Naturaleza y TECNOLOGÍA
Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA A LA RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN AISLADOS DE *Sporothrix brasiliensis*

Alan Daniel González-Novoa [a], Perla Haydee Guillen-Granados [a], Manuela Gómez-Gaviria [a], Leonardo Padró-Villegas [a], Héctor Manuel Mora-Montes [a,*]

[a] Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, CP 36050, Guanajuato, Gto. hmora@ugto.mx

Resumen

Sporothrix brasiliensis es el principal agente etiológico de la esporotricosis zoonótica en América Latina y representa un problema emergente para la salud pública, debido al incremento de casos y a la variabilidad en la respuesta al tratamiento antifúngico. Dado que los mecanismos moleculares asociados con la disminución de la susceptibilidad aún son poco conocidos, en este estudio se analizó la expresión de los genes *CDR1, MDR1, ERG11* y *FKS1* en aislados clínicos de *S. brasiliensis* con diferentes perfiles de susceptibilidad frente a fluconazol, itraconazol y anfotericina B. Se evaluaron siete aislados clínicos y una cepa de referencia mediante RT-qPCR, utilizando el método 2^(-ΔΔCt) para el análisis de la expresión relativa. Los resultados evidenciaron una respuesta transcripcional heterogénea entre los aislados analizados. Los genes *CDR1, MDR1* y *ERG11* mostraron una mayor expresión en algunos aislados con resistencia o susceptibilidad reducida a los azoles, mientras que *FKS1* presentó un patrón de expresión variable, lo que sugiere que la respuesta antifúngica en *S. brasiliensis* involucra múltiples mecanismos de adaptación. En conjunto, estos hallazgos indican que la disminución de la susceptibilidad antifúngica en *S. brasiliensis* es un fenómeno multifactorial y aportan información relevante para comprender las bases moleculares de la respuesta a los antifúngicos en esta especie.

Palabras clave: Sporothrix brasiliensis; Resistencia antifúngica; Expresión génica; Esporotricosis.

Naturaleza y TECNOLOGÍA

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

GENE EXPRESSION ANALYSIS ASSOCIATED WITH ANTIFUNGAL RESISTANCE IN *Sporothrix brasiliensis* ISOLATES

Abstract

Sporothrix brasiliensis is the main etiological agent of zoonotic sporotrichosis in Latin America and represents an emerging public health concern due to the increasing number of cases and the variability in response to antifungal treatment. Since the molecular mechanisms associated with reduced susceptibility remain poorly understood, this study analyzed the expression of the *CDR1*, *MDR1*, *ERG11*, and *FKS1* genes in clinical isolates of *S. brasiliensis* exhibiting different susceptibility profiles to fluconazole, itraconazole, and amphotericin B. Seven clinical isolates and one reference strain were evaluated by RT-qPCR, using the 2^(-ΔΔCt) method to determine relative gene expression. The results revealed a heterogeneous transcriptional response among the isolates analyzed. The *CDR1*, *MDR1*, and *ERG11* genes showed increased expression in some isolates displaying resistance or reduced susceptibility to azoles, whereas *FKS1* exhibited a variable expression pattern, suggesting that the antifungal response in *S. brasiliensis* involves multiple adaptive mechanisms. Collectively, these findings indicate that reduced antifungal susceptibility in *S. brasiliensis* is a multifactorial phenomenon and provide relevant insights into the molecular basis of the antifungal response in this species.

Keywords: Sporothrix brasiliensis; Antifungal resistance; Gene expression; Sporotrichosis.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

1. Introducción

La esporotricosis es una micosis subcutánea de evolución aguda o crónica que afecta a humanos y otros mamíferos. Clínicamente, se caracteriza por lesiones cutáneas y subcutáneas, aunque en algunos casos puede comprometer otros tejidos y originar manifestaciones extracutáneas, como afecciones oculares, nasales y bucales (de Aguiar Freire y Moreira Reis, 2025).

La enfermedad es causada por especies del complejo *Sporothrix*, un grupo de ascomicetos pertenecientes al orden *Ophiostomatales*, entre las cuales *Sporothrix brasiliensis* es considerada la especie de mayor virulencia (Gómez-Gaviria y col., 2023). *S. brasiliensis* es un hongo termodimórfico que crece como micelio filamentoso, formado por hifas hialinas y septadas que producen conidios cuando se desarrolla en el ambiente, con un crecimiento óptimo entre 25 y 28 °C. En contraste, durante la infección del hospedero se encuentra en forma de levadura, cuyo crecimiento óptimo ocurre entre 36 y 37 °C (Gómez-Gaviria y col., 2023; Etchecopaz y col., 2021).

La esporotricosis puede adquirirse por transmisión sapronótica, mediante la inoculación traumática del hongo presente en suelo, materia vegetal u otro material orgánico contaminado (Xavier y col., 2023). Sin embargo, en las últimas décadas la transmisión zoonótica ha cobrado especial relevancia debido al incremento de casos asociados al contacto con exudados de lesiones cutáneas, mordeduras o arañazos de animales infectados, particularmente gatos, considerados el principal reservorio y fuente de transmisión de *S. brasiliensis* (Rossow y col., 2020). Este aumento de la esporotricosis zoonótica ha convertido a la enfermedad en un importante problema de salud pública, especialmente en América Latina, donde constituye la micosis subcutánea más frecuente y se han documentado numerosos casos en Brasil, Argentina, Paraguay y Chile, así como en países fuera de la región, entre ellos Estados Unidos y el Reino Unido (Téllez y col., 2014; Xavier y col., 2023).

