

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETECCION DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFUNGICOS:
ANALISIS DE LAS METODOLOGIAS EXISTENTES Y SUS APLICACIONES

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de Especialidad en Micología Médica

GISELLE VIQUEZ BARQUERO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi compañero Gonzalo, gracias por apoyarme siempre, por la paciencia, comprensión y sacrificio durante todo este proceso, por las palabras de aliento y motivación que me han ayudado a salir adelante y no rendirme. Gracias por estar siempre presente, incondicionalmente, por creer en mi y sostenerme en los momentos de crisis.

AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento en primer lugar a Dios por darme la fuerza, sabiduría y salud para alcanzar esta meta.

Al Sistema de Estudios de Posgrado (SEP) de la Universidad de Costa Rica por darme la oportunidad de ingresar a esta especialidad.

A este grupo de compañeros de especialidad tan lindo, tan unido, que me ha motivado y brindado su amistad desde el primer momento.

A mi amigo el Dr. Javier Oviedo por motivarme siempre a seguir superándome y estar pendiente de todo este proceso.

A dos grandes maestros que me enseñaron el amor por esta rama de la microbiología tan hermosa como lo es la micología; la Dra. Jeannette Rodríguez como mi jefatura años atrás y el Dr. Edgar López como mi profesor de grado.

A todos y cada uno de los profesores de la especialidad por sus enseñanzas y el tiempo brindado durante esta formación, en especial a la Dra. Ingrid Salas coordinadora de la especialidad.

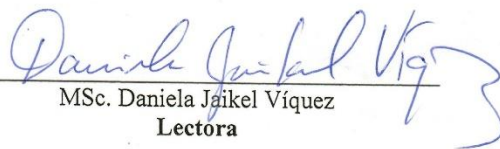
A mi tutor, el Dr. Allan Valverde por su apoyo, consejos, motivación y el esmero que ha puesto para que este proyecto sea una realidad.

A mis dos lectoras; la Dra. Daniela Jaikel y la Dra. Mariamalia Cob por su ayuda y tiempo invertido en la revisión de este documento.

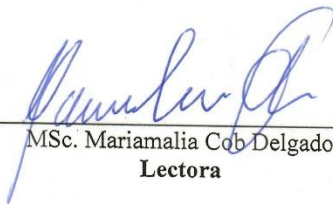
Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Micología Médica



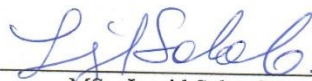
Esp. Allan Ignacio Valverde Vindas
Tutor



MSc. Daniela Jaikel Víquez
Lectora



MSc. Mariamalia Cob Delgado
Lectora

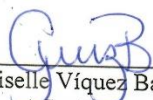


MSc. Ingrid Salas Campos
Directora

Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología



Esp. Marian Céspedes Varela
Miembro del tribunal



Giselle Víquez Barquero
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
ANTECEDENTES	1
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
METODOLOGÍA	7
CAPÍTULO I. MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIFÚNGICOS.....	8
Inhibidores de la síntesis y función del ergosterol.....	10
Azoles	11
Polienos	14
Alilaminas	18
Morfolinas	18
Inhibidores de la síntesis de la pared celular	19
Lipopéptidos	19
Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos y división nuclear	21
Pirimidinas: (5- fluorocitocina)	21
Griseofulvina	23

CAPITULO II. MECANISMOS DE RESISTENCIA	25
Azoles	25
Aumento en la expresión de las bombas de eliminación activa	26
Modificación de la diana.....	29
Aumento en el número de copias de la diana	31
Sustitución del ergosterol.....	33
Alteración en la importación de esteroides.....	34
Formación de biopelículas.....	35
Polienos	37
Alilaminas	39
Lipopéptidos (Equinocandinas)	42
Fluocitosina	46
CAPITULO III. METODOLOGÍAS Y ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS	50
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
PCR Convencional:.....	53
PCR tiempo real:.....	54
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR):	54
Secuenciación de primera generación: método de Sanger.....	58
Secuenciación masiva en paralelo (SMP) o secuenciación de nueva generación (NGS).61	
Secuenciación de tercera generación	62
Pirosecuenciación	65
Microarreglos (<i>Microarrays</i>).....	66
Tecnología del Sistema de Amplificación Refractaria a Mutaciones (ARMS).....	69
Análisis de Curvas de Melting o de fusión	72

Espectrometría de Masas (EM-MALDI TOF).....	76
CONCLUSIONES.....	87
RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS.....	91

RESUMEN

El presente trabajo es una revisión bibliográfica que incluye una revisión inicial de los mecanismos de acción de los diferentes grupos de antifúngicos tanto en lo que respecta a síntesis y función de la membrana plasmática, como síntesis de la pared celular y síntesis de ácidos nucleicos. Posteriormente, se describen los principales mecanismos de resistencia por grupo de antifúngico, también se hace referencia a las diferentes técnicas moleculares de detección de aquellas mutaciones que conllevan a la resistencia a los antifúngicos, tales como la secuenciación, los microarreglos, reacción en cadena de la polimerasa, la tecnología ARMS, análisis de Curvas de Melting o de fusión, se incluye en este apartado la espectrometría de masas, no como un método de detección de mutaciones sino como un método que está tomando auge en la discriminación de aislamientos sensibles y resistentes a los antifúngicos. Por último, se incluyen algunos ejemplos de las aplicaciones de estas técnicas moleculares en la detección de mutaciones relacionadas a la resistencia a los antifúngicos.

ABSTRACT

The following study is a literature review that includes an initial review of the action mechanisms of different antifungal groups, both in terms of synthesis and function of the plasma membrane, as well as cell wall synthesis and nucleic acid synthesis. Subsequently, the main resistance mechanisms by antifungal group are described, and molecular techniques for detecting those mutations that lead to antifungal resistance, such as sequencing, microarrays, polymerase chain reaction, ARMS technology, and melting curve analysis. Mass spectrometry is included in this section, not as a method for detecting mutations but as a method that is gaining popularity in the discrimination of susceptible and resistant isolates to antifungals. Finally, some examples of the applications of these molecular techniques in the detection of mutations related to antifungal resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El fracaso terapéutico en las micosis.....	9
Figura 2. Vía biosíntesis del ergosterol.....	11
Figura 3. Enzimas implicadas en el mecanismo de acción de los azoles.....	13
Figura 4. Mecanismo de acción de los azoles.....	13
Figura 5. Interacción de la anfotericina B con el ergosterol por medio de la micosamina...	16
Figura 6. Mecanismo de acción de la anfotericina B.....	17
Figura 7. Mecanismo de acción 5-fluocitocina.....	23
Figura 8. Componentes de la reacción de PCR	52
Figura 9. Esquema convencional de PCR.....	52
Figura 10. Fases de la PCR	53
Figura 11. Método de secuenciación didesoxi de Sanger.....	60
Figura 12. Método de Sanger donde cada ddNTP está marcado con un fluoróforo diferente y la posterior señal emitida por fluorescencia.....	61
Figura 13. Diagrama de Microarreglos.....	68
Figura 14. Esquema del principio de la Tecnología ARMS.....	69
Figura 15. Actividad del agente fluorescente. A: ADN doble cadena saturado con el colorante. B: Aumento gradual de la temperatura. C: Inicio de la desnaturalización y disminución de la fluorescencia.....	73
Figura 16. A: Curva de fusión para un amplicón único y puro. B: Curva de fusión para dos amplicones diferentes.....	73
Figura 17. Esquema del espectrómetro de masas MALDIT-TOF.....	77
Figura 18. Alteraciones en el espectro de masa de una cepa de <i>C albicans</i> expuesta a diferentes concentraciones de antifúngico.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: ATP Binding Cassette

AMB: Anfotericina B

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

HS: Hot Spot

LOH: Pérdida de heterocigocidad

MFS: Major Facilitators Superfamily

CDR: Candida Drug Resistance

MDR: Multi Drug Resistance

ATP: Adenosin Trifosfato

C35: Carbono 35

5-FC: 5-Fluorocitocina

5-FU: 5-Fluorouracilo

5-FUMP: 5-fluorouridina monofosfato

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

dNTPs: Desoxinucleótidos Tri Fosfato

EM: Espectrometría de masas

CLSI: Clinical and Laboratory Standars Institute

SDA: Agar Sabouraud

AM: Azul de Metileno

HRMA: High Resolution Melting Analysis

TRB: Terbinafina

SE: Enzima escualeno epoxidasa

ANTECEDENTES

Las infecciones fúngicas son un problema de salud pública, que han aumentado considerablemente en los últimos años; dentro de estas se incluyen las producidas por hongos resistentes y multirresistentes a los antifúngicos (Castro et al, 2019). Las características de las micosis invasoras están cambiando ya que día a día se describen nuevas especies patógenas y la frecuencia de aislamientos resistentes a los antifúngicos ha aumentado (Mellado et al, 2002). Por lo tanto, en aras de contribuirle al médico a brindar el tratamiento más adecuado es que es importante analizar la información sobre la sensibilidad de estos microorganismos (Castro et al, 2019).

Los adelantos tecnológicos han logrado dar solución o mejoría al abordaje de muchas enfermedades; por ejemplo, se realizan trasplantes de órgano sólido y médula ósea, que han permitido incrementar la sobrevida y mejorar las condiciones de vida a muchos. Por otro lado, es importante señalar que, para su éxito, estos procedimientos van de la mano con tratamientos de inmunosupresión profunda de estos pacientes, lo que los hace extremadamente susceptibles a la invasión por cualquier microorganismo, especialmente hongos, que se caracterizan por ser excelentes oportunistas (Mellado et al, 2002). También son susceptibles aquellos pacientes con quimioterapia; especialmente si presentan neutropenia, los pacientes diagnosticados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) con bajos conteos de linfocitos T CD4 y pacientes que reciben dosis prolongadas de inmunosupresores como corticoesteroides (Nocua et al, 2020). El aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad asociado al incremento en la incidencia de las micosis en pacientes inmunosupresos tiene mucha relación con la gran capacidad que tienen los hongos de adaptarse a los cambios ambientales y al inevitable desarrollo de resistencias a los antifúngicos dada su exposición continua a los tratamientos de uso comunitario e intrahospitalario (Pontón & Quindós, 2006). Destaca como grupo blanco los pacientes con neoplasias hematológicas cuya susceptibilidad disminuida se atribuye al uso profiláctico del fluconazol generando resistencia y favoreciendo la aparición de numerosas infecciones con especies de *Candida* no *albicans* y otras levaduras afines (Gómez, 2010).

El diagnóstico de las micosis sistémicas no es tan sencillo ya que las herramientas disponibles para ello tienen un bajo rendimiento, por lo que como medida preventiva los protocolos de tratamiento incluyen la profilaxis con antifúngicos, lo que suma un nuevo componente que facilita el desarrollo de resistencias secundarias a estos fármacos (Mellado et al, 2002).

El objetivo principal de las pruebas de susceptibilidad que se realizan *in vitro* es la detección de aislamientos entre la población que son resistentes (o poco susceptibles) o bien monitorear el desarrollo de resistencia durante el tratamiento, lo que podría orientar el éxito o fracaso del tratamiento antifúngico (Castro et al, 2019).

Para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos ya se están desarrollando nuevas herramientas que están orientadas tanto a la metodología proteómica (MALDI-TOF MS) como a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, estas podrían optimizar la detección de resistencias microbianas, favoreciendo así la eficacia de la terapia antifúngica. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos permiten la detección de mutaciones de genes que están relacionados con la resistencia a los antifúngicos. Así por ejemplo en el caso de los azoles y las levaduras los genes involucrados son el *MDR* o *CDR* y el *ERG11*, mientras que en los hongos filamentosos es el gen *Cyp51A*; en lo que respecta a la resistencia a las equinocandinas las mutaciones se encuentran en los genes *FKS* y *FKSI* para hongos filamentosos y todas las especies de *Candida* excepto *Nakaseomyces glabratus* en cuyo caso el gen involucrado es el *FKS2* (Castro et al, 2019).

Las estrategias de prevención para evitar o disminuir la resistencia a los antifúngicos, deben realizarse a nivel epidemiológico, diagnóstico, profiláctico y terapéutico (Mellado et al, 2002). La estrategia que podría constituirse en la más adecuada para poder controlar la resistencia a los antifúngicos y poder evitar las consecuencias que el desarrollo de la resistencia puede ocasionar a largo plazo es el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia, que hasta permitiría diseñar como nuevas opciones otras moléculas más potentes que puedan retrasar la aparición de esta resistencia (Mellado et al, 2002). Por lo tanto, es necesario que se mejoren las técnicas de detección y diagnóstico precoz para que con ello se pueda establecer un tratamiento efectivo que mejore la evolución de aquellos

pacientes con micosis oportunistas. Dentro de las estrategias para alcanzar este objetivo se tiene el aumento de las dosis o la creación de nuevas formulaciones menos tóxicas, pero más efectivas; desarrollo de nuevas moléculas con mejor actividad o la identificación de nuevas dianas, así como combinaciones entre antifúngicos o de antifúngicos con inmunomoduladores (Mellado et al, 2002).

Se puede prever que para un futuro próximo haya un aumento de cepas resistentes; puede que un elemento que se ha convertido en un peligro es la posible ocupación del nicho ecológico cercano al ser humano por especies resistentes, lo anterior debido al uso indiscriminado de los azoles en la agricultura lo que, además de favorecer la aparición de cepas resistentes podría desplazar las especies sensibles, cambiando así la población que infecta al ser humano. Sumado a esto los hongos filamentosos patógenos humanos comparten nichos ecológicos con los fitopatógenos por ser ubicuos, a lo que hay que sumarle la utilización de antifúngicos en la clínica humana (Mellado et al, 2002).

Las recientes investigaciones se han enfocado en la comprensión de la síntesis de la pared celular de los hongos, dada la importancia de esta en la supervivencia de la célula fúngica y por el hecho de que los componentes estructurales de esta no se encuentran en las células de los mamíferos; esto con el objetivo de diseñar antifúngicos específicos dirigidos al bloqueo de esta estructura. También se ha enfocado la atención en enzimas extracelulares y de pared que participan en su remodelación (Niño, 2021).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las infecciones fúngicas se han convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en ser humano, en especial aquellas con su sistema inmunológico debilitados (Rabaan et al, 2023) Estas infecciones afectan a más de mil millones de personas en el mundo; de las cuales, al menos 1 millón de ellas sufren de infección invasiva, principalmente por especies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis* (Papon et al, 2020; Firacative, 2020) Así mismo, estas infecciones se asocian con altas tasas de mortalidad, que oscilan entre 20 % y 50 %, a pesar de la disponibilidad de agentes antifúngicos potentes (Papon et al, 2020). Según Hossain y colaboradores (2022) para el 2020 se reportó 1.7 millones de muertes por estas infecciones. Este total de muertes anuales es similar o incluso, puede superar las mortalidades anuales debidas a la malaria, la tuberculosis o el VIH (Gow et al, 2022; Firacative, 2020). Las infecciones fúngicas representan una amenaza importante para la salud pública y, como componente poco reconocido de la resistencia a los antimicrobianos, constituyen una crisis emergente a nivel mundial (Fisher et al, 2022).

Las infecciones fúngicas son cada vez más comunes, ello a pesar de que en la actualidad se cuenta con un mayor conocimiento de ellas, así como de métodos de tratamiento para contrarrestarlas, y esto se debe en gran medida, a la aparición regular de resistencias a los antifúngicos utilizados en el ámbito clínico (Rabaan et al, 2023). De hecho, Gow y colaboradores (2022), subrayan que el impacto de estas infecciones se ha visto exacerbado por el aumento constante de cepas y especies resistentes, lo que refleja el uso generalizado de los antimicóticos, ya sea para profilaxis o como terapia.

Es por ello por lo que, en 2022 la Organización Mundial de la Salud desarrolló una lista de patógenos fúngicos prioritarios, que incluye los 19 hongos más importantes para la salud pública (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022; Rabaan et al, 2023). Esta lista, basada en la gravedad de la infección, constituye la primera iniciativa de ámbito mundial para clasificar por prioridad los patógenos fúngicos, considerando para ello las necesidades

no atendidas en materia de investigación y desarrollo, así como la importancia percibida para la salud pública (OMS, 2022; Rabaan et al, 2023)

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer los mecanismos de acción de los antifúngicos, los mecanismos de resistencia descritos actualmente, así como las metodologías utilizadas para su detección en el Laboratorio de Micología.

Objetivos específicos

1. Describir los mecanismos de acción de las diferentes familias de antifúngicos.
2. Describir los mecanismos de resistencia a los antifúngicos descritos actualmente.
3. Describir las metodologías para detección de mecanismos de resistencia a los antifúngicos y sus aplicaciones.

METODOLOGÍA

Para este trabajo se realizó una revisión sistemática y exhaustiva en diferentes bases de datos como Scielo, Access Medicine, BioMed Central, Free Medical Journals, Ovid, Google, Google académico, PubMed, ScienceDirect, Wiley Online Library, EBSCO, JAMA y *New England Journal of Medicine*. Además, se consultaron sitios web de organizaciones internacionales a las que les competen temas en salud como los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés).

Se utilizaron palabras clave en español e inglés como, por ejemplo: antifúngicos, mecanismos de resistencia, resistencia a los antifúngicos, *Candida auris*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton indotineae*, Terbinafina, Anfotericina B, Azoles, Fluconazol, farmacodinámica antifúngica, antimicóticos, Flucitosina, entre otros.

Se incluyeron artículos científicos y libros especializados que aportaban información valiosa para el cumplimiento de los objetivos, tales como artículos, páginas web. Otro de los criterios de selección se basó en que la información fuera lo más reciente posible por lo que se incluyó la literatura comprendida en el rango de 1999-2025, tanto en inglés como en español.

CAPÍTULO I. MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIFÚNGICOS

Es esencial profundizar en el conocimiento de la resistencia a los antifúngicos para el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas eficaces que permitan prevenir y evitar los problemas que en la actualidad debe enfrentar el personal sanitario al enfrentarse a las micosis provocadas por hongos resistentes (Pontón & Quindós, 2006). El concepto de resistencia de los hongos a los antifúngicos se puede clasificar en resistencia microbiológica y resistencia clínica; la resistencia microbiológica a su vez se subdivide en: intrínseca o innata que es la que presentan todas las cepas de una misma especie y que no tiene relación con la exposición al antifúngico; en resistencia primaria que es cuando aparecen espontáneamente cepas resistentes a un antifúngico en una especie normalmente sensible al antifúngico, sin haber tenido un contacto previo con estos; y en resistencia secundaria o adquirida es aquella que se desarrolla después de la exposición al antifúngico y que se puede deber a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se van a manifestar de forma estable o transitoria (Mellado et al, 2002; López et al, 2016). Por su parte la resistencia clínica se define como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en este haya concentraciones terapéuticas del antifúngico, esta resistencia se relaciona con factores dependientes del fármaco, como la penetración y distribución del mismo, su naturaleza fungistática o fungicida, su mecanismo de acción y su interacción con otros fármacos; por factores relacionados con el paciente, como lo son el estado inmunológico, el lugar de la infección y el posible incumplimiento terapéutico, o bien por una combinación de ambos factores, pacientes que son portadores de válvulas, catéteres, etc, o bien cuando los niveles del antifúngico son bajos en sangre debido a interacciones con otros fármacos. En la Figura 1 se enumeran las posibles razones de fracaso terapéutico (Mellado et al, 2002; Pontón & Quindós, 2006).

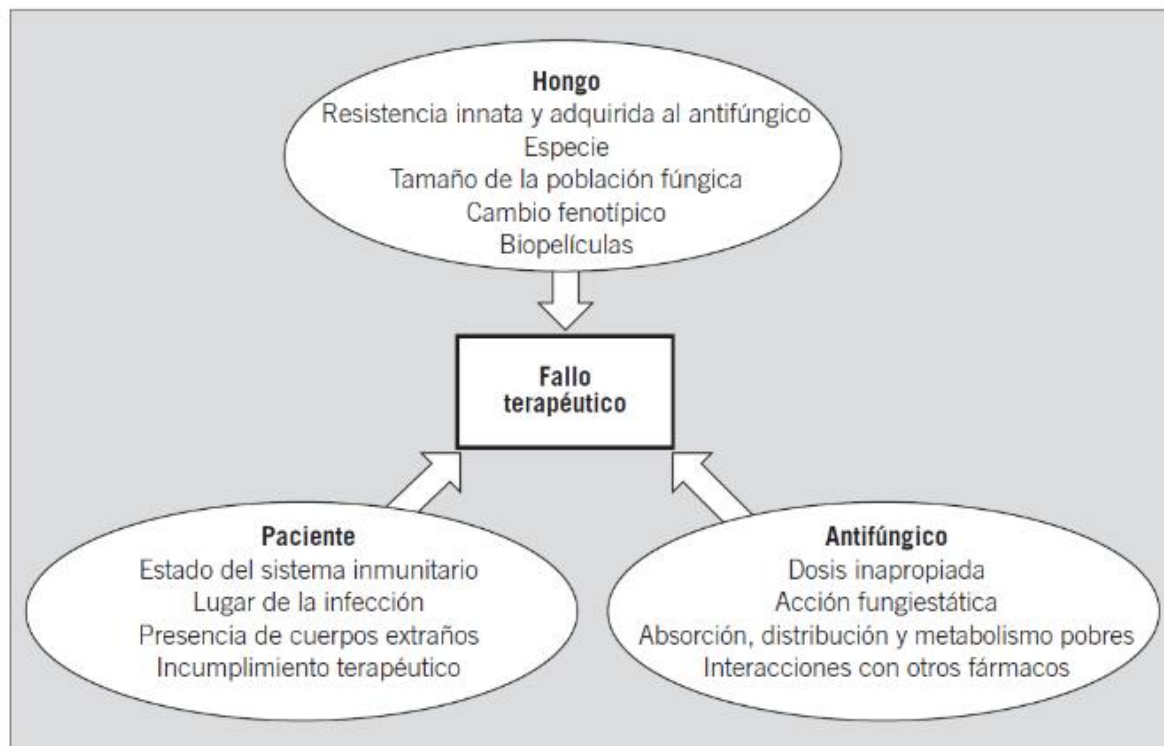


Figura 1. El fracaso terapéutico en las micosis. Tomado de Pontón & Quindós, 2006.

Una vez que se ha realizado la prueba de susceptibilidad o caracterización fenotípica de la resistencia, se debe realizar el análisis molecular que identifique los mecanismos de resistencia. Si bien es cierto las pruebas de susceptibilidad *in vitro* ayudan a elegir la mejor alternativa de tratamiento al reducir la posibilidad de que se dé un fallo terapéutico, estas poseen la limitante de que no se sabe con seguridad si son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a la anfotericina B, además de ser técnicas cuya complejidad metodológica no permite que se puedan realizar en todos los laboratorios. El estudio molecular es la estrategia más importante para poder evitar las consecuencias que a largo plazo puede ocasionar el desarrollo de la resistencia, además para desarrollar moléculas más potentes y seguras que las eviten (Mellado et al, 2002).

En general los mecanismos que se han identificado por los cuales una célula que inicialmente es sensible se hace resistente son:

1. Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, esto se puede dar por barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al

exterior (Mellado et al, 2002).

2. Cambios en la interacción del fármaco y la diana, debido a un aumento del número de copias de la diana o por modificaciones debido a mutaciones (Mellado et al, 2002).
3. Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas (Mellado et al, 2002).
4. Alteraciones en la degradación o modificación del fármaco a nivel intracelular (Mellado et al, 2002).

No son muchos los grupos de antifúngicos de los que se dispone, esto se debe en parte a la estrecha relación evolutiva entre los hongos y los humanos, siendo esto una limitante en el número de blancos hongo específicos que pueden utilizarse para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos (Lee et al, 2023).

Actualmente, en la práctica clínica los grupos de fármacos antifúngicos que se utilizan se clasifican con base en diferentes características como su mecanismo de acción, su estructura química, espectro de acción y tipo de micosis contra la que actúan en azoles, polienos, alilaminas, morfolinas, lipopéptidos, pirimidinas y griseofulvina (Rivera et al, 2020; Bonifaz, 2012). Estos fármacos se dirigen a diferentes procesos celulares, como la biosíntesis de la membrana celular, la biosíntesis de la pared celular, o la biosíntesis de ácidos nucleicos y división nuclear; ya sea inhibiendo (fungistático) o eliminando (fungicida) el crecimiento de la célula patógena (Bhattacharya et al, 2020). A continuación, se detallarán estos grupos de antifúngicos según su mecanismo de acción.

Inhibidores de la síntesis y función del ergosterol

El ergosterol es el componente mayoritario de las membranas celulares, tanto de la membrana plasmática como de la membrana mitocondrial y es vital para el mantenimiento y función de estas. La biosíntesis del ergosterol es catalizada por una cascada de 25 enzimas diferentes (figura 2). Esta vía es un blanco ideal porque el ergosterol es un lípido esencial para los hongos y no está presente en las células humanas (Bhattacharya et al, 2020).

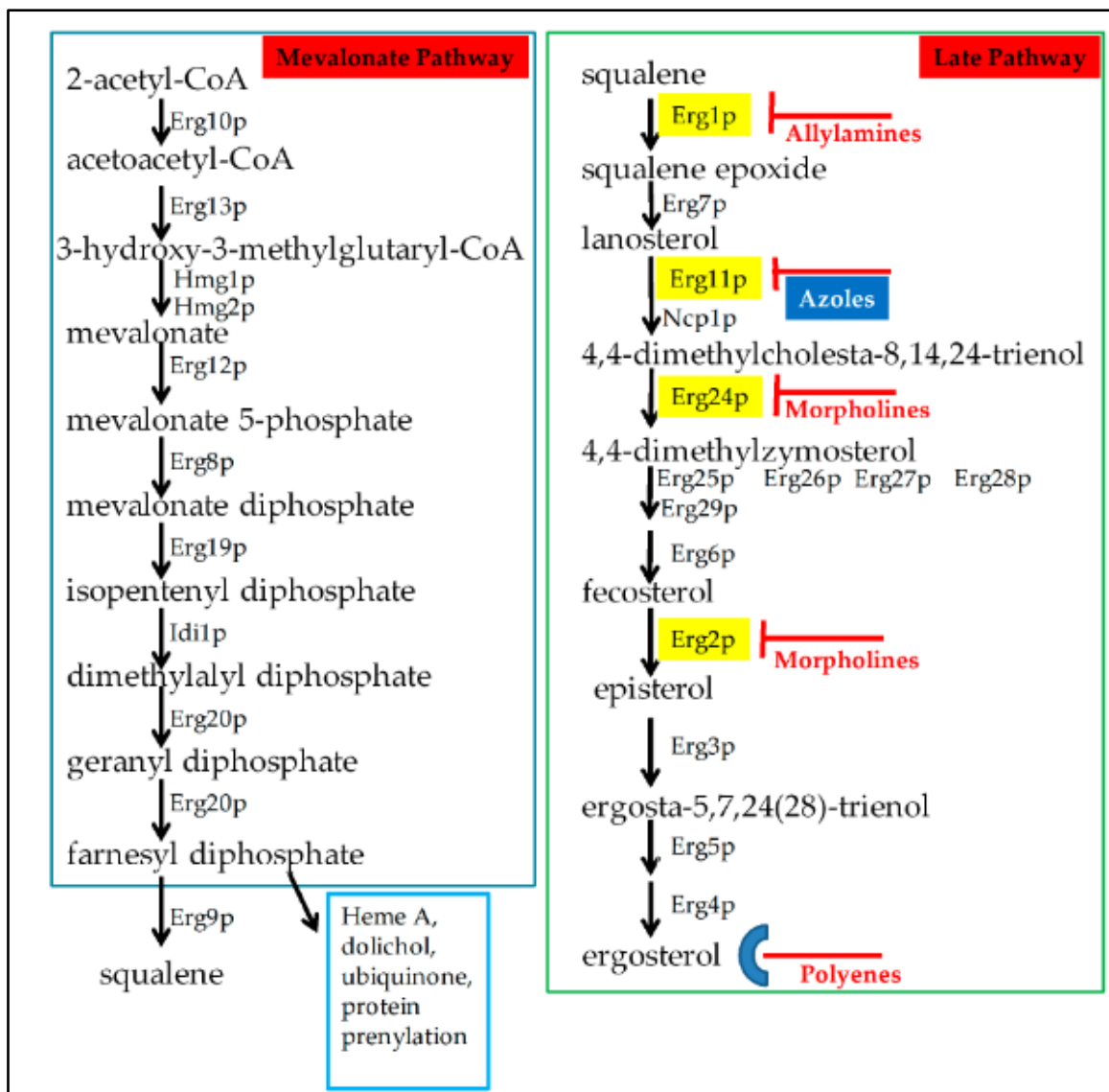


Figura 2. Vía de biosíntesis del ergosterol. Tomado de Bhattacharya et al, 2020.

