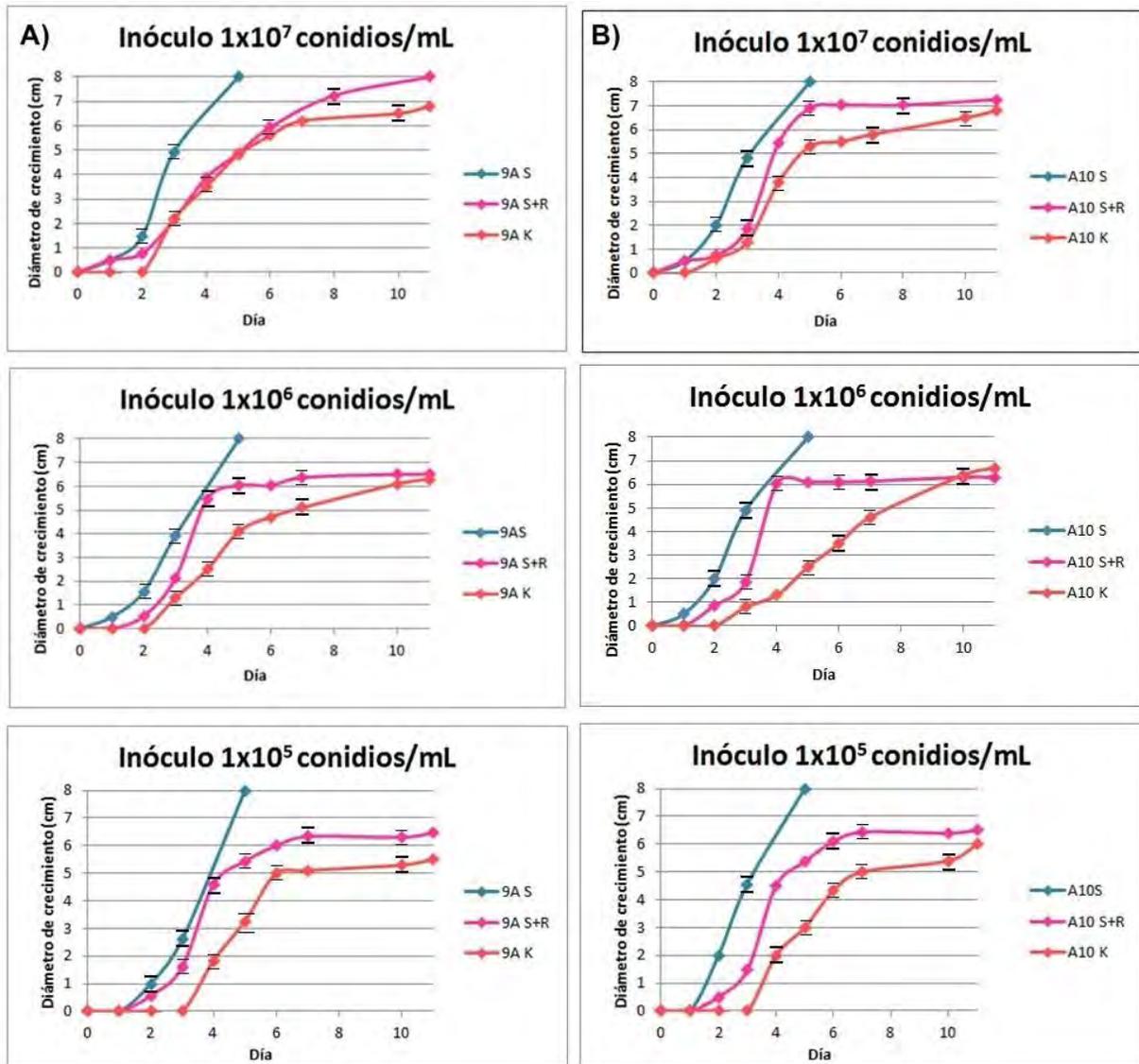
### 7.1. Estandarización de la determinación de la actividad de elastasa

Al realizar las curvas de crecimiento con las tres suspensiones evaluadas ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  conidios/mL), se observó que los inóculos sembrados en medio Sabouraud llenaban toda la caja de Petri (8.0 cm de diámetro) dentro de los primeros cinco días; mientras que el medio que contenía rosa de bengala disminuía la velocidad de crecimiento de los hongos. Como se aprecia en la **Figura 4**, el tamaño de la colonia del hongo en un medio con rosa de bengala al 0.01% y en el medio de Kothary *et al.* (1984) es menor, en comparación con un medio Sabouraud.

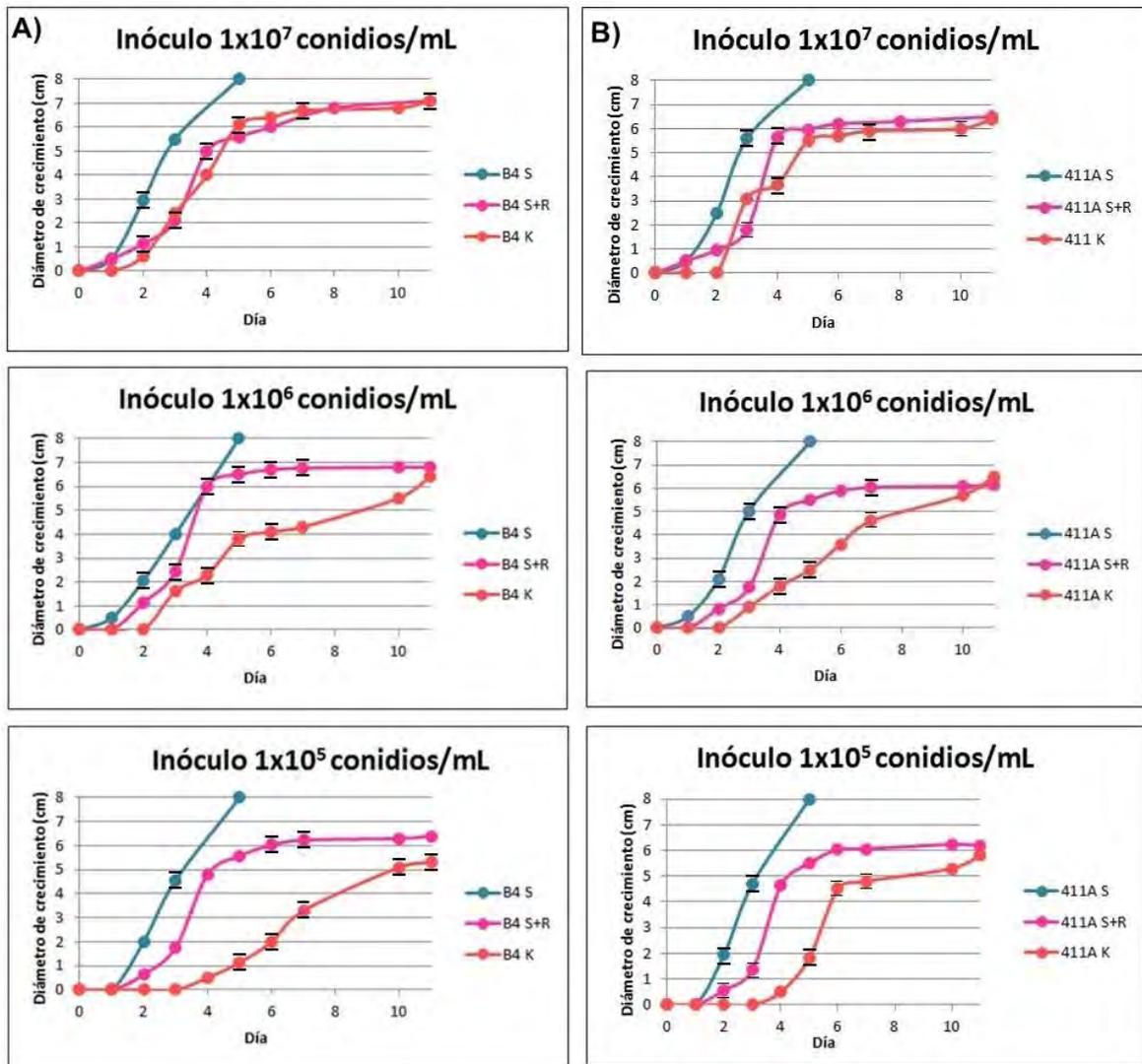


**Figura 4.** Evaluación del crecimiento de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de *A. fumigatus* sección *Fumigati* (aislado 9A), al día 4. El crecimiento se evaluó en: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y C) Medio de Kothary *et al.* (1984).