Ante este escenario, el tratamiento antifúngico representa la principal estrategia terapéutica para el control de la infección. En la práctica clínica, estos fármacos se clasifican en cinco grupos, de acuerdo a su estructura química: polienos, azoles, alilaminas, equinocandinas y análogos de pirimidinas (Rivera-Toledo y col., 2020). Entre ellos, los polienos y los azoles

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

constituyen las principales opciones para el tratamiento de la esporotricosis. (Rivera-Toledo y col., 2020). Los polienos, representados principalmente por la anfotericina B, ejercen su actividad mediante la unión de la micosamina, presente en su estructura, al ergosterol de la membrana plasmática fúngica (Rivera-Toledo y col., 2020). Esta interacción altera la permeabilidad de la membrana, favorece la formación de poros y la pérdida del contenido intracelular. Además, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo al daño celular y a la muerte del hongo (Rivera-Toledo y col., 2020). Por su parte, los azoles, entre los que se encuentran el fluconazol y el itraconazol, inhiben la enzima lanosterol 14-α-desmetilasa (*ERG11* o *CYP51*), clave en la biosíntesis del ergosterol. Como consecuencia, disminuye la producción de este esterol esencial y se acumulan intermediarios tóxicos que alteran la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, inhibiendo el crecimiento y la proliferación del hongo (Angulo Rodríguez y Santos Ortiz, 2022).

La disminución de la susceptibilidad a los azoles y a otros antifúngicos representa uno de los principales desafíos para el tratamiento de la esporotricosis, ya que puede comprometer la eficacia terapéutica y favorecer la persistencia de la infección (Etchecopaz y col., 2021). Aunque los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno en *S. brasiliensis* aún no se conocen por completo, se ha propuesto que la diversidad genética de esta especie y las alteraciones en la expresión de genes relacionados con la respuesta antifúngica podrían desempeñar un papel importante (Gómez-Gaviria y col., 2023).

Entre los genes codificados por *S. brasiliensis* se han identificado genes candidatos asociados con mecanismos de respuesta y resistencia a los antifúngicos descritos en otros hongos patógenos, particularmente en *Candida* spp. Entre ellos destacan *ERG11*, involucrado en la biosíntesis del ergosterol; *CDR1* y *MDR1*, relacionados con el transporte activo de fármacos; y *FKS1*, implicado en la síntesis de β-(1,3)-glucano y el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar la expresión de los genes *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* y *FKS1* en aislados clínicos de *S. brasiliensis* con diferentes perfiles de susceptibilidad frente a fluconazol,

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

itraconazol y anfotericina B mediante RT-qPCR, con el propósito de aportar evidencia sobre los mecanismos moleculares asociados con la respuesta a estos antifúngicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepa de referencia y aislados clínicos

Se utilizó la cepa silvestre (*WT*) de *S. brasiliensis* (5110; ATCC MYA 4823) como cepa de referencia. Se emplearon siete aislados clínicos de *S. brasiliensis* obtenidos de gatos infectados, con perfiles de susceptibilidad y resistencia a antifúngicos previamente determinados en todas las muestras (datos no publicados).

2.2. Cultivo de cepas y aislados

La cepa silvestre y los aislados clínicos se cultivaron en medio líquido YPD (5 mL en tubos cónicos) durante cuatro días a 37°C, con el propósito de obtener crecimiento levaduriforme. La ausencia de contaminación bacteriana en los cultivos se verificó mediante microscopía óptica de campo claro.

2.3. Extracción y purificación de ADNg

El ADN genómico (ADNg) de la cepa silvestre de *S. brasiliensis* se extrajo a partir de los cultivos líquidos. Las células se recuperaron por centrifugación (9 485 *x* g, 10 min), se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 2 mL de agua estéril. Posteriormente, la suspensión se transfirió a microtubos estériles y se adicionaron 500 µL de buffer de extracción y perlas de vidrio; la mezcla se sometió a agitación en vórtex durante 10 min, seguida de centrifugación (14 881 *x g, 5* min). El sobrenadante se descartó y se mezcló con 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1), se homogeneizó en vórtex y se centrifugó (14 881 *x g, 10* min). La fase acuosa se descartó y se adicionaron 500 µL de cloroformo, se mezcló nuevamente en vórtex y se centrifugó (14 881 *x g*, 5 minutos). Se descartó la fase acuosa y el ADNg se precipitó mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto, incubándose en frío durante 1 h. Finalmente, la muestra se mezcló por inversión, se centrifugó durante 5 min para recuperar la pastilla, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50 µL de agua Mili-Q estéril (Raeder & Broda, 1985).

Se evaluó la integridad del ADNg mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (p/v).

Posteriormente, se incubaron 30 µL de ADNg con 0.8 µL de RNasa (10 µg/mL), se incubó a

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

37°C, 30 min y finalmente la enzima se inactivó (65°C, 15 min). Para evaluar la pureza del ADNg, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (p/v) a 100 V.

2.4. Validación de ADNg

Se verificó la capacidad de amplificación del ADN genómico (ADNg) mediante PCR utilizando oligonucleótidos para el gen endógeno *L6*, con el fin de confirmar la calidad del ADN antes de emplearlo en la validación de los pares de oligonucleótidos de los genes de interés. Se preparó la mezcla de reacción: regulador amortiguador DreamTaq 1X (20 mM $MgCl_2$), 0.04 U/µL DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher), dNTPs 0.25 mM (Invitrogen), aforado a 22 µL con agua tratada con DEPC. La reacción incluyó un control positivo (0.5 µL cada cebador L6 + 1 µL ADNg 100 ng/µL) y un control negativo (0.5 µL cada cebador, sin ADN). Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V.

2.5. Diseño y validación de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes de interés (*ERG11*, *CDR1*, *MDR1* y *FKS1*), con Primer3Plus, considerando 250-350 pb y temperatura de alineamiento de ~60°C. La especificidad de los oligonucleótidos se verificó utilizando Primer-BLAST (NCBI). Las secuencias de los oligonucleótidos para los genes de interés, así como de los oligonucleótidos para el control endógeno estandarizado (gen *L6*) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos para los genes de interés

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
ERG11	GAGAACCGCAAGAAGTACGG	TCGGAGATGATGTGGACGTA
CDR1	TCGTTTATGGGCACGGGC	CGGGCAAGCGACTGGACA
MDR1	TAGCACAAGCAGAGACTG	TGCCGTCTCTTTGGATGC
FKS1	ACGAACAACAGTATCACGATC	TCGTAAAGTCGCTGAAGGTCT
L6 (Control endógeno)	ATTGCGACATCAGAGAAGG	TCGACCTTCTTGATGTTGG

Para la validación, se procedió a amplificar ADNg de *S. brasiliensis* utilizando DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción contenía

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

buffer DreamTaq 1X (con 20 mM $MgCl_2$), 0.04 U/µL de enzima, dNTPs 0.25 mM (Invitrogen) y se aforó a 22 µL con agua tratada con DEPC. Cada par de oligonucleótidos se validó mediante cuatro ensayos paralelos: positivo (5.5 µL mezcla + 0.5 µL cebador directo + 0.5 µL reverso + 1 µL ADNg 100 ng/µL), dos negativos direccionales (5.5 µL mezcla + un solo cebador + 1 µL ADNg 100 ng/µL) y blanco (5.5 µL mezcla + ambos oligonucleótidos, sin ADNg).