Azoles

Generalidades: son moléculas sintéticas, se clasifican en dos grupos, los imidazoles que contienen dos moléculas de nitrógeno en el anillo azólico e incluyen al clotrimazol, econazol, ketoconazol, miconazol y tioconazol. Los triazoles que contienen tres moléculas de nitrógeno en el anillo azólico e incluye al fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol y posaconazol (Bhattacharya et al, 2020; Cuenca, 2010). Son la familia más amplia de los antifúngicos (Pontón & Quindós, 2006). Los imidazoles tienen actividad frente a levaduras,

dermatofitos y algunos hongos miceliales no dermatofitos, pero por su toxicidad aumentada con respecto a los triazoles son poco utilizados en la práctica hospitalaria (Cuenca, 2010).

Los triazoles son los más recomendados para el tratamiento de las micosis invasivas, tienen una afinidad mucho mayor por las enzimas fúngicas que por las humanas, por esta razón muestran mucho menos toxicidad que los imidazoles y pueden administrarse a dosis más elevadas (Cuenca, 2010; Espinel, 2008).

A pesar de que *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) y *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) presentan sensibilidad disminuida a fluconazol, su espectro de acción se restringe a la mayoría de las especies de *Candida* y *Cryptococcus*. El voriconazol tiene un espectro de actividad que incluye *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, dermatofitos, *Histoplasma capsulatum*, *Malassezia*, *Pseudallescheria boydi*, *Sporothrix schenckii* y *Absidia corymbifera* (Pontón & Quindós, 2006).

La aparición de aislamientos de *Candida* resistentes principalmente al fluconazol se ha favorecido por el hecho de que estos fármacos son los más prescritos en la práctica clínica y se utilizan de forma indiscriminada (Oliveira et al, 2013). La mayoría de los hongos filamentosos tienen resistencia intrínseca a ketoconazol y fluconazol por lo que no tienen utilidad en las infecciones fúngicas invasivas por estos hongos (Mellado et al, 2002). *Pichia kudriavzevii* presenta resistencia intrínseca a estos fármacos. El itraconazol y el voriconazol tienen un espectro de acción más amplio ya que se extiende a la mayor parte de las cepas de *Aspergillus* spp., por su parte los mucorales presentan resistencia natural al voriconazol. El espectro de acción del posaconazol si se extiende a los mucorales (Cuenca et al, 2010).

Mecanismo de acción: se unen de manera no competitiva al grupo hemo que forma parte de muchas enzimas que están implicadas en la síntesis de ergosterol especialmente la 14- α demetilasa (Cuenca et al, 2010; Czajka, 2023). Básicamente interfieren en la síntesis del ergosterol al bloquear la conversión del lanosterol en ergosterol, uniéndose a la enzima 14- α demetilasa (Erg11); enzima unida a la membrana en el retículo endoplásmico y la que cataliza

la eliminación del grupo 14- α metil del lanosterol, este bloqueo da como resultado la inhibición de la síntesis de ergosterol, con lo cual se produce una alteración de la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas y la acumulación de esteroides metilados que resultan tóxicos para la célula. Sin embargo, este bloqueo inhibe el crecimiento de la célula, pero no la mata, por lo que su efecto es meramente fungistático (Mellado et al, 2002; Espinel, 2008; López et al, 2016). Por ejemplo, cuando se inhibe la Erg11 otras enzimas de la vía como: Erg6p, Erg25p, Erg26p, Erg27p y Erg3p sintetizan el esteroil tóxico fungistático 14- α -metilergosta 8-24 (28) dienoil (Bhattacharya et al, 2020) (figuras 3 y 4).

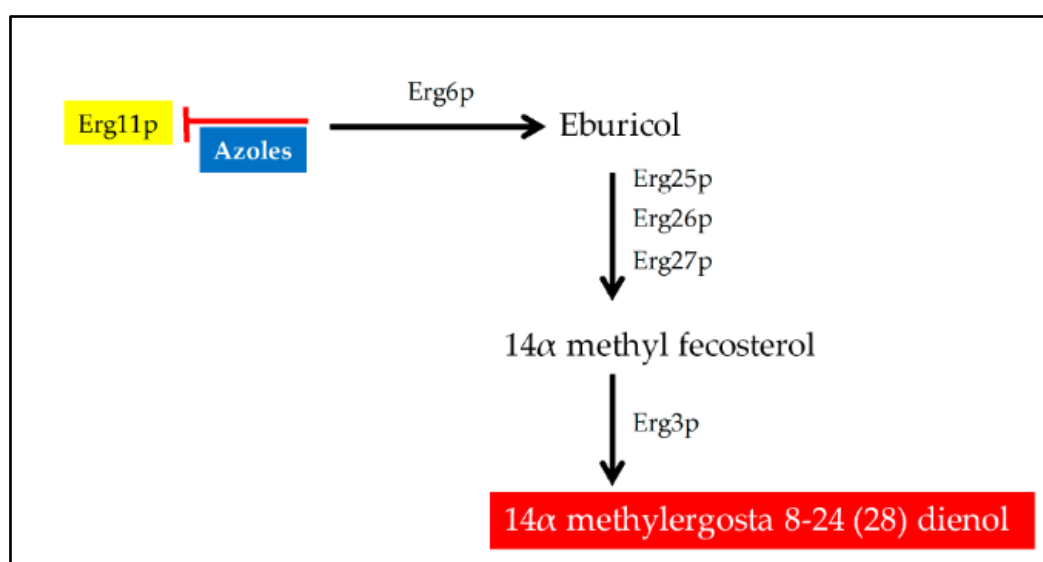


Figura 3. Enzimas implicadas en el mecanismo de acción de los azoles. Tomado de Bhattacharya et al, 2020.

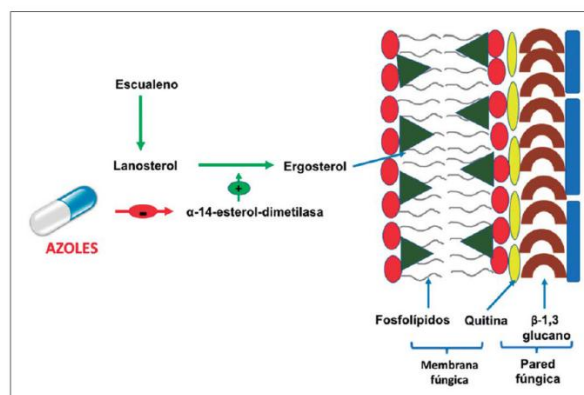


Figura 4. Mecanismo de acción de los azoles. Tomado de Nocua et al, 2020.

Los azoles también son responsables de elevar los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Tanto la producción de esteroides tóxicos como las ROS elevadas inhiben el crecimiento del hongo (Bhattacharya et al, 2020).

De las 36 familias de las enzimas del citocromo P-450 (CYP), hay siete (CYP51-57) que existen en distintas especies fúngicas. Actualmente, se conocen las secuencias del gen *CYP51* en algunos mamíferos, plantas, varias levaduras y algunos hongos filamentosos; en *Aspergillus* spp. se conoce que esta enzima Cyp51 está codificada por dos genes que codifican las isoenzimas, Cyp51A y Cyp51B que son 60 % idénticas, complicando el estudio de las resistencias (Mellado et al, 2002; Cuenca, 2010; Lee et al, 2023). La mutación en Cyp51A está bien caracterizada y confiere resistencia a los triazoles en *A. fumigatus*, pero el papel de la resistencia azoles en la mutación Cyp51B no está muy claro. (Lee et al, 2023).

Los azoles en el anillo imidazólico o triazólico tienen un átomo de nitrógeno mediante el cual se unen a la protoporfirina ligada a hierro en el centro activo de la enzima; mientras que la unión del resto de la molécula del azol va a depender de la estructura de cada azol. Cada especie fúngica varía en su conformación exacta del sitio activo, la unión de cada azol con las diferentes clases de enzimas va a determinar su espectro de acción. La sustitución del anillo imidazólico por el anillo triazólico ha permitido aumentar la especificidad de la unión a la enzima (Pontón & Quindós, 2006).

Polienos

Generalidades: desarrollados desde la década de 1950, fueron los primeros antifúngicos de amplio espectro disponibles para infecciones fúngicas invasivas (Angulo & Santos, 2022). Son producto del metabolismo secundario de bacterias del orden Actinomycetales, y fueron los primeros compuestos con actividad antifúngica específica. Se clasifican en trienos, tetraenos, pentaenos, exaenos y heptaenos de acuerdo con el número de dobles enlaces conjugados en su estructura. En la actualidad se utilizan más frecuentemente los tetraenos como la nistatina y natamicina, y el heptaeno anfotericina B (AMB) (Rivera et al, 2020).

Son activos contra gran variedad de hongos, la anfotericina B ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas (Pontón & Quindós, 2006). Pero es raramente requerido en casos de *Candidiasis* invasiva (Bhattacharya et al, 2020). Es utilizada vía intravenosa principalmente para el tratamiento de micosis de alta patogenicidad como *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *C. neoformans* y especies de *Aspergillus* y Mucorales (Rivera et al, 2020). Por su baja absorción no se cuenta con presentación vía oral. La limitante para su uso es su elevada toxicidad, por lo que a mediados de 1990 se realizaron formulaciones como la AMB liposomal, AMB complejo lipídico y AMB de dispersión coloidal; sin embargo, no se ha podido eliminar la nefrotoxicidad, presentándose especialmente en dosis altas o cuando se administra por periodos prolongados (Angulo & Santos, 2022). *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Trichosporon* spp., poseen resistencia intrínseca a la AMB (Mellado et al, 2002).

La nistatina se encuentra en presentación tópica y oral, utilizada principalmente para el tratamiento de infecciones cutáneas y de mucosas causadas por *Candida* spp., no posee actividad contra dermatofitos (Rivera et al, 2020). La formulación convencional de nistatina produce efectos tóxicos graves por lo que no es posible su utilización en forma de infusión parenteral, solo se emplea en forma de ungüento o soluciones en infecciones superficiales (Cuenca, 2010). La natamicina es utilizada de forma tópica para el tratamiento de queratitis micótica causada por hongos filamentosos como *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. y *Aspergillus* spp (Rivera et al, 2020).

Mecanismo de acción: Los polienos se unen al ergosterol de la membrana plasmática y esta unión genera que se formen poros por los que la célula fúngica va a perder iones monovalentes como Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻, y moléculas carbonadas, lo que posteriormente conduce a la muerte celular (Mellado et al, 2002; Espinel, 2008; Bhattacharya et al, 2020). Esta interacción se da por la micosamina, que es un componente estructural (figura 5) (Rivera et al, 2020).

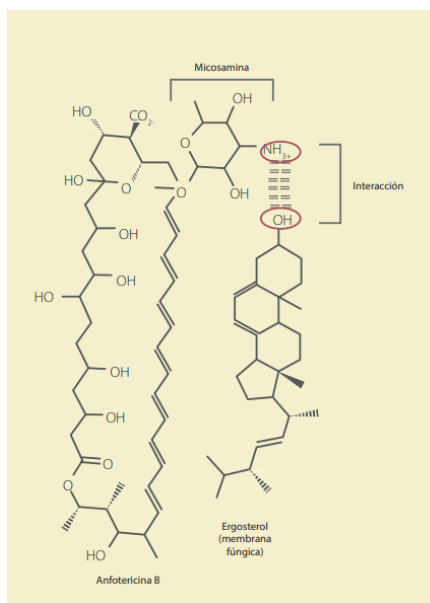


Figura 5. Interacción de la anfotericina B con el ergosterol por medio de la micosamina. Tomado de Rivera et al, 2020

Para la AMB y nistatina se ha demostrado que alteran la permeabilidad, por la capacidad para formar poros en la membrana fúngica, siendo este un mecanismo complementario que incrementa la potencia de ambos antifúngicos. Esto porque el grupo hidroxilo del C35 de la AMB es crítico para que se dé el ensamblaje de este canal iónico que atraviesa la bicapa lipídica, y al eliminar este C35 de la AMB se inhibe la formación del canal iónico y no se altera su capacidad de unión al ergosterol, conservando su actividad antifúngica. Es posible evaluar la formación de este canal mediante la salida de potasio (Rivera et al, 2020). La AMB se acumula en la membrana fúngica que contenga ergosterol y forma una estructura oligomérica que es la que actúa como canal iónico (Huang et al, 2024). El diámetro del poro determina el tipo y tamaño de la molécula que sale de la célula, normalmente AMB forma poros de mayor tamaño, facilitando así el transporte de moléculas más grandes, comparado con la nistatina que forma poros más pequeños (Huang et al, 2024).

También se ha descrito como un nuevo mecanismo de acción que AMB extrae el ergosterol de la membrana fúngica, actuando como una especie de esponja, esto produce inestabilidad en la membrana, e interrumpe procesos celulares esenciales como la endocitosis y la regulación de la función de las proteínas membrana, esto ya que muchos de los procesos celulares dependientes de ergosterol están controlados por proteínas de membrana que se

unen directamente al ergosterol. Esto explica la poca frecuencia de la resistencia a los polienos, debido a que es poco probable que los esterol de membrana alternativos como el lanosterol funcionen correctamente en estos procesos en células resistentes a los fármacos, reduciendo así la supervivencia y patogenicidad celular (figura 6) (Quiles & García, 2021; Huang et al, 2024).

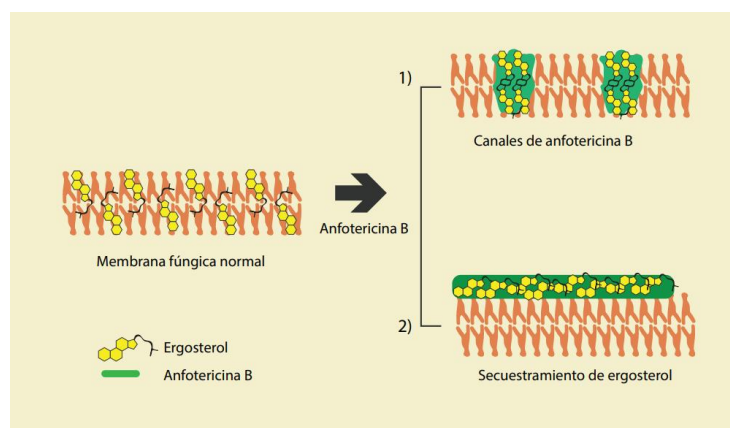


Figura 6. Mecanismo de acción de la anfotericina B. 1) formación de canales que alteran la permeabilidad, 2) Secuestro del ergosterol lo que produce inestabilidad de la membrana. Tomado de Rivera et al, 2020.

La AMB se encuentra como monómero y como polímero, esto es importante en su interacción con los hongos ya que si está como polímero mata las levaduras al extraer el ergosterol de sus membranas, pero si está en la forma monomérica tiende a insertarse en las membranas que contienen ergosterol para formar poros acuosos (Huang et al, 2024). Además de la unión a los esterol de membrana, los polienos se unen con los esterol intracelulares, lo que causa daño a la célula principalmente en las vías de la respiración celular. También tiene efectos inmunomoduladores, activando funciones de los linfocitos como lo es la secreción de linfoquinas (Cuenca, 2010). También hay otros mecanismos indirectos de daño a las células fúngicas, como el aumento en la producción de ROS en biopelículas fúngicas por parte de la AMB y la nistatina, esto hace que antes de que los compuestos poliénicos permeabilicen la membrana se disminuya la viabilidad de hongos filamentosos y levaduras, esto produce un efecto fungicida más fuerte que la interacción con el ergosterol (Rivera et al, 2020; Huang et al, 2024).

Se ha observado la secreción de IL-1 β en altas concentraciones con respecto a los azoles al tratar células dendríticas y macrófagos murinos con AMB, nistatina y natamicina; lo que posiblemente se dé como una respuesta a la secreción de iones de potasio por la formación de los canales iónicos. (Rivera et al, 2020). Es importante resaltar que la AMB es un antifúngico fungicida tanto para levaduras como para hongos miceliales, y que es el antifúngico con mayor espectro de acción (Cuenca, 2010).

Alilaminas

Generalidades: este grupo incluye la terbinafina (TRB), (Lamisil), flunarizina y naftifina (Bhattacharya et al, 2020). Tiene actividad frente a los dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos, y presenta sinergismo con los azoles (Mellado et al, 2002). Se utiliza como tratamiento de micosis superficiales, principalmente infecciones por dermatofitos, porque básicamente tienen acción fungicida contra los dermatofitos y fungistática contra *Candida albicans*. Son utilizados por lo tanto de manera tópica, o en el caso de las tiñas la forma oral de terbinafina (Angulo & Santos, 2022).

Mecanismo de acción: la TRB ejerce su acción mediante la inhibición de la enzima escualeno epoxidasa (Erg1p), una enzima implicada en la síntesis de ergosterol. Su acción es fungicida (figura 2) (Mellado et al, 2002; Pontón & Quindós, 2006). La muerte fúngica se debe a una mayor permeabilidad de la membrana por una alta concentración de escualeno y no a la deficiencia de ergosterol (Espinel, 2008).

Morfolinas

Las morfolinas se utilizan comúnmente en la agricultura y tienen una alta toxicidad en humanos (Bhattacharya et al, 2020). La amorolfina inhibe las enzimas D₁₄ reductasa (Erg24) y la D₈-D₇isomerasa (Erg2p) (figura 2) (Pontón & Quindós, 2006). Su aplicación clínica es para el tratamiento de dermatofitos en uñas, la presentación es una solución de laca para uñas que contiene clorhidrato de amorolfina al 5% (Bhattacharya et al, 2020).

Inhibidores de la síntesis de la pared celular

La pared celular es el blanco de varios antifúngicos, la capa más externa de la célula fúngica, rígida y es la primera línea de defensa, protegiendo a la célula del estrés osmótico. Las enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular son blancos importantes de los antifúngicos debido a que las células de los mamíferos no tienen paredes celulares. A este grupo de antifúngicos pertenecen los lipopéptidos como las equinocandinas, dentro de las que se encuentran la caspofungina, micafungina y anidulafungina (Bhattacharya et al, 2020).

Lipopéptidos

Equinocandinas:

Generalidades: son una familia de fármacos pertenecientes a las candinas, se inicia su desarrollo desde 1974 pero hasta el año 2001 se aprueba la utilización de caspofungina en humanos (Cuenca, 2010). En el año 2004 se aprueba la micafungina y para el año 2006 la anidulafungina (Angulo & Santos, 2022). Este antifúngico es fungicida para *Candida* y fungistático para hongos filamentosos, ya que inhibe el crecimiento en la terminación de la hifa (Quiles & García, 2021). Su espectro no incluye los hongos que contienen 1,6- β glucano en su pared como en el caso de *Cryptococcus* spp., hongos dimórficos y los mucorales. Tampoco tienen actividad contra *Fusarium* y *Scedosporium* (Quiles & García, 2021).

Se ha extendido su uso como profilaxis y tratamiento por lo que se reporta que más del 60 % de los pacientes con candidemia han recibido equinocandinas ya que por lo general tienen una adecuada farmacocinética y poca interacción con otras drogas, por lo que instituciones como *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID), *Japanese Society for Medical Mycology* (JSMM) y *Japanese Mycoses Forum* (JMF) las recomiendan en sus guías, así como la caspofungina y la micafungina son también recomendadas en Japón como primera línea de tratamiento para aspergilosis pulmonar crónica (Hori & Shibuya, 2018).

En la medida en que ha aumentado la aplicación de equinocandinas también los fracasos clínicos debido a organismos resistentes, especialmente *Candida* spp (Hori & Shibuya, 2018).

Mecanismo de acción: Actúan inhibiendo de forma específica pero no competitiva la síntesis del β -1,3 glucano, uno de los principales componentes de la pared celular fúngica, esto al unirse a la subunidad catalítica de la β -1,3 glucano sintetasa (FKS1p), la que es una enzima necesaria para la formación de polímeros de β -D-1,3 glucano, es codificada por los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*. Esta enzima es un complejo de tres proteínas Fks1p, Fks2p y Fks3p (Pontón, 2008; Mellado et al, 2002; Bhattacharya et al, 2020). Utiliza uridina difosfato glucosa (UDG-glucosa) para la formación de los polímeros de β -D-1,3 glucano (Bhattacharya et al, 2020).

La β -1,3-D-glucano sintasa comprende una subunidad catalítica en la membrana plasmática y una subunidad reguladora localizada en el citoplasma. En *Saccharomyces cerevisiae* la subunidad catalítica es una proteína integral de aproximadamente 215 kDa con 16 hélices transmembrana, mientras que la subunidad reguladora es una pequeña proteína de unión a GTP, Rho1 (Hori & Shibuya, 2018).

Las equinocandinas actúan produciendo hinchamiento y lisis celular en las zonas de crecimiento de la pared (zona apical) (Pontón, 2008). Sin embargo, este efecto trae consigo también, la activación de los genes relacionados con la biosíntesis de la pared, como una medida compensatoria por parte del Hongo, a través de la vía de integridad celular de la Proteína Kinasa C (Reinoso et al, 2003). Además, estas alteraciones en la pared pueden exponer el β -1,3-D-glucano en la superficie celular facilitando la interacción de este antígeno con la dectina-1, que es el receptor para el β -1,3-D-glucano, lo que activa la secreción de citocinas por parte de las células de la inmunidad innata (Pontón, 2008).

Este tipo de antifúngicos se podrían utilizar en terapia combinada con otros antifúngicos que actúan sobre la membrana plasmática como azoles o anfotericina B ya que su mecanismo de acción no muestra resistencia cruzada con estos (Mellado et al, 2002).

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos y división nuclear

Pirimidinas: (5- fluorocitocina)

Generalidades: las pirimidinas fueron aprobadas como tratamiento antifúngico en 1960; su mecanismo de acción se base en interferir con la síntesis de ADN y ARN de las células fúngicas (Angulo & Santos, 2022). También conocida como 5-fluorocitosina (5-FC), aproximadamente un 10 % de las *C. albicans* presentan resistencia intrínseca a la flucitosina, mientras que un 30 % de los aislamientos de esta especie desarrollan resistencia durante el tratamiento con fluocitocina (Espinel, 2008). Este fármaco es recomendado para el tratamiento de infecciones fúngicas en sitios en donde la penetración de otros fármacos es limitada, como en infecciones del tracto urinario, cerebro, ojos o válvulas cardiacas (Zohra et al, 2021).

Es la terapia de primera línea para el tratamiento de la meningitis criptocócica, administrándose en combinación con la AMB como terapia de inducción, lo que da como resultado la esterilización rápida del LCR. Es posible obtener este mismo efecto si se utiliza en combinación con el fluconazol. Además, la 5-FC también puede ser utilizada como complemento de la AMB o el fluconazol en el tratamiento de infecciones sistémicas complejas como septicemia, endocarditis, meningitis o infecciones pulmonares causadas por cepas susceptibles de *Candida* o *Cryptococcus*. Su uso como monoterapia es limitado debido a la tendencia al rápido desarrollo de resistencia, por lo que sólo se utiliza para el tratamiento de cistitis por *Candida* en caso de resistencia al fluconazol, ya que se alcanzan concentraciones elevadas en orina y, también para el tratamiento de cromoblastomicosis causadas por algunos hongos melanizados (Chandra, 2009; Zohra et al, 2021).

De acuerdo con la IDSA (del inglés *Infectious Diseases Society of America*) no se recomienda el uso de 5-FC como terapia en cualquier forma de aspergilosis debido a una aparente carencia de actividad de este compuesto *in vitro*. No se recomienda el uso de 5-FC en dermatofitos debido a que este compuesto no tiene actividad contra ellos (Zohra et al, 2021).

Aproximadamente, un 6 % de los pacientes tratados con 5-FC presentan efectos secundarios gastrointestinales como vómito, náuseas, diarrea, dolor abdominal y otros efectos más severos como la hepatotoxicidad y depresión de la médula ósea (Zohra et al, 2021; Angulo & Santos, 2022). Las concentraciones más elevadas de 5-FU se detectan en el plasma de los pacientes que recibieron el fármaco vía oral en comparación de los que lo recibieron intravenoso; esto se cree se debe posiblemente a la conversión de la 5-FC a 5-FU por parte de la microflora intestinal (Costa et al, 2015; Zohra et al, 2021).

Mecanismo de acción: es un fármaco fungistático que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en la célula fúngica, es un profármaco, es decir, que para su activación necesita ser metabolizado, entonces el fármaco debe ser tomado por la célula mediante la citosina permeasa (Fcy2) que es codificada por el gen *FCY2* y otros homólogos codificados por *FCY21* y *FCY22* para convertirlo en 5-FU por la citosina desaminasa (Fcy1), enzima que no está presente en las células humanas y es codificada por el gen *FCY1*. Hay dos mecanismos por los cuales la 5-FC ejerce su acción antifúngica, primero, por la uracil fosforibosil transferasa (Fur1) se convierte en 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP), que es fosforilado por dos quinasas pasando a 5-fluorouridina trifosfato (5FUTP), que se incorpora al ARN en lugar de la uridina trifosfato (UTP), alterando la aminoacilación del ARNt, alterando el conjunto de aminoácidos e inhibiendo la síntesis de las proteínas. El segundo mecanismo es el metabolismo del 5-FUMP que también puede ser convertido en 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5FdUMP) por la uridina monofosfato-pirofosforilasa. El 5-FdUMP es un inhibidor la timidilato sintasa, que es una enzima importante en la biosíntesis de ADN y produciendo un ARN aberrante y la inhibición celular (Chandra et al, 2009; Cuenca, 2010; Bhattacharya et al, 2020; Zohra et al, 2021). Además, la 5-FC actúa interfiriendo en el metabolismo de las pirimidinas y la síntesis de proteínas, su actividad provoca lisis celular y muerte (Chandra et al, 2009) (Figura 7).

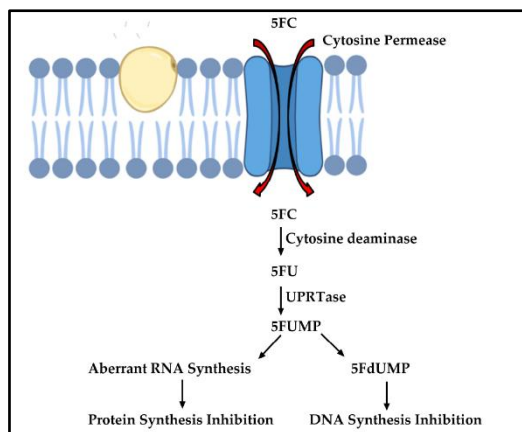


Figura 7. Mecanismo de acción 5-fluorocitocina. La 5- fluorocitocina (5-FC) es transportada al interior de la célula por la enzima citosina permeasa, ahí es convertida por la enzima citosina desaminasa a 5- fluorouracilo (5-FU), que es convertido por la uracil fosforibosil transferasa a 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP). Esta puede seguir dos vías: se incorpora al ARN alterando la aminoacilación del ARNt e inhibiendo la síntesis de proteínas; o también puede ser convertido por la uridina monofosfato-pirofosforilasa en 5- fluorodesoxiuridina monofosfato (5FdUMP), que inhibe la timidilato sintasa, enzima importante en la biosíntesis de ADN. Tomado de Bhattacharya et al, 2020

Griseofulvina

Generalidades: Es un producto metabólico del *Penicillium griseofulvum*, descrito por primera vez por Oxford y colaboradores en 1939. Desde entonces ha sido ampliamente utilizada hasta hoy para tratamiento de las dermatomicosis (Álvarez et al, 1986). Su espectro de acción está reducido a los dermatofitos, en especial *Microsporum canis* y algunas especies de *Trichophyton*, especialmente los queratinofílicos y queratinolíticos (Pontón & Quindós; 2006Martínez et al, 2023).