En los gráficos de las **Figuras 5 y 6** se muestran las curvas de crecimiento, donde se observa el rápido de crecimiento del hongo en medio Sabouraud (línea azul); mientras que en los medios Sabouraud con rosa de bengala (línea rosa) y Kothary (línea roja) el perfil de crecimiento es más lento. Los resultados fueron similares para los cuatro aislados evaluados.



**Figura 5.** Curvas de crecimiento de los aislados A) 9A y B) A10 de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. Las curvas se llevaron a cabo en medio Sabouraud (S), Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (S+R) y Medio de Kothary *et al.* (1984) (K). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar.



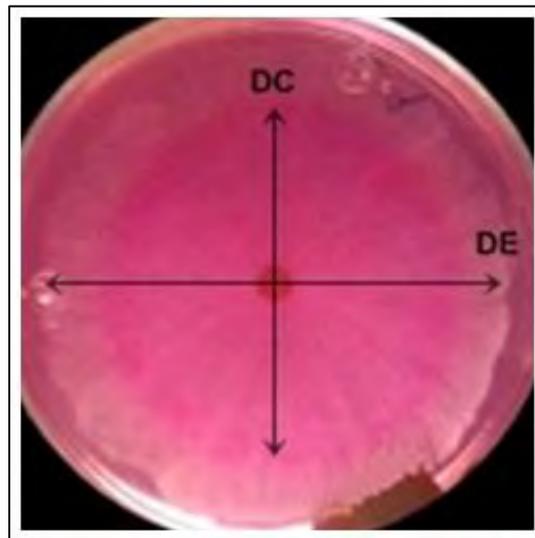
**Figura 6.** Curvas de crecimiento de los aislados A) B4 y B) 411A de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. Las curvas se llevaron a cabo en medio Sabouraud (S), Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (S+R) y medio de Kothary *et al.* (1984) (K). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Como se muestra en las figuras 5 y 6, el crecimiento de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* es más lento en el medio de Kothary *et al.* (1984) que en Sabouraud.

Respecto al tamaño de inóculo, se decidió descartar el inóculo de  $1 \times 10^5$  conidios/mL ya que a esta concentración, el crecimiento era muy lento, y en el

medio de Kothary *et al.* (1984) no se logró observar halo de degradación a diferencia de los otros inóculos.

Al evaluar los inóculos de  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  conidios/mL en medios de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de fosfatos y boratos, se disminuyó a 7  $\mu$ L la cantidad de inóculo que se colocaba sobre el papel filtro, ya que con 10  $\mu$ L, el disco se movía y en ocasiones se despegaba del medio. Se observó que todos los aislados crecieron tanto en medio de Kothary *et al.* (1984) preparado con el amortiguador de fosfatos, como con el amortiguador de boratos; sin embargo, el halo de la degradación de la elastina fue más evidente en el amortiguador de fosfatos; en algunas muestras, el halo de lisis comenzó a desarrollarse al día 4; aunque éste no era muy marcado. En la **Figura 7** se muestra un aislado que presentó lisis de elastina; donde el crecimiento se observa como una zona delimitada por un color rosa oscuro, rodeada por un halo de lisis, presentando una coloración más clara.



**Figura 7.** Halo de lisis de elastina generado por el aislado MM-20 de *A. fumigatus* sección *Fumigati* en medio de Kothary *et al.* (1984). DC, Diámetro de crecimiento; DE, Diámetro de actividad de elastasa.

Con los resultados obtenidos durante la estandarización de las condiciones se pudieron realizar las mediciones y calcular el IAE. En la **Tabla 2**, se pueden observar los resultados de la producción de elastasa en el medio de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de fosfatos; para ambos inóculos ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^6$

conidios/mL) los valores de los IAE son mayores en el día 7 y para el día 10 comienzan a disminuir; no obstante que en el día 15 hubo buen crecimiento de los aislados, la degradación de la elastina ya no era visible, por lo que no fue posible determinar el IAE. Se obtuvieron mejores lecturas de los diámetros tanto de crecimiento como del halo de lisis en el inóculo de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, por lo que éste se consideró el tamaño de inóculo más adecuado.

**Tabla 2.** Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* sección *Fumigati* en medio de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de fosfatos 0.05M pH 7.6.

$1 \times 10^7$ conidios/mL				$1 \times 10^6$ conidios/mL			
Aislado	IAE			Aislado	IAE		
	7 (d)	10 (d)	15 (d)		7 (d)	10 (d)	15 (d)
C-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	C-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9A	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	ND	9A	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	ND
A10	1.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	ND	A10	0.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	ND
B4	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.1	ND	B4	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	ND
411A	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	ND	411A	1.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0	ND

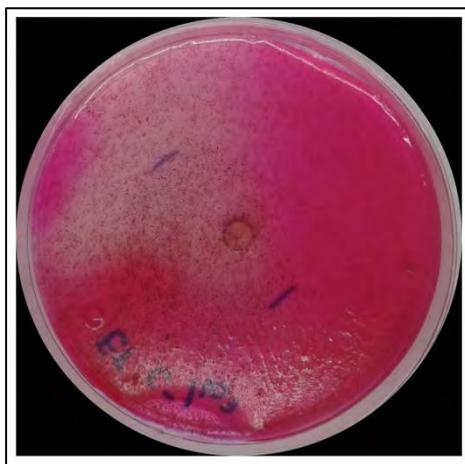
C-: Testigo negativo (*A. niger*); ND: No determinado; d: días

Cuando el medio de Kothary *et al.* (1984) fue preparado con amortiguador de boratos (**Tabla 3**) los resultados fueron inconsistentes, comenzando por el hecho de que el testigo negativo en la mayor concentración del inóculo parecía degradar la elastina al tornar el medio de un color transparente (**Figura 8**). Por otro lado, los IAE en algunos aislados disminuyeron para el día 10 y en otros casos aumentaba y para el día 15 ya no se observaba halo de lisis de la elastina.

**Tabla 3.** Índices de actividad de elastasa (IAE) de aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* en medio de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de boratos 0.05M pH 7.6.

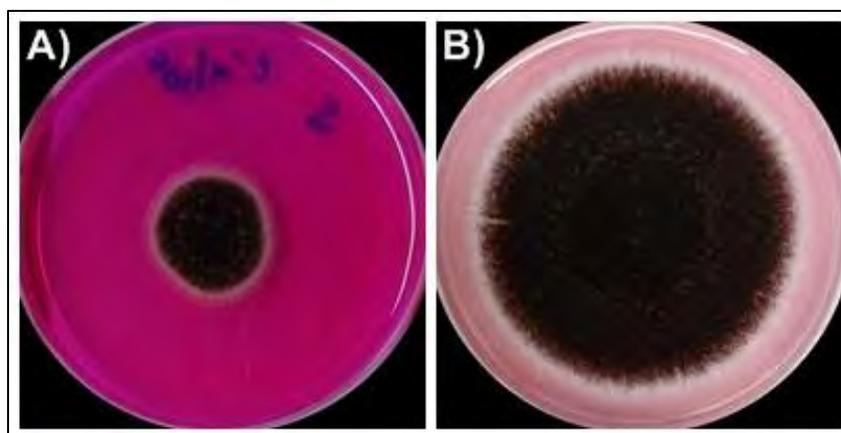
1x10 <sup>7</sup> conidios/mL				1x10 <sup>6</sup> conidios/mL			
Aislado	IAE			Aislado	IAE		
	7 (d)	10 (d)	15 (d)		7 (d)	10 (d)	15 (d)
<b>C-</b>	*	*	*	<b>C-</b>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<b>9A</b>	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.0	ND	<b>9A</b>	1.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	ND
<b>A10</b>	0.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	ND	<b>A10</b>	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	ND
<b>B4</b>	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2	ND	<b>B4</b>	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	ND
<b>411A</b>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	ND	<b>411A</b>	1.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	ND

\*Alrededor de la colonia, el medio se observaba transparente; ND: No Determinado; d: días



**Figura 8.** Decoloración del medio de Kothary *et al.* (1984) causado por *A. niger*.

Al repetir el experimento, se observó que *A. niger* generaba resultados falsos positivos, ya que el medio se tornó más claro, en la **Figura 9** se muestra el crecimiento del hongo en Sabouraud con rosa de bengala en los días 3 y 7; en este último se observa como el medio ha pasado de tener un color rosa fuerte a uno más claro.