La amplificación se ejecutó en un termociclador T100 (Bio-Rad) con el siguiente programa: desnaturalización inicial (95 °C, 3 min), 29 ciclos (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 60 s) y extensión terminal (72 °C, 5 min), concluyendo con enfriamiento (12 °C). Los productos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V.

2.6. Curvas de calibración para oligonucleótidos

Para establecer curvas de referencia de los oligonucleótidos *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* y *FKS1* se empleó qPCR con detección de SYBR Green. Se prepararon cinco diluciones seriadas de ADNg de *S. brasiliensis* cuantificado previamente en un rango entre 1.28 y 800 ng/µL. Las reacciones se amplificaron en un termociclador Step One ™ (Applied Biosystems) utilizando el kit Fast SYBR Green Master Mix.

Las mezclas se prepararon en dos formatos según su aplicación. La mezcla blanco contenía 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix (que incluye SYBR Green I, AmpliTaq Fast ADN polimerasa, uracil-ADN glicosidasa, ROX y dNTPs en regulador optimizado), 0.5 µL de cada cebador y se ajustó a 20 µL con 9.5 µL de agua tratada con DEPC. Para las reacciones con material genético se ajustó la proporción de oligonucleótidos a 0.4 µL cada uno y agua tratada con DEPC a 4.2 µL, manteniendo el volumen de Master Mix en 10 µL. Cada pozo de la placa de reacción MicroAmp® Fast Optical 96 (Life Technologies) recibió 15 µL de mezcla de reacción más 5 µL de la dilución correspondiente de ADNg y se selló con la película óptica MicroAmp®.

2.7. Extracción y purificación de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de los cultivos líquidos (5 mL) de los aislados clínicos y de la cepa silvestre (WT) de *S. brasiliensis*.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

Las células se recuperaron por centrifugación (9 485 *x g*, 5 min). El precipitado celular resultante se resuspendió en 1 mL de agua estéril y cada muestra se transfirió a un microtubo distinto. Se llevaron a cabo dos ciclos de lavado adicionales (9 485 *x g*, 5 min, resuspensión en agua estéril).

Cada precipitado se pulverizó con nitrógeno líquido, se transfirió a microtubos con 1 mL de TRIzol, se homogeneizó por inversión y se incubó a temperatura ambiente (5 min). Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por inversión durante 15 s y se incubó nuevamente a temperatura ambiente (3 min). A continuación, se centrifugó a 14 881 *x g*, 15 min, 4°C.

La fase acuosa se recuperó en un nuevo microtubo, se adicionaron 500 µL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente (10 min). La pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol 70% (v/v), se volvió a centrifugar (14 881 *x g*, 3 min, 4°C) y se dejó secar, el precipitado final de ARN se resuspendió en un volumen mínimo de agua tratada con DEPC.

El tratamiento con desoxirribonucleasas (DNasa) se llevó a cabo añadiendo en tubos de PCR: 3 µL de la muestra de ARN, 1 µL de buffer, 1 µL de DNasa y 5 µL de agua tratada con DEPC. Tras someter la mezcla a una incubación a temperatura ambiente (15 min), la reacción se detuvo mediante la adición de 1 µL de EDTA e incubación (65°C, 10 min).

La calidad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) a 80 V tras la extracción y después del tratamiento con DNasa, tratando las muestras previamente con calor (60°C, 5 min) para evaluar la integridad y, en el segundo análisis, para descartar la presencia de ADNg contaminante (Logemann, 1987; Trujillo-Esquivel E y col., 2017).

2.8. Validación de ARN

Para verificar la ausencia de contaminación con ADNg residual tras la extracción y tratamiento con DNasa, se realizó PCR de punto final con oligonucleótidos L6 siguiendo el protocolo descrito en la sub-sección 2.4. Se incluyeron control positivo (ADNg 100 ng/µL), control negativo (sin ADN) y nueve controles de ARN (0.5 µL ARN tratado de cada muestra). Los productos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V.

2.9. Síntesis y validación de ADNc

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit SuperScript II. Para la mezcla

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

de la reacción se dispusieron 9 microtubos de PCR, en los cuales se depositó 1 µg/µL de la muestra de ARN, 1µL del oligonucleótido dT20 (10µM), 1 µL de dNTPs (10mM), se ajustó a un volumen final de 10 µL con agua tratada con DEPC.

Se incubó (65°C, 5 min) y se enfrió 1 min en hielo, se adicionó el mix de reacción compuesto por: 2 µL de buffer RT, 4 µL de $MgCl_2$, 2 µL de DTT, 1 µL de RNase OUT y 1 µL de retrotranscriptasa SuperScript. El proceso de síntesis se desarrolló a 50°C por 50 min, deteniéndose posteriormente con una inactivación enzimática (85°C, 5 min). Se adicionó 1µL de RNasa H seguido de una incubación (37°C, 20 min).

Se confirmó la viabilidad del ADNc sintetizado de las nueve muestras mediante PCR con oligonucleótidos L6, aplicando el protocolo de la sub-sección 2.4. Se incluyeron control positivo (ADNg 100 ng/µL), control negativo (sin ADN) y nueve muestras de ADNc (0.5 µL de cada muestra). Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V. Tras confirmación, las muestras se cuantificaron y ajustaron a 200 ng/µL.