Se administra exclusivamente por vía oral. Debido a su naturaleza poco soluble, su principal problema es la dificultad de su absorción a nivel de tracto intestinal, por lo que esta es dependiente de varios factores como la dieta, dosis, formulación y tamaño de las partículas. Por esta razón, en su administración es importante la forma de la presentación empleada, así como que se administre con alimentos grasos (Sánchez et al, 1999; Martínez et al, 2023;).

Este medicamento se distribuye en todo el organismo, especialmente por la piel y sus anexos, incluyendo las glándulas sudoríparas. Se metaboliza en el hígado y se excreta por heces y orina. Aunque su vida media es de (24-30) horas, debido a los problemas de su absorción, se recomienda suministrarla cada 6 horas para mantener los niveles sanguíneos estables y reducir los efectos secundarios (Sánchez et al, 1999)

La cefalea es el efecto adverso más frecuente, pero no requiere suspender la medicación para que cese la cefalea. Otros efectos adversos son las molestias gastrointestinales, sequedad de boca y pérdida temporal del sabor; incluso reacciones alérgicas en forma de urticaria, eritema y fotosensibilidad. Es un inductor enzimático que acelera el metabolismo de otros fármacos, entre los que destacan los anticoagulantes orales, el fenobarbital y sedantes (Sánchez, et al, 1999)

Este antifúngico es teratogénico en animales, razón por la cual no se recomienda su uso en el embarazo; además, por su efecto sobre los espermatozoides, los varones deben abstenerse de procrear mientras están utilizando el medicamento (Sánchez et al, 1999)

Mecanismo de Acción: Este antifúngico es fungistático, ya que su acción se limita a bloquear la reproducción del hongo (Sánchez et al, 1999). Según Martínez y colaboradores (2023), cuando el dermatofito se une a la queratina, la griseofulvina se fija en la tubulina fúngica inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico, evitando así la división celular. Debido a lo anterior, es que su acción se limita únicamente sobre los hongos que se encuentran en fase reproductiva, conforme el tejido crece, las células sanas van desplazando a las células infectadas, siendo este el motivo por el cual la curación requiere de varias semanas o meses, dependiendo de la velocidad de recambio de las células enfermas (Sánchez et al, 1999; Martínez et al, 2023).

Este fármaco sigue siendo eficaz y seguro, constituyéndose en la primera elección para el tratamiento de tiña capitis. Tiene las mismas tasas de curación que otros antifúngicos como la terbinafina o itraconazol; pero tiene como desventaja que sus pautas posológicas son del doble de duración que los anteriores (Sánchez et al, 1999).

CAPITULO II. MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia a los antifúngicos se puede definir de tres formas, como resistencia microbiológica o como resistencia clínica, e incluso como una combinación de ambas. En cuanto a la resistencia microbiológica, esta se observa cuando el crecimiento de un organismo o patógeno infectante es inhibido por una concentración de agente antimicrobiano superior al rango observado para las cepas de tipo silvestre. Por otro lado, la resistencia clínica se define por la situación en la que el organismo infectante es inhibido por la concentración del agente antimicrobiano que está asociada con una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Es decir, el patógeno es inhibido por una concentración de antimicrobiano superior a la que podría alcanzarse de forma segura con la dosificación normal. Respecto a la definición compuesta, la resistencia está presente cuando los aislados no son inhibidos por las concentraciones habitualmente alcanzables del agente con esquemas de dosificación normales y/o cuando muestran un valor de CIM que cae en el rango donde existe una mayor probabilidad de la presencia de los mecanismos específicos de resistencia microbiana, y donde la eficacia clínica contra el aislado no se ha demostrado de forma fiable en estudios de tratamiento (Pfaller, 2012).

Azoles

La resistencia a los azoles puede ocurrir por varios mecanismos como: mutaciones que modifican la diana, sobreexpresión del gen *ERG11*, sobreexpresión de bombas de eliminación, interferencia con la acción sobre la 14- α demetilasa, alteraciones en otras enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco. Se menciona que en cepas de *C. albicans* resistentes se ha demostrado en un 85 % de los casos la sobreexpresión de genes que codifican las bombas de eliminación, en un 65 % de los casos mutaciones en el gen *ERG11*, y en un 35 % la sobreexpresión del gen *ERG11* (Pontón & Quindós, 2006).

Las especies de *Candida* pueden presentar plasticidad genómica, esto resulta en pérdida de heterocigocidad, aumento en el número de copias cromosómicas, aneuploidía o formación

de isocromosomas; lo que puede alterar la expresión de *ERG11* o de las bombas de expulsión de fármacos. (Perlin & Wiederhold, 2017).

Aumento en la expresión de las bombas de eliminación activa

En levaduras el mecanismo de resistencia más frecuente es debido al aumento de expresión o activación de los genes que codifican bombas de eliminación activa, lo que produce una disminución de las concentraciones intracelulares del fármaco; estas bombas de eliminación son los transportadores ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*), codificados por genes *CDR* que son los responsables de la resistencia a casi la totalidad de los azoles y los transportadores MFS (del inglés *Major Facilitators Superfamily*), codificados por los genes *MDR1*, responsables de la resistencia al fluconazol (Mellado et al, 2002; Gómez, 2010; Vale et al, 2012). Estos transportadores son un sistema de bombeo activo que se localizan en la membrana citoplasmática y contribuyen a la resistencia de casi todos los azoles al expulsar el fármaco hacia el exterior de la célula (López et al, 2016).

La bomba MSF transporta dos solutos hacia distintos lados de la membrana plasmática de la célula fúngica, utiliza como fuente de energía un gradiente de protones (H^+), en lugar de ATP, para translocar moléculas (Fuentes et al, 2014). La sobreexpresión de ambos tipos de bombas no permite la acumulación intracelular del fármaco, por lo que estos mecanismos pueden estar involucrados no solo en la resistencia a azoles sino también a otros antifúngicos (Fuentes et al, 2014). En las células sensibles a los azoles hay una baja expresión de los genes *CDR* y *MDR*, mientras que en las células resistentes los azoles hay sobreexpresión de los genes *CDR* y *MDR* por lo que los azoles son menos efectivos contra la lanosterol 14- α -demetilasa (López et al, 2016).

La resistencia a azoles se puede relacionar con variaciones genómicas como la pérdida de heterocigocidad o LOH (por sus siglas en inglés *loss of heterozygosity*) y la aneuploidía. Esta pérdida de heterocigocidad se puede dar en regiones genómicas específicas que albergan determinantes de resistencia a azoles como *ERG11* y *TAC1* (Lee et al, 2023). Si un alelo de un gen está mutado LOH puede copiar la mutación al segundo alelo, LOH se ha observado en aislamientos clínicos de *C. albicans* en *CaTAC1*, *CaERG11* y *CaMRR1* lo que

correlaciona con el aumento de la resistencia a azoles debido a que estas mutaciones son homocigotas (Bhattacharya et al, 2020; Lee et al, 2023).

Se ha demostrado que la actividad de las bombas de eflujo es más alta en el complejo *Candidozyma haemuli* (*Candida haemulonii*) que en otras especies de *Candida* no *albicans* como *P. kudriavzevii*, *C. tropicalis* y *Clavispora lusitaniae*, explicando así su baja sensibilidad a los azoles (Huang et al, 2024). En *C. albicans* y otras especies de levaduras como *N. glabratus* se han descrito hasta diez genes diferentes relacionados con la producción de los transportadores ABC, los llamados *CDR1-CDR10*. En cepas con aumento en la expresión de los genes *CDR1* y *CDR2* se ha observado que presentan resistencia a azoles (Cuenca, 2010).

En cepas de *C. albicans* sensibles a fluconazol el gen *MDR1* no se expresa durante el crecimiento *in vitro*, pero en aislamientos clínicos resistentes a fluconazol se encuentra sobre expresado (Pontón & Quindós, 2006). La trisomía en el cromosoma 3 y cromosoma R en *C. albicans* se correlacionan con el aumento en la resistencia a los triazoles. En el cromosoma 3 se encuentran los genes que codifican para las bombas de eflujo *CDR1* y *CDR2*, por lo que el aumento en el número de copias del cromosoma 3 aumenta la expresión de dichos genes. Esta trisomía en el cromosoma 3 se desarrolla por exposición prolongada a los azoles (Bhattacharya et al, 2020).

También en *C. albicans* se relaciona con la resistencia a los azoles la aneuploidía segmentaria, en donde dos copias del brazo izquierdo del cromosoma 5 que contienen *CaERG11* y *CaTAC1* forman un isocromosoma. Esta aneuploidía resulta en una mayor dosis de genes que codifican tanto para la diana azólica *ERG11* como para el factor de transcripción Tac1 que regula el eflujo del fármaco (Lee et al, 2023). La aneuploidía en el cromosoma 6 en donde se encuentra el gen *MDR1* que codifica por la bomba de eflujo también se relaciona con esta resistencia debido al aumento en su expresión (Bhattacharya et al, 2020; Lee et al, 2023).

En *C. albicans* mutaciones en el gen *TAC1* que codifica por el factor de transcripción Tac1p que regula las bombas de eflujo CDR1 y CDR2 da como resultado la sobreexpresión de la bomba y la resistencia a los azoles. Estas mutaciones incluyen T225A, V736A, N972D, N977D, G980E y G980W. De la misma manera mutaciones en el gen *MRR1* que codifica por el factor de transcripción Mrr1p incluyen P683S y P683H, mientras que para *C. dubliniensis* las mutaciones en este gen *MRR1* incluyen T374I, S595Y y C866Y. Hay otros factores de transcripción que regulan la expresión de las bombas, pero a la fecha no se han relacionado con la resistencia en aislamientos clínicos (Bhattacharya et al, 2020). En *N. glabratus* las mutaciones en el factor de transcripción Pdr1 que inducen sobreexpresión de transportadores ABC incluyen L328F, R376W, D1082G, T588A, T607S, E1083Q, Y584C, D276Y, L280F, N691D, S316I, D261G, R293I, R592S, G583S, S343F y R376G. También la mutación L946S aumenta la expresión del transportador MFS en *N. glabratus*. (Bhattacharya et al, 2020; Perlin & Wiederhold, 2017). *Candidozyma auris*, contiene el homólogo *CDR1* de *C. albicans* y se encuentra sobre expresado en aislamientos que han mostrado aumento en la tolerancia a fluconazol. Este aumento de la expresión de este homólogo de transportador correlaciona con el aumento en el número de copias del factor de transcripción *TAC1* en dicha cepa cuando se compara con su progenitora (Bhattacharya et al, 2020).

De la misma manera se han observado alteraciones cromosómicas en aislamientos clínicos de *N. glabratus*, como reordenamientos segmentarios en el cromosoma M que alberga el gen *CgCDR1* que codifica la bomba de eflujo y en el cromosoma F que contiene el gen *CgPDHI* que también codifica por una bomba de eflujo (Bhattacharya et al, 2020).

Una biopelícula precoz es más susceptible a los antifúngicos, debido a que en ella hay una sobreexpresión de los genes que codifican para ergosterol, como el gen *ERG25*, *ERG6*, y *ERG16*, pero a medida que la biopelícula madura estos genes disminuyen y se elevan drásticamente los genes codificantes para las bombas de eflujo, lo que explica la resistencia a los antifúngicos azoles (Pinilla et al, 2018). Debido a un perfil transcripcional alterado de la vía del ergosterol con el fin de mantener una mejor fluidez de la membrana, las células formadoras de biopelículas tienen una concentración significativamente menor de ergosterol

en su membrana celular, especialmente en las últimas etapas de la formación de la biopelícula, así las células en biopelículas maduras contienen aproximadamente la mitad de ergosterol que las células planctónicas (Amann, 2025).

En los hongos filamentosos se desconocen la mayoría de los mecanismos moleculares y bioquímicos que explican la resistencia, pero estudios en hongos fitopatógenos sugieren que los mecanismos de resistencia son similares a los que se han descrito para levaduras. En ellos se han descrito genes homólogos de los descritos para levaduras como lo son para *A. fumigatus* (*MDR1* y *MDR2*), *A. flavus* (*MDR1*), *A. nidulans* (*atrA*, *atrB* y *atrC*) y en *Penicillium digitatum* (*PMR1* y *PMR5*); todos pertenecientes a la familia de los transportadores ABC; sin embargo, el aumento de su expresión se relaciona con resistencia a diferentes antifúngicos y no directamente con la resistencia a los azoles (Mellado et al, 2002).

En un estudio realizado por Fuentes y colaboradores con respecto a la cuantificación de las bombas de eflujo observaron diferencias significativas entre las cepas resistentes y las sensibles en todas las bombas estudiadas; observaron una sobreexpresión de las bombas analizadas en más de la mitad de las cepas resistentes, correlacionando así con la resistencia fenotípica de las cepas. También en una de las cepas se encontró la presencia de una sobreexpresión del gen *ERG11*, así como una sobreexpresión de los genes de las bombas de eflujo *CDR1* y *CDR2*, evidenciando así que la resistencia a azoles es un fenómeno multifactorial (Fuentes, 2014).

Modificación de la diana

En segundo lugar, se tienen las mutaciones del gen *ERG11* lo que afecta la diana de los azoles, ya que causa una alteración estructural de la enzima 14- α esterol demetilasa (Erg11p), esta enzima es clave en la síntesis del ergosterol donde el lanosterol y sus derivados son su sustrato. Esta enzima es producto del gen *CYP51* en hongos filamentosos y del gen *ERG11* en levaduras (Mellado et al, 2002). Estas mutaciones disminuyen la unión del azol con el sitio activo de la enzima (Bhattacharya et al, 2020; Lee et al, 2023). Se han reportado más de 140 distintas sustituciones de aminoácidos en la enzima Erg11 en aislamientos clínicos de *C.*

albicans, la mayoría en tres regiones de puntos calientes. Algunas de estas sustituciones implican residuos expuestos en el sitio activo, afectando directamente la unión al azol, mientras que otras se dan en la superficie proximal de la enzima y contribuyen indirectamente con la resistencia a azoles influyendo en las interacciones con el citocromo P450 reductasa (Lee et al, 2023).

Se han identificado mutaciones puntuales en el gen *ERG11* de aislamientos resistentes de *C. albicans*, como son A61V, A114S, Y132F, Y132H, K143Q, K143R, Y257H, S405F, G448E, F449S, G464S, R467K y I471T, las que contribuyen con la resistencia a los azoles en *C. albicans* (Bhattacharya et al, 2020). También se han asociado mutaciones puntuales del gen *ERG11* en otras especies de *Candida* resistentes a azoles como C108G, C423T y A1581G en *N. glabratus*, y A497C y G1570A en *P. kudriavzevii* (Bhattacharya et al, 2020).

Para *Aspergillus* spp., se han descrito dos mecanismos de resistencia a azoles que son mutaciones puntuales de *CYP51A* y concentración reducida del fármaco intracelular, este podría ser por una sobreexpresión de las bombas de eflujo o por una penetración reducida del fármaco (Espinel, 2008).

La resistencia cruzada a itraconazol y posaconazol se ha relacionado con mutaciones específicas en *CYP51A* debido a sustituciones de aminoácidos en la glicina 54, o sustituciones en metionina 220 se han asociado con resistencia a itraconazol y diferentes perfiles de susceptibilidad en otros azoles (Espinel, 2008). En *A. fumigatus* la modificación con un plásmido que contenga el gen *CYP51* lo hace resistente al itraconazol (Mellado et al, 2002).

En un estudio realizado por V. Oliviera y colaboradores encontraron una nueva mutación L321F en el gen *ERG11* en cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol, posteriormente analizaron cepas sensibles a fluconazol y la nueva mutación no se encontró en ninguno de ellos, lo que indica su asociación con las cepas resistentes. En esta nueva mutación el aminoácido presenta propiedades físicas diferentes ya que la lisina es altamente hidrofílica mientras que la fenilalanina es altamente hidrofóbica lo que puede provocar una estructura

proteica modificada ya que las interacciones de los aminoácidos con el agua son cruciales para la estabilidad y plegamiento de la proteína. Esta mutación se encuentra en la hélice central de la molécula lo que puede alterar la estructura tridimensional y esta hélice está descrita como sitio de unión de la enzima (Oliviera et al, 2013).

En *C. auris* estas mutaciones en *ERG11* también contribuyen a su reducida susceptibilidad a los azoles, se hace referencia a un estudio reciente donde se menciona una mutación de Erg11 (F444L) que no se ha descrito previamente, identificada en aislamientos clínicos del clado IV resistentes a azoles (Lee et al, 2023).

Aumento en el número de copias de la diana

Se ha visto en levaduras que durante la exposición a los azoles hay un aumento de la transcripción del gen *ERG11*, aún en células sensibles, se cree que este aumento se da como respuesta de la célula a la disminución de ergosterol o a la acumulación de esteroides tóxicos; y en los hongos filamentosos los niveles de expresión de *CYP51* pueden ocasionar el desarrollo progresivo de resistencia a los azoles. (Mellado et al, 2002). En el caso de cepas de *Penicillium digitatum* que son resistentes a triflumizol, que es un azol de uso agrícola, se ha demostrado que presentan un activador de la transcripción en el promotor del *CYP51*, y el número de copias de esta secuencia repetida en tándem correlaciona directamente con la CMI a triflumizol (Mellado et al, 2002).

Se sugiere una relación entre los cambios en la vía de la síntesis de ergosterol y la resistencia a los azoles; una delección en el gen *UPC2* (homólogo de *UPC2/ECM22* genes en *S. cerevisiae*) en *C. albicans*, codifica para el factor de transcripción Upc2, que es un regulador de la mayoría de los genes *ERG* involucrados en la síntesis de ergosterol, la sobreexpresión del gen *UPC2* aumenta la resistencia a los azoles (Espinel, 2008). Upc2p es un factor de transcripción que regula la mayoría de los genes de la biosíntesis de ergosterol como *CaERG2* y *CaERG11* en *C. albicans*, la sobreexpresión génica de *UPC2* puede ser inducida por la exposición a los azoles y puede compensar la inhibición de las enzimas diana. Sobreexpresión que puede ser impulsada por las mutaciones de ganancia de función (por sus siglas en inglés *Gain of function* GOF) y su consecuente resistencia al fluconazol. Así,

mutaciones en el gen *UPC2* como la sustitución A643V o G648D pueden causar que Upc2 se libere de un represor induciendo hiperactividad. Esta mutación A643V afecta el dominio regulador C-terminal y en consecuencia la función normal de *UPC2* (Czajka, 2023). Además, es auto regulado, inducido por crecimiento anaeróbico y por bajos niveles de ergosterol. Upc2p está bien caracterizado en *C. albicans*, el extremo N-terminal es el dominio de unión al ADN y el extremo C-terminal el dominio de activación/regulación. El ergosterol se une al dominio C-terminal de Upc2p y regula negativamente la transcripción de *UPC2* (Bhattacharya et al, 2020; Lee et al, 2023). En Upc2 se da un cambio conformacional que es dependiente del ligando y las mutaciones interfieren con la unión del ligando lo que conlleva a una activación constitutiva (Lee et al, 2023). Mutaciones como G648D, G648S, A643T, A643V, Y642F, G304R, A646V y W478C se han descrito en aislamientos clínicos resistentes a azoles. Hay siete de estas mutaciones que incrementan la expresión de *CaERG11*. Así mismo otras mutaciones en *CaUPC2* aumentan la expresión de otros genes de la vía del ergosterol, como por ejemplo la mutación A643V en *CaUPC2* induce la expresión de *CaERG2*, *CaERG3*, *CaERG5*, *CaERG6*, *CaERG9* y *CaERG10*. Dado que *C. albicans* es diploide, mutaciones en ambos alelos de *CaUPC2* causan mayor resistencia que las mutaciones en un solo alelo (Bhattacharya et al, 2020).

En el caso de *N. glabratus* el genoma tiene dos genes homólogos de *CaUPC2*; *CgUPC2A* y *CgUPC2B*. Por su parte *CgUPC2A* es un importante regulador de la vía del ergosterol y se requiere para la resistencia a azoles, la delección en este gen produce sensibilidad en los azoles mientras que no se han observado efectos en las cepas con *CgUPC2B* deleccionado. Hasta el momento no se han reportado mutaciones en *CgUPC2A* o *CgUPC2B* (Bhattacharya et al, 2020; Lee et al, 2023).

La expresión de *CYP51A/ERG11* como respuesta a la exposición a los azoles es regulada por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP por sus siglas en inglés), siendo SrbA en *A. fumigatus* y Sre1 en *C. neoformans* (Lee et al, 2023).

La aneuploidía puede conferir tolerancia cruzada a diferentes fármacos, ya que cambia el número de copias de muchos genes de forma simultánea y en un momento dado (Lee et al, 2023).

Sustitución del ergosterol

Otro mecanismo de resistencia menos común es la alteración en la vía de la biosíntesis de los esteroides que resulta en la sustitución del ergosterol por otro esteroide en la membrana citoplasmática. Se ha visto que este mecanismo puede asociarse a varios genes, entre ellos el *ERG3* y *ERG6* (Vale et al, 2012).

Gen *ERG3*: Este mecanismo es crítico en la resistencia a los azoles consiste en la inactivación de la enzima esteroide $\Delta 5,6$ desaturasa que es codificada por el gen *ERG3*, esta enzima cataliza la formación de un doble enlace carbono-carbono en el sustrato en las últimas etapas de la síntesis de ergosterol (Vale et al, 2012). Específicamente por mutaciones de pérdida de función en *ERG3* que conducen a un bloqueo en la acumulación de esteroide tóxico 14- α -metil-3,6-diol, y que de lo contrario se acumularía en respuesta a la inhibición de Erg11 mediada por los azoles (Lee et al, 2023). Esta enzima convierte el episterol en ergosta-5,7,24(28)-trienol durante la síntesis de ergosterol (Bhattacharya et al, 2020).

Entonces, cuando Erg11 es inhibido la enzima Erg3 es la responsable de la conversión de los esteroides 14- α -metilados intermediarios no tóxicos acumulados debido a la acción de los azoles, básicamente el 14- α -metilfecosterol, en el esteroide tóxico 14- α -metil ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, tanto en *C. albicans* como *N. glabratus* (Vale et al, 2012; Bhattacharya et al, 2020) (figura 3). Mutaciones como el cambio de un ácido aspártico por ácido glutámico en la posición 19, produce la inhibición de la enzima y confiere resistencia a los azoles, dando lugar a la acumulación de un esteroide no tóxico (14 α -metilfecosterol) para la célula (Espinel, 2008).

Por lo tanto, una disrupción en *ERG3* da como resultado un incremento en la resistencia a azoles en *C. albicans*. Se ha reportado que un cambio de una glutamina por alanina en la

posición 139 de Erg3p (Q139A) se relaciona con resistencia a azoles en aislamientos de *N. glabratus* (Bhattacharya et al, 2020).

Gen ERG6: la enzima $\Delta 24$ esterol C-metil transferasa o Erg6p es una enzima no esencial en la biosíntesis de ergosterol, contribuye con la formación del diol tóxico a partir del lanosterol. Se observa una resistencia significativa a los azoles en *C. albicans* con una delección heterocigota de ERG6, mientras que en *S. cerevisiae* Erg6p muestra un aumento a la resistencia a los azoles, un aumento en la permeabilidad de la membrana y una baja actividad de la bomba de eflujo Pdr5p. Lo anterior sugiere que la resistencia a azoles dependiente de ERG6 es el resultado de la formación del esterol tóxico y no a una sobreexpresión de bombas de eflujo (Bhattacharya et al, 2020).

Alteración en la importación de esteroides

La importación de esteroides es un posible mecanismo de resistencia a azoles que se ha identificado recientemente. La importación exógena de esteroides puede compensar la disminución de los niveles de ergosterol de la célula debido a la acción de los azoles. La importación de esteroides se ha caracterizado en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *N. glabratus*. (Bhattacharya et al, 2020).

Tanto *S. cerevisiae* como *N. glabratus* importan esteroides bajo condiciones anaeróbicas o microaerofílicas, para lo que utilizan importadores como Aus1p y Pdr11p mostrando así resistencia a los azoles. Aumentos en la importación de esteroides se pueden dar por las mutaciones en *UPC2*, defectos en la biosíntesis de ergosterol y grupo hemo. Estos aumentos se pueden reflejar en cepas de *S. cerevisiae* con mutaciones *ScERG1* y *ScERG7*. (Bhattacharya et al, 2020).

En el caso de *C. albicans* importa los esteroides aeróbicamente, por lo que puede aumentar la resistencia a los azoles importando colesterol y suero de la sangre. (Bhattacharya et al, 2020).

Formación de biopelículas

Las levaduras pueden crecer libremente (planctónicamente) o desarrollar una matriz extracelular (por sus siglas en inglés *extracellular matrix* ECM) para unirse y formar una comunidad organizada de células microbianas. Esta matriz está compuesta de polisacáridos y proteínas, la produce la levadura como protección contra factores estresantes como los antimicóticos y el sistema inmunológico del huésped. Las biopelículas están estructuradas de manera que proporcionan el espacio adecuado para que entren los nutrientes y salgan desechos, proporcionando a la vez un entorno estable capaz de tolerar concentraciones extremadamente altas de antimicrobianos (Tsui, 2016; Czajka, 2023). *C. albicans* es la que más se asocia a la formación de biopelículas, pero también se asocian otras especies como: *C. auris*, *N. glabratus*, *C. dubliniensis*, *P. kudriavzevii*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Czajka, 2023).

La biopelícula se puede desarrollar durante el tratamiento antifúngico, permitiendo así que las células sean más resistentes. Dentro de los antifúngicos que se han citado como menos eficaces, incluso dentro de las 72 horas del desarrollo/maduración de la biopelícula se encuentran los azoles y los polienos. En el caso de *C. albicans* con biopelícula la resistencia puede aumentar hasta 1000 veces para el tratamiento con fluconazol y aproximadamente 10 veces para el tratamiento con AMB, en comparación con las células planctónicas (Czajka, 2023). En general las biopelículas fúngicas muestran un aumento de hasta 20000 veces la CMI antifúngica en comparación con las células planctónicas (Tsui, 2016). Esta resistencia a los antifúngicos se da tanto por las mutaciones genéticas que promueven la resistencia en las células planctónicas como por factores que incluyen la protección física, aumento de la densidad celular de la comunidad microbiana, células persistentes y secreción vesicular extracelular. Por lo que es importante considerar si esta característica está presente al momento del diagnóstico (Czajka, 2023). Así, la resistencia y tolerancia de *C. albicans* a los antifúngicos es multifactorial y compleja, pero se atribuye en gran medida a la presencia de la matriz extracelular, la regulación positiva de las bombas de eflujo de fármacos (independientemente de la exposición a los fármacos) y la presencia de células persistentes (Kaur, 2023).

La proteína de superficie específica de la hifa de *C. albicans* Als3, funciona como una adhesina, media la unión a las células epiteliales, células endoteliales y las proteínas de la matriz extracelular. También desempeña un papel importante en la formación de biopelículas en superficies protésicas (Liu, 2011). El gen *ALS3* codifica por una glicoproteína en la superficie celular se menciona como posible biomarcador de su formación (Czajka, 2023).