**Figura 9.** Crecimiento de *A. niger* en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% en el día A) 3 y B) 7.

Al incluir las muestras clínicas (**Tabla 4**), nuevamente se observó que las lecturas óptimas de la actividad de elastasa son en el día 7, mientras que en el día 10 disminuyen y para el día 15 ya no se pueden determinar. De los seis aislados evaluados, los de origen clínico mostraron índices altos de actividad de elastasa en comparación con las muestras ambientales, a excepción de la cepa ambiental A10. Como se mencionó anteriormente, también se realizó el experimento en medio de Kothary *et al.* (1984) con amortiguador de boratos; sin embargo, fueron pocos los aislados que crecieron y ninguno presentó degradación de la elastina.

**Tabla 4.** Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* sección *Fumigati* en medio de Kothary *et al.* (1984) en amortiguador de fosfatos 0.05M pH 7.6. El inóculo utilizado fue de  $1 \times 10^7$  conidios /mL.

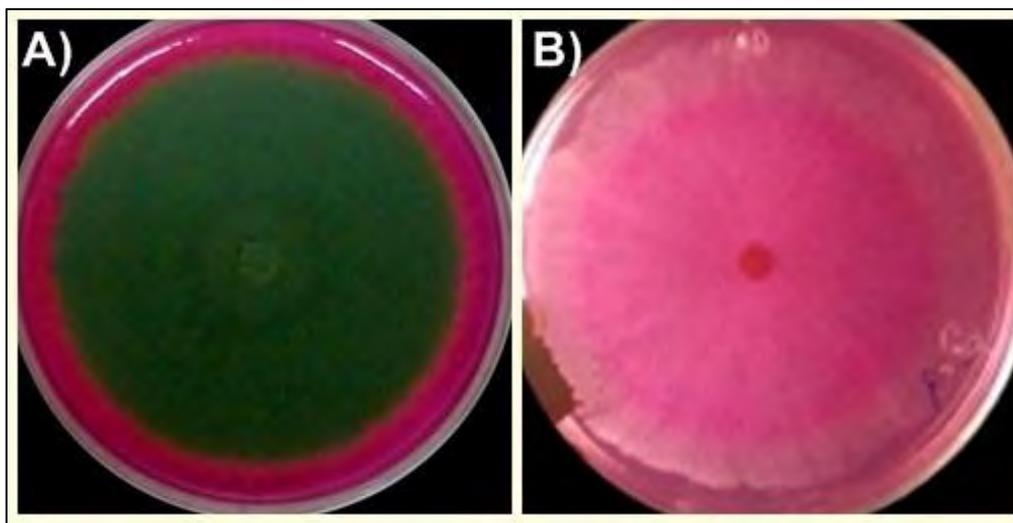
	Aislado	IAE		
		7(d)	10(d)	15(d)
	C-	*	*	*
Aislados ambientales	A10	1.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	ND
	257C	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	ND
	411A	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	ND
Aislados clínicos	205-M	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1	ND
	MM-16	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	ND
	MM-20	1.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	ND

\*Alrededor de la colonia el medio se hallaba transparente ND: No Determinado: d: días

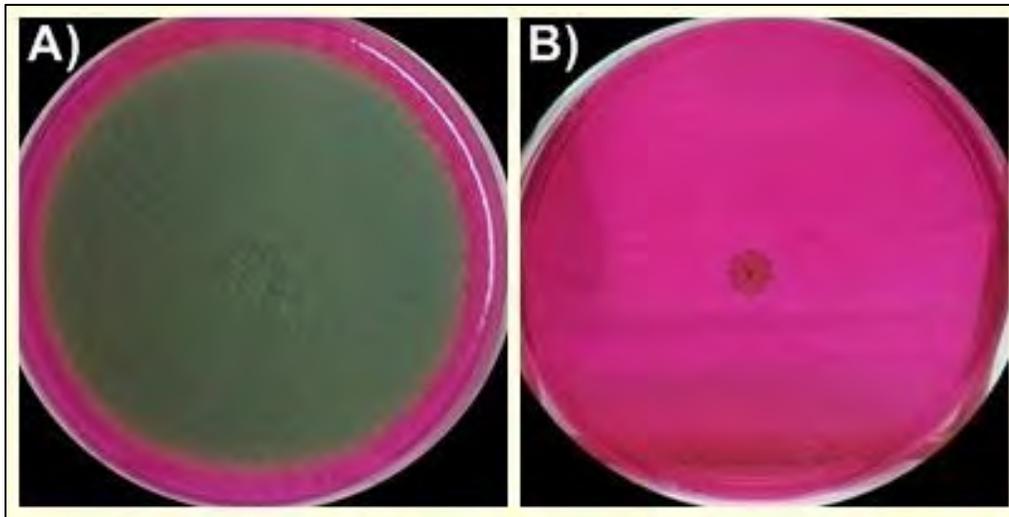
Con base en los resultados obtenidos, finalmente se estableció que las condiciones óptimas para realizar la determinación de la actividad de elastasa fueron: 7  $\mu$ L de inóculo con  $1 \times 10^7$  conidios/mL, el tiempo para medir el crecimiento y la lisis fue el día 7 en medio de Kothary *et al.* (1984), preparado con amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 7.6). Se descartó a *A. niger* como testigo negativo, y se eligió el medio de cultivo sin elastina como testigo negativo para la producción de elastasa.

## 7.2. Determinación de la actividad de elastasa

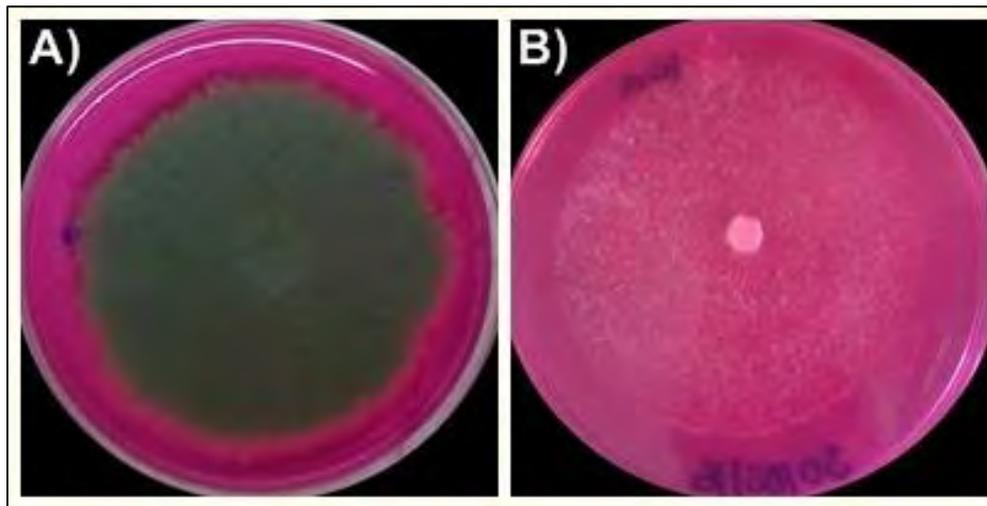
De los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* evaluados, el 86.2% mostró actividad de elastasa al degradar la elastina presente en el medio y formar el respectivo halo de lisis (**Figura 10**); mientras que el 13.8% de los aislados, sólo crecieron en el medio de cultivo pero no presentaron actividad de elastasa; dentro de éstos se hallaban algunos cuyo crecimiento era escaso o nulo en el medio de cultivo y por ende no producían halo de lisis, y otros que a pesar de tener buen crecimiento, no degradaron la elastina presente en el medio (**Figuras 11 y 12**).