2.10. Análisis de la expresión génica

Una vez comprobada la amplificación con cada par de oligonucleótidos, se evaluó la expresión relativa de los genes *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1*. Se empleó el ADNc a una concentración de 200 ng/µL. Las reacciones de qRT-PCR se ejecutaron en el termociclador Step One™ (Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Para el análisis de los datos, la expresión génica de los siete aislados clínicos fue normalizada utilizando el gen L6 como control endógeno de referencia, tomando como calibrador basal a la cepa silvestre (WT). La preparación de las reacciones se estandarizó a un volumen final de 20 µL por pocillo. En el caso de los blancos, se formularon combinando 10 µL del Fast SYBR Green Master Mix, 0.5 µL de cada cebador (directo y reverso) y 9.5 µL de agua tratada con DEPC. Para las muestras problema, se elaboró una mezcla de 10 µL del Fast SYBR Green Master Mix, 0.4 µL de cada cebador y 4.2 µL de agua tratada con DEPC; de esta solución se depositaron 15 µL por pocillo, adicionando posteriormente 5 µL del ADNc de cada muestra correspondiente.

El conjunto de las reacciones, tanto los controles como las muestras, se montó por duplicado. Finalmente, los ensayos se

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

dispusieron en placas ópticas de 96 pocillos de 0.1 mL (MicroAmp® Fast Optical, Life Technologies) selladas herméticamente con película óptica adherible (MicroAmp®, Life Technologies).

2.11. Análisis estadístico

El análisis transcripcional se efectuó empleando dos réplicas biológicas independientes. Para la estimación de la expresión relativa se utilizó como calibrador basal a la cepa WT de *S. brasiliensis*. Los resultados se presentaron como la media aritmética ± desviación estándar (DE). La comparación estadística entre los distintos aislados clínicos y la cepa control se analizó mediante la prueba *t* de Student, considerando significancia cuando $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Cultivos de aislados clínicos y cepas silvestres de S. brasiliensis.

El desarrollo biológico de los siete aislados clínicos de *S. brasiliensis* y de las cepas control (M9) se llevaron a cabo mediante la metodología descrita. Se verificó la fase de levadura y la ausencia de contaminación bacteriana previa a los ensayos de expresión génica. Las micrografías de las nueve muestras se presentan en la Figura 1.

3.2. Extracción y tratamiento de ADNg y ARN

Se extrajo ADNg de la cepa silvestre (M9) y ARN total de los aislados clínicos (M1-M8), así como de la cepa silvestre (M9) mediante la metodología previamente descrita. En la Figura 2 se observa el resultado de la electroforesis realizada para evaluar la calidad del ADNg y ARN. En el bloque superior (carriles 2 y 3), se observan las bandas del ADNg de la cepa silvestre (M9) y una réplica de un cultivo independiente (M9*). Los carriles restantes corresponden al ARN total de cada muestra, distinguiéndose las bandas ribosomales 28S y 18S, material genético residual y ARN degradado. Los carriles marcados con X corresponden al marcador de tamaño.

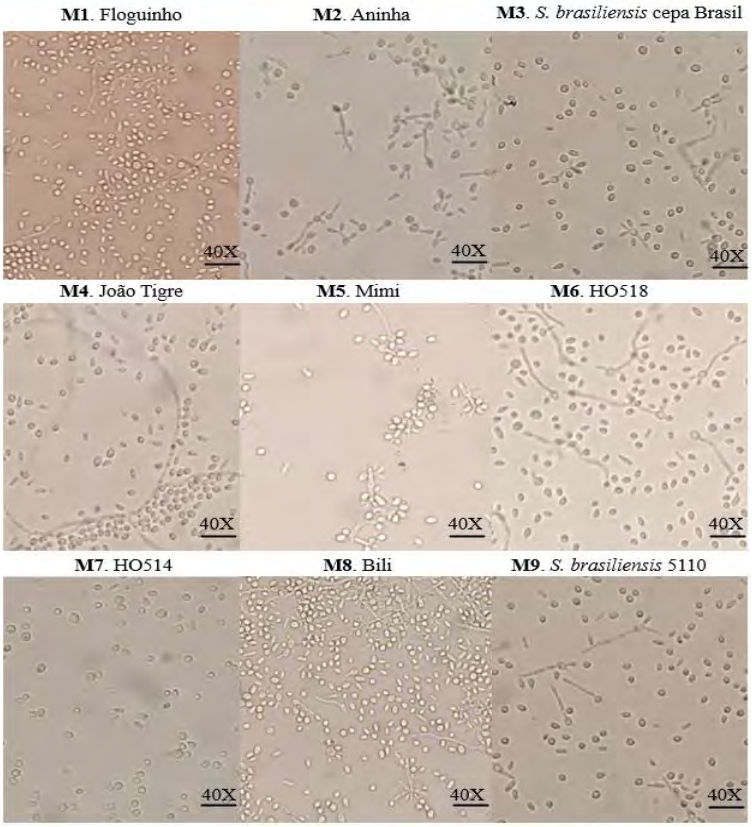


Figura 1. Cultivos de aislados clínicos observados en microscopía óptica de campo claro 40X. Se observa crecimiento levaduriforme en medio YPD de las muestras de estudio M1-M9 sin contaminación

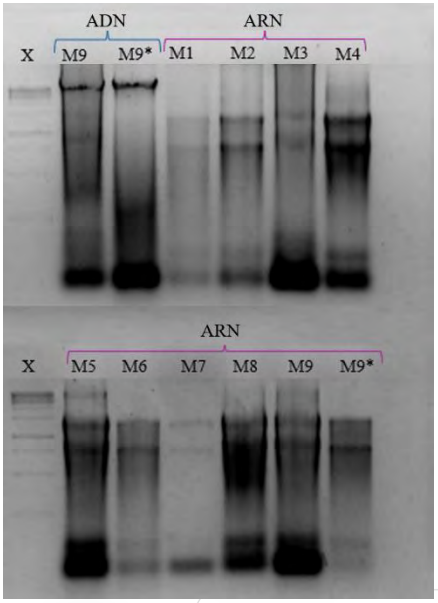


Figura 2. Evaluación de la integridad del ADNg y ARN de *S. brasiliensis* por electroforesis en agarosa

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

Posterior al tratamiento enzimático del ADNg, el análisis electroforético (Figura 3) evidenció la reducción significativa del ARN residual, conservando la integridad del ADNg. Dicho material fue empleado subsecuentemente en los ensayos de validación de los oligonucleótidos. En la Figura 3, en el carril 1, se observa el marcador de tamaño molecular y en los carriles 2 a 4 las alícuotas del ADNg tratado, evidenciándose la presencia de la banda definida de ADNg.