La matriz de la biopelícula es compleja y los principales constituyentes polisacáridos son α -manano, β -1,6 glucano y el β -1,3 glucano, que a pesar de estar en menor cantidad constituye un componente crítico de la matriz extracelular y es el responsable del secuestro del antifúngico impidiendo la difusión del fármaco, por lo tanto, se ha convertido en el objetivo principal para el tratamiento de infecciones por *Candida*. Tratamiento que complementado con la enzima β -1,3 glucanasa puede descomponer la molécula alterando así la arquitectura de la biopelícula. Se ha demostrado que las paredes de las células asociadas a biopelículas son dos veces más gruesas y contenían más carbohidratos y β -1,3 glucanos que las células planctónicas (Tsui, 2016; Czajka, 2023). Además, la sobreexpresión del gen *FKS1* puede aumentar la producción de β -1,3 glucano en las biopelículas de *Candida*, y se ha demostrado que este aumento afecta la susceptibilidad de las biopelículas de *C. albicans* a los antifúngicos al aumentar los niveles de secuestro de éstos, evitando que alcancen sus objetivos celulares. Se ha demostrado que las enzimas glucano transferasas como Bg12 y Phr1, así como también la exoglucanasa Xog1, son necesarias para el ensamblaje del β -glucano de la matriz extracelular y están involucradas en su transporte postraduccional desde la célula hasta la matriz extracelular, por lo que tienen funciones en el secuestro de fármacos antimicóticos (Czajka, 2023; Kaur, 2023).

Estudios refieren que, en células asociadas a biopelículas tratadas, se observa un aumento significativo en la expresión de los genes *ERG1*, *ERG3*, *ERG11* y *ERG25*, lo que indica una mayor capacidad de las biopelículas para responder al estrés antifúngico (Tsui, 2016).

Los genes que codifican para las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1 se ha demostrado que se expresan significativamente en cepas de *Candida* asociadas a biopelículas, pero parece no influir en la resistencia a las equinocandinas en este tipo de infecciones por *Candida*, por lo que la combinación de equinocandinas con otros fármacos puede ser una de las opciones

más potentes para tratar una infección asociada a una biopelícula (Tsui, 2016; Czajka, 2023; Amann, 2025). La expresión de los genes *CDR* y *MDR* parece ser inducida por la unión de *C. albicans* a la superficie de un sustrato, es decir, durante la etapa de adherencia de la formación de la biopelícula y permanecen regulados positivamente a medida que la biopelícula madura, independientemente de si hay o no un antimicótico presente; por lo que es intrínseca a la formación de la biopelícula y no se desencadena por la presencia de los fármacos azólicos (Tsui, 2016; Kaur, 2023).

Polienos

La resistencia más comúnmente descrita tiene que ver con las mutaciones en los genes *ERG* que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de ergosterol (Quiles & García, 2021). Estas mutaciones se relacionan con los genes *ERG3* y *ERG11*, se ha descrito que la disrupción en ambos genes causa disminución en los niveles de ergosterol y resistencia en *C. albicans* y *N. glabratus* a la AMB; sin embargo, esta resistencia en aislamientos clínicos no ha sido bien caracterizada (Bhattacharya et al, 2020).

Esta resistencia está descrita en levaduras y menos común en hongos filamentosos. En levaduras como *C. albicans* la resistencia se debe a la mutación de la enzima C-5,6 esterol desaturasa (Quiles & García, 2021). Esta mutación siempre se acompaña de mutaciones en el gen *ERG11*, por lo que siempre hay resistencia cruzada con los azoles, dando lugar a aislamientos multirresistentes (Mellado et al, 2002; Espinel, 2008; Quiles & García, 2021). En otras levaduras como *C. haemuli* (*C. haemulonii*) o *C. auris* la resistencia se debe a mutaciones en varios genes como *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* (Quiles & García, 2021).

Se ha propuesto que la escasa cantidad de cepas con resistencia a los polienos tiene que ver con que son utilizados en tratamientos cortos debido a su toxicidad y a lo que se presume es una desventaja evolutiva como lo es la asociación de la resistencia con la deficiencia en ergosterol (Mellado et al, 2002). La reducción de la síntesis de ergosterol es un mecanismo de resistencia fúngica ante los polienos, así como el tener una mayor actividad de la enzima

catalasa para reducir el daño por la peroxidación de los lípidos, que es inducida durante el tratamiento con AMB (Rivera et al, 2020).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las bombas de eflujo pueden contribuir a la resistencia antifúngica a la anfotericina B (AMB), particularmente en especies de *Candida*. Si bien se cree que el mecanismo principal de AMB es menos susceptible a las bombas de eflujo porque se dirige a los lípidos de la membrana (ergosterol), la aparición de la actividad de la bomba de eflujo, especialmente en biopelículas o en respuesta a otros medicamentos, puede conducir a la resistencia a AMB. Esto puede ocurrir a través de una mayor expresión de bombas de eflujo, como la bomba CDR1, que puede ser inducida por otros antimicóticos o medicamentos contra el cáncer. (Lee et al, 2023) (O'keeffe y Kavanagh, 2004)

Las bombas de eflujo contribuyen con la resistencia antifúngica a la Anfotericina B de manera indirecta, ya que el mecanismo de acción de AMB, que se une al ergosterol en la membrana celular y forma poros, no se basa directamente en proteínas (enzimas), lo que lo hace menos susceptible a las bombas de eflujo en comparación con otros medicamentos como los azoles. Sin embargo, las bombas de eflujo pueden ser un factor de resistencia importante de considerar. (Huang et al, 2024)

Estudios realizados por O'keeffe & Kavanagh, 2004 han mostrado que otros fármacos, como la adriamicina utilizada en quimioterapia, pueden inducir en las células fúngicas un aumento en la expresión de bombas de eflujo como CDR1 en el modelo *C. albicans*. Este aumento de la actividad de la bomba de eflujo puede disminuir la concentración intracelular de AMB, lo que lleva a tolerancia o resistencia (O'keeffe & Kavanagh, 2004; Huang et al, 2024).

La actividad de la bomba de eflujo es especialmente importante durante las primeras etapas de la formación de biopelículas fúngicas. Los estudios han demostrado que los genes de la bomba de eflujo se regulan al alza durante el crecimiento de la biopelícula, lo que puede contribuir a la resistencia general de la biopelícula a AMB. Las biopelículas son

aproximadamente ocho veces más resistentes a la AMB que las células planctónicas (Taff et al, 2013).

Alilaminas

La resistencia a la TRB es muy infrecuente, pero se ha relacionado con una mutación en el gen *ERGI* (Pontón & Quindós, 2006). En los dermatofitos esta resistencia se ha atribuido a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen de la enzima escualeno epoxidasa (*SQLE*). Las sustituciones de aminoácidos dan lugar a cambios estructurales que alteran la conformación de la enzima reduciendo la unión al fármaco y sin interrumpir la biosíntesis del ergosterol de la célula. Las diez mutaciones puntuales (A1179T, T1178C, C1191A, T1189C, T1189A, T1189G, T1305A, T1305G, T1306C y C1380T) llevan a la sustitución de aminoácidos en una de las cuatro posiciones (Leu393, Phe397, Phe415 e His440), las que corresponden a CMI elevadas “*in vitro*” para la terbinafina. Estas mutaciones modifican la estructura de la proteína provocando interferencia en la unión de la terbinafina a las enzimas diana y por ende una disminución de la susceptibilidad en las especies del género *Trichophyton* (Shankarnarayan et al, 2020; Gupta et al, 2025).

La resistencia a TRB se documentó por primera vez en el 2003, al encontrar que la resistencia en una cepa de *T. rubrum* era causada por una mutación puntual sin sentido en el gen *SQLE* y que provocaba la sustitución de aminoácidos L393F, situación que ha ido aumentando con el tiempo (Blanchard et al, 2023). Los aislamientos de *T. rubrum* por lo general siguen siendo susceptibles a la terbinafina; sin embargo, las mutaciones en el gen *SQLE* detectadas con más frecuencia en *T. rubrum* son F397L y F397I, seguido L393F y S395P. En el caso de *T. indotineae* P397L surge como la más dominante, seguida de la mutación A448T, L393S es menos frecuente seguida de S436A. Sin embargo, se ha documentado que la sustitución A448T no es un factor principal de la resistencia a la terbinafina por si sola, esto por cuanto se ha evidenciado que tal mutación se encuentra tanto en aislados sensibles como resistentes a la terbinafina, además de que esta mutación se localiza en la superficie de la proteína *SQLE*, lejos del punto de la TRB, lo que concuerda con su falta de impacto directo en la susceptibilidad a la TRB. Se ha reportado que la posición H440 se encuentra cerca del sitio

de unión de la enzima y las mutaciones se han asociado a bajos niveles de resistencia a la TRB en aislamientos de *Trichophyton* (Gupta et al, 2025).

Hay un aumento en el número de casos de resistencia a TRB causados por un nuevo taxon reportado en India del complejo *T. mentagrophytes/T. interdigitale*, el que ya se considera una especie separada llamada *Trichophyton indotineae* (Blanchard et al, 2023). Este es un patógeno emergente, y conocido por causar severas dermatofitosis como *tiña corporis* y *tiña cruris*. Se caracteriza por presentar una elevada resistencia a TRB, y la alta prevalencia de aislamientos con tal característica se atribuye a la frecuencia de las sustituciones de aminoácidos en la enzima escualeno epoxidasa, donde cambia la leucina por la fenilalanina en la posición 393 (L393F) y la fenilalanina por la leucina en la posición 397 (F397L) (De Paepe et al, 2023).

Se ha informado también esta resistencia en aislamientos de *T. rubrum* por las mutaciones sin sentido L393F y F397L, en el gen de la enzima escualeno epoxidasa. Así como resistencia cruzada en otros inhibidores de la enzima escualeno epoxidasa (SE) como la butenafina y el tolnaftato. También se encontró resistencia a la terbinafina en *A. nidulans*, la sustitución de fenilalanina por leucina en la posición 391 (F391L) SE y la mutación equivalente en el gen *ERGA* de *A. fumigatus* (Espinel, 2008; De Paepe et al, 2023).

El cambio de aminoácido en el codón 397 (F397L) SE se ha notificado en varios países como Estados Unidos, Japón, Rusia, Irán, Grecia, Suiza, Francia, Bélgica, Alemania, Dinamarca, Finlandia, Polonia y Canadá; por lo que las infecciones por dermatofitos resistentes a terbinafina no se limitan solo al sur de Asia (Cañete et al, 2023).

Cañete-Gibas y colaboradores evaluaron los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos de dermatofitos provenientes de varias instituciones de Estados Unidos entre los años 2021-2022 e identificaron especie que consideraron presentaban resistencia *in vitro*. De los aislamientos analizados el 18.6 % fueron resistentes a TRB y de ellos el 87.5 % se confirmó que 21 aislamientos eran de *T. rubrum* y 21 aislamientos eran *T. indotineae*. La resistencia a itraconazol fue rara. Con el fin de determinar la presencia de aislamientos previos con

resistencia a TRB, los investigadores realizaron una revisión de la susceptibilidad a los antifúngicos en las bases de datos entre 2001 y 2020, encontrando 32 aislamientos de *Trichophyton* resistentes a TRB. De estos, tres fueron identificados como *T. indotineae*, siendo que el primero en ser aislado data del 2017. Demostrando que la resistencia a TRB en dermatofitos fue relativamente común y que *T. indotineae* está presente en diversas zonas de Estados Unidos. Ninguno de los aislados analizados diferentes a *Trichophyton* fue resistente a la TRB o a itraconazol. Se analizó la secuencia del gen de la SE en 11 de los 21 aislamientos de *T. indotineae*, ocho presentaron variantes que condujeron a la sustitución de F397L dentro de la enzima SE; sin embargo, esta sustitución de aminoácidos no se encontró en el aislado que data del 2017. Se identificó un cambio de aminoácido de leucina a serina en el codón 393 (L393S), la cual es conocida por conducir a una resistencia de alto nivel a la TRB, y no se encontró en los restantes diez aislados (Cañete et al, 2023).

En el estudio realizado por Gabriela Blanchard y colaboradores encontraron que la resistencia a la TRB había aumentado de 0.63% en el 2013 a 1.3% en el 2021. Analizaron un total de 5634 aislamientos de los que el 0.83 % (47 cepas), 39 de *T. rubrum* y 8 de *T. mentagrophytes/T. interdigitale* tenían resistencia *in vitro* a TRB; identificación molecular reveló que del complejo mencionado cinco correspondían a *T. interdigitale* y tres *T. indotineae*. El tamizaje molecular detectó una mutación en *SQLE* en todos los casos, como L393F, L393S, F397L, F397I, F397V, Q408K, F415I, F415S, F415V, H440Y; también detectaron delección en A398, A399 y G400 en *T. rubrum*. Las mutaciones L393F y F397L fueron las más frecuentes; sin embargo, todas las mutaciones encontradas en el complejo *T. mentagrophytes/T. interdigitale* fueron F397L y solamente en una cepa encontraron la L393S (Blanchard et al, 2023).

Shen y colaboradores en 2020 motivados por el aumento en la resistencia a terbinafina y fracaso terapéutico consecuente, realizaron un estudio utilizando la terapia fotodinámica (TFD), esta se basa en la combinación de un fotosensibilizador, luz y oxígeno para crear especies reactivas del oxígeno fotoactivas. Utilizaron cepas de *T. rubrum* y *T. interdigitale* silvestre y con resistencia a TRB, y azul de metileno como fotosensibilizador. Los aislamientos con resistencia a TRB albergaban mutaciones en *SQLE* F397L, L393F, L393S,

F415S y F397I. La combinación de la terapia fotodinámica con el azul de metileno inhibió por completo todos los aislados independientemente del tiempo de incubación antes de la iluminación, la susceptibilidad de la terbinafina y la presencia de mutaciones SQLE. Solo se observó una ligera disminución de la eficacia en dos cultivos pigmentados de *T. interdigitale*, especulando los autores, que esto podría deberse a interferencia de la melanización en la luz inducida para la formación de especies reactivas del oxígeno. Concluyeron los autores que la susceptibilidad de la TRB al complejo TFD-AM es igual para cepas susceptibles y resistentes.

Lipopéptidos (Equinocandinas)

La resistencia a caspofungina es inusual, la alteración del gen *FKSI* que codifica la enzima a la que se dirigen las equinocandinas es el mecanismo de resistencia mejor estudiado en las equinocandinas (Pontón, 2008). Este mecanismo de resistencia involucra un limitado número de sustituciones de aminoácidos en la región *hot spot* del producto del gen *FKS*, que es la subunidad catalítica de la β -1,3-D-glucano sintasa (Perlin & Wiederhold, 2017; Hori & Shibuya, 2018) Estas mutaciones disminuyen la sensibilidad de la enzima por el fármaco dando lugar a CMI elevadas y se han relacionado con fracasos terapéuticos (Shields et al, 2012); Perlin & Wiederhold, 2017). En la mayoría de las especies de *Candida* hay tres genes *FKS*; *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* (Perlin & Wiederhold, 2017). Las mutaciones en *FKS1* son las que se relacionan con la resistencia a todas las especies de *Candida* a excepción de *N. glabratus*. Estas mutaciones *FKS1* incluyen sustituciones de aminoácidos en dos regiones altamente conservadas de la Fks1 llamadas *hot-spot 1* (HS1) y *hot-spot 2* (HS2), en *S. cerevisiae* y varios hongos patógenos. En *S. cerevisiae* la región HS1 abarca de Phe639-Pro647 y en *C. albicans* de Phe641-Pro649; HS2 en *S. cerevisiae* abarca Asp1353-Leu1360 y en *C. albicans* Asp1357-Leu1364 (Hori & Shibuya, 2018).

En *N. glabratus* la β -1,3-D-glucano sintetasa también está codificada por tres genes (*FKS1*, *FKS2* y *FKS3*), pero tanto las mutaciones de *FKS1* como las *FKS2* son las que se relacionan con la reducción de la sensibilidad a las equinocandinas y por ende con el fracaso de la terapia con las mismas (Shields et al, 2012; Perlin & Wiederhold, 2017). La disrupción simultánea de ambos genes es letal en *N. glabratus*, lo que sugiere que son funcionalmente redundantes

(Hori & Shibuya, 2018). Análisis *in vitro* han demostrado que la β -1,3-D-glucano sintetasa codificada por *FKS* mutados de aislamientos de *N. glabratus* es menos sensible a las equinocandinas. La identificación de estas mutaciones puede ser más sensible que las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos para la detección de aislamientos con resistencia a las equinocandinas. Son pocos los aislamientos de *Candida* que se han estudiado en el mundo, sin embargo, la prevalencia de las mutaciones de *FKS* parece ser baja. Se necesitan más estudios con un número sustancial de aislamientos para determinar si las pruebas de genotipo de *FKS* juegan un papel en el manejo de la candidiasis invasiva (Shields et al, 2012).

Si bien en los aislamientos clínicos de *N. glabratus* las mutaciones que están relacionadas con la resistencia ocurren tanto en *FKS1* como *FKS2*, la frecuencia de las sustituciones de aminoácidos en Fks2 es el doble que las de Fks1. Las sustituciones de aminoácidos más relevantes en *N. glabratus* incluyen S629P, F625 Δ y F625C en Fks1 y F659 Δ , S663F, R1378S, R1378G, S663P, P667H, P667T, E655G y E655K en Fks2 (Hori & Shibuya, 2018; Bhattacharya et al, 2020).

Las cepas con resistencia adquirida a las equinocandinas tienen mutaciones en las regiones *hot spot* de los genes *FKS*, mientras que algunas de las especies de hongos que son inherentemente resistentes a las equinocandinas como *C. parapsilosis* y *Fusarium solani* tienen polimorfismos naturales en esas regiones. *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii*, *C. dubliniensis*, *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*) y *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*) también se ha reportado que presentan resistencia adquirida (Hori & Shibuya, 2018; Quiles & García, 2021).

En el estudio realizado por Shields, R y colaboradores se hizo una correlación entre la respuesta terapéutica con las MICs y la presencia de mutaciones *FKS*, e identificar factores de riesgo predisponentes a las mutaciones *FKS* y falla terapéutica con equinocandinas de varios aislamientos de *N. glabratus* de pacientes que fueron tratados con equinocandinas. (Shields et al, 2012). De los 39 pacientes del estudio un 26 % (10) tuvo falla terapéutica mientras que un 74 % (29) respondieron a las equinocandinas. Las mutaciones en *FKS* se encontraron en 7 de los 18 % de los aislamientos, de las cuales dos fueron en *FKS1* y cinco

en *FKS2*. Además, se encontró que la sensibilidad y especificidad de la mutación *FKS* para predecir el fallo fue de un 60 % y 97 % respectivamente. Se demostró la correlación entre la presencia de la mutación *FKS* y el fallo terapéutico. Los factores asociados con las mutaciones incluyeron cirugía gastrointestinal o recepción de nutrición parenteral dentro de los 30 días de la candidiasis invasiva, exposición previa a equinocandinas, duración prolongada de la exposición a las equinocandinas y candidiasis invasiva irruptiva durante la terapia con equinocandinas. La conclusión a la que llegaron fue que la detección de la mutación *FKS* en *N. glabratus* fue superior que las MICs prediciendo la respuesta terapéutica de los pacientes (Shields et al, 2012).

Concentraciones de caspofungina >2 $\mu\text{g/ml}$ de varios aislamientos clínicos de *C. albicans* se han asociado con mutaciones en el gen *FKS1*, donde hay cambio de aminoácidos; ser 645F, o 645P o 645Y. Estas sustituciones son necesarias para que haya una susceptibilidad reducida a la caspofungina (Espinel, 2008).

En *S. cerevisiae* se han clonado tres genes *FKS* relacionados; *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*. *FKS1* y *FKS2* son homólogos en un 88 %, mientras que *FKS3* comparte un 56 % de identidad con *FKS1* y *FKS2*. *FKS1* se expresa durante el crecimiento vegetativo mientras que *FKS2* se expresa durante la esporulación. Cuando hay una disrupción en *FKS1* o *FKS2* la célula es viable pero una disrupción simultánea en ambos genes es letal. *FKS3* se expresa durante la esporulación, pero en relación con *FKS1* y *FKS2* su expresión es muy baja (Hori & Shibuya, 2018).

C. albicans también tiene tres genes *FKS* mientras que *A. fumigatus* y *C. neoformans* tienen un solo gen (Hori & Shibuya, 2018).

El complejo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* sensu stricto, *C. ortopsilosis* y *C. metapsilosis* tienen valores elevados de MIC para equinocandinas en comparación con otras *Candidas* spp. susceptibles. La β -1,3-D-glucano sintetasa sintetizada por *C. parapsilosis* es de diez a cincuenta veces menos afín a las equinocandinas comparado con *C. albicans*. El complejo *C. parapsilosis* tiene un polimorfismo natural en HS1 de la Fks1; comparando con la secuencia

de aminoácidos de *Candida albicans* la Pro660 de HS1 en *C. parapsilosis* se sustituye con alanina (P660A, equivalente a P649A en *C. albicans*). La mutación P647A en Fks de *S. cerevisiae* es equivalente a P660A en *C. parapsilosis* y a P649A en *C. albicans*; lo que resulta en mutantes con una disminución marcada en la sensibilidad de la β -1,3-D-glucano sintetasa y un aumento en las MICs para las equinocandinas (Hori & Shibuya, 2018).

Meyerozyma guilliermondii (*Candida guilliermondii*) tiene dos polimorfismos de aminoácidos en HS1 de Fks1, donde Leu633 se sustituye con metionina (L633M, equivalente a L642M en *C. albicans*) y Thr634 se sustituye con alanina (T634A, lo que es equivalente a T643A en *C. albicans*) (Hori & Shibuya, 2018). Las cepas modificadas genéticamente de *S. cerevisiae* en las que se reemplazó una región del gen *FKSI* por la de *Meyerozyma guilliermondii* mostraron un aumento de 32 veces en los valores de CMI en las equinocandinas. Estas sustituciones naturales parecen ser la causa de la susceptibilidad reducida a las equinocandinas en *Meyerozyma guilliermondii* (Hori & Shibuya, 2018).

En *C. auris* también se han encontrado sustituciones de aminoácidos en *FKSI* que se han asociado con la disminución de la sensibilidad a las equinocandinas (Lee et al, 2023).

Desde que se reportó por primera vez en 2005 la resistencia a las equinocandinas en *C. albicans* y otras *Candidas* spp., esta sigue relativamente baja; pero está aumentando rápidamente en *N. glabratus*. De 1669 aislamientos de *N. glabratus* obtenidos de sangre periférica entre 2006 y 2010 según el programa de vigilancia SENTRY, se encontró que entre el (8.0-9.3) % fueron resistentes a las equinocandinas. También en un estudio del hospital de la Universidad de Duke entre los años 2001 al 2010, de 313 aislamientos de *N. glabratus* de sangre periférica la resistencia aumentó del 4.9 % al 12.3 % (Hori & Shibuya, 2018).

La resistencia a las equinocandinas en *A. fumigatus* es rara (Lee et al, 2023). Se han descrito resistencias intrínsecas a los antifúngicos en especies que tienen 1-6- β glucano en su pared como el caso de *Cryptococcus* spp. y *Fusarium* spp. (Cuenca, 2010).

Fluocitosina

La resistencia se produce tanto de forma primaria como secundaria por defectos en las enzimas permeasa, desaminasa y/o fosforibosil transferasa, presentándose especialmente en *C. albicans* (Pontón & Quindós, 2006; Bhattacharya et al, 2020). Estudios han revelado que esta resistencia se debe a pérdida o mutación en la enzima purina-citosina permeasa, codificada por el gen *FCY2* y que es responsable de la adsorción del fármaco por la célula; por cambios en la enzima citosina desaminasa, codificada por el gen *FCY1* que es el responsable de la conversión a 5-FU, cambios en la enzima uracilo fosforibosil transferasa, codificada por el gen *FUR1* y que es responsable de la transformación de 5-fluorouracilo a 5-fluorouridina monofosfato o por un aumento en la producción de pirimidinas (Espinel, 2008; Bhattacharya et al, 2020; Zohra et al, 2021).

En el caso de *S. cerevisiae* la alteración en la citosina desaminasa se asocia con una fuerte resistencia que es independiente de la dosis, mientras que las alteraciones en la citosina permeasa se asocia a un nivel de toxicidad bajo, pero este es dependiente de la dosis, lo que indica la participación de otras dos citosinas permeasa; *FCY21* y *FCY22*. En el estudio realizado por Zohra y colaboradores descubrieron que hay rutas de entrada alternas del fármaco a través de dos genes homólogos de *FCY2* que contribuyen significativamente con la toxicidad de 5-FC (Zohra et al, 2021).

La resistencia puede ser primaria cuando está relacionada con una disminución de la captación del fármaco por la citosina permeasa, y secundaria cuando hay una limitación en la conversión de 5-fluocitosina a 5-FU o a 5-fluorouridina monofosfato por alteraciones en la enzima citosina desaminasa o uracilo fosforibosiltransferasa (Costa et al, 2015).

En muchos aislamientos que son clínicamente resistentes a 5-FC lleva a la hipótesis de que existen otros mecanismos que podrían regular la respuesta de las células fúngicas, u otros genes implicados en las vías de rescate de las pirimidinas (Zohra et al, 2021).

La resistencia primaria en *Candida* se da en menos del 5 % de las especies, excepto en *P. kudriavzevii* en la que la resistencia se da en más del 35 % de los aislamientos. En *C. albicans*

se ha demostrado que tanto la menor susceptibilidad, así como el aumento en la resistencia se correlacionan principalmente con un cambio de citosina a timina en la posición 301 del gen *FUR1*, lo que resulta en una sustitución de arginina a cisteína en la posición 101 (R101C) de la proteína Fur1, lo que altera su estructura cuaternaria y se afecta la actividad óptima.

En el caso de *C. dubliniensis* la resistencia se limita a los aislados pertenecientes al clado 3 y se asocia con una mutación S29L en el gen de la citosina desaminasa (Zohra et al, 2021), una mutación sin sentido en la enzima fur1 afecta la resistencia tanto en 5-FC como en 5-FU (Billmyre et al, 2020). Para *C. lusitaniae* la resistencia se asocia con dos eventos genéticos que son tanto la mutación C205T en el gen *FCY2* como la mutación sin sentido T26C en el gen *FCY1*, las que resultan en la sustitución de aminoácidos M9T en la citosina desaminasa. Se ha encontrado en *N. glabrata* la mutación G210D y L136R en el gen *FUR1*, la T84L en *FCY1* y la I384F en *FCY2* en aislamientos clínicos (Zohra et al, 2021). En diferentes estudios realizados no se ha encontrado resistencia en *C. tropicalis* o los aislamientos resistentes no portaban ninguna mutación en las secuencias codificantes de *FCY1*, *FCY2* o *FUR1*; se sugiere que uno de los mecanismos implicados se refiere al aumento de la transcripción de todos los genes implicados en la vía biosintética de novo de la pirimidina, lo que conduce a una sobreabundancia de uridil-monofosfato (UMP) (Delma et al, 2021). En *Candidozyma auris* la tasa de resistencia varía entre (0-47) %, se desconocen los mecanismos moleculares de resistencia para este patógeno; sin embargo, se ha reportado la presencia de una mutación en el gen *FUR1* que causa una sustitución de una isoleucina por una fenilalanina en la posición 211 (I211F) en un único aislado resistente a 5-FC (Zohra et al, 2021).

Chang y colaboradores realizaron un estudio en donde demostraron que los aislamientos de *Cryptococcus* desarrollaban frecuentemente resistencia a la 5-FC cuando se exponen a concentraciones varias veces superiores a la CMI, sugiriendo que la 5-FC es mutagénica a ciertas concentraciones. Encontraron diversos tipos de modificaciones genéticas aleatorias tanto en *C. neoformans* como en *C. gatti*, la frecuencia de resistencia excedía la frecuencia de mutación clásica espontánea. Además, encontraron que la mutación en el gen *UXS1* que codifica por una enzima que convierte el UDP-ácido glucurónico en UDP xilosa (molécula que proporciona componentes esenciales de los polisacáridos de la cápsula de *Cryptococcus*),

contribuye a la resistencia a la 5-FC; los aislamientos con la mutación *uxs1* acumulan UDP-ácido glucurónico, lo que parece regula la baja expresión de la permeasa *FCY2* reduciendo la captación celular del fármaco (Chang et al, 2021). Esta vía es crítica para la formación de la cápsula la cual constituye un factor de virulencia fundamental en el género *Cryptococcus*, pero no es una vía que se conozca desempeñe un papel en el metabolismo de la 5-FC (Billmyre et al, 2020). No existe ningún ortólogo de *UXSI* en *S. cerevisiae* ni en *C. albicans*, donde se dilucidaron muchos de los mecanismos de resistencia a 5-FC, por lo que los autores desconocían del papel de *UXSI* en esta resistencia hasta este estudio (Billmyre et al, 2020).