**Figura 10.** Actividad de elastasa en el aislado 636-M: A) crecimiento en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y B) crecimiento en medio de Kothary *et al.* (1984), en el día 7.



**Figura 11.** Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado 392-A: A) crecimiento en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y B) crecimiento escaso en medio de Kothary *et al.* (1984), en el día 7.

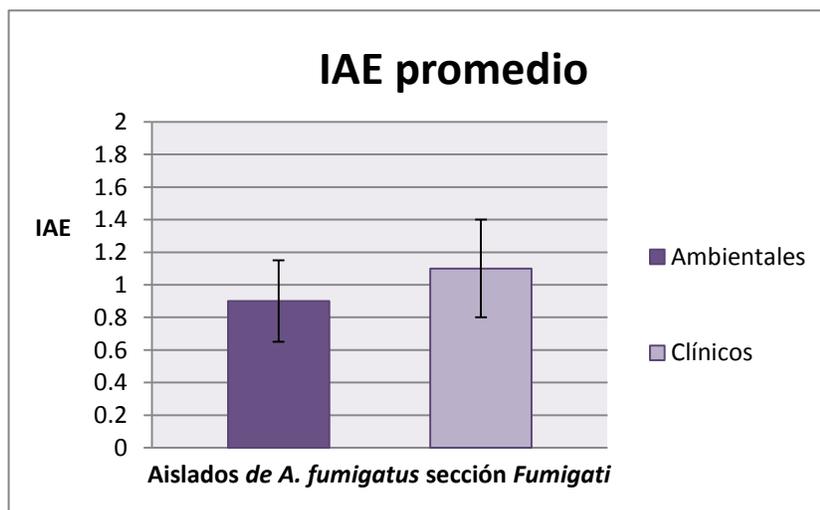


**Figura 12.** Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado B23: A) crecimiento en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y B) crecimiento en medio de Kothary *et al.* (1984), en el día 7.

Los diámetros de crecimiento y del halo de lisis de cada aislado junto con sus respectivos promedios del IAE se muestran en la **Tabla 5** para los de origen ambiental y en la **Tabla 6** los de origen clínico.

Tanto en aislados ambientales como clínicos, se encontraron valores altos, bajos e incluso nulos de IAE; no obstante que el promedio del IAE de los aislados ambientales fue menor ( $M = 0.9$ ;  $DS = 0.5$ ) en comparación con los aislados clínicos ( $M = 1.1$ ;  $DS = 0.6$ ), no hubo diferencia significativa entre los valores del

IAE de ambos aislados; ya que el estadístico H supera el valor de p establecido como límite (DF=1, H=0.11,  $p > 0.05$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Promedio del índice de Actividad de Elastasa (IAE) en los aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.

**Tabla 5.** Índices de Actividad de Elastasa (IAE) de aislados ambientales de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Aislado		Diámetro de crecimiento (cm)	Diámetro del halo de lisis (cm)	IAE	IAE Promedio $\pm$ DS
9A	a	3.0	6.0	2.0	<b>1.8 <math>\pm</math> 0.2</b>
	b	4.3	6.7	1.6	
	c	3.2	6.0	1.9	
A10	a	4.8	6.3	1.3	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	5.2	6.0	1.2	
	c	4.2	5.2	1.2	
A28	a	6.4	7.0	1.1	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	6.6	7.5	1.1	
	c	6.8	7.5	1.1	
A35	a	6.5	7.3	1.1	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	7.0	7.5	1.1	
	c	6.6	7.5	1.1	
A36	a	7.0	0.0	0.0	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	7.0	0.0	0.0	
	c	7.0	0.0	0.0	

<b>176A</b>	<b>a</b>	5.3	6.5	1.2	<b>1.3 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.3	7.0	1.3	
	<b>c</b>	5.7	7.2	1.3	
<b>222A</b>	<b>a</b>	6.4	6.0	0.9	<b>1.0 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.5	7.0	1.1	
	<b>c</b>	6.6	7.0	1.1	
<b>233A</b>	<b>a</b>	3.5	5.5	1.6	<b>1.4 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	3.5	5.0	1.4	
	<b>c</b>	4.5	5.8	1.3	
<b>235A</b>	<b>a</b>	7.0	7.0	1.0	<b>1.1 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.7	7.0	1.0	
	<b>c</b>	6.3	7.0	1.1	
<b>257C</b>	<b>a</b>	6.5	7.5	1.2	<b>1.1 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.5	7.5	1.2	
	<b>c</b>	6.8	7.4	1.1	
<b>B4</b>	<b>a</b>	6.5	4.0	0.6	<b>0.6 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.8	4.7	0.7	
	<b>c</b>	7.0	4.3	0.6	
<b>B11</b>	<b>a</b>	7.0	7.0	1.0	<b>1.0 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.7	7.5	1.1	
	<b>c</b>	7.8	7.3	0.9	
<b>B18</b>	<b>a</b>	6.6	7.5	1.1	<b>1.1 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.6	7.5	1.1	
	<b>c</b>	6.5	7.5	1.2	
<b>B20</b>	<b>a</b>	7.5	7.5	1.0	<b>1.1 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	7.5	7.5	1.0	
	<b>c</b>	6.5	7.5	1.2	
<b>B21</b>	<b>a</b>	5.6	7.0	1.3	<b>1.1 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	7.0	7.5	1.1	
	<b>c</b>	6.8	7.0	1.0	
<b>B23</b>	<b>a</b>	7.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	7.0	0.0	0.0	
	<b>c</b>	7.0	0.0	0.0	
<b>B43</b>	<b>a</b>	7.0	6.0	0.9	<b>0.8 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	7.0	5.0	0.7	
	<b>c</b>	6.9	6.0	0.9	
<b>100A</b>	<b>a</b>	7.0	5.0	0.7	<b>0.8 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.9	6.0	0.9	

	<b>c</b>	7.0	6.0	0.9	
<b>262A</b>	<b>a</b>	5.6	6.5	1.2	<b>1.2 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.7	7.1	1.2	
	<b>c</b>	5.5	6.6	1.2	
<b>270B</b>	<b>a</b>	4.5	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	4.8	0.0	0.0	
	<b>c</b>	4.0	0.0	0.0	
<b>312B</b>	<b>a</b>	4.0	5.0	1.3	<b>1.3 ± 0.4</b>
	<b>b</b>	4.2	5.5	1.3	
	<b>c</b>	4.2	5.4	1.3	
<b>314A</b>	<b>a</b>	6.0	6.5	1.1	<b>1.1 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.2	7.0	1.1	
	<b>c</b>	6.5	6.5	1.0	
<b>373C</b>	<b>a</b>	5.8	6.2	1.1	<b>1.1 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.5	6.2	1.1	
	<b>c</b>	5.4	6.0	1.1	
<b>385B</b>	<b>a</b>	6.8	7.5	1.1	<b>1.1 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.8	7.5	1.1	
	<b>c</b>	7.0	7.5	1.1	
<b>392A</b>	<b>a</b>	0.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	0.0	0.0	0.0	
	<b>c</b>	0.0	0.0	0.0	
<b>394A</b>	<b>a</b>	6.0	7.5	1.3	<b>1.2 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.6	7.0	1.3	
	<b>c</b>	5.7	7.0	1.2	
<b>411A</b>	<b>a</b>	5.7	6.5	1.1	<b>1.1 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.3	6.9	1.1	
	<b>c</b>	6.3	6.8	1.1	
<b>435A</b>	<b>a</b>	7.0	4.3	0.6	<b>0.6 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	6.7	4.3	0.6	
	<b>c</b>	6.7	4.3	0.6	

Letras a, b y c indican los triplicados de cada aislado.