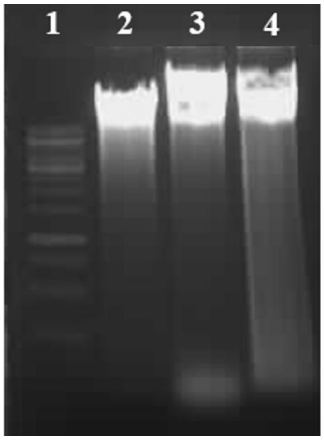


Figura 3. Evaluación de la pureza del ADNg de *S. brasiliensis* (M9) tratado con RNasa

Por su parte, el tratamiento de ARN con DNasa fue verificado por una electroforesis (Figura 4) que evidenció la ausencia de ADNg. En la Figura 4, en los carriles M1-M10 se muestran alícuotas del ARN tratado, los carriles marcados con X corresponden al marcador de tamaño.

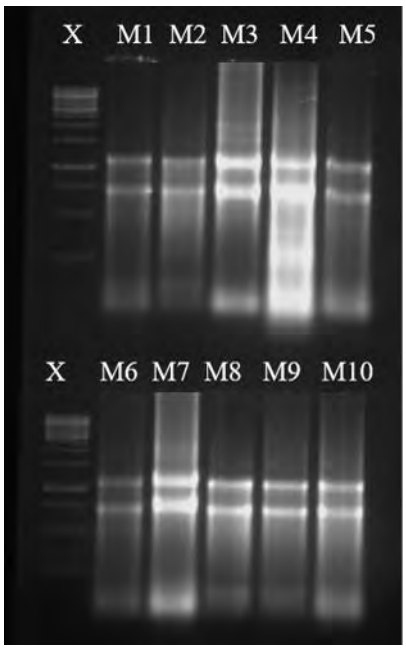


Figura 4. Evaluación de la pureza de las muestras de ARN de aislados clínicos de *S. brasiliensis* tratadas con DNasa

3.3. Validación del ADNg y ARN

Para verificar la calidad y la capacidad de amplificación del ADNg extraído de la cepa silvestre de *S. brasiliensis*, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos al gen endógeno *L6*. Como se observa en la Figura 5, el control positivo (+) presentó una banda de amplificación del tamaño esperado, confirmando la integridad y la calidad del ADN obtenido. En contraste, el control negativo (−) no mostró amplificación, descartando contaminación durante la reacción de PCR.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

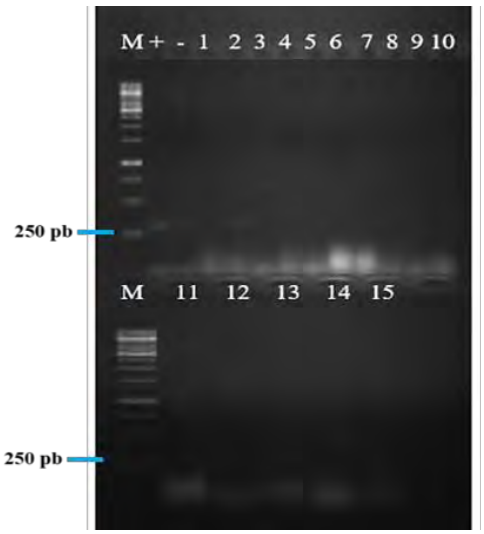


Figura 5. Evaluación de la pureza de ARN y ADNg por PCR de punto final

Para confirmar la ausencia de contaminación con ADNg en las muestras de ARN, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos al gen endógeno *L6*. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los carriles 1 al 15, correspondientes a las muestras de ARN, no presentaron productos de amplificación, lo que confirma la ausencia de contaminación con ADNg y demuestra la adecuada pureza de los extractos de ARN para los análisis posteriores de expresión génica.

3.4. Validación de par de oligonucleótidos

La especificidad de los oligonucleótidos diseñados para *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1* se validó por PCR de punto final utilizando ADNg, incluyendo el gen *L6* como control de referencia. El análisis por electroforesis reveló la presencia de un solo producto de amplificación del tamaño esperado para cada uno de los controles positivos (Figura 6).

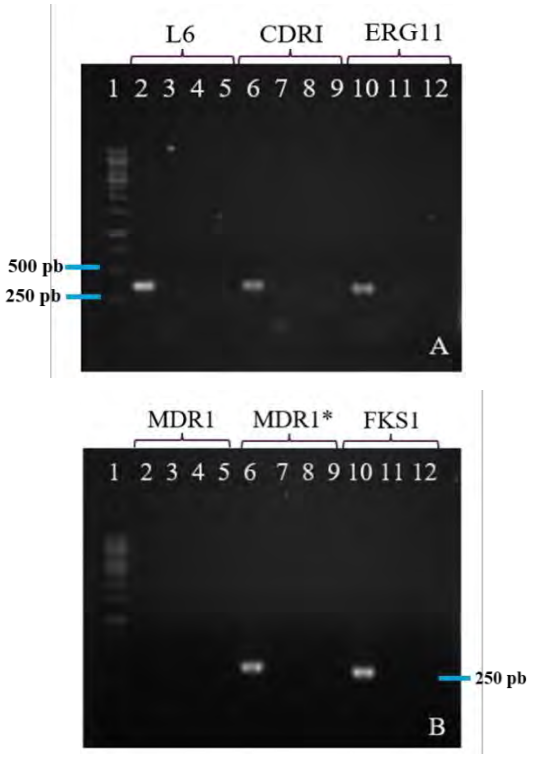


Figura 6. Validación de los oligonucleótidos de *CDR1*, *ERG11*, *MDR1* y *FKS1* por PCR de punto final

En la Figura 6, el carril 1 de ambos geles contiene el marcador de peso molecular. El gel A muestra amplificación específica únicamente en los controles positivos del gen *L6* (carril 2; 303 pb), *CDR1* (carril 6; 319 pb) y *ERG11* (carril 10; 272 pb). El gel B refleja la ausencia de amplicón en el control positivo del primer par de *MDR1* (carril 2), en

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

contraste con el segundo par (*MDR1**; carril 6), que exhibió la banda esperada de 287 pb. Para *FKS1*, la amplificación se observó exclusivamente en el control positivo (carril 10; 280 pb). Estos resultados confirmaron la eficacia de los oligonucleótidos para su uso en el análisis de expresión génica.