Phan-Canh y colaboradores encontraron que en *C. auris* una sola mutación sin sentido en el gen *FURI* provoca resistencia a la 5-FC por inactividad de Fur1, como la mutación R214T y la F211I. Consideran los autores que las mutaciones en el gen *FURI* no son las únicas asociadas a la resistencia a 5-FC, esto debido a que en algunas cepas estudiadas no detectaron mutaciones en *FUR1* a pesar de las CMI elevadas. A la vez detectaron mutaciones en *FCY2* como la I217S y la I212M (Phan-Canh et al, 2025).

En el estudio realizado por Pujol y colaboradores con aislamientos de *C. albicans* de diferentes sitios geográficos, identificaron 3 clados principales de *C. albicans* (I, II, III). En estudios posteriores se identificaron el cuarto clado, el grupo SA y el quinto clado, el grupo E. Demostraron que los aislamientos que son naturalmente resistentes a 5-FC están restringidos al grupo I y que los aislamientos del grupo I son generalmente menos susceptibles a 5-FC que los aislamientos que no pertenecen al grupo I; evidenciado ya que el 97 % de las cepas analizadas que mostraban una CMI ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ pertenecían al clado I y solo un 3 % pertenecían a alguno de los otros grupos. Además, el 72 % de los aislamientos del clado I eran menos susceptibles mientras que solo el 2 % de los aislamientos que eran de otro clado eran menos susceptibles; los autores demostraron por primera vez que un rasgo clínicamente relevante como la resistencia a 5-FC, es específica de un clado y que esto respalda la idea de que se da poca recombinación entre aislados del grupo I y los de los otros cuatro clados (Pujol et al, 2003). La prevalencia del clado SA es en Sur África y la del clado E en Europa, lo que los hace geográficamente específicos; también demostraron que el clado II no se encontraba en el sureste de Estados Unidos, y que los aislamientos del grupo I

representaban la mayoría de los aislamientos de América del Norte, seguido de los de Europa y en menor grado los de Sudáfrica; por esto el grupo I representa el clado principal de *C. albicans* en todas las regiones que fueron estudiadas (Pujol et al, 2004).

Las mutaciones en *FCY1* y *FCY2* suelen distinguirse de las mutaciones en *FURI*, ya que estas últimas confieren resistencia no solo a 5-FC sino también a 5-FU, mientras que las mutaciones en *FCY1* y *FCY2* le confieren resistencia solo a la 5-FC (Billmyre et al, 2020). Billmyre y colaboradores en 2020 realizaron una secuenciación completa del genoma por el método de Illumina junto con una secuenciación de Sanger para identificar la base genética de la resistencia a 5-FC “*in vitro*” de 16 aislamientos de *Cryptococcus deuterogattii*. Con base en los resultados obtenidos atribuyeron la resistencia a mutaciones en el gen *FURI* e identificaron una vía de resistencia a 5-FC que implica mutaciones en la vía responsable de la producción de cápsula. También demostraron que las deleciones del gen de reparación de errores de apareamiento del ADN (*MSH2*) conferían una tasa elevada de resistencia a 5-FC en *C. deuterogattii*; y que la exposición al antifúngico durante la infección puede seleccionar cepas con tasas de mutación elevadas con capacidad de adquirir resistencia al fármaco más rápidamente (Billmyre et al, 2020).

CAPITULO III. METODOLOGÍAS Y ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

Los nuevos métodos diagnósticos basados en la biología molecular han avanzado mucho dando lugar a técnicas muy sensibles y específicas que son capaces de analizar pequeñas cantidades de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN) y así detectar e identificar tanto microorganismos como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia relacionados al fracaso terapéutico. Estos métodos han permitido mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas y con ello brindar un tratamiento temprano, permitiendo disminuir la morbimortalidad asociada (Diz, 2020).

Todas las técnicas de biología molecular necesitan un paso previo de extracción de ADN o de ARN y para esto están disponibles kits comerciales con el respectivo protocolo, pero también se han desarrollado diferentes equipos que realizan este proceso de extracción de manera automatizada. Este material genético se requiere que sea purificado, para evitar la presencia de inhibidores o contaminantes que lleven a falsos positivos o negativos. Los métodos de purificación se basan en extracción/precipitación, ultra centrifugación, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad (Diz, 2020).

Otra técnica muy utilizada actualmente es la secuenciación del genoma, la cual consiste en determinar el orden de las bases adenina, citosina, guanina y timina en el genoma; esto es fundamental para determinar la cadena de aminoácidos por la que codifica un gen específico, lo cual permite la detección de mutaciones y de esta manera llegar al diagnóstico de enfermedades. También es posible determinar la presencia de genes de resistencias a tratamientos farmacológicos (Diz, 2020).

En general estos métodos moleculares se basan en la actividad de la enzima ADN polimerasa que sintetiza ADN a partir de otro fragmento de ADN produciendo la hebra complementaria. Existen diferentes métodos de secuenciación, como la secuenciación de Sanger, la secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS), pirosecuenciación, hibridación de sondas de

ADN, polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD) y polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) (Diz, 2020).

Los métodos de secuenciación han ido evolucionando a través de los años; el método de Sanger es el que se describe como primera generación, en la segunda generación figuran el método Roche 454 e Illumina, y dentro de los métodos de tercera generación se encuentran las plataformas PacBio y Oxford Nanopore (Camargo et al, 2020).

A continuación, se realizará una descripción detallada de las metodologías analíticas que han sido empleadas hasta la fecha para la determinación de factores de resistencia a los fármacos antifúngicos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares, se basa en la replicación exponencial *in vitro* de una región específica de ADN utilizando secuencias de ADN con una longitud de entre 15 y 30 nucleótidos que son las que van a delimitar la zona de amplificación y son complementarias a la región de ADN que se quiere amplificar; estas secuencias son los *primers* o cebadores (Salazar et al, 2013; Diz, 2020).

La función de los iniciadores o primers se basa en proporcionar un extremo 3' libre al que se añaden los nucleótidos mediante un enlace fosfodiéster, ya que la ADN polimerasa inicia la síntesis partiendo de un 3'OH preexistente. Como se aprecia en la figura 10 un iniciador "sentido" es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADN por lo que la polimerasa al añadir nucleótidos origina cadena 5'-3', mientras que el iniciador "antisentido" es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3' por lo que da origen a la cadena 3'-5' (Salazar, 2013).

Se requiere de una cadena de ADN que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa termoestable, cofactores como Mg⁺² o Mn⁺² para la correcta actividad de la polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis de la cadena y los oligonucleótidos o primers. Todos se agregan en un tubo Eppendorf y una vez que todos los reactivos son añadidos se

someten a una serie de (25-40) ciclos repetitivos con tres temperaturas diferentes (Figura 8). En cada uno de ellos las moléculas se duplican hasta que se agotan los reactivos, así cada copia que se genera en un ciclo sirve de molde para los siguientes ciclos por lo que la amplificación es exponencial. Esta amplificación *in vitro* se basa en una secuencia que sirve de molde y por complementariedad se sintetiza la cadena antiparalela, esta síntesis sigue la dirección 5'-3' para lo que necesita de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, formando el enlace fosfodiéster (Figura 9) (Salazar et al, 2013; Diz, 2020).

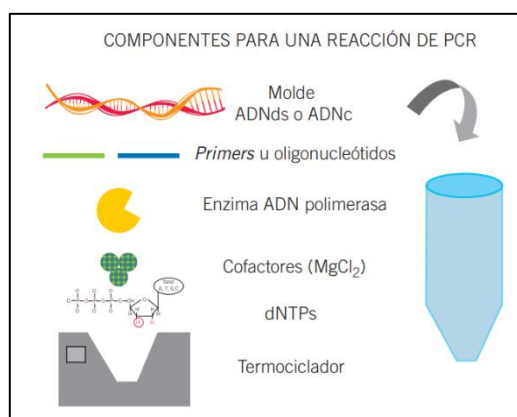


Figura 8: Componentes de la reacción de PCR Tomado de Salazar et al, 2013

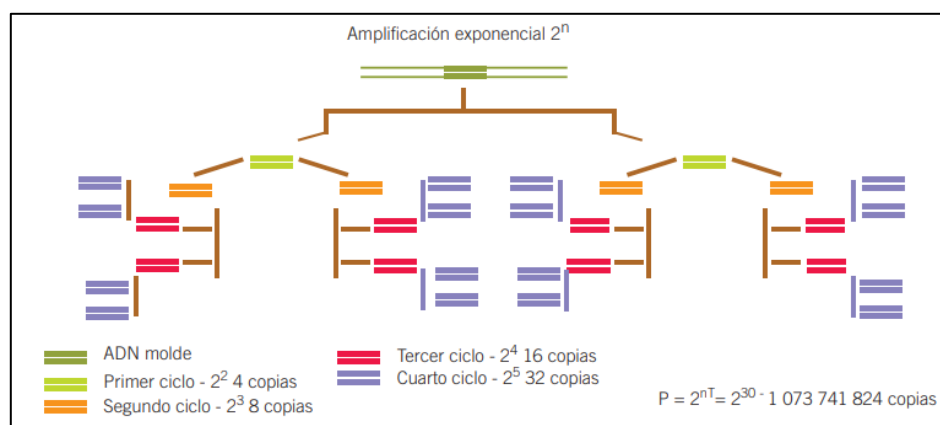


Figura 9. Esquema convencional de PCR Tomado de Salazar et al, 2013

En esta técnica de amplificación cada uno de los ciclos tiene tres fases (figura 10):

Fase de desnaturalización: ambas hebras de ADN se separan por la ruptura de los puentes de hidrógeno, quedando dos cadenas por separado que son las que van a servir de molde para que se unan los primers, esta fase tiene una temperatura de (94-96) °C (Diz, 2020).

Fase de apareamiento o *annealing*: los imprimadores se unen a la secuencia específica que se ha separado en la fase anterior, la temperatura va a depender de los imprimadores, pero oscila entre (45-55) °C (Diz, 2020).

Fase de extensión o *elongación*: la ADN polimerasa añade los nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde una vez que se ha dado la unión del primer a la cadena complementaria, obteniendo así una molécula de ADN de doble cadena. La temperatura está por encima de los 72°C (Diz, 2020).

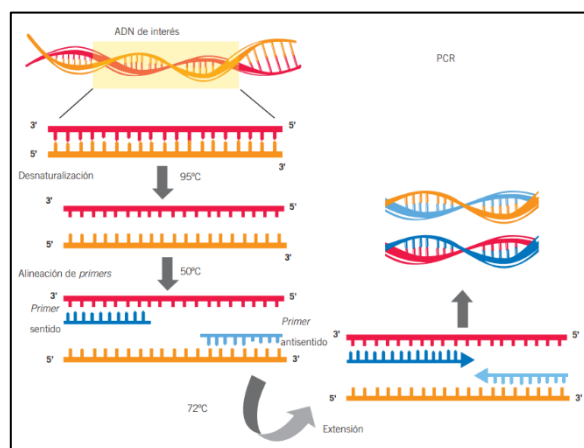


Figura 10: Fases de la de PCR Tomado de Salazar et al, 2013

PCR Convencional: se basa en la detección del producto amplificado por medio de una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. Los ácidos nucleicos migran en dirección del polo positivo por la carga negativa aportada por el grupo fosfato. La intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de producto amplificado y se verifica la longitud interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas (Salazar et al, 2013; Diz, 2020).

PCR tiempo real: cambia el método de detección del producto amplificado, esta se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación. Mediante la detección de la fluorescencia liberada durante la reacción de amplificación puede medirse la cantidad de ADN sintetizado en cada momento ya que la fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado (Salazar et al, 2013).

Hay diferentes sistemas comerciales que se basan en esta técnica como por ejemplo el GeneXpert y Film Array Biofire (Diz, 2020).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR): se diferencia de PCR convencional en que la hebra molde es ácido ribonucleico (ARN), a partir del que se sintetiza ADN complementario y sobre este se realiza la PCR. Esta PCR puede ser en tiempo real (con marcaje fluorescente) o multiplex (amplificación simultánea de varios genes, para lo que utilizan varios *primers*) (Diz, 2020).

El producto de la PCR puede utilizarse para secuenciación, detección de patógenos infecciosos como bacterias, virus y hongos, en medicina forense, detección de mutaciones, análisis de expresión génica o determinación de carga viral. Con esta técnica se puede hacer diagnóstico al amplificar segmentos que contienen una mutación conocida o mutaciones desconocidas las que se secuenciarán y determinarán después de la PCR. La detección de genomas de patógenos es la aplicación diagnóstica más utilizada de la PCR, permite un diagnóstico temprano ya que detecta pocas copias del genoma como sucede en períodos iniciales de la infección (Salazar, 2013).

En un estudio realizado por Fuentes *et al.* se estudiaron 27 aislamientos de *C. albicans* para determinar mutaciones en la región 408-488 del gen *ERG11*, dentro de los cuales se tenían aislamientos tanto resistentes como sensibles y sensibles dosis dependiente. Estos aislamientos fueron identificados por métodos como tubo germinativo, microcultivo, agar cromogénico (CHROMagar *Candida*) y API 32C (Biomeriux); mientras que las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos para fluconazol y voriconazol se realizaron según los estándares del CLSI en el documento M27-A3. Para la secuenciación de la región 405-488 del gen *ERG11* se extrajo el ADN mediante el sistema comercial High Pure PCR Template

Preparation Kit®, luego por PCR se la amplificó la región 405-488 del gen *ERG11* (GeneID: 3641571), y estos productos purificados se enviaron a secuenciar a la empresa especializada MacroGen®. Las secuencias se depuraron usando el programa Conting Expres de Vector NTI® Advance 11.0 y se alinearon usando el programa Clustal W tomando como referencia *ERG11* de *C. albicans* ATCC SC5314 (Gene ID: 3641571) con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) 5.1. La extracción del ARN se realizó con el sistema comercial RNeasy Mini Kit®, la reacción de retrotranscripción se realizó con ImPromII ReverseTranscripcion System®. Para la expresión de genes se diseñaron los siguientes primers usando el programa Primer Express®:

ERG11 644pb

erg11-for: GGGTGGTCAACATACTTCTGC

erg11-rev: TCCCAAATGATTTCTGCTGGT

ERG11 144pb

erg11RT-for: TACTGCTGCTGCCAAAGCTA

erg11RT-rev: GCAAATTGTTCCCAATACA

CDR1 288 pb

CDR1-for: GAAAGAGAACCATTACCAGG

CDR1-rev: AGGAATCGACGGATCAC

CDR2 1500 pb

CDR2-for: GAATTTGCCGCTAGATTAAGAA

CDR2-rev: ACCACGCACAAAATCGTTAC

MDR1 148 pb

MDR1-for: CAAATTCCCACTGCTTTGGT

MDR2-rev: CGGCTAACCCAACCTGGTAAA

ACT1 209 pb

ACT1-for: CCAGCTTTCTACGTTTCC

ACT1-rev: CTGTAACCACGTTTCAGAC

La expresión de los genes se determinó mediante el método de delta-delta CT (*cycle threshold*) o $\Delta\Delta$ CT y los gráficos se analizaron con el programa Graph Pad Prism® 5. Se detectaron 10 mutaciones, pero no se relacionaron con la resistencia a azoles porque estaban presentes tanto en cepas resistentes como susceptibles. Para la expresión relativa del gen *ERG11* no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre aislados resistentes y susceptibles. En cuanto a las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1; se encontró una sobreexpresión de los tres genes en un 62.5% de las cepas con resistencia a los azoles y no se encontró diferencia en la expresión de estos genes entre las cepas sensibles dosis dependiente y las sensibles.

Alicia Moreno y colaboradores, 2022 realizan un estudio con 580 aislamientos clínicos de *T. rubrum* y del complejo *T. interdigitale/T. mentagrophytes* obtenidos de laboratorios de diagnóstico de París; inicialmente identificados considerando las características micro y macroscópicas. La resistencia a TRB se determinó inicialmente por cultivo en agar SDA modificado con terbinafina (TCAM) y agar SDA sin el fármaco, además, se determinó la CMI para terbinafina, itraconazol, amorolfina y voriconazol siguiendo el método de microdilución en caldo de EUCAST; solo se obtuvieron tres aislamientos resistentes a TRB. La extracción de ADN de los aislados del complejo *T. interdigitale/T. mentagrophytes* se realizó por el método eMAG. La identificación de los aislados del complejo *T. interdigitale/T. mentagrophytes* se confirmó a nivel de especie y genotipo por secuenciación y amplificación por PCR del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal (ADNr). Para la secuenciación de ITS utilizaron los *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4c (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y la amplificación por PCR se realizó con la mezcla lista para usar LC480 (Roche, Diagnostics, Mylan Francia). Las secuencias obtenidas se editaron y compararon en el programa BLAST con la base de datos GeneBank y la genotipificación de los aislados se realizó con la alineación MUSCLE de las secuencias ITS con el programa Mega X con secuencias de

referencia y la construcción del árbol filogenético con el programa Mega X. El gen *SQLE* de los tres aislamientos resistentes a TRB y veinte aislados más del complejo *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes* susceptibles seleccionados al azar, se amplificó por PCR igual que lo descrito para la identificación. El segmento amplificado era de más de mil nucleótidos, por lo que se cortó en dos para la secuenciación, y para esta se utilizaron cuatro primers: Tr*SQLE-F1*, Tr*SQLE-R1*, *erg1_2-F* y *erg1_2-R*. Las secuencias se alinearon utilizando la secuencia GeneBank MT700509.1 (*T. mentagrophytes* aislado 203513/19) y la secuencia GenBank XM_003233797.1 (*T. rubrum* CBS 118892). Las mutaciones sin sentido se analizaron mediante MEGA X. El análisis molecular determinó que uno de los aislamientos resistentes a TRB clasificado inicialmente como *T. mentagrophytes* era *T. indotineae* y se confirmó la identificación previa de los otros dos aislamientos clasificado como *T. rubrum* y *T. interdigitale*. Se encontraron mutaciones sin sentido relacionadas a una sustitución de aminoácidos en la proteína SQLE de nueve aislamientos. El aislado TRB resistente de *T. indotineae* albergaba una sustitución del aminoácido leucina por serina en la posición 393 (L393S), mientras que los aislamientos de *T. indotineae* susceptibles a TRB eran de tipo salvaje o tenían la sustitución del aminoácido alanina por treonina en la posición 448 (Ala448Thr). Los aislados resistentes a TRB de *T. rubrum* y *T. interdigitale* albergaban la sustitución del aminoácido F397L.

Debido a la descripción en el 2001 de *C. africana* en mujeres con candidiasis vulvo-vaginal recurrente, y que una de las características que la diferencian de *C. albicans* es el tamaño del gen *HWPI* (Hyphal wall protein 1). En su tesis para optar por el grado de bacterióloga Cadena, S.A en 2016 hace un estudio con una colección de aislamientos provenientes de muestras de tracto genito/urinario que habían sido identificadas anteriormente como *C. albicans*, se realizó PCR convencional para la evaluación de presencia y tamaño del gen *HWPI*, utilizando los iniciadores específicos del gen: 5-GTACCACTTCAGAATCATCAC-3 (for) y 5-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3 (rev). La posterior revelación de resultados se hizo por electroforesis en gel de agarosa y para la visualización de las bandas se utilizó el agente fluorescente HydraGren 1x, como patrón de longitud molecular se utilizó zymoresearch de 100 pb para comparar los fragmentos obtenidos. Se utilizaron 22 aislados tomando en cuenta los resultados de los estudios

fenotípicos (asimilación de Trehalosa y formación de clamidosporas), dentro de los cuales 12 se consideraron presuntivas *Candidas* atípicas, es decir, con resultados diferentes a lo establecido para *C. albicans* en pruebas fenotípicas, bioquímicas y/o molecular, y las otras 10 se tomaron como control. En 3 de las cepas típicas se observó un peso molecular de 700 pb para este gen HWP1, lo que coincide según comenta la autora con lo mencionado en la literatura con respecto a *C. africana*, y que esta disminución en el tamaño del gen (que para *C. albicans* está descrito en 900 pb) es debido a una delección de 604 pb en el tamaño total del gen y los cebadores utilizados flanquean una porción de aproximadamente 200 pb dentro de este.

Secuenciación de primera generación: método de Sanger

El demostrar que la molécula de ADN contiene la información para la expresión génica y que el orden en el que se disponen las bases nitrogenadas es lo que codifica tal información dio pie al desarrollo de las técnicas de secuenciación. La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos adenina, guanina, citosina y timina de secciones de una molécula de ADN, esto es importante ya que es lo que determina la información genética para el funcionamiento de los organismos (Ongay, 2021).

Las técnicas de secuenciación arrojan lecturas de información denominadas *reads* que son los que reflejan los resultados de la secuenciación; estos resultados son un conjunto complejo de múltiples caracteres que son transformados y analizados posteriormente haciendo uso de programas bioinformáticos. Esta información generada se interpreta según sea el objetivo del estudio, ya sea en metagenómica, transcriptómica o secuenciación de genomas completos (Rojas, 2023).

Para el análisis, organización y visualización de los resultados de la secuenciación se han desarrollado programas como NanoPlot (procesamiento de secuencias de lectura larga) y FastQC (procesamiento de secuencias lectura corta), de los que se obtienen resúmenes y representaciones gráficas de los datos. Para el ensamblaje de los genomas se emplean plataformas como Unicycler, que acomodan las lecturas cortas y largas y así generar un archivo con el genoma completo en estudio. Una vez obtenido el genoma y dependiendo de

la finalidad del estudio puede analizarse de diversas formas, ya sea como alineamiento con otros genomas, estudio de relaciones filogenéticas o para observaciones sobre los distintos genes presentes (Rojas, 2023).

El método que ha sido el estándar de oro de secuenciación de ADN es el desarrollado por Sanger en 1974, denominado “Método dideoxi de Sanger”, el cual permite obtener secuencias de hasta 500 pares de bases y es la base de los procedimientos actuales de secuenciación automatizada. En este método se utilizan análogos de dNTP específicos de terminación de cadena como lo son los dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTP), cuya diferencia con los dNTP es que no poseen el grupo hidroxilo en el carbono 3' de la desoxirribosa. Estos ddNTP se incorporan a la cadena de ADN en crecimiento mediante la ADN polimerasa, y actúan como terminadores ya que, al poseer el OH libre en el extremo 3', no es posible realizar la adición de otro nucleótido. Para llevar a cabo este método, lo primero que se debe hacer, es aislar y clonar el ADN que se quiere secuenciar, luego se desnaturaliza y se utiliza una sola hebra en la secuenciación, se utiliza un iniciador o primer marcado, este iniciador por lo general es un fragmento de restricción que suministra el extremo 3' OH que necesita la ADN polimerasa para continuar la adición de nucleótidos. Se preparan 4 tubos de reacción, cada uno con el ADN molde de hebra sencilla que se desea secuenciar, la ADN polimerasa, el iniciador marcado y los 4 dNTP, además a cada tubo se le agrega uno de los ddNTP en exceso (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP). En cada tubo se van a producir cadenas de ADN de diferentes longitudes y todas van a terminar en el lugar en donde se incorporó el dideoxinucleótido correspondiente. El contenido de los 4 tubos se separa en paralelo por electroforesis en gel de poliacrilamida; aquí lo que sucede es que se separan las cadenas de ADN de acuerdo, a la longitud en donde las más pequeñas migran más rápido y las más grandes más lento. Cada tubo debería tener suficientes fragmentos terminados en cada una de las posiciones del nucleótido correspondiente (figura 8). En la actualidad las marcas que se emplean son quimioluminiscentes (fluorescentes) para evitar la exposición a la radiactividad, que era lo que anteriormente se utilizaba como marcaje y se visualizaba mediante una auto-radiografía. El fluorocromo se tiene en el extremo 5' del iniciador y la identificación se hace separando los diferentes fragmentos por electroforesis

en gel de poliacrilamida y así se pueda leer la secuencia directamente sobre el gel de acuerdo con el patrón de bandas (Salazar et al, 2013; Diz, 2020).

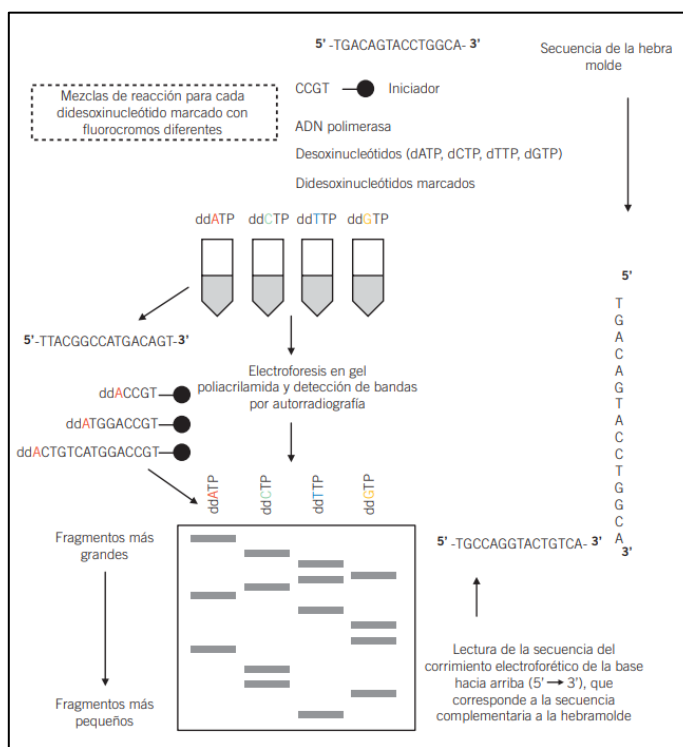


Figura 11. Método de secuenciación didesoxi de Sanger. Tomado de Salazar, 2013

Actualmente, se cuenta con esta técnica de manera automatizada en donde la reacción se puede llevar a cabo en un solo tubo ya que cada ddNTP está marcado con un fluoróforo diferente, cada vez que se añade un didesoxinucleótido la reacción se detiene y se emite una señal fluorescente que será diferente dependiendo del nucleótido que se haya incorporado. Se obtienen muchos fragmentos con diferente número de nucleótidos según se hayan incorporado y después de muchos ciclos de amplificación. Luego se hace una electroforesis capilar y una computadora, a través de un láser excita cada fluoróforo para así identificar cada ddNTP (Camargo et al, 2020; Diz, 2020). El fragmento de ADN fluorescente pasa por el punto de tensión del secuenciador automático y estas señales se envían a una computadora con un programa especial. Así un golpe de láser excita la tinción fluorescente, la señal de fluorescencia emitida se digitaliza y es captada por detectores que una computadora analiza y descifra, y pueden observarse los resultados obtenidos en tiempo real. En minutos, este

programa procesa la imagen del gel capilar. Para cada muestra secuenciada se crean curvas de cuatro colores, cada uno por cada nucleótido, y debajo de cada pico de la secuencia de identifica la secuencia de nucleótidos correspondientes al fragmento analizado. Puede analizarse la secuencia de 10 muestras simultáneamente o bien estudiar 40 fragmentos de ADN (figura 9) (Salazar et al, 2013).