**Tabla 6.** Índices de Actividad de Elastasa (IAE) de aislados clínicos de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Aislado		Diámetro de crecimiento (cm)	Diámetro del halo de lisis (cm)	IAE	IAE Promedio $\pm$ DS
19-M	a	6.2	6.7	1.1	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	6.4	7.0	1.1	
	c	6.5	7.0	1.1	
141-M	a	4.2	4.2	1.0	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.2</b>
	b	3.3	4.2	1.3	
	c	3.3	4.2	1.3	
205-M	a	5.5	7.0	1.3	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
	b	5.0	6.0	1.2	
	c	5.5	7.2	1.3	
636-M	a	5.0	5.0	1.0	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.2</b>
	b	5.5	7.0	1.3	
	c	6.5	7.5	1.2	
380-M	a	4.3	5.5	1.3	<b>1.4 <math>\pm</math> 0.1</b>
	b	4.5	6.0	1.3	
	c	4.0	6.0	1.5	
918-M	a	6.0	6.5	1.1	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.1</b>
	b	5.8	7.0	1.2	
	c	6.0	7.0	1.2	
149-M	a	6.3	6.7	1.1	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	5.9	6.5	1.1	
	c	5.4	6.2	1.1	
576-M	a	3.5	6.0	1.7	<b>1.7 <math>\pm</math> 0.0</b>
	b	3.3	5.5	1.7	
	c	3.5	6.0	1.7	
154-M	a	3.3	5.0	1.5	<b>1.5 <math>\pm</math> 0.1</b>
	b	3.8	5.5	1.4	
	c	3.3	5.2	1.6	
21-M	a	4.2	5.5	1.3	<b>1.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
	b	4.3	6.0	1.4	
	c	5.0	6.2	1.2	

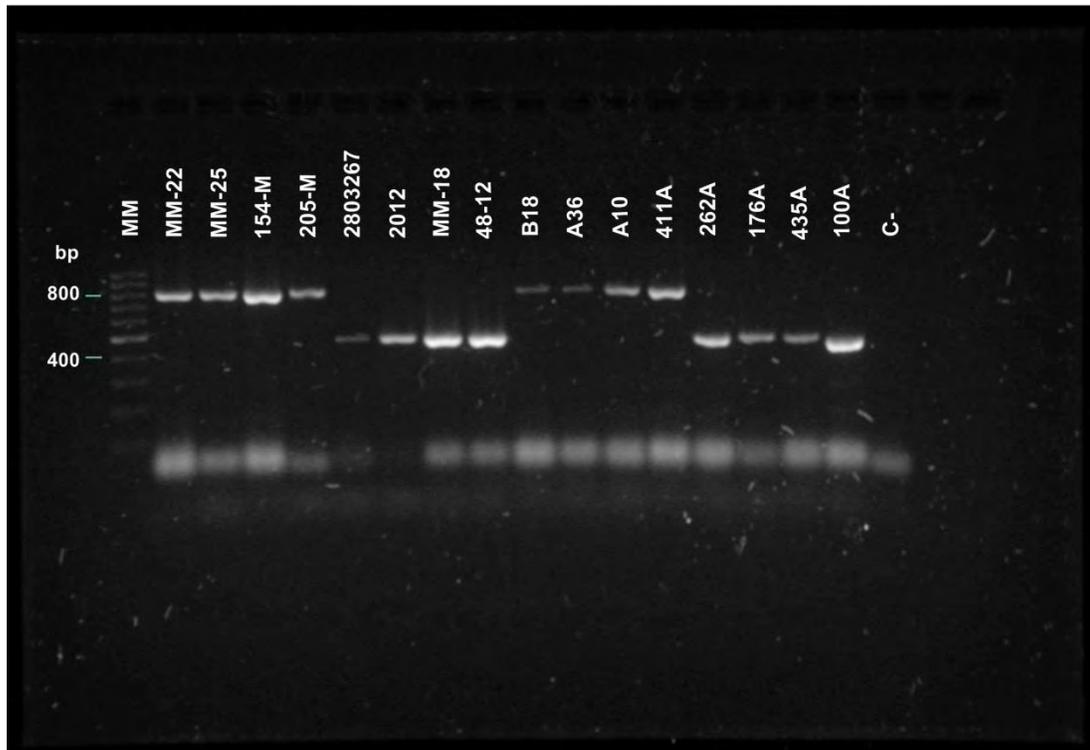
<b>2803267</b>	<b>a</b>	5.0	0.0	0.0	<b>0.3 ± 0.2</b>
	<b>b</b>	6.0	2.5	0.4	
	<b>c</b>	6.0	2.3	0.4	
<b>2012</b>	<b>a</b>	6.0	4.5	0.8	<b>0.6 ± 0.2</b>
	<b>b</b>	5.0	2.0	0.4	
	<b>c</b>	5.5	3.5	0.6	
<b>2013</b>	<b>a</b>	6.0	6.5	1.1	<b>1.2 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	5.8	7.0	1.2	
	<b>c</b>	6.0	7.0	1.2	
<b>128-12</b>	<b>a</b>	3.0	5.0	1.7	<b>1.7 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	3.0	5.0	1.7	
	<b>c</b>	3.0	5.0	1.7	
<b>48-12</b>	<b>a</b>	0.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	0.0	0.0	0.0	
	<b>c</b>	0.0	0.0	0.0	
<b>MM-12</b>	<b>a</b>	7.5	7.5	1.0	<b>1.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	7.5	7.5	1.0	
	<b>c</b>	7.5	7.5	1.0	
<b>MM-13</b>	<b>a</b>	5.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.0	0.0	0.0	
	<b>c</b>	5.0	0.0	0.0	
<b>MM-14</b>	<b>a</b>	6.1	7.0	1.1	<b>1.2 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.4	7.2	1.1	
	<b>c</b>	6.0	7.5	1.3	
<b>MM-15</b>	<b>a</b>	5.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	4.5	0.0	0.0	
	<b>c</b>	4.5	0.0	0.0	
<b>MM-16</b>	<b>a</b>	5.0	0.0	0.0	<b>0.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.0	0.0	0.0	
	<b>c</b>	4.5	0.0	0.0	
<b>MM-17</b>	<b>a</b>	6.0	7.0	1.2	<b>1.2 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	5.9	7.0	1.2	
	<b>c</b>	6.0	7.0	1.2	
<b>MM-18</b>	<b>a</b>	6.1	2.1	0.3	<b>0.3 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.0	2.5	0.4	
	<b>c</b>	6.4	2.2	0.3	
<b>MM-19</b>	<b>a</b>	4.0	6.0	1.5	<b>1.7 ± 0.3</b>
	<b>b</b>	3.0	6.0	2.0	

	<b>c</b>	3.0	5.0	1.7	
<b>MM-20</b>	<b>a</b>	5.0	6.9	1.4	<b>1.4 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	5.3	6.7	1.3	
	<b>c</b>	5.1	6.9	1.4	
<b>MM-21</b>	<b>a</b>	6.0	6.5	1.1	<b>1.1 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	6.7	6.7	1.0	
	<b>c</b>	6.3	7.0	1.1	
<b>MM-22</b>	<b>a</b>	2.3	5.5	2.4	<b>1.9 ± 0.4</b>
	<b>b</b>	3.0	5.0	1.7	
	<b>c</b>	3.0	5.0	1.7	
<b>MM-23</b>	<b>4.5</b>	4.5	5.0	1.1	<b>1.0 ± 0.1</b>
	<b>4.5</b>	4.5	5.0	1.1	
		5.5	5.0	0.9	
<b>MM-24</b>	<b>a</b>	3.0	3.0	1.0	<b>1.0 ± 0.0</b>
	<b>b</b>	3.2	3.2	1.0	
	<b>c</b>	4.0	4.0	1.0	
<b>MM-25</b>	<b>a</b>	4.3	6.2	1.4	<b>1.3 ± 0.1</b>
	<b>b</b>	4.8	6.0	1.3	
	<b>c</b>	5.0	6.3	1.3	
<b>MM-26</b>	<b>a</b>	3.0	6.0	2.0	<b>1.8 ± 0.2</b>
	<b>b</b>	3.5	6.0	1.7	
	<b>c</b>	3.5	6.2	1.8	

Letras a, b y c indican los triplicados de cada aislado.