3.5. Curvas de disociación y calibración de los oligonucleótidos

Una vez validados los pares de oligonucleótidos, se construyeron las curvas de calibración para los genes *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1* mediante qPCR, empleando las diluciones de ADN preparadas según lo descrito en la metodología. A continuación, se muestran las curvas de disociación correspondientes y los porcentajes de eficiencia calculados para cada conjunto de oligonucleótidos.

ERG11. La curva de calibración mostró una eficiencia de amplificación del 97 %, una pendiente de -3.4837 y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997, valores dentro del rango óptimo. La curva de disociación exhibió un único pico de fusión ($T_m \approx 85.16\,^{\circ}C$) correspondiente al producto específico, confirmando la idoneidad de los oligonucleótidos para su uso en análisis de expresión génica (Figura 7).

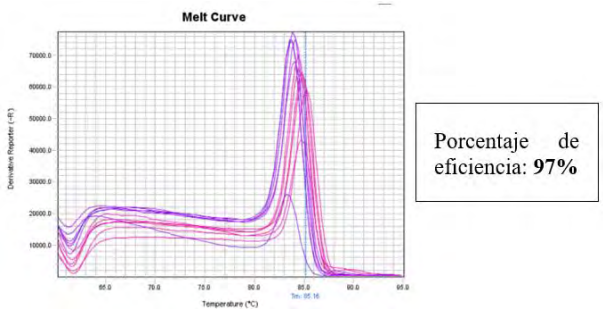


Figura 7. Curva de disociación (*Melt Curve*) del gen *ERG11*

CDR1. La curva de calibración exhibió adecuada linealidad ($R^2 = 0.9997$, pendiente = -3.5924) y una eficiencia del 93 %, ideal para análisis de expresión génica por qPCR. La curva de disociación presentó un único pico de fusión ($T_m \approx 87\,^{\circ}C$) sin picos secundarios, validando la alta especificidad del diseño para *CDR1* (Figura 8).

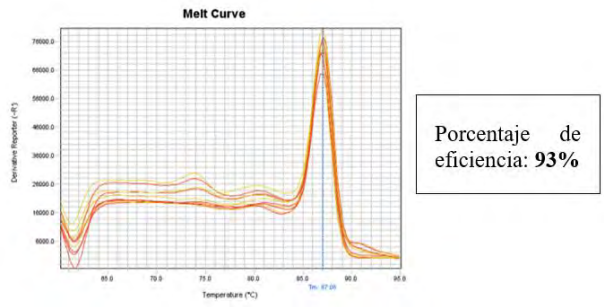


Figura 8. Curva de disociación (*Melt Curve*) del gen *CDR1*

MDR1. La curva de calibración registró una pendiente de -3.8628, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9993 y una eficiencia de amplificación del 89 %. El

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

análisis de disociación exhibió un único pico de fusión ($T_m \approx 85.74$ °C), correspondiente al amplicón específico. Aunque la eficiencia se sitúa ligeramente por debajo del rango óptimo convencional, el desempeño del par de oligonucleótidos resulta adecuado para los análisis de expresión (Figura 9).

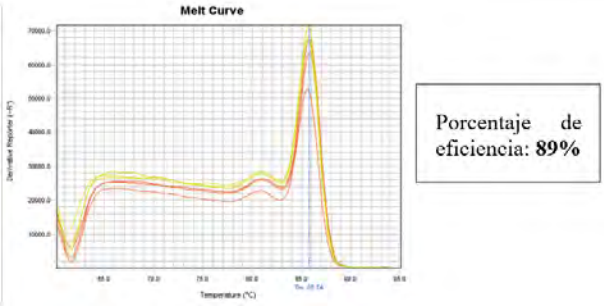


Figura 9. Curva de disociación (*Melt Curve*) del gen *MDR1*

FKS1. La curva de calibración mostró una pendiente de -3.194, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.984 y una eficiencia de amplificación del 105 %, parámetros que confirman un desempeño adecuado para el ensayo. Por su parte, el análisis de disociación exhibió un único pico de fusión ($T_m \approx 82.92$ °C), correspondiente al amplicón específico y demostrando el funcionamiento ideal de este par de oligonucleótidos (Figura 10),

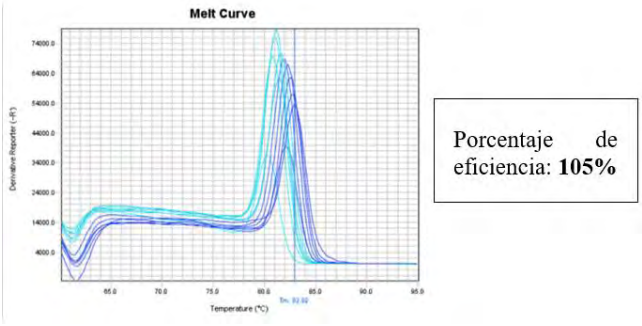


Figura 10. Curva de disociación (*Melt Curve*) del gen *FKS1*

3.5. Síntesis y validación de cDNA

El ADNc, sintetizado a partir del ARN de la cepa silvestre y los aislados clínicos, se validó mediante una PCR punto final utilizando los oligonucleótidos del gen *L6*. En la Figura 11 se observa, en los carriles 1 a 17, la presencia del amplicón característico de ~250 pb que evidencia la viabilidad del ADNc. El control positivo (ADNg de *S. brasiliensis*) confirmó la amplificación, mientras que el control negativo (−) libre de producto confirmó la especificidad e inocuidad del ensayo. Los carriles etiquetados con *M* indican el marcador de tamaño.