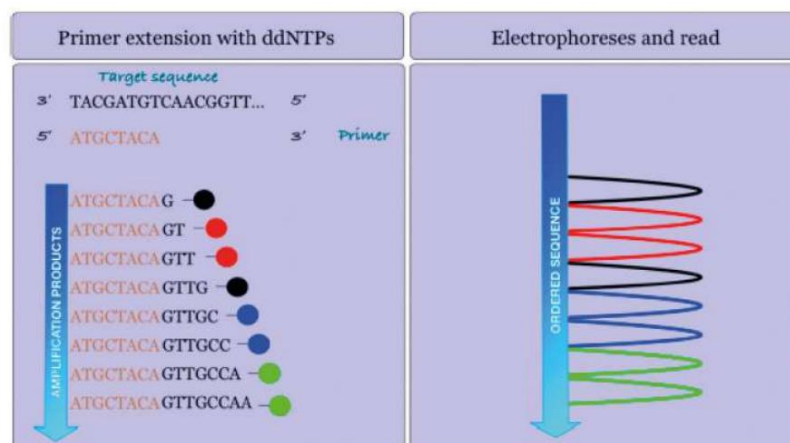


Figura 12. Método de Sanger donde cada ddNTP está marcado con un fluoróforo diferente y la posterior señal emitida por fluorescencia. Tomado de Diz, 2020.

Secuenciación masiva en paralelo (SMP) o secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación de segunda generación, se abrió paso a partir del 2005, en ella se facilita la manera de secuenciar grandes cantidades de ADN. Se caracterizan porque amplifican millones de bandas a la vez. Tienen la ventaja de un mejor rendimiento, bajo costo y menor tiempo de corrida, pero la desventaja es que presentan mayor tasa de error. Estas plataformas pueden emplearse para obtener secuencias de genomas completos o regiones genéticas de interés (Camargo et al, 2020).

Estas técnicas de nueva generación permiten detectar mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y variantes estructurales. En general, en esta técnica, el ADN o ARN que ha sido extraído previamente se fragmenta y se amplifica en una superficie sólida donde se agrupan para secuenciarse. La secuenciación se hace con muchos ciclos, en los que se añaden nucleótidos marcados con fluorescencia y se determina la secuencia correspondiente mediante fotografía (Diz, 2020). Las plataformas de secuenciación de próxima generación

más importantes son Roche 454, descrita en 1987 pero debido a su bajo rendimiento dejó de ser comercializada en 2013, secuenciación por ligación y detección de nucleótidos (SOLiD) en 2006, Illumina descrita entre el 2006 y 2008, e Ion Torrent que se lanzó al mercado en el 2010, este es el primer método que traduce la información del cambio de pH generado durante la síntesis en información digital en lugar de sistemas ópticos (Camargo et al, 2020; Diz, 2020). Estas plataformas varían de acuerdo con la plantilla que se utiliza para la secuenciación, la reacción de secuenciación y la forma en que se hace la detección (Diz, 2020).

Sin embargo, estas tecnologías han sido desplazadas y/o descontinuadas por la tecnología de Illumina que utiliza el método de secuenciación por síntesis o SBS (por sus siglas en inglés (*sequencing by synthesis*) que permite la lectura paralela de millones de fragmentos al detectar las bases individuales a medida que se incorporan a las cadenas de ADN en crecimiento, y una vez finalizado el proceso se obtiene una secuenciación base por base con datos de alta precisión y calidad que pueden usarse para el ensamblaje *de novo*, identificación de mutaciones de interés clínico y la metagenómica (Rojas, 2023).

Se considera que este tipo de secuenciación tiene un rendimiento más alto que las tecnologías de tercera generación y una preparación de muestras más compleja ya que requiere de una amplificación previa por PCR, pero a la vez cuenta con algunos sesgos y limitaciones como que la lectura de secuencias cortas se ve limitada ante las repeticiones en tándem del ADN, lo que puede causar errores de lectura y en el ensamblaje (Rojas, 2023).

Secuenciación de tercera generación

Las técnicas de tercera generación o TGS (por sus siglas en inglés *third-generation sequencing*) fueron desarrolladas para mejorar las debilidades de las técnicas de segunda generación en lo que respecta a la capacidad de generar lecturas extensas. Estas técnicas permiten lecturas con extensiones de hasta 2.3 Mb y tienen la ventaja de que no requieren de una amplificación preliminar (Rojas, 2023).

Su desarrollo inicia en el 2004, se generan secuencias de más de 1000 pb, utilizan como plantilla una molécula sencilla de ADN que es secuenciada en tiempo real y no requiere pasos de limpieza entre las lecturas. No requieren mucha preparación de la muestra, disminuyen el costo y aumentan la velocidad de la secuenciación. En esta generación se encuentra la Tecnología de secuenciación de Molécula Única en Tiempo real (por sus siglas en inglés *Single-Molecule, Real Time*, SMRT®) y la Secuenciación Oxford Nanopore Technology (Camargo et al, 2020).

La tecnología Oxford Nanopore Technology utiliza la secuenciación por nanoporos, los que emplean el perfil eléctrico de cada nucleótido de ADN y ARN para su identificación. Estos canales detectan cambios en la corriente eléctrica que son característicos de cada nucleótido gracias a que permiten el paso de una molécula a la vez. Además, esta es la única tecnología que tiene la capacidad de hacer una lectura directa de secuencias de ARN. La tecnología SMRT® se utiliza para la elaboración de perfiles filogenéticos de microbiomas por medio de una clasificación taxonómica a nivel de género, para estudios genómicos, transcriptómicos, epigenómicos, metagenómicos y de ensamblaje *de novo*. La secuenciación de fragmentos largos tiene ventajas al momento de hacer el ensamblaje genómico, como mayor repetitividad de fragmentos, cobertura y probabilidad para el cierre del genoma, comparado con ensamblaje de secuencias cortas. Sin embargo, a la vez la secuenciación de fragmentos largos tiene desventajas relacionadas a la calidad de las lecturas, la amplia longitud de las secuencias leídas aumenta la tasa de error y esta tendencia se mantiene a lo largo de las secuencias tanto para ADN como para ARN directa o indirectamente (Rojas, 2023).

Recientemente se utilizan las técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación de próxima generación, para analizar cuantitativamente las comunidades de biopelículas y tener información sobre su dinámica ecológica, ya que permiten identificar la diversidad y la composición de las poblaciones microbianas (Amann, 2025).

De Paepe y colaboradores realizaron un estudio de tamizaje donde detectaron la resistencia a TRB en 20 cepas de *Trichophyton indotineae*; la identificación se confirmó por secuenciación de ADN de la región ITS del ADNr, para lo que se utilizaron los *primers* V9G

(for) y LSU (rev). Para la extracción de ADN se utilizó el método de secuenciación eMAG®, no se especifica el método utilizado para la amplificación del gen que codifica por la SE, pero se hace referencia a que el fragmento amplificado tenía una longitud de más de 1000 nucleótidos, por lo que se cortó en dos partes para la secuenciación y se utilizaron cuatro primers para secuenciar el producto de la PCR: TrSQLE-F1, TrSQLE-R1, erg1_2-F y erg1_2-R. Las secuencias se alinearon utilizando la secuencia GeneBank MT700509.1 y la secuencia GeneBank XM_003233797.1. Las mutaciones sin sentido se buscaron utilizando el método bioinformático MEGA X. Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante pruebas de susceptibilidad antifúngica para la TRB bajo el método referencia de microdilución en caldo de hongos filamentosos basado en el protocolo descrito por EUCAST y también por cultivo utilizando para ello agar SDA modificado con TRB y con agar SDA sin antifúngico, y se realizaron con fluconazol, itraconazol, voriconazol, ketoconazol, terbinafina, griseofulvina, clopirox olamina, naftifina y amorolfina. Por secuenciación del ADN encontraron que la resistencia a TRB era consecuencia de las mutaciones puntuales sin sentido en el gen que codifica por la SE, las que resultaban en las sustituciones de aminoácidos F397L (n=8) o L393F. (n=1); causadas por las mutaciones sin sentido T1189C, C1191A o A1179C. Ambas mutaciones no se presentaron en los aislamientos que eran sensibles a TRB. Los aislamientos se identificaron previamente por MALDI-TOF MS ya que es una especie difícil de distinguir utilizando características morfológicas de especies estrechamente relacionadas como *T. interdigitale* o *T. mentogrophytes*, ya que las diferencias entre ellos son mínimas. Las cepas resistentes a terbinafina también mostraron valores de CMI aumentados para la naftifina, una alilamina que también inhibe la SE y por consiguiente la producción de ergosterol (De Paepe et al, 2024; Moreno et al, 2022).

En un estudio realizado por Vale *et al* en 2012, se menciona que se identificó un aislado de *C. albicans* (al que llamaron VSY2) con una alta resistencia a los azoles y Anfotericina B *in vitro* en la prueba de susceptibilidad por microdilución en caldo; además, con ausencia de ergosterol, pero acumulaba principalmente ergosta-7,22-ienol y episterol, lo que es consistente con la pérdida de actividad de ERG3, y se confirmó una transición normal a hifas al incubarlo en presencia de suero. La secuenciación se realizó utilizando un kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v1.1. Para la amplificación del gen *ERG3* de

VSY2, se utilizaron los primers ERG3-HI (5'-TTGTTAAGCTTTTTTTTCTTCCACCTATTTTG-3') y (ERG3-Ba (5'-CACACGGATCCATGTAACCCTTGATTC-3'). Se revelaron las mutaciones puntuales silenciosas (T51C y T434C), una delección doble de adenina en las posiciones consecutivas 120 y 121 y una mutación sin sentido C1052T (A351V). La doble delección consecutiva conduce a un codón de terminación prematuro y por consiguiente a una enzima no funcional, que incorpora solo 51 de los 386 aa de la enzima de tipo silvestre. En el estudio se hizo una reversión de la delección de doble base en el alelo mutante en las posiciones consecutivas 120 y 121, lo que restableció la biosíntesis de ergosterol y la sensibilidad completa a fluconazol en VSY2, confirmando así que la inactivación del gen *ERG3* fue el mecanismo de resistencia.

Pirosecuenciación

Es una técnica bioluminométrica no electroforética que emplea una cascada de reacciones enzimáticas acopladas para monitorear la síntesis de ADN (Wiederhold et al, 2008). La síntesis de la secuencia de ADN se realiza en tiempo real, se utiliza tanto para la identificación de bases individuales como para secuencias cortas de ácidos nucleicos. La ADN polimerasa va liberando los nucleótidos de forma secuencial, los cuales se van uniendo sobre la hebra molde que se desea secuenciar, en el proceso se libera pirofosfato (PPi) que es el sustrato de la ATP sulfurilasa y se genera ATP a partir de ADP; la luciferasa a partir de ATP convierte la luciferina en oxiluciferina liberándose una señal fluorescente y la cantidad de luz emitida es proporcional al número de nucleótidos añadidos. Esta técnica tiene la desventaja de ser compleja y de alto costo, y que para aumentar la sensibilidad hay que hacer un pre-enriquecimiento de la muestra para aumentar la concentración del patógeno (Diz, 2020).

Con respecto a la detección de mecanismos de resistencia o factores de virulencia, esta técnica permite detectar mutaciones puntuales y puede examinar rápidamente una gran colección de muestras en busca de polimorfismos conocidos (Wiederhold et al, 2008).

El estudio realizado por Wiederhold et al en 2008, se comparó la secuenciación dideoxi de Sanger con la pirosecuenciación para la detección de mutaciones en el gen *FKS1* en aislados con CIM elevadas para las equinocandinas en *C. albicans* y encontraron una concordancia en 10 de 12 aislados. Así, por ejemplo, el cambio de la fenilalanina a serina en el codón 641 (F641S) en 8 de los 12 aislamientos, así como mutaciones homocigotas T1933C en tres aislamientos. Demostrando así la utilidad de la pirosecuenciación para la detección de mutaciones puntuales conocidas que confieren resistencia a las equinocandinas.

Los 12 aislamientos utilizados en el estudio fueron subcultivados dos veces antes de realizar la prueba de susceptibilidad y el análisis de secuencia. La cepa de referencia utilizada para realizar estos procedimientos fue *C. albicans* SC5314. El ADN genómico se extrajo usando el kit de purificación de ADN de levadura MasterPure (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). Se realizó la amplificación del gen *FKS1* mediante una PCR utilizando cebadores específicos para este gen (número de acceso de GenBank XM_716336) antes de realizar la secuenciación de Sanger y la pirosecuenciación. La secuenciación dideoxi se realizó por duplicado con un kit de inicio rápido de secuenciación de ciclo de terminación de colorante CEQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y fue analizada con el software del sistema de análisis genético CEQ 8000 (Beckman Coulter). La pirosecuenciación se realizó mediante hibridación de las cadenas simples de ADN a un cebador de secuenciación seguido de la adición de kit de reactivos SNP (Biotage, Uppsala, Sweden); el análisis de las secuencias se realizó usando un instrumento de pirosecuenciación 96MA (Biotage) (Wiederhold et al, 2008).

Microarreglos (*Microarrays*)

Es una nueva herramienta de la biología molecular que surgió gracias al uso de la bioinformática. Son una distribución ordenada de más de 10 mil genes por cm² que pueden estudiarse simultáneamente mediante hibridación en una superficie del tamaño de un portaobjetos y se puede tener una interpretación inmediata de la expresión de múltiples genes (distinguidos unos de otros) en un solo análisis. Las sondas son fragmentos de ADN complementario de unos cuantos pares de bases de longitud, cada uno representa un gen diferente y están adheridos e inmovilizados en un soporte o matriz sólida (vidrio, plástico,

silicona, etc), y agrupadas de manera ordenada (filas y columnas) según sea su función (receptores, hormonas, factores de transcripción, etc); para exponerlas a la muestra que se quiere analizar. (Salazar et al, 2013; Vallin, 2007). Con un buen diseño de *microarray* se pueden identificar genes que se asocian a factores de virulencia y genes que confieren a tratamientos con antibióticos (Diz, 2020).

Esta técnica se basa en la hibridación de ácidos nucleicos y su detección por fluorescencia mediante análisis de imagen, solo se obtendrá señal fluorescente en los puntos (genes) donde hubo hibridación y la intensidad de la fluorescencia será directamente proporcional al nivel de expresión del gen. La interpretación de los marcajes indicará un patrón de colores; así cada punto en el soporte del microarreglo se asocia con el gen localizado según su color. Para la interpretación de los resultados se requiere de una plantilla donde se establezca la codificación de acuerdo con la base de datos que se trabaje y así saber en qué posición se ubica un determinado gen o marcador y cual muestra fue aplicada. El tipo de ensayo de microarreglos va a depender de la sonda utilizada, los más comunes son los utilizados para determinar cambios en la expresión de genes o análisis de mutaciones o polimorfismos. Los oligonucleótidos de las sondas son ADN sintético de cadena sencilla y la tendencia es que sean de longitud corta (Salazar et al, 2013; Diz, 2020).

Esta técnica determina la expresión genética completa de un tejido en un momento determinado, es decir, una “foto genética transversal” o transcriptoma; el cual se diferencia del genoma, que es el conjunto de todos los genes existentes en una célula, en que este cambia continuamente como respuesta a los cambios en el microambiente celular o tisular (temperatura, pH, PO₂, citocinas, hormonas, etc) y es por esto que su interpretación requiere necesariamente de su comparación con un tejido control. Esta técnica de Microarreglo de ADN permite esta comparación, a lo que se le llama “differential display” (Vallin, 2007).

Para comparar el transcriptoma en estudio con el control lo primero es aislar el ARNm de ambos y obtener sus correspondientes ADNc, estas moléculas se deben marcar con un compuesto fluorescente diferente para cada uno; en general el ADNc del estudio de marca con el compuesto fluorescente Cy3 (emite fluorescencia a una longitud de onda de 588 nm)

lo que en el espectro correspondería a un color rojo; y el ADNc del tejido control se marca con un compuesto Cy5 (emite fluorescencia a una longitud de onda de 680 nm) lo que corresponde a un color entre naranja y amarillo (figura 10) (Vallin, 2007).

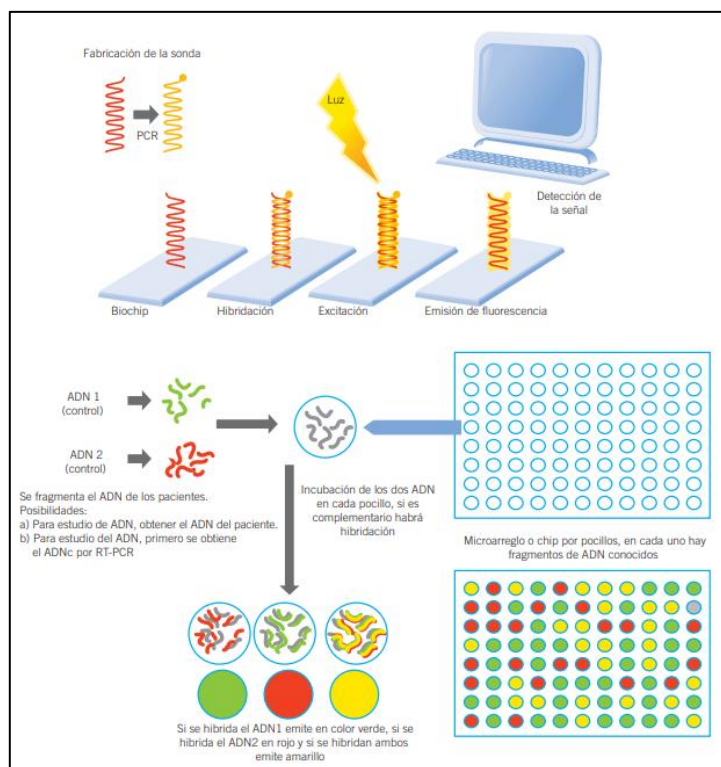


Figura 13: Diagrama de microarreglos Tomado de Salazar et al, 2013

Luego ambos ADNc marcados se incuban juntos en el microarreglo de ADN para que cada uno se hibride (se una) con su ADNc complementario inmovilizado en el microarreglo; cuanto mayor sea la hibridación de un ADNc marcado con el del microarreglo, mayor es la expresión tisular original del ARNm correspondiente. La cantidad de hibridación se calcula determinando la longitud de onda emitida por cada uno de los ADNc incubados, para ello el lector del ADN del microarreglo asigna un código informático de colores a la cantidad de fluorescencia emitida. Entonces, si hay mayor hibridación del ADNc en estudio predominará en componente rojo de la emisión, si la hibridación del control es mayor predominará el componente amarillo de la emisión, y por último si la hibridación de ambos es similar se asignará un código de color verde. Esta evaluación se realiza en cada uno de los pocillos del

microarreglo de ADN, comparando así la expresión de todos los genes representados (Vallin, 2007).

Hay diferentes tipos de ensayo de microarreglos, y esto depende de la sonda utilizada; así los más comunes son los empleados para determinar cambios en los niveles de expresión de genes o análisis de mutaciones o polimorfismos. Esta tecnología permite conocer la expresión de gran número de genes al mismo tiempo (Salazar, 2013).

Tecnología del Sistema de Amplificación Refractaria a Mutaciones (ARMS)

Esta técnica se utiliza para determinar el genotipo de los polimorfismos de un solo nucleótido (NSP), es decir, detecta mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en el ADN. Se basa en el diseño de oligonucleótidos con un residuo 3' que se no se aparea con el ADN normal o sin la mutación que se busca, por lo que no funciona como iniciador de la PCR. Al diseñar los cebadores es importante la complementariedad del nucleótido del extremo 3' ya que si esta base en particular no se empareja con la base complementaria la amplificación del fragmento no se da y por ende la ausencia de la banda visible durante la electroforesis en gel. Es importante determinar si el alelo es homocigota o heterocigota mediante el uso de cebadores, estos cebadores normales y mutados pueden colocarse en microtubos separados y de forma independiente se hacen las reacciones de PCR o pueden marcarse con colorantes fluorescentes y no es necesario separar las reacciones. Tiene la ventaja de ser una reacción de corta duración y no es necesario la utilización de enzimas de restricción. Pero a su vez tiene la desventaja de que no reconoce deleciones ni duplicaciones (Pinoncely, 2010; TritaGene, s.f).

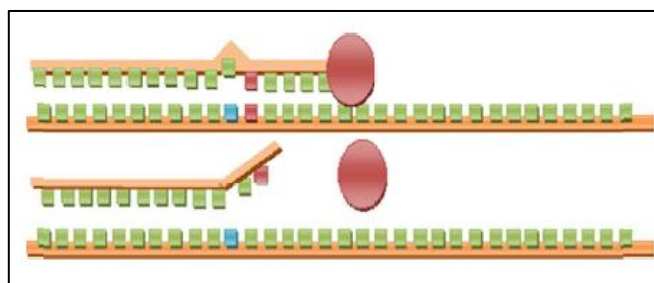


Figura 14. Esquema del principio de la Tecnología ARMS. Tomado de Pinoncely, 2010

Shankarnarayan et, al realizaron un estudio mediante la utilización de la técnica ARMS PCR en el que detectaron dos mutaciones puntuales en el gen de la SE, la T1189C previamente descrita, así como una nueva mutación C1191A en diferentes especies de *Trichophyton*; encontrando que este cambio de la pirimidina (citosina) por la purina (adenina) fue el responsable de la sustitución del aminoácido fenilalanina por leucina en la posición 397 del gen de la SE en los aislamientos resistentes a terbinafina. De los 15 aislamientos del complejo *T. mentagrophytes* 10 tenían la mutación T1189C y 5 la mutación C1191A. Además, concluyeron que el método de ARMS PCR es simple y confiable para la detección de aislamientos de *Trichophyton* resistentes a terbinafina.

En la tesis de Pinoncely, 2010 la autora utiliza el Sistema de Amplificación Refractaria a Mutaciones (ARMS) para detectar mutaciones en *ERG3*, *Mrr1*, *UPC2* y *Tac1*, de las cepas de *C. albicans* aisladas en su estudio. Realizó una extracción de ADN según lo descrito por la autora paso a paso, analizó la presencia de este extracto haciendo una electroforesis en gel de agarosa para luego ser observado en un transluminador BioRad con luz UV y el software Quantity One. Para la amplificación de este ADN mediante PCR utilizó los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4: ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'; para la amplificación de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2. A los productos obtenidos de la amplificación también les realizó una electroforesis en gel de agarosa y utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb para corroborar los tamaños y la observación de estos se realizó de la misma forma que mencionada en la extracción de ADN. Luego en las 3 regiones amplificadas utilizó la enzima de restricción *MspI* (corta los enlaces fosfodiéster entre dos citocinas que son seguidas por dos guaninas en ambos sentidos), esto genera un patrón de banas distinto para cada especie. Los oligonucleótidos mutantes se diseñaron identificando el sitio de la mutación en el ADN, de manera que el diseño de la secuencia del oligonucleótido terminara en el sitio de la mutación. Los oligonucleótidos diseñados para la identificación de las mutaciones en los genes *TAC1* y *UPC2*:

TAC1_F: CGTCCAAAATGATTGCATTG

TAC1_R: TATTGGACTCGGGGTTTTC

UPC2_F: GCTACGAGAAGCCGTGTTGAATAT
 UPC2_R: CTAAATTACTGGTAAGGACGCTTGG

TAC1_F: CGTCCAAAATGATTGCATTG
 Pr N977D_R: AACCCCTTAAATCCCCAAATTAAC

UPC2_F: GCTACGAGAAGCCGTGTTGAATAT
 Pr G648D_R: CCAAGGAAATCCATCATCATATGCATTT

Los oligonucleótidos diseñados para la identificación de los genes *ERG3* y *MRR1*:

ERG3_F: AGGTCAACCTTCCCATCACA
 ERG3_R: TGGCAGTAGTGGCACGTTTA

MRR1_F: TCGGTGGAAGATTACCAAGG
 MRR1_R: TGCCTCTCCTCAGTTCTGGT

ERG3_F: AGGTCAACCTTCCCATCACA
 ERG3_NR: GCACCATCTTTAGGGAAAAGA

MRR1_F: TCGGTGGAAGATTACCAAGG
 MRR1_NR: TCTCTTGATTATTATTTACTAAATCCAACC

PrT57G: GCACCATCTTTAGGGAAAAGA
 ERG3_R: TGGCAGTAGTGGCACGTTTA

MRR1_F: CTCAAGAAAGTATACCAATGATTTTCT
 MRR1_R: TGCCTCTCCTCAGTTCTGGT

Encontrando la mutación G648D en el gen *UPC2* con una frecuencia del 69.8% y presentándose tanto en cepas resistentes a fluconazol como en cepas sensibles en proporciones similares, arguyendo la autora que esto puede deberse al estado diploide de *C. albicans*, y que el gen mutado se active durante la terapia antifúngica. Encontró que el 65% de los aislamientos de este organismo presentaron la mutación N977D en el gen *TAC1*; en los aislamientos analizados no encontró la mutación G977V en el gen *MRR1* y esto lo atribuye a un posible error de diseño de los cebadores o a ser una mutación poco frecuente; finalmente, encontró que el 69.2% de los aislamientos presentaron la mutación D19E en el gen *ERG3*. Sobre este tema o punto de la tesis, la autora concluye que “la presencia de las mutaciones en las proteínas descritas no predice *in vitro* resistencia a los antifúngicos. Puede ser que en conjunto estas mutaciones expresen un fenotipo de *C. albicans* resistente al tratamiento con antimicóticos o que las mutaciones estén en otros sitios que aún no han sido detectados.”

Análisis de Curvas de Melting o de fusión

La técnica de HRM (por sus siglas en inglés *High resolution Melting*) puede llevarse a cabo en muchas de las plataformas disponibles para PCR en tiempo real, generalmente al final de la reacción de amplificación. (Vinueza, 2009). Primero se debe hacer una amplificación por PCR convencional de una secuencia diana, pero adicionando un colorante (como el SYBR Green), que emite fluorescencia al intercalarse en el ADN bicatenario, tras la amplificación del fragmento específico (30 a 40 ciclos aprox) la fluorescencia es mayor debido a una mayor cantidad de ADN doble cadena, este ADN amplificado se calienta gradualmente entre 70 y 90°C para disociar la doble cadena de ADN y generar una curva de disminución de fluorescencia. El punto en el que el ADN se disocia o se funde debido al calor se produce una caída repentina de las lecturas de fluorescencia debido a que el colorante deja de estar unido al producto de la PCR, esta señal de fluorescencia emitida es captada por el lector del dispositivo generando patrones de curvas (Tolvanen & Karp, 2011; Tomaz et al, 2016). Este es un método de punto final y por ende no es cuantitativo (Vinueza, 2009).

Este análisis de la curva de fusión se utiliza para determinar la especificidad de los amplicones mediante la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la temperatura de

los reactivos, el sistema de detección de la curva de fusión consta de un módulo de calentamiento y uno óptico. (Miao et al, 2020). Este método es semejante al de electroforesis en gel de agarosa y en ambos se puede evidenciar la presencia de productos no específicos (Vinueza, 2009).

Esta técnica de HRM es tan sensible que detecta un cambio de base único entre secuencias de nucleótidos idénticas, con el análisis de datos es sencillo y se pueden analizar múltiples muestras a la vez (Vieille et al, 2019).

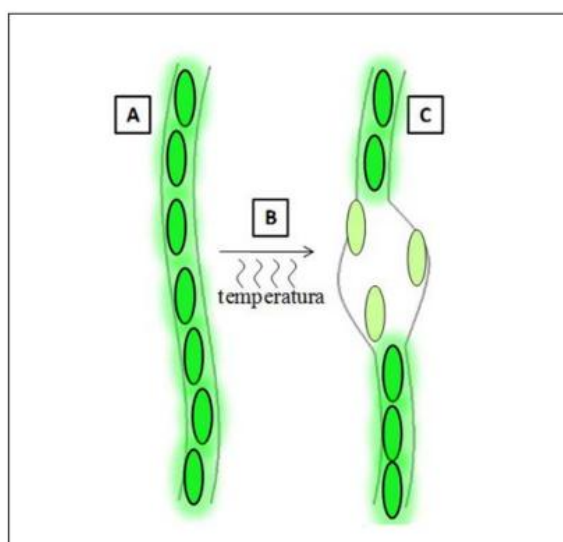


Figura 15: Actividad del agente fluorescente. A: ADN doble cadena saturado con el colorante. B: Aumento gradual de la temperatura. C: Inicio de la desnaturalización y disminución de la fluorescencia. Tomado de Tomaz, 2016.