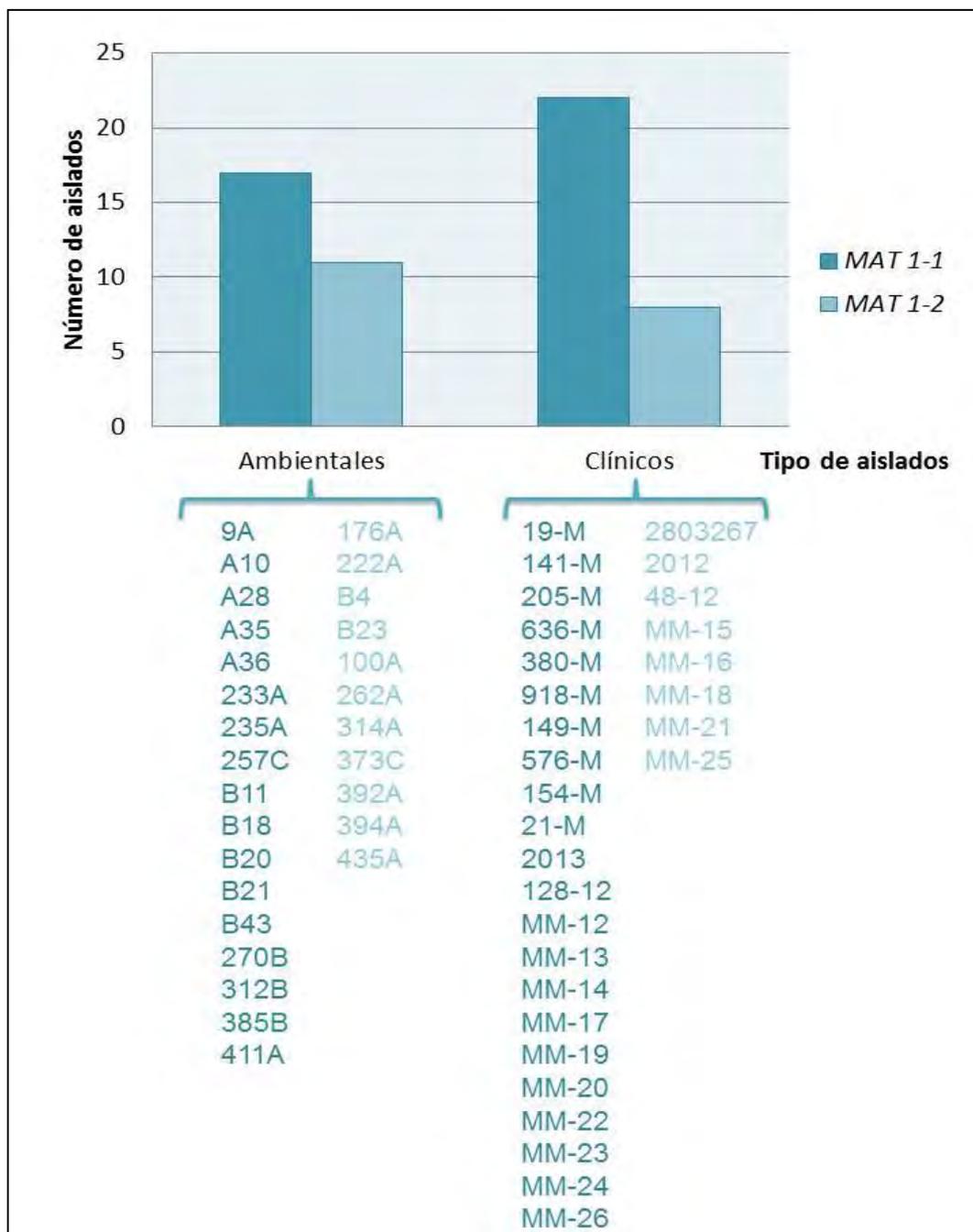
### 7.3. Determinación del genotipo sexual

El tipo sexual de cada aislado fue determinado de acuerdo al tamaño del producto de amplificación (834 bp para el genotipo *MAT1-1* y 438 bp para el genotipo *MAT1-2*) observado en la electroforesis (**Figura 14**).



**Figura 14.** Determinación, por PCR, del genotipo sexual *MAT1-1* y *MAT1-2* de aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. Los primeros ocho aislados son de origen clínico y los ocho restantes de origen ambiental. MM: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. C-: Testigo negativo.

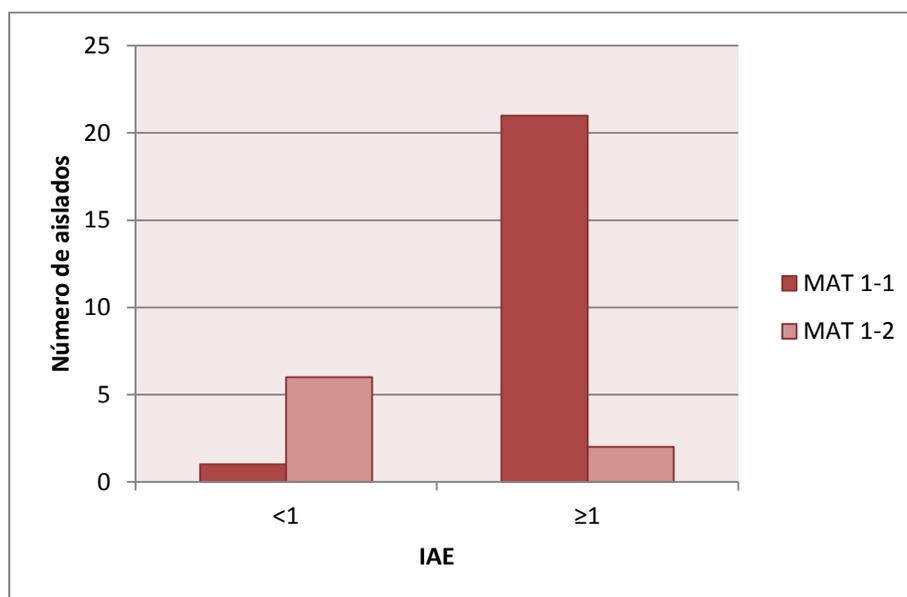
De los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, el 67.3% presentó el genotipo *MAT1-1* mientras que el 32.7% fue *MAT1-2*, tanto en los aislados ambientales como en los clínicos, el genotipo predominante fue *MAT1-1* (**Figura 15**).



**Figura 15.** Distribución del genotipo *MAT1-1* y *MAT1-2* en los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*

Para determinar la correlación entre el genotipo sexual y la actividad de elastasa en los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, se consideraron valores altos de la actividad enzimática aquellos cuyos IAE fueran mayores o iguales a 1 y valores bajos, aquellos cuyo IAE fuera menor a 1 (Blanco *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*,

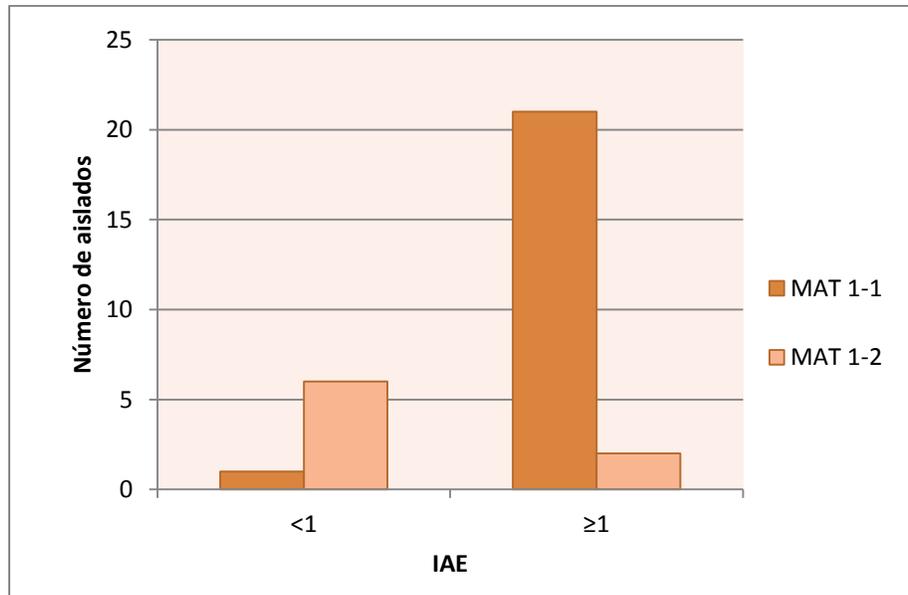
2010). Como se observa en la Fig.16 la mayoría de los aislados, tanto ambientales como clínicos, que presentaron un IAE  $\geq 1$  correspondían a aquellos cuyo genotipo sexual fue *MAT1-1*.