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

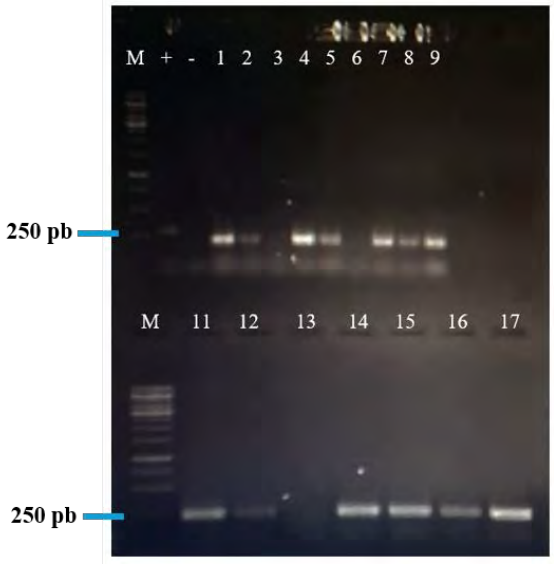


Figura 11. Validación del ADNc de cepas y aislados clínicos de *S. brasiliensis* mediante PCR de punto final

3.6. Análisis de la expresión génica

La cuantificación fue realizada por RT-qPCR en aislados clínicos respecto al control M9 (*S. brasiliensis* 5110). En las siguientes gráficas, las barras representan la media $\pm$ desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes. Significancia estadística calculada mediante la prueba *t* de Student ($p < 0.05$). Valores superiores e inferiores a cero indican inducción y represión transcripcional, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre.

El perfil de expresión de *ERG11* mostró una regulación heterogénea entre los aislados de *S. brasiliensis* frente a la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). La sobreexpresión más pronunciada se observó en M8 Bili (6.40 ± 1.27), seguida por M2 Aninha (3.13 ± 0.10), M6 HO518 (2.45 ± 0.78), M3 *S. brasiliensis* Brasil (1.25 ± 0.35) y M1 Floguinho (1.13 ± 1.52). En tanto, M7 HO514 (0.90 ± 2.12) y M4 João Tigre (0.05 ± 0.92) mantuvieron niveles equivalentes al control. M5 Mimi fue el único aislado con subregulación genómica (-2.65 ± 0.92). De acuerdo con la prueba *t* de Student, los aislados M2 Aninha, M3 *S. brasiliensis* Brasil, M6 HO518 y M8 Bili presentaron cambios estadísticamente significativos con respecto a M9 ($p < 0.05$; Figura 12).

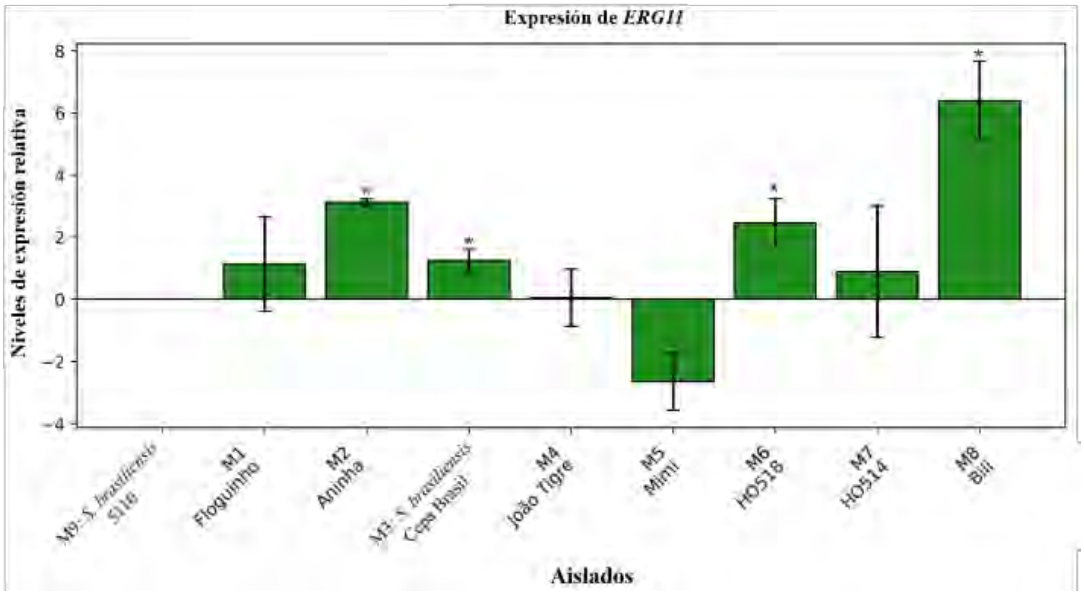


Figura 12. Niveles de expresión relativa de *ERG11* en cepa silvestre y aislados clínicos de *S. brasiliensis* evaluados mediante una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) comparando contra la expresión de la cepa silvestre (M9); considerando diferencias estadísticamente significativas (*)

El gen *CDR1* exhibió una marcada heterogeneidad en sus niveles de expresión relativa entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis*. El mayor incremento transcripcional se registró en M1 Floguinho (6.50 ± 4.53), seguido en orden descendente por M2 Aninha (2.60 ± 1.96), M7 HO514 (1.85 ± 0.80), M4 João Tigre (1.50 ± 0.71) y M3 *S. brasiliensis* Brasil (1.32 ± 0.12). En contraste, los aislados M5 Mimi (-3.02 ± 2.23), M6 HO518 (-2.95 ± 1.63) y M8 Bili (-1.60 ± 0.99) mostraron valores promedio negativos, al igual que la cepa de referencia M9 (-0.80 ± 0.14). Estos hallazgos evidencian patrones de regulación contrastantes para *CDR1* según el aislado analizado (Figura 13).