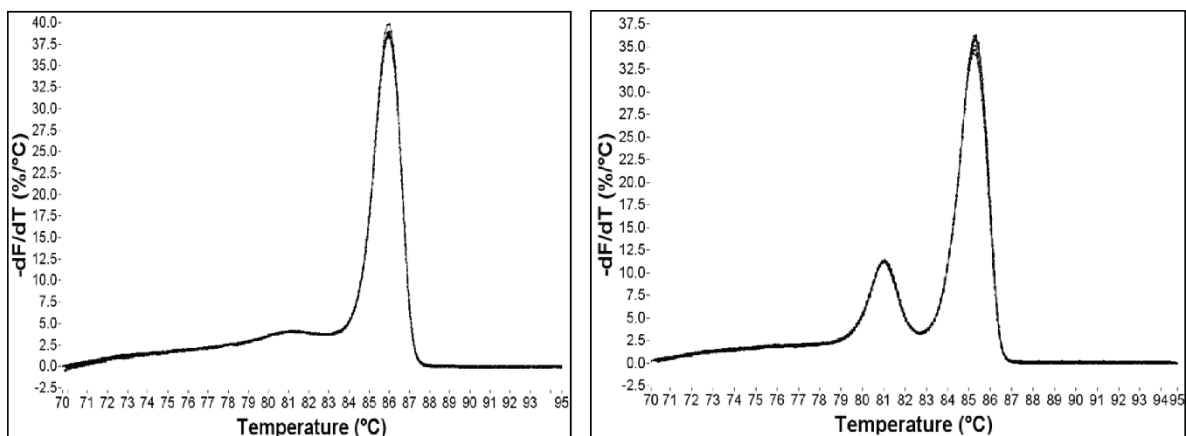


Figura 16. A: Curva de fusión para un amplicón único y puro. B: Curva de fusión para dos amplicones diferentes. Tomado de Downey, 2023.

En el estudio de Vieille y colaboradores analizaron 17 cepas clínicas y 3 de control, con el objetivo de clasificar a nivel de especie cepas clínicas del complejo *T. mentagrophytes*, las que fueron subcultivadas en agar SDA, agar lactrimiel y agar avena para la identificación morfofisiológica. Para la identificación del ADN cada aislamiento se preparó utilizando el kit de extracción GeneJET Plant Genomic ADN Purification Mini Kit. De cada extracto de ADN se hicieron 2 PCR convencionales; una con los *primers* para la HRMA:

Forward 5'-CAACAACGGATCTCTTGGTT-3'

Reverse 5'-GAATGGGCAACAAACCAGC-3'

Estos primers fueron diseñados para flanquear los principales sitios polimórficos entre el gen 5.8S y la región ITS2 de las secuencias de referencia, y generar un producto de 280 pb. Para el análisis se utilizaron las herramientas disponibles en Primer-BLAST y Oligo Analyzer Versión 3.21. La segunda PCR con los *primers* universales:

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Para la visualización de las bandas realizaron una electroforesis en gel de agarosa, posteriormente se purificaron y estos productos se secuenciaron en el equipo 3730 xl/DNA Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

En la técnica de HRM se aplicó la tecnología de Step One Plus™ real-time PCR.

Para el análisis filogenético las secuencias de las regiones estudiadas por HRM e ITS se alinearon con el software Clustal X, los alineamientos múltiples se corrigieron con el programa Gblocks versión 0.91b. Luego del análisis de HRM se distinguiéndose claramente tres curvas, lo que correlacionó con la clasificación morfológica (macro y microscópica) previa, en donde las cepas fueron clasificadas como *Trichophyton mentagrophytes*,

Trichophyton interdigitale y *Trichophyton erinacei*; sin embargo, todas las cepas clínicas se identificaron como *Trichophyton mentagrophytes*.

En un estudio realizado por Loeffler y colaboradores en 2000, compararon la secuenciación convencional con la LightCycler™ de Sistemas Moleculares Roche, se analizaron 13 cepas de *C. albicans* y 21 cepas de *C. tropicalis*, todas resistentes a fluconazol, por la presencia del gen *ERG11*. Los *primers* seleccionados para la amplificación por PCR para cada especie fueron:

Para *C. albicans*:

forward primer CAL-PRF (5'-TCT CCA GGT TAT GCT CAT ACT A-3')

reverse primer CAL-PRR (5'-AAC AAT CAG AAC ACT GAA TCG AA-3')

CAL-FL (5'-ATCTATGTCTACCACCACCAAATGGTAAA-3')

CAL-RED (5'-AGGTGAAGAAACCCCTTTAGAAACTTTCC-3')

Para *C. tropicalis*:

forward primer CTR-PRF (5'-TCA TAC CAG TGA TAG ATG G-3')

reverse primer CTR-PRR (5'-TTT TCT AGC TAC TCC ATG G-3')

CTR-FL (5'-GTTGATTACCAATCCATGGTTACCTTAC-3')

CTR-RED (5'-ATTAGAACCTGCTGAAATTGTTTGG-3')

En este equipo los amplicones obtenidos en la PCR se hibridan en tiempo real con sondas de oligonucleótidos que se unen a la región blanco del genoma que contiene los sitios de la mutación. Según el artículo, las sondas de hibridación utilizadas en el estudio consistían en dos diferentes oligonucleótidos que hibridaban con una secuencia interna del gen *ERG11*. La sonda de hibridación 1 estaba marcada en su extremo 3' con fluoresceína y abarcaba la mutación puntual, mientras que la sonda 2 estaba marcada en su extremo 5' con "LigthCycler Rojo 640", la cual funcionaba con una sonda de anclaje. Ambas sondas podían hibridar de cabeza a cola acercando ambos tintes fluorescentes, la fluoresceína se excita por la fuente de luz del LigthCycler y la energía de excitación se transfiere al fluoróforo del aceptor LigthCycler-Red 640, la fluorescencia emitida se mide mediante los fotohíbridos del

instrumento. La fluorescencia se controlaba mientras la temperatura aumentaba lentamente y disminuía cuando una de las sondas se fundía y los dos tintes fluorescentes ya no estaban tan cerca. Cuando una sonda abarcaba un desajuste aún podía hibridar con la secuencia diana pero se fundía a una temperatura más baja que una sonda de hibridación con un ajuste perfecto.

En 2 de los 13 aislamientos de *C. albicans*, se detectó una mutación homocigota producto de una sustitución G464S, mientras que en los restantes 11 aislamientos no se demostró esta mutación. En los aislamientos de *C. tropicalis*, 8 mostraron una mutación homocigota en la posición 1554 (T154C); 8 mostraron una mutación heterocigota en esta misma posición; los restantes 5 aislamientos no mostraron mutación en la posición 1554. Concluyen los autores que el LigthCycler constituye una herramienta comercialmente disponible, rápida (resultados en 45 minutos), exacta y reproducible para la amplificación de ADN, combinada con la detección sensible y específica de mutaciones puntuales mediante el análisis de curvas de fusión o “melting curves”.

Espectrometría de Masas (EM-MALDI TOF)

La espectrometría de masas (EM) fue concebida hace más de 100 años. Pero no es hasta la invención de las técnicas de ionización suave como la MALDI (por sus siglas en inglés de *Matrix-assisted laser desorption/ionization* [desorción/ionización por láser asistida por una matriz]) que se empezó a utilizar en los laboratorios para aplicaciones rutinarias; especialmente para el análisis de proteínas de elevado peso molecular y de mezclas. Estas nuevas técnicas se convierten en indispensables, principalmente para el avance de la proteómica, al combinarse con el analizador de masas tipo TOF (por sus siglas en inglés *Time-of-flight* [tiempo de vuelo]). En la actualidad se utiliza para el análisis y cuantificación de proteínas, péptidos, toxinas, ácidos nucleicos y otros compuestos (Jordana et al, 2012).

El espectrómetro de masas tiene tres elementos principales: la fuente de ionización para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa, un analizador de masas

que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un detector para monitorizar los iones separados, mantenidos en una atmósfera de vacío (Jordana et al, 2012).

En esta técnica la muestra es embebida en una matriz orgánica, la cual cristaliza en contacto con el aire. Es mezcla se deposita en una tarjeta de un material conductor y es irradiada por un láser, cuya energía causa una desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de partículas. Los iones de dicha nube se extraen al ser sometidos a un campo eléctrico, a través del cual estos son acelerados debido a su carga. Los iones obtenidos son dirigidos hacia el analizador de masas y, posteriormente, al detector. El papel de la matriz es fundamental para los procesos electroquímicos que se producen. El analizador de TOF posee una estructura que delimita una zona de vuelo a través de la cual los iones son acelerados adquiriendo una elevada energía cinética, y durante este trayecto se separarán según su ratio masa/carga (m/z). El periodo de tiempo que tarda cada ion en llegar hasta el detector se denomina tiempo de vuelo. Al final de la zona de vuelo, los iones impactan en el detector. Antes de este elemento, se encuentra el reflector, cuyo objetivo es compensar las velocidades cinéticas antes de que los iones impacten el detector, lo que permite aumentar la resolución. A partir de la información recogida por el detector, se genera el espectro de masas en el cual se muestra la masa de los diferentes iones de la muestra calculada a partir del tiempo de vuelo. La identificación se consigue por la comparación del espectro o perfil proteico obtenido, con los existentes en la base de datos que ofrece el proveedor, el software le adjudica una identificación y un valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación (Jordana et al, 2012).

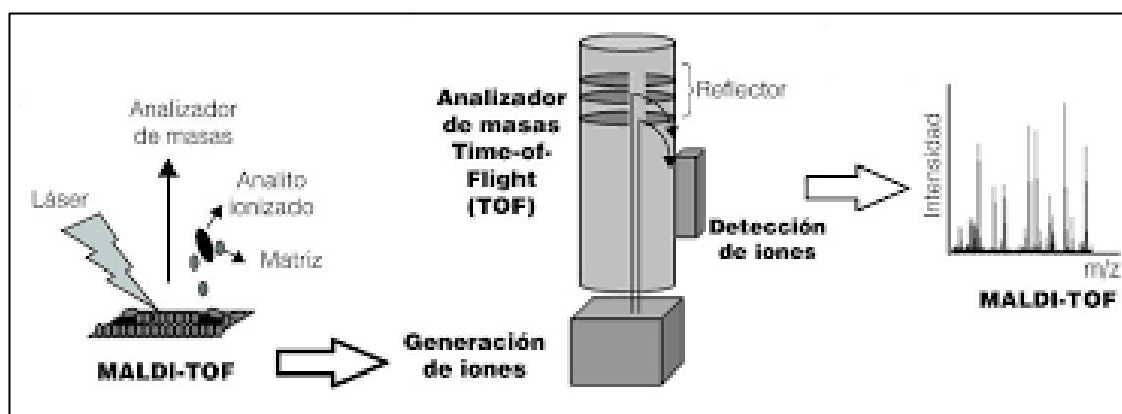


Figura 17: Esquema del espectrómetro de masas MALDIT-TOF. Tomado de Fiol, 2014.

Pocos estudios utilizan MALDIT-TOF como herramienta para analizar la resistencia antifúngica y se basan en el crecimiento del hongo en presencia de diferentes concentraciones de antifúngico de acuerdo con las normas CLSI (por sus siglas en inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) y posterior análisis con EM de esas células recuperadas en los pocillos en microdilución. Para la interpretación se utiliza un nuevo punto de corte denominado “concentración mínima de cambio de perfil” (MPCC, *minimal profile change concentration*) o concentración mínima en la que el perfil del espectro de masas cambia significativamente en comparación con los espectros de células incubadas en diferentes niveles de antifúngico, una alternativa al valor de la MIC (Quiles et al, 2016).

Las plataformas comerciales utilizan la EM para la identificación de microorganismos basada en la aproximación proteómica o perfil proteico específico de cada microorganismo; o bien, en la aproximación genómica o análisis de ácidos nucleicos (Jordana et al, 2012).

Esta metodología permite la reducción del tiempo de espera para obtener un resultado de identificación, lo que favorece elección temprana de la terapia antimicrobiana adecuada y la disminución de la estancia hospitalaria. En actualidad los sistemas más utilizados con esta tecnología MALDI-TOF-MS para la identificación de microorganismos son el sistema VITEK®MS (bioMérieux, Durham, NC) y el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA), cuyas bases de datos de los espectros de referencia son construidas y mantenidas por los fabricantes (Maldonado et al, 2018; Quiles et al, 2016).

El MALDI-TOF MS puede ser una herramienta con un impacto significativo en el campo de la micología ya que puede servir para discriminar aquellos hongos que presenten efecto *trailing* o lecturas subjetivas de los que verdaderamente tienen resistencia. En general se debe optimizar la reproducibilidad y metodología del proceso, estandarizando la técnica y definiendo los puntos de corte, mediante más estudios con más cepas y diferentes antifúngicos (Quiles, 2016).

Son pocos los estudios que utilizan esta metodología para analizar la resistencia a los antifúngicos, sin embargo, en general se basan en el análisis con EM de las células recuperadas en los pocillos de dilución posterior a su exposición con diferentes concentraciones de antifúngico de acuerdo con las normas CLSI (Quiles et al, 2016).

Con esta tecnología los espectros de proteínas altamente específicos generados, son como un código de barras; también llamados por Bruker *Main Spectra Profiles* (MSP), por sus siglas en inglés, que permiten en corto tiempo la identificación de microorganismos a nivel de especie. La precisión se basa en las bases de datos creadas previamente que son conocidas como bibliotecas y que incluyen miles de espectros de referencia que se obtienen de cepas que han sido identificadas por secuenciación. (Robert et al, 2021). Es un método rápido, rentable y fácil de manejar que genera perfiles espectrales de masas que son característicos de cada microorganismo, que pueden asignarse a la especie respectiva mediante comparación con una base de datos (Knoll et al, 2021).

Los intentos de utilizar esta tecnología en las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos son recientes, para la detección la resistencia en bacterias se han desarrollado diferentes enfoques; pero en el caso de la sensibilidad a los antifúngicos se han investigado principalmente dos enfoques: el primer método se basa en el cambio del perfil espectral fúngico posterior a la exposición a un antifúngico, *minimal profile change concentration* (MPCC por sus siglas en inglés), esta es la concentración mínima en la que el perfil del espectro cambia significativamente en comparación con los espectros de las células incubadas en diferentes niveles del antifúngico, y es un valor equivalente la CMI que se infiere del índice de correlación compuesto (ICC), basado en los espectros de diferentes concentraciones del antifúngico, este índice se obtiene con el software MALDI Biotyper (Knoll et al, 2021; Delavy et al, 2019). El ICC tiene valores de 0 a 1, donde 1 representa una correlación completa entre los espectros y 0 indica que no hay correlación. (Saikat et al, 2017; Vella et al, 2013). El segundo método se denomina MALDI *Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay* (MBT-ASTRA por sus siglas en inglés), aquí el crecimiento del agente infeccioso se determina para diferentes concentraciones de antifúngico y se compara con un control sin el fármaco, lo que proporciona una razón de crecimiento relativo (CR). Al definir

un punto de corte, el CR a la concentración antifúngica correspondiente puede utilizarse para clasificar la cantidad de crecimiento del patógeno como susceptible o resistente (Knoll et al, 2021; Delavy et al, 2019).

Hasta el momento no se cuenta con un método comercial para la utilización de rutina de las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos por MALDI-TOF; los métodos que se han utilizado para su desarrollo se basan en la teoría de que la composición proteica cambia después de la exposición al fármaco, este concepto se aplicó en *C. albicans* utilizando diferentes concentraciones de fluconazol y 15 horas de incubación. Posteriormente, el proceso se fue simplificando hasta llegar a un proceso de 3 concentraciones del antifúngico y una incubación de 3 horas; sin embargo; se sugiere que el tiempo de incubación es crítico debido a que el porcentaje de concordancia aumenta con el aumento del tiempo de incubación. (Robert et al, 2021). En 2016 Robert et al, probaron un protocolo para la detección de resistencia a equinocandinas específicamente de *C. glabrata*. Para ello, utilizaron cantidades iguales de cepas tanto resistentes como sensibles, se incubaron por un periodo de 4 horas con o sin anidulafungina a una concentración de 0.06 mg/L que corresponde con el punto de corte de Sensible, Intermedio y Resistente, para esa especie; y por un periodo de incubación de 6 horas con o sin micafungina en igual concentración. Los autores establecieron un índice de correlación entre ambas condiciones (con o sin antifúngico), un índice de correlación cercano a 1 indica que independientemente de la presencia o ausencia del antifúngico la cepa permanece sin alteraciones, sugiriendo en este caso resistencia, y para las cepas sensibles hubo alteración en el perfil del espectro en presencia del antifúngico (anidulafungina y micafungina), llevando a un índice de correlación < 0.8 entre ambas condiciones. De esta manera se logró la detección adecuada de un fenotipo resistente en el 81.25 % y el 87.5 % de los casos y un fenotipo sensible en el 100 % y 85.7 % para anidulafungina y micafungina respectivamente. Consideran los autores que a pesar de que se han obtenido buenos resultados con los métodos de MS, aún no están lo suficientemente “maduros”, son heterogéneos, necesitan estandarización y validación. (Robert et al, 2021).

Por su parte Marinach y colaboradores en 2009 observaron que al exponer *C. albicans* a diferentes diluciones de fluconazol durante 15 horas provocaba cambios en la expresión de proteínas variando el espectro de masas en aquellas cultivadas por encima de una concentración determinada de antifúngico, vrs aquellas que crecían por debajo de esa concentración. Se determinó el MPCC en las 17 cepas del estudio, encontrando una correlación del 94% entre CMI y MPCC con ± 1 dilución y una correlación de 100% con ± 2 diluciones. A pesar de estos resultados la ventaja de la rapidez diagnóstica es mínima, 15 horas contra 24 horas.

En la figura 18 se muestra el resultado de los espectros de masas obtenidos para los cultivos expuestos a diluciones seriadas de fluconazol de la cepa clínica de *Candida albicans* DSY2260 (CIM fluconazol = 8 $\mu\text{g/ml}$). Al lado derecho se muestran las concentraciones del antifúngico, mientras que en primera línea sobre eje X corresponde al cultivo sin fluconazol, utilizado como control. Para esta cepa, los cultivos expuestos a concentraciones de antifúngico desde 0.125 $\mu\text{g/ml}$ hasta 2 $\mu\text{g/ml}$, muestran espectros que son indistinguibles del observado para cultivo control, por lo que los mismos se superponen. Por el contrario, los espectros obtenidos en los cultivos expuestos a concentraciones del antifúngico de 4 $\mu\text{g/ml}$ y más, muestran desviaciones con respecto al control de manera detectable y cuantificable, ya sea a través de la ganancia o pérdida de picos. (Marinach et al, 2009)

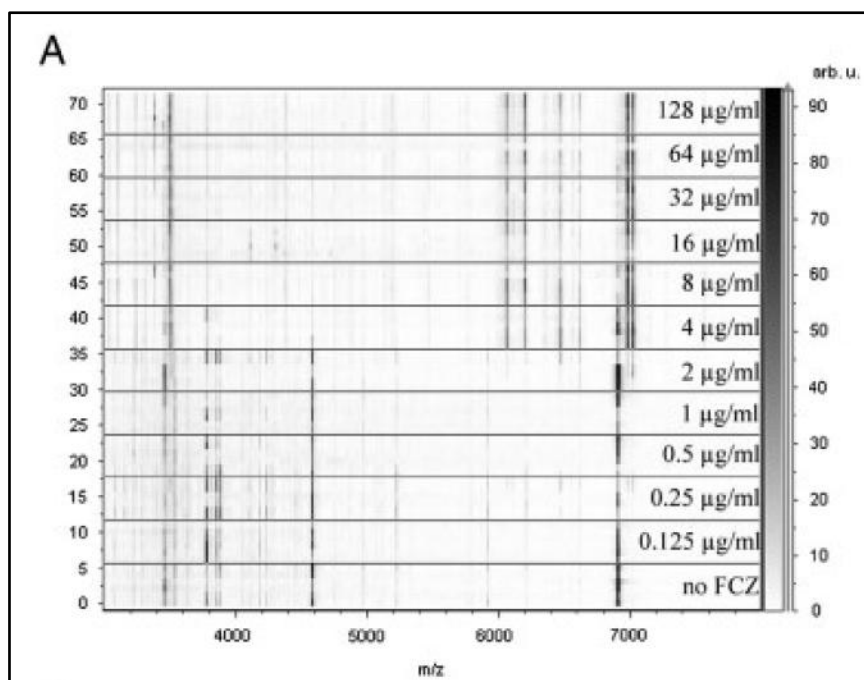


Figura 18: Alteraciones en el espectro de masa de la cepa clínica de *C. albicans* DSY2260 expuesta a diferentes concentraciones de antifúngico. Tomado de Marinach et al, 2009.

En 2013, Vella y colaboradores publicaron el estudio que facilita la discriminación de aislamientos de *C. albicans* como susceptibles y resistentes a caspofungina después de 3 horas de incubación en presencia del antifúngico a las concentraciones de puntos de corte utilizando el método de MALDI-TOF-MS; donde el espectro a concentraciones de 0 (nulo), 0,03 (intermedio) y 32 (máximo) µg/ml de caspofungina, se utilizaron para crear matrices de índice de correlación compuesto (ICC) para 65 aislamientos, 13 de ellos con mutación en *FKSI*. Los aislamientos se clasificaron como susceptibles o resistentes a caspofungina si el valor medio de ICC de los espectros a 0.03 y 32 µg/ml era mayor o menor, respectivamente, al valor medio de ICC de los espectros de 0.03 y 0 µg/ml. De esta manera lograron evaluar la resistencia o susceptibilidad de los aislamientos de *C. albicans* a la caspofungina. Las categorizaciones de estos aislamientos fueron consistentes con los fenotipos salvaje y mutantes de *FKSI* y la metodología de referencia; por lo que este método de sensibilidad a los antifúngicos por espectrometría de masas, consideran los autores, puede proporcionar un método rápido y fiable para detectar la resistencia antifúngica emergente y acelerar el inicio del tratamiento adecuado. Por este método se evalúa la concentración mínima de cambio de perfil (MPCC) para la caspofungina; lo que se define como el valor de ICC en el que un

espectro fúngico es más similar al observado en la concentración máxima efectiva del fármaco (32 µg/ml) que al espectro fúngico observado en la concentración nula del fármaco (0 µg/ml). Se clasificaron correctamente 51 de 51 (100 %) aislamientos como susceptibles y 10 de 11 (90.9 %) como resistentes a caspofungina; el error de tal aislamiento se relacionó con que alberga un genotipo D648Y *FKSI*, que pertenece a aislados con niveles más bajos de resistencia a las equinocandinas y a los aislados más difíciles de identificar con las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos convencionales. Los autores sugieren que el estudio proporciona evidencia de que las alteraciones mínimas inducidas por fármacos en la expresión de proteínas y por ende en el espectro de masas de *C. albicans* pueden explotarse como marcadores rápidos y para la aparición de disminución de susceptibilidad a la caspofungina en esta especie. Sin embargo, consideran que se requieren más estudios para evaluar el alcance de esta prueba de susceptibilidad MS, para poder adoptarla de forma rutinaria en los laboratorios clínicos; ya que este estudio evaluó una sola especie de *Candida* y un solo antifúngico; sin embargo, sí es posible su utilización de forma fiable para la detección precisa de *C. albicans* resistente y susceptible a caspofungina. Por otro lado, los autores consideran que el costo beneficio de ahorrar 21 horas para iniciar la terapia con caspofungina puede no ser apropiado, si el resultado de la PSA-MS indica un resultado resistente, el cual se vería contrarrestado en parte por los gastos adicionales que implica utilizar este método, en lugar del método establecido por la CLSI para el cual la prueba de sensibilidad a los antifúngicos estaría disponible 21 horas más tarde.

En 2021 Knoll et al, realizaron una revisión sistemática y metaanálisis, donde evaluaron la precisión diagnóstica de la prueba de sensibilidad a los antifúngicos en levaduras y hongos filamentosos con respecto a azoles y equinocandinas, basada en la espectrometría de masas; analizaron los distintos enfoques técnicos y evaluaron la influencia de factores como la especie evaluada, antifúngico y tiempo de incubación en el desempeño de los ensayos. Hicieron una revisión de 12 estudios previos y realizaron un análisis comparativo de su precisión y metodología; al comparar el método de MALDI-TOF-MS con el método de referencia de dilución en caldo, la primera obtuvo una sensibilidad de un 91.1 %, y una especificidad de un 95.1%, ambos con un intervalo de confianza de un 95 %. La sensibilidad fue mayor para la técnica semicuantitativa MB ASTRA (96%) que para la de ICC (85 %),

que se basa en los cambios de espectro; la especificidad fue similar para ambos enfoques (93.2 % vrs 94.2 %), respectivamente. Además, encontraron que los tiempos de respuesta inferiores a 8 horas alcanzaban mejores valores diagnósticos que los periodos de incubación más largos, por lo que los autores califican la prueba de sensibilidad a los antifúngicos basada en la espectrometría de masas como un método rápido y preciso para la detección de la resistencia a los antifúngicos.

Saikat y colaboradores (2017), publicaron un estudio con el cual estandarizaron un método para la prueba de susceptibilidad a fluconazol basado en MALDI-TOF MS para aislamientos de *C. tropicalis*, también se evaluó la correlación entre la CMI y la MPCC. EL estudio incluyó 34 aislamientos en total, 15 aislamientos resistentes a fluconazol (con CMI entre 16 y 128 $\mu\text{g/ml}$) y 19 aislamientos susceptibles a este antifúngico (CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$), encontrándose cambios significativos en los espectros de todos los aislamientos analizados después de 4 horas de incubación, estableciéndose este como el tiempo óptimo de incubación. En cuanto a la MPCC y la CMI, se encontró que fueron equivalentes en 16 aislamientos, mientras que para los restantes 18, la primera mostró ser menor a la segunda en una dilución. Sin embargo, los autores concluyeron que la correlación entre la MPCC y la CMI era significativa ($P < 0.05$), por lo que consideran que el MALDI-TOF MS puede ser utilizado como técnica de tamizaje rápida para resistencia a fluconazol en *C. tropicalis*, pero es necesario probar más aislamientos de otras especies y otros antifúngicos previo a la implementación de esta técnica en los laboratorios clínicos. La MPCC se definió como la concentración mínima de fluconazol a la cual se altera el perfil de espectro de masa o huella dactilar del aislamiento analizado. Su detección se realizó de forma visual y los hallazgos fueron confirmado por tres métodos basados en software: análisis de matriz del índice de correlación compuesto, análisis de gel virtual y análisis de clúster o grupo basado en el análisis de componente principal.

Saracli y colaboradores (2015), evaluaron la capacidad de la tecnología MALDI-TOF MS, para detectar la resistencia de *C. albicans*, *N. glabratus* y *C. tropicalis* a fluconazol, voriconazol y posaconazol. El estudio incluyó 35 aislamientos de *C. albicans*, 35 de *N. glabratus* y 37 de *C. tropicalis*, y fueron expuestos a fluconazol, voriconazol o posaconazol,

a los cuales se les realizó microdilución en caldo siguiendo las guías de la CLSI (M27-A3) y la prueba de susceptibilidad a los antifúngicos por MALDI-TOF MS, utilizando dos concentraciones de antifúngico y un control sin este compuesto, una concentración media y una concentración alta. Con los espectros obtuvieron el ICC para cada aislado, cuando este ICC en la concentración media/alta fue menor que el de la concentración media/nula se clasificó la cepa como resistente, y los resultados se compararon con los obtenidos con el método CLSI. Los resultados mostraron que MALDI-TOF MS para clasificar especies de *Candida* como susceptibles o resistentes a los antifúngicos triazoles, los autores no encontraron que la prueba de susceptibilidad a los antifúngicos por espectrometría de masas ofreciera ahorros significativos en tiempo respecto al método de la CLSI. Dentro de las ventajas del uso de la espectrometría de masas, resaltan que puede eliminar la determinación visual subjetiva del punto final, la posibilidad de la determinación automatizada de la resistencia y la oportunidad para realizar pruebas concomitantes de susceptibilidad a los antifúngicos para aquellos laboratorios de micología que utilizan rutinariamente MALDI-TOF MS para la identificación de aislamientos clínicos; sin embargo, también recalcan la necesidad de realizar más estudios en este campo.