**Figura 16.** Distribución de los índices de Actividad de Elastasa (IAE) respecto al genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) en aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.

Cuando los resultados fueron analizados estadísticamente, la correlación entre el genotipo sexual *MAT1-1* y los índices altos de la actividad de elastasa (IAE  $\geq 1$ ) fue significativa ( $\chi^2_c = 15.12 > \chi^2_t = 3.84$ ,  $P=0.05$ ).

Al evaluar, solamente los aislados de origen clínico (**Figura 17**), nuevamente el genotipo predominante fue *MAT1-1*; obteniéndose una correlación significativa entre éste y un IAE  $\geq 1$  ( $\chi^2_c = 15.7 > \chi^2_t = 3.84$ ,  $P=0.05$ ).



**Figura 17.** Distribución de los índices de Actividad de Elastasa (IAE) respecto al genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) en aislados clínicos de *A.fumigatus* sección *Fumigati*.

## 8. DISCUSIÓN

Los trabajos experimentales que se han realizado con el fin de relacionar la ocurrencia del tipo sexual con la patogenicidad en *A. fumigatus* son escasos (Álvarez *et al.*, 2009, 2010b), además ninguno de ellos ha considerado realizar una identificación taxonómica del hongo, lo cual resulta inquietante, porque *A. fumigatus* es en realidad un complejo de especies, cuyos miembros poseen morfología similar, pero presentan diferentes perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos y patogenicidad (Samson *et al.*, 2007, 2014; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2014; Giray *et al.*, 2016). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar si existe correlación entre el IAE, *in vitro*, y el genotipo sexual (*MAT1-1* o *MAT1-2*) en aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, los cuales fueron previamente identificados con base en características micro y macromorfológicas, así como mediante la secuenciación de un fragmento del gene  $\beta$ -tubulina (Díaz Lomelí, 2015; Rosas de Paz, 2015).

Para realizar la determinación del IAE, se utilizó el medio de cultivo descrito por Kothary *et al.* (1985), quienes fueron los primeros en evaluar la producción de elastasa de *A. fumigatus* en un modelo murino. Inicialmente, se constató que el rosa de bengala contenido en el medio, limitara el rápido crecimiento del hongo y permitiera monitorear su desarrollo por más de siete días, como reportaron Kothary *et al.* (1984), al realizar las curvas de crecimiento se confirmó la disminución de éste en los medios que contenían el colorante, permitiendo realizar el monitoreo por más de diez días, a diferencia de lo que se observó en medio Sabouraud, donde el desarrollo de las colonias fue dentro de los primeros cinco días de incubación, como se reporta en la literatura (Latgé, 1999).

Por otro lado, se esperaba que la tasa de crecimiento de los aislados en el medio de Kothary *et al.* (1984) fueran similares al presentado en agar Sabouraud con rosa de bengala; sin embargo, el comportamiento no fue el mismo ya que su crecimiento fue aún más lento, lo que permitió evaluar el IAE a 10 días. Esto podría deberse a que los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* no asimilan rápidamente la elastina y requieren de mayor tiempo para expresar la actividad proteolítica y así degradar el principal sustrato del medio; razón por la cual en otros estudios evalúan la actividad de elastasa durante 15 días (Blanco *et al.* 2002; Álvarez *et al.*, 2010; Khosravi *et al.*, 2012).

Durante la estandarización de la metodología para la determinación del IAE, también se tomó en cuenta que la elastina se degrada a elevadas temperaturas, ya que en algunos estudios, el medio se esterilizaba en autoclave, sin considerar la posible desnaturalización de la proteína, de manera que no se podía determinar con certeza si el halo de lisis se debía a la elastasa o a otras proteasas que pudieran haber sido activadas por la degradación de la elastina durante la esterilización (Kothary *et al.* 1984).

Así mismo, aunque se trataba de un modelo *in vitro*, se procuró que las condiciones en el experimento fueran similares a las de una infección por *A. fumigatus* a nivel fisiológico, por esto se probó el medio preparado con amortiguador de boratos (Macarulla *et al.*, 1994; Lodish, 2005) y con uno de

fosfatos, manteniendo la misma concentración y pH. La producción del halo de lisis fue más evidente en el medio preparado con el amortiguador de fosfatos, en comparación con el de boratos; aun cuando la actividad enzimática óptima de la elastasa está reportada en éste último (Shotton, 1970); esta diferencia pudiera atribuirse al hecho de que en este trabajo se evaluó la actividad producida por un microorganismo al momento de cultivarlo en presencia del sustrato y no a partir de la enzima purificada, como reporta Shotton (1970).

Durante la estandarización, se había incluido un aislado de *A. niger* como testigo negativo; sin embargo, se observó decoloración tanto en el medio de Kothary *et al.* (1984) como en el medio que sólo contenía rosa de bengala. Esto puede deberse a que se ha reportado la actividad de elastasa en aislados de *A. niger* (Alp *et al.*, 2008), o a que probablemente el hongo puede estar utilizando al rosa de bengala como nutriente o secretar alguna sustancia al medio que propicie la decoloración y genere resultados falsos positivos en las lecturas. Por estas razones, se descartó la utilización de este hongo como testigo negativo.

Una vez estandarizada la metodología, se analizó la actividad de elastasa en los 58 aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, de origen ambiental y clínico. Con base en lo reportado en estudios previos (Blanco *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2010), se esperaba que todos los aislados de origen clínico presentaran valores altos de IAE y valores bajos en aislados ambientales; sin embargo, esto no ocurrió, ya que se encontraron valores altos de IAE en algunos aislados ambientales e índices bajos o nulos en aislados clínicos. No obstante que el promedio del IAE de los aislados de origen ambiental fue menor en comparación con el promedio obtenido para los aislados clínicos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre éstos, lo que indica que todos los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, independientemente de su origen, tienen la capacidad de expresar la elastasa. El hecho de que algunos aislados clínicos presentaran baja actividad de elastasa puede atribuirse a que probablemente el hongo no provenía de una aspergilosis invasiva, sino de algún proceso colonizador, o bien, a una atenuación en la patogenicidad de los aislados clínicos como consecuencia de resiembras

consecutivas del hongo (Cheema *et al.*, 2011), ya que los aislados clínicos con los que se trabajó no eran primoaislamientos. No obstante, no podemos afirmar que los aislados, ambientales o clínicos, que presentaron poca o nula actividad de elastasa no son patógenos, pues se ha visto que aun cuando los aislados de *Aspergillus* carecen de la actividad de elastasa, son capaces de colonizar los tejidos; y que, después de inoculaciones sucesivas, la actividad de elastasa aumenta debido a una adaptación del hongo a las condiciones del medio donde se desarrolla (García *et al.*, 2006).

Cuando se determinó el genotipo *MAT* de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, se observó que el genotipo *MAT1-1* predominó, tanto en aislados clínicos como ambientales; lo que concuerda con lo descrito por Álvarez-Pérez *et al.* (2010), quienes observaron una mayor proporción de aislados *MAT1-1* en casos de aspergilosis invasiva en comparación con los obtenidos de otras fuentes, sugiriendo la posible asociación entre el genotipo sexual y la invasividad de los aislados. Además, los autores mencionan que la distribución de ambos genotipos sexuales (*MAT1-1* y *MAT1-2*) es similar en muestras procedentes de procesos no invasivos y del ambiente; sin embargo, en las muestras ambientales evaluadas en el presente estudio, el genotipo *MAT1-1* prevaleció sobre el genotipo *MAT1-2*. Estos resultados también contrastan con lo reportado por Paoletti *et al.* (2005), quienes encontraron que la frecuencia del genotipo en aislados clínicos era similar a la de los ambientales; mientras que Bain *et al.* (2007) reportaron una mayor frecuencia del genotipo *MAT1-2*.

Cuando se analizó si existía correlación entre el genotipo sexual y la actividad de elastasa presente en los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*; se encontró que el genotipo *MAT1-1* se asociaba con valores altos de IAE, como se esperaba de acuerdo con lo reportado en la literatura (Alvárez-Pérez *et al.*, 2010; Cheema *et al.*, 2011). La correlación existente entre el genotipo sexual y la actividad de elastasa nos indica que, si bien la actividad de esta enzima se encuentra en aislados clínicos y ambientales por igual, es el genotipo *MAT1-1* que puede influir en la invasividad del hongo (Alvárez-Pérez *et al.* 2010; Cheema *et al.* 2011).

Cabe destacar que esta asociación entre el genotipo sexual y la virulencia no sólo se encuentra en *Aspergillus*, sino también en otros patógenos, como *C. neoformans*, en donde se ha observado que en la variedad *neoformans* (Serotipo D), el genotipo sexual  $\alpha$  es más virulento que el genotipo *a* (Nielsen *et al.* 2005). Con lo anterior, queda en evidencia que la presencia de genes involucrados en el ciclo sexual de *A. fumigatus* sección *Fumigati* puede ser una herramienta valiosa para determinar la patogenicidad del hongo en aislados ambientales, especialmente del entorno hospitalario de pacientes susceptibles a la aspergilosis invasiva, como son los pacientes sometidos a algún tipo de trasplante; y con esto determinar las estrategias más adecuadas para la prevención y control de esta micosis.

## 9. CONCLUSIONES

Se encontró una correlación entre la actividad de elastasa y el genotipo sexual (*MAT1-1*) en los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. Dentro de estos aislados se observó que la actividad de elastasa no depende del origen de los aislados; de manera que, todos tienen el potencial de causar una infección.

Al observarse que el genotipo *MAT1-1* se correlacionó con aislados que presentaron valores altos de IAE, este genotipo puede tener un papel importante como marcador del potencial patogénico de los aislados.

## 10. PERSPECTIVAS

Utilizar la PCR múltiple para detectar el genotipo sexual en aislados de *A. fumigatus* como un monitoreo en el ambiente de hospitales; si las muestras presentan una alta proporción del genotipo *MAT1-1*, esto podría ser un indicador para tomar mayores medidas preventivas en aquellos pacientes que son susceptibles a contraer alguna infección.

## 11. REFERENCIAS

1. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(4):155-182.
2. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela J. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1244-1251.
3. Alp S, Arikan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol.* 2008;48(5):331-337.
4. Álvarez-Pérez S, Blanco J, Alba P, García M. Sexualidad y patogenicidad en *Aspergillus fumigatus*: ¿existe alguna relación? *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(1):1-5.
5. Álvarez-Pérez S, Blanco J, Alba P, Garcia M. Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2010;48(2):273-277.
6. Álvarez-Pérez S, Garcia M, Bouza E, Pelaez T, Blanco J. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. *Med Mycol.* 2009;47(6):601-608.
7. Askew D. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):331-337.
8. Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, Alvar Ezquerro J. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006.

9. Bain J, Tavanti A, Davidson A, Jacobsen M, Shaw D, Gow N *et al.* Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2007;45(5):1469-1477.
10. Barnes P, Marr K. Aspergillosis: Spectrum of disease, diagnosis, and treatment. Infect Dis Clin North Am. 2006;20(3):545-561.
11. Blanco J, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T, Muñoz P, *et al.* Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1811-1813.
12. Bonifaz A. Micología médica. 4a ed. México: Mc Graw Hill; 2012.
13. Cadena J, Thompson G, Patterson T. Invasive aspergillosis. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(1):125-142.
14. Cheema M, Christians J. Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2011;49(2):202-207.
15. Dagenais TKeller N. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 2009;22(3):447-465.
16. Díaz Lomelí P. Utilización de la secuencia parcial del gene de actina (act) para diferenciar aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos de ambientes intrahospitalarios. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
17. Fernández J, Abad A, Sueiro M, Pellon A, Ramírez A, Garaizar J *et al.* Rapid and specific detection of section *Fumigati* and *Aspergillus fumigatus* in human samples using a new multiplex real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80(2):111-118.
18. Frisvad JC, Larsen TO. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. Front Microbiol 2016;6:1-14.

19. Gams W, Christensen M, Onions AH. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Pitt JI, Samson RA., editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press; New York: 1985:55 – 62.
20. García M, Caballero J, Blanco I, Cruzado M, Costas E, Blanco J. Changes in the elastase activity and colonization ability of *Aspergillus fumigatus* after successive inoculations in mice. *Rev Iberoam Micol*. 2006;23:221-223.
21. Geiser D, Klich M, Frisvad J, Peterson S, Varga J, Samson R. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2007;59:1-10.
22. Geltner C, Lass-Flörl C. Invasive pulmonary aspergillosis in organ transplants – Focus on lung transplants. *Respir Investig*. 2016;54(2):76-84.
23. Giray B, Kocaöğüt E, B. Uçar F, Haliki-Uztan A. Genotypic discrimination of *Aspergillus fumigatus* strain from related species within section *Fumigati*. *Ann Agric Env iron Med*. 2016;23(3):448-451.
24. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(1):33-39.
25. Hawksworth D. Separate name for fungus's sexual stage may cause confusion. *Nature*. 2009;458(7234):29-29.
26. Khosravi A, Mahdavi Omran S, Shokri H, Lotfi A, Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. *J Med Mycol*. 2012;22(2):167-172.
27. Kimbel P. Proteolytic lung damage. *Chest*. 1980;77(2):274-276.
28. Klich M. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2002.
29. Kothary M, Chase T, Macmillan J. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun*. 1984;43(1):320-325.

30. Latgé J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(2):310-350.
31. Latgé J. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. 2001;9(8):382-389.
32. Lodish H. Biología celular y molecular. 5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.
33. Macarulla J, Goñi F. Bioquímica humana: curso básico. 2a ed. España: Reverté; 1994.
34. Modelo B, González A, Monjarás J, González N, Méndez A, Lemus R, *et al.* La importancia de la deficiencia de alfa-1 antitripsina en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otras patologías pulmonares. Neumol Cir Tórax. 2008;67(1):16-23.
35. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, *et al.* Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol. 2005;43:49-58.
36. Nielsen K, Cox GM, Litvintseva AP, Mylonakis E, Malliaris SD, Benjamin DK, *et al.* *Cryptococcus neoformans a* strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. Infect Immun. 2005;73:4922-4933.
37. O'Gorman C, Fuller H, Dyer P. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2008;457(7228):471-474.
38. Paoletti M, Rydholm C, Schwier E, Anderson M, Szakacs G, Lutzoni F, *et al.* Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Curr Biol. 2005;15(13):1242-1248.
39. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. Molecules. 2014;19:1085-1119.

40. Patterson FT. *Aspergillus* species. In: Mandell G, Douglas R, Bennett J, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2014;2895-2908.
41. Pontón J, Cabañes F. *Aspergillus* y aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 2000;17:77-78.
42. Quindós G. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Rev Iberoam Micol. 2002;19:1-4.
43. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco A, Bikandi J, Pontón J, *et al.* Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev Iberoam Micol. 2005;22:1-23.
44. Rosas de Paz E. Caracterización polifásica de aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* procedentes de México y Argentina [Tesis]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2015.
45. Samson R, Hong S, Peterson S, Frisvad J, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Stud Mycol. 2007;59:147-203.
46. Samson R, Visagie C, Houbraken J, Hong S, Hubka V, Klaassen C, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol. 2014;78:141-173.
47. Shotton D. Elastase. In: Methods in Enzymology (eds. Perlman, G.E. & Lorand, L.) Vol. XIX, 1970:113-40. Academic Press;1970
48. Tekaia F, Latgé J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Curr Opin Microbiol. 2005;8(4):385-392.
49. Tomee K. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. Clin Exp Allergy. 2000;30(4):476-484.
50. Youngchim S. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol. 2004;53(3):175-181.