Zvezdanova y colaboradores (2022) realizaron un estudio cuyos objetivos eran aplicar el análisis de picos a los datos de la espectrometría de masas para diferenciar *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (*A. fumigatus* s.s) del resto de especies del complejo *A. fumigatus* s.s. y detectar con mayor precisión la resistencia a los azoles en aislamientos de esta especie en ausencia de exposición previa a este antimicótico. En este estudio, los autores lograron identificar correctamente, mediante espectrometría de masas, el 97.7 % de los aislamientos de *Aspergillus*, donde el análisis de picos demostró ser un excelente complemento para lograr esta discriminación. Así mismo, la utilización de distintos algoritmos en conjunto con el agrupamiento de las especies por Análisis de Componente Principal (ACP) permitió la discriminación de todas las especies crípticas por medio de un pico biomarcador a 4586 m/z, que puede ser utilizado cuando no se cuenta con librerías fúngicas actualizadas. La susceptibilidad a los azoles se determinó por el método de EUCAST, posterior a esto realizaron la secuenciación del gen *CYP51A* a los aislamientos con resistencia fenotípica a uno o más azoles, con el fin de determinar la presencia de mutaciones. Además, secuenciaron

este gen en aislados susceptibles a los azoles, los cuales mostraron la secuencia del gen de tipo salvaje y otras mutaciones, esto con el fin de usarlos como confirmación. Es importante mencionar que, para la prueba de sensibilidad a los azoles, los autores aplicaron el análisis de picos, utilizando los mismos espectros de proteínas obtenidos para la identificación de hongos. El estudio proporcionó una clasificación 100% correcta de los aislamientos de *A. fumigatus* sensibles y resistentes. Los autores intentaron una clasificación adicional de 40 aislamientos de *A. fumigatus* sensu stricto resistentes a los azoles basándose en mutaciones del gen CYP51A, identificándose tres grupos de acuerdo con las mutaciones. Los aislamientos de *A. fumigatus* sensu stricto con diferentes mutaciones en el gen *CYP51A* se agruparon correctamente en el 91.5% de los casos. Los autores consideran al MALDI-TOF MS como una herramienta que muestra un gran potencial al diferenciar *A. fumigatus* sensu stricto de otras especies del complejo *A. fumigatus*, así como la detección rápida de *A. fumigatus* sensu stricto con resistencia a los azoles en aislados de origen clínico, a pesar de esto consideran que se requiere más estudios.

En una revisión realizada por Quiles *et al.* en 2016 de varios estudios realizados sobre la aplicación de MALDI-TOF en los estudios de sensibilidad, encontró uno el cual la correlación entre CMI y MPCC fue del 94%; mientras que en otro fue de 100%, aunque con los puntos de corte actuales para la mayoría de las especies de *Candida spp.*, la concordancia paso al 94%. En otro estudio donde se evaluó la concordancia de este método frente a las técnicas tradicionales en la resistencia a triazoles, esta fue del 54 al 97%. Por otro lado, la rapidez diagnóstica es mínima (15 h frente a 24 h). Concluyen los autores que, si bien los resultados de los estudios son prometedores, es necesario optimizar la reproducibilidad y la metodología del proceso, así como estandarizar la técnica y definir los puntos de corte, por lo que son necesarios más estudios en los que se evalúen más cepas y antifúngicos.

CONCLUSIONES

Los antifúngicos constituyen una herramienta esencial en el tratamiento de las infecciones causadas por hongos patógenos, en especial en pacientes inmunocomprometidos. Esto ha permitido reducir significativamente la mortalidad asociada a infecciones sistémicas. El conocimiento de la forma en que actúan estos fármacos ya sea sobre la membrana celular, la pared celular o el material genético es fundamental para su uso racional disminuir la aparición de resistencias. Esto, por el hecho de que los antifúngicos están agrupados según su mecanismo de acción, lo que permite seleccionar el tratamiento adecuado para cada patógeno en particular.

Se deben de aumentar los estudios en la búsqueda de nuevos blancos para el desarrollo de nuevas moléculas de antifúngicos debido a que los antifúngicos disponibles en la actualidad son pocos y hay un notable aumento en la resistencia a dicho fármacos, representando una amenaza para la salud pública. Por lo que es importante la utilizar de forma correcta las herramientas disponibles como los estudios de vigilancia epidemiológica sobre la aparición de resistencias y las estrategias terapéuticas eficaces basadas en el diagnóstico precoz de las micosis invasivas. Los estudios de sensibilidad *in vitro* están orientados a predecir el éxito o fracaso del tratamiento antifúngico, de ahí la importancia de buscar nuevos métodos que proporcionen tales resultados en el menor tiempo posible.

La prevención de la resistencia a los antifúngicos debe hacerse actuando a nivel epidemiológico, de diagnóstico, profiláctico y terapéutico, ya que es una tarea muy compleja y más aún porque hay que tomar en cuenta que en algunos casos las micosis invasoras son muy agresivas, además se debe considerar la debilidad inmunológica de quienes las padecen.

Si bien es cierto que es importante el estudio de los mecanismos de resistencia, también es importante tener presente que no todos se deben a mutaciones en el genoma; es decir cambios en las bases nitrogenadas que llevan a un cambio de aminoácido haciendo a la vez que cambie la proteína en cuestión. También hay aumento en la cantidad de copias que se expresan del mismo gen, aumento de expresión o activación de los genes que codifican bombas de

eliminación activa o sustitución de ergosterol por otros esteroides. Aun así, no todas las mutaciones genómicas tienen implicaciones en la resistencia ya que algunas de ellas se han encontrado tanto en aislamientos resistentes como sensibles.

Se debe considerar que las pruebas de detección de mecanismos de resistencia no se le hacen normalmente a todos los hongos, sino más bien a aquellos que ya se conoce poseen resistencia, esto porque previamente se testeó con alguna de las pruebas fenotípicas disponibles, como microdilución en caldo o sensititre.

Es importante recalcar que el hecho de buscar la presencia de secuencias que codifican por las proteínas mutadas en el genoma del hongo no implica que el hongo las vaya a expresar en el paciente; pero si hay que prestarle atención ya que sabemos que el hongo la podría expresar en cualquier momento

Las nuevas metodologías basadas en la proteómica y en la amplificación de ácidos nucleicos podrían optimizar la detección rápida de resistencias, favoreciendo así la eficacia de la terapia antifúngica; sin embargo, las metodologías basadas en proteómica necesitan más estudios con una mayor cantidad tanto de aislamientos fúngicos como de antifúngicos. Además, si bien es cierto en los estudios realizados hasta el momento en proteómica (como el MALDI-TOF-MS), han obtenido resultados prometedores, es muy importante señalar que estos arrojan resultados de si un aislamiento es sensible o resistente a un determinado antifúngico, pero no discrimina un resultado intermedio o dosis dependiente, así como tampoco, por su naturaleza puede brindar ninguna información acerca de las mutaciones que estén presentes que confieren resistencia al fármaco en cuestión.

Es importante la implementación de técnicas que ayuden al diagnóstico precoz de las micosis, además de la identificación de hongos a nivel de especie de manera que sea posible considerar las resistencias intrínsecas actualmente conocidas a la hora de definir la terapia empírica.

Actualmente, la mayoría de los laboratorios tienen acceso a las pruebas de PCR, siendo esta de gran ayuda para el diagnóstico y correlación de variaciones génicas con enfermedades, además, la detección de genomas de patógenos es la aplicación diagnóstica más utilizada en lo que respecta a las enfermedades adquiridas.

Las pruebas moleculares permiten un diagnóstico temprano, en los periodos iniciales de la enfermedad, en donde aún hay pocas copias del genoma fúngico.

RECOMENDACIONES

Promover mejoras en la identificación fúngica llegando a nivel de especie y estandarizando la determinación de las pruebas de susceptibilidad, a la vez que se promueva la vigilancia epidemiológica y con esto establecer a nivel nacional de forma centralizada programas de detección de mecanismos de resistencia; con lo que se puede ir detectando los principales mecanismos de resistencia circulantes a nivel nacional.

Fomentar la investigación a nivel nacional del uso de las distintas metodologías disponibles en el mundo, de manera que se adecúen a la realidad y necesidad actual de la morbilidad de nuestra población, en especial aquellas metodologías diagnósticas rápidas, sensibles, costo-efectivas y, sobre todo, reproducibles, que contribuyan a optimizar la toma de decisiones clínicas, reducir los desenlaces adversos y frenar la expansión global de la resistencia antifúngica.

Para lograr lo anterior, debe ser prioritario la optimización y estandarización de los métodos de detección en el laboratorio clínico, como las técnicas moleculares y genómicas, lo que permitirá una identificación rápida y precisa de cepas resistentes, fortaleciendo así la vigilancia epidemiológica y favoreciendo la instauración de tratamientos oportunos y eficaces.

REFERENCIAS

1. Álvarez, J., Del Pino, J. & Pérez R. (1986). Estudio comparativo sobre la efectividad terapéutica de griseofulvina y ketoconazol. *Dermatología Venezolana*, 24(2, 3y4). <https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/download/927/902>
2. Amann, V., Kissmann, A.-K., Firacative, C. y Rosenau, F. (2025). Candidiasis asociada a biopelículas: Patogénesis, prevalencia, desafíos y opciones terapéuticas. *Pharmaceuticals*, 18 (4), 460. <https://doi.org/10.3390/ph18040460>
3. Angulo, A. y Santos, M.F. (2022). Antifúngicos actuales y futuros enfoques terapéuticos: artículo de revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 20 (4), 469-470. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2022/dcm224r.pdf>
4. Bhattacharya, S., Sae, S. y Fries, B. (2020). Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*, 9 (6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
5. Billmyre, R.B., Applen Clancey, S., Li, L., Doering, T. y Heitman, J. (2020). 5-fluorocytosine resistance is associated with hypermutation and alterations in capsule biosynthesis in *Cryptococcus*. *Nature Communications*, 11 (127). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13890-z>
6. Blanchard, G., Amarow, B., Fratti, M., Salamin, K., Bontems, O., Chang, Y., Sabou, A. M., Künzle, N., Monod, M. y Guenova, E. (2023). Reliable and rapid identification of terbinafine resistance in dermatophytic nail and skin infections. *Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology*, 37 (10), 2080-2089. <https://doi.org/10.1111/jdv.19253>
7. Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. Mc Graw Hill.
8. Cadena, S. A. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Candida africana* en una colección de aislamientos clínicos de origen Genito-Urinario de *Candida albicans*. *Tesis de grado, Universidad Javeriana*. <http://hdl.handle.net/10554/20401>
9. Camargo, A.J., Valero, K.N., Gómez, A.M., Camargo, D.F., Suárez, C.F. y Cuy, L.E. (2020). Fundamentos y aplicaciones biomédicas de las principales tecnologías de secuenciación: una revisión de literatura. *Revista de Investigación en Salud Universidad de Boyacá*, 7(2), 138-172. <https://doi.org/10.24267/23897325.498>

10. Cañete, C., Mele, J., Patterson, H., Sanders, C., Ferrer, D., Garcia, V., Fan, H., David, M., Wiederhold, N. (2023). Terbinafine-Resistant Dermatophytes and the Presence of *Trichophyton indotineae* in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(8). <https://doi.org/10.1128/jcm.00562-23>
11. Castro, C., García, E. y Martín, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(Supl 1), 32-39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30180-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30180-6)
12. Chandra, J., Mohammad, S., Ghannoum, M.A. (2009). Flucytosine: Site of Action, Mechanism of Resistance and Use in Combination Therapy. In: Mayers, D.L. (eds) *Antimicrobial Drug Resistance. Infectious Disease*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_27
13. Chang, Y.C., Lamichhane, A.K., Cai, H., Walter, P.J., Bennett, J.E. y Kwon-Chung, K. (2021). Moderate levels of 5-fluorocytosine cause the emergence of high frequency resistance in cryptococci. *Nature Communications*, 12 (3418). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23745-1>
14. Costa, C., Ponte, A., Pais, P., Santos, R., Cavalheiro, M., Yaguchi, T., Chibana, H. y Cacho, M. (2015). New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. *Plos one*, 10 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135110>
15. Cuenca, M. (2010). Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Española de Quimioterapia*, 23 (4), 169-176. <https://seq.es/wp-content/uploads/2009/12/cuenca.pdf>
16. Czajka, K. M., Venkataraman, K., Brabant-Kirwan, D., Santi, S. A., Verschoor, C., Appanna, V. D., Singh, R., Saunders, D. P., & Tharmalingam, S. (2023). Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells*, 12 (22), 2655. <https://doi.org/10.3390/cells12222655>
17. De Paepe, R., Normand, A. C., Uhrlaß, S., Nenoff, P., Piarroux, R. y Packeu, A. (2024). Resistance Profile, Terbinafine Resistance Screening and MALDI-TOF MS

- Identification of the Emerging Pathogen *Trichophyton indotineae*. *Mycopathologia*, 189 (2), 29. <https://doi.org/10.1007/s11046-024-00835-4>
18. Delavy, M., Dos Santos, A., Heiman, C. y Coste, A. (2019). Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9 (19). <https://doi: 10.3389/fcimb.2019.00019>
 19. Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, III (30), 88-111. <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>
 20. Downey, N. (2023, 20 enero). *Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis*. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>
 21. Espinel, A. (2008). Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeast and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 101-106. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70027-5)
 22. Fiol, E. (2014). Iniciación a la experimentación en proteómica. Análisis de un caso práctico. Tesis de grado, *Universitat de les Illes Balears*. https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/1059/TFG_BIOLOGIA_FiolDiezElena.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 23. Firacative, C. (2020). Invasive Fungal Disease in Humans: Are We Aware of the Real Impact? *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz*. 115, e200430. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200430>
 24. Fisher, M., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, J., Bignell, E., Bowyer, P., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O., Gurr, S., Harrison, T., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D., Warris, A., White, P., Xu, J., Zwaan, B. & Verweij, P. (2022) Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol* 20, 557–571. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>
 25. Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falconer, M.A., Amaro, J. y Tapia, C. (2014) Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 511-517. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000500001>

26. Gómez, C.H. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Revista Infectio*, 14 (S2), S172-S180. <https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-pdf-S012393921070134X>
27. Gow, N., Johnson, C., Berman, J., Coste, A., Cuomo, C., Perlin, D., Bicanic, T., Harrison, T., Wiederhold, N., Bromley, M., Chiller, T., y Edgar, K. (2022). The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. *Nature communications*, 13(1), 5352. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32249-5>
28. Gupta, A. K., Susmita, Nguyen, H. C., Liddy, A., Economopoulos, V. y Wang, T. (2025). Terbinafine Resistance in *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton indotineae*: A Literature Review. *Antibiotics*, 14(5), 472. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050472>
29. Hori, Y. y Shibuya, K. (2018). Role of *FKS* Gene in the Susceptibility of Pathogenic Fungi to Equinocandins. *Medical Mycology Journal*, 59 (2), E31-E40. <https://doi.org/10.3314/mmj.18.004>
30. Hossain, C., Ryan, L., Gera, M., Choudhuri, S., Lyle, N., Ali, K., y Diamond, G. (2022). Antifungals and Drug Resistance. *Encyclopedia*, 2, 1722–1737. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040118>
31. Huang, Y., Su, Y., Chen, X., Xiao, M. y Xu, Y. (2024). Insight into Virulence and Mechanisms of Amphotericin B Resistance in the *Candida haemulonii* Complex. *Journal of Fungi*, 10 (9). <https://doi.org/10.3390/jof10090615>
32. Jordana, E., Martró, E. y Ausina, V. (2012). La espectrometría de masas en el Laboratorio de Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30 (10); 635-644. [doi: 10.1016/j.eimc.2012.01.012](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.012)
33. Kaur, L y Nobile, C. (2023). Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 71 (102237). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>
34. Knoll, M.A., Ulmer, H. y Lass-Flörl, C. (2021). Rapid Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Molds by MALDI-TOF MS: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Fungi*. 7 (63). <https://doi.org/10.3390/jof7010063>
35. Lee, Y., Robbins, N. y Cowen, Leah. (2023). Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *Antimicrobials and resistance*, 1 (5). <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2>

36. Liu, Y., y Filler, S. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic cell*, 10(2), 168–173. <https://doi.org/10.1128/EC.00279-10>
37. Loeffler, J., Hagemeyer, L., Hebart, H., Henke, N., Schumacher, U., y Einsele, H. (2000). Rapid detection on point mutations by Fluorescence Resonance Energy Transfer and probe Melting Curves en *Candida* species. *Clinical Chemistry*, 46 (5), 631-635. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.5.631>
38. López, K., Dzul, K., Lugo, C., Arias, J. y Zavala, J. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista Biomedica*, 27 (3), 127-136. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i3.541>
39. Maldonado, N., Robledo, C. y Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22 (1), 35-45 <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n1/0123-9392-inf-22-01-00035.pdf>
40. Marinach, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J.Y., Brun, S., Snounou, G., Hennequín, C., Sanglard, D., Datry, A., Goldmard, J.L. y Mazier., D. (2009). MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*, 9 (20), 4627-4631. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900152>
41. Martínez, D., Bravo, M., & Semprún, N. (2023). Antifúngicos: lo que tenemos, lo que tendremos, lo que queremos. *Investigación Clínica*, 64(4), 539-556. <https://ve.scielo.org/pdf/ic/v64n4/2477-9393-ic-64-04-539.pdf>
42. Mellado, M., Cuenca, M. y Rodríguez, J.L. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 20 (10), 523-530. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72856-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72856-5)
43. Miao, G., Zhang, L., Zhang, J., Ge, S., Xia, N., Qian, N., Yu, D. y Qiu, X. (2020). Free convective PCR: From principle study to commercial applications-A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1108, 177-197. doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.069
44. Moreno, A., Normand, A.C., Bidaud, A.L., Cremer, G., Foulet, F., Brun, S., Bonnal, C., Aït-Ammar, N., Jabet, A., Ayachi, A., Piarroux, R., Botterel, F., Houzè, S., Desoubeaux, G., Hennequin, C., y Dannaoui, E. (2022). Terbinafine Resistance in Dermatophytes: A

- French Multicenter Prospective Study. *Journal of Fungi*, 8 (3), 220. <https://doi.org/10.3390/jof8030220>
45. Niño, G. (2021). La pared celular de los hongos patógenos: su importancia en la supervivencia del hongo y el establecimiento de las infecciones fúngicas. *Revista de Sociedad Venezolana de Microbiología*. 41 (1-2), 5-11. [file:///C:/Users/36831/Downloads/Pared_celular_hongos_2021_SVM%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/36831/Downloads/Pared_celular_hongos_2021_SVM%20(3).pdf)
46. Nocua, L.C., Uribe, P., Tarazona, L., Robles, R. y Cortés, J.A. (2020). Azoles de antes y ahora: una revisión. *Revista Chilena de Infectología*, 37 (3), 219-230. <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v37n3/0716-1018-rci-37-03-0219.pdf>
47. O'Keefe, J., & Kavanagh, K. (2004). Adriamycin alters the expression of drug efflux pumps and confers amphotericin B tolerance in *Candida albicans*. *Anticancer research*, 24(2A), 405–408. <https://ar.iijournals.org/content/anticancer/24/2A/405.full.pdf>
48. Oliveira, V., Okay, T., Melhem, M., Walderez, M. y Del Negro, G. (2013). The new mutation L321F in *Candida albicans* *ERG11* gene may be associated with fluconazole resistance. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30 (3), 209-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.01.001>
49. Ongay, L. y Códiz, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Mensaje bioquímico*. 45 (2021), 23-34. <http://biosensor.facmed.unam.mx/mensajebioquimico/wp-content/uploads/2021/06/6-Ongay-Larios-secuenciacion.pdf>
50. Papon, N., Bougnoux, M. E., y d'Enfert, C. (2020). Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. *Trends in microbiology*, 28 (4), 240–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.007>
51. Perlin, D. y Wiederhold, N. (2017). Culture-Independent Molecular Methods for Detection of Antifungal Resistance Mechanisms and Fungal Identification. *The Journal of Infectious Diseases*, 216 (supl 3), S458-S465. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix121>
52. Phan-Canh, T., Nguyen-Le, D., Luu, P., Khunweeraphong, N., Kuchler, K. (2025). Rapid in vitro evolution of flucytosine resistance in *Candida auris*. *American Society Microbiology*, 10 (4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00977-24>

53. Pinilla, G., Esteban, J., Navarrete, J., Muñoz, L., Lindarte, D., Molano, J. y Montes, J. (2018). Herramientas para el análisis de mecanismos de resistencia de *Candida albicans*. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 38 (3), 86-92. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2018/ei183e.pdf>
54. Pinoncely, N. A. (2010). Prevalencia de la resistencia a antifúngicos y de mutaciones en genes asociados en especies de *Candida albicans* aislado de pacientes ginecológicas. *Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/528/1/185911.pdf>
55. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25 (2), 78-82. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
56. Pontón, J. y Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clínica*, 126 (1), 56-60. <https://doi.org/10.1157/13097528>
57. Pujol, C., Pfaller, M.A y Soll, D.R. (2004). Flucytosine Resistance Is Restricted to a Single Genetic Clade of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48(1). <https://doi.org/10.1128/aac.48.1.262-266.2004>
58. Quiles, I. y García, J. (2021). Antifúngicos de uso sistémico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38 (2), 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.004>
59. Quiles, I., Peláez, T., Rezusta, A. y García, J. (2016). Aplicación de la espectrometría de masas en micología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34 (Supl 2), 26-30. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30187-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30187-2)
60. Rabaan, A., Sulaiman, T., Al-Ahmed, S., Buhaliqah, Z., Buhaliqah, A., AlYuosof, B., Alfaresi, M., Al Fares, M., Alwarthan, S., Alkathlan, M., Almaghrabi, R., Abuzaid, A., Altowaileb, J., Al Ibrahim, M., AlSalman, E., Alsalman, F., Alghounaim, M., Bueid, A. S., Al-Omari, A., y Mohapatra, R. (2023). Potential Strategies to Control the Risk of Antifungal Resistance in Humans: A Comprehensive Review. *Antibiotics*, 12 (3), 608. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030608>
61. Reinoso, C., Schüller, C., Schuetzter, M. & Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through

- activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1200-1210. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1200-1210.2003>
62. Rivera, E., Jiménez, A.U. y Manzano, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 63 (2). <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02>
63. Robert, M. G., Cornet, M., Hennebique, A., Rasamoelina, T., Caspar, Y., Pondérand, L., Bidart, M., Durand, H., Jacquet, M., Garnaud, C., & Maubon, D. (2021). MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage. *Microorganisms*, 9 (6), 1283 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061283>
64. Rojas, D., Benavides, D., Angulo, Belén., Muñoz, L. y Consumi, C. (2024). Caracterización de las tecnologías de secuenciación genética de segunda y tercera generación, *Tecnología en marcha*, 37 (2). <https://doi.org/10.18845/tm.v37i2.6494>
65. Saikat, P., Singh, P., Shamanth A.S., Rudramurthy, S.M., Chakrabarti, A. y Ghosh, A.K. (2017). Rapid detection of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* by MALDI-TOF MS. *International Society for Human an Animal Mycology*, 56 (2), 234-241. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx042>
66. Salazar, AM., Sandoval, A.S. y Armendáriz, J.S. (2013). *Biología Molecular: Fundamentos y Aplicaciones en las Ciencias de la Salud*. México D.F: McGraw-Hill Interamericana de Editores. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1473>
67. Sánchez, J., Losada, O. & Pont, V. (1999). Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, S26-S30. <https://www.reviberoammicol.com/1999-16/S26S30.pdf>
68. Saracli, M., Fothergill, A., Sutton, D. y Wiederhold, N. (2015). Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Medical Mycology*, (53) 7, 736–742. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv046>
69. Shankarnarayan, S., Shaw, D., Sharma, A., Chakrabarti, A., Dogra, S., Sendhil, M., Kaur, H., Ghosh, A. y Rudramurthy, S. (2020). Rapid detection of terbinafine resistance in *Trichophyton* species by Amplified refractory mutation system-polymerase chain reaction. *Scientific reports*, 10 (1297). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58187-0>

70. Shen, J., Arendrup, M., Jemec, G. y Saunte, D. (2021). Photodynamic therapy: A treatment option for terbinafine resistant *Trichophyton* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102169>
71. Shields, R., Nguyen, M. H., Press, E., Kwa, A., Cheng, S., Du, Ch. y Clancy, C. (2012). The Presence of an FKS Mutation Rather than MIC Is an Independent Risk Factor for Failure of Echinocandin Therapy among Patients with Invasive Candidiasis Due to *Candida glabrata*. *Antimicrobials Agentes and Chemotherapy*, 56 (12), 4862-4869. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aac.00027-12>
72. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future microbiology*, 8(10), 1325–1337. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.101>
73. Tolvanen, K. y Karp, M. (2011). Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (9), 5280-5288. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.029>
- Tomaz, P. R., Santos, J. R., Santos, P.C. (2016). Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de melting. *Revista Brasileira de Análisis Clínicos*, 48(1), 19-23. https://sbac.org.br/rbac/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-3_VOL-48_1_-2016-ref-129.pdf
74. TritaGene Biotech. (s.f). ARMS-PCR. <https://tritagene.com/en/arms-pcr/>
75. Tsui, C., Kong, E. F., y Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
76. Vale, L.A., Coste, A.T., Ischer, F., Parker, J.E., Kelly, S.L., Pinto, E. y Sanglard, D. (2012). Azole Resistance by Loss of Function of the Sterol Δ 5,6-Desaturase Gene (*ERG3*) in *Candida albicans* Does Not Necessarily Decrease Virulence. *Antimicrobial Agentes and Chemotherapy*, 56 (4). <https://doi.org/10.1128/aac.05720-11>
77. Vallin Plous, C. (2007). Microarreglos de ADN y sus aplicaciones en investigaciones biomédicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 38 (2), 132-135. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221636005>
78. Vella, A., De Carolis, E., Vaccaro, L., Posteraro, P., Perlin, D. S., Kostrzewa, M., Posteraro, B., y Sanguinetti, M. (2013). Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2964–2969. <https://doi.org/10.1128/JCM.00903-13>
79. Vieille, P., Cruz, R. y Alvarez, E. (2020). Diferenciación morfofisiológica y molecular por curvas de melting de alta resolución (HRMA) y secuenciación del complejo *Trichophyton mentagrophytes* en cepas humanas en Valparaíso, Chile. *Revista Argentina de Microbiología*. 52 (2), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.002>
80. Vinuesa-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1-13. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617114013.pdf>
81. Wiederhold, N.P., Grabinski, J.L., García, G., Perlin, D.S. y Lee, S.A. (2008). Pyrosequencing to detect mutations in *FKSI* that confer reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52 (11), 4145-4148. <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/AAC.00959-08>
82. World Health Organization: WHO. (2022, 25 octubre). La OMS publica su primera lista de hongos que constituyen una amenaza para la salud. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi>
83. Zohra, F., Al-Hatmi, A., Brüggemann, R., Melchers, W., De Hoog, S., Verweij, P. y Buil, J. (2020). Molecular Mechanisms of 5-Fluorocytosine Resistance in Yeast and Filamentous Fungi. *Journal of Fungi*, 7 (11). <https://doi.org/10.3390/jof7110909>
84. Zvezdanova, M. E., Arroyo, M. J., Méndez, G., Candela, A., Mancera, L., Rodríguez, J. G., Serra, J. L., Jiménez, R., Lozano, I., Castro, C., López, C., Muñoz, P., Guinea, J., Escribano, P., Rodríguez-Sánchez, B., & ASPEIN group (2022). Detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* complex isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.06.005>