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

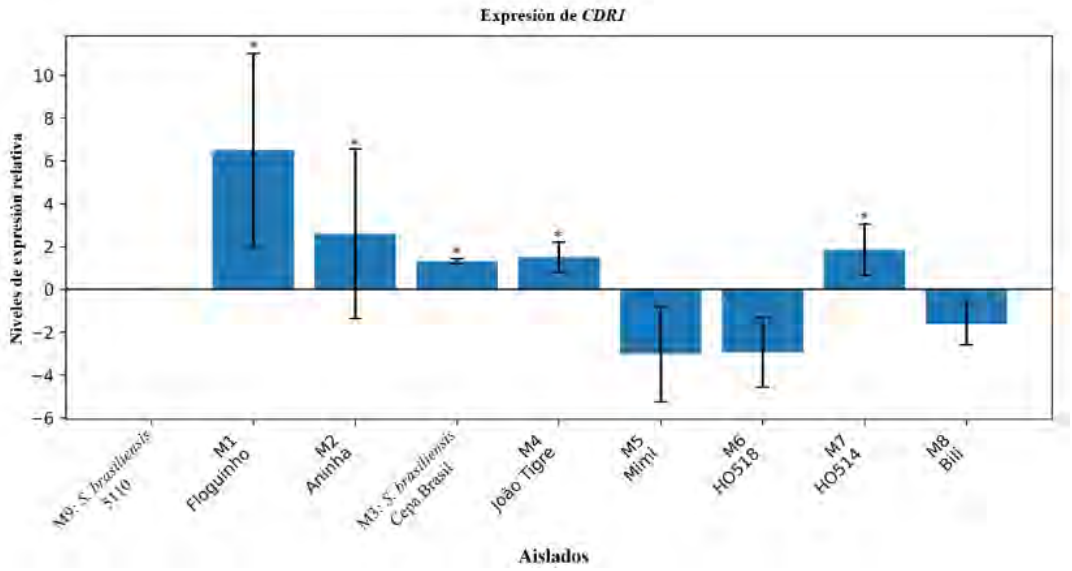


Figura 13. Niveles de expresión relativa de *CDR1* en cepa silvestre y aislados clínicos de *S. brasiliensis* evaluados mediante una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) comparando contra la expresión de la cepa silvestre (M9); considerando diferencias estadísticamente significativas (*)

La cuantificación transcripcional del gen *MDR1* mostró fluctuaciones notables entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* respecto a la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). La sobreexpresión más acentuada se registró en el aislado M5 Mimi (6.05 ± 0.64), seguido por M1 Floguinho (3.40 ± 0.28) y M2 Aninha (2.90 ± 1.41), los cuales mostraron un incremento estadísticamente significativo. En sentido opuesto, se observó una disminución o represión de la expresión en M6 HO518 (-4.40 ± 5.23), M4 João Tigre (-4.30 ± 3.25), M8 Bili (-2.60 ± 0.71), M7 HO514 (-1.85 ± 0.21) y M3 *S. brasiliensis* Brasil (-1.65 ± 2.05) (Figura 14).

Finalmente, el perfil transcripcional de *FKS1* exhibió una marcada heterogeneidad en la población clínica de *S. brasiliensis* frente a la cepa control M9 (*S. brasiliensis* 5110). Se observó una sobreexpresión significativa (* $p < 0.05$) en M1 Floguinho (6.95 ± 6.01), M2 Aninha (5.00 ± 3.68) y M3 *S. brasiliensis* Brasil (3.20 ± 0.14). Por el contrario, los aislados M5 Mimi (-2.90 ± 0.99), M8 Bili (-2.80 ± 2.97), M6 HO518 (-1.90 ± 1.70) y M4 João Tigre (-1.15 ± 0.49) mostraron subregulación del gen, mientras que M7 HO514 (0.20 ± 1.41) conservó una expresión similar al control (Figura 15).

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

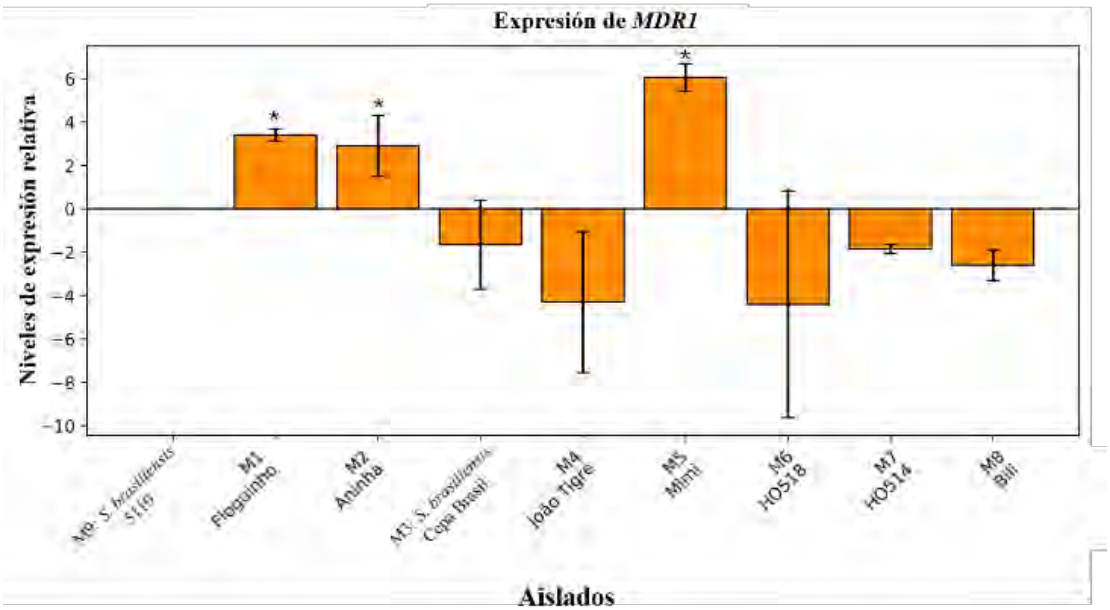


Figura 14. Niveles de expresión relativa de *MDR1* en cepa silvestre y aislados clínicos de *S. brasiliensis* evaluados mediante una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) comparando contra la expresión de la cepa silvestre (M9); considerando diferencias estadísticamente significativas (*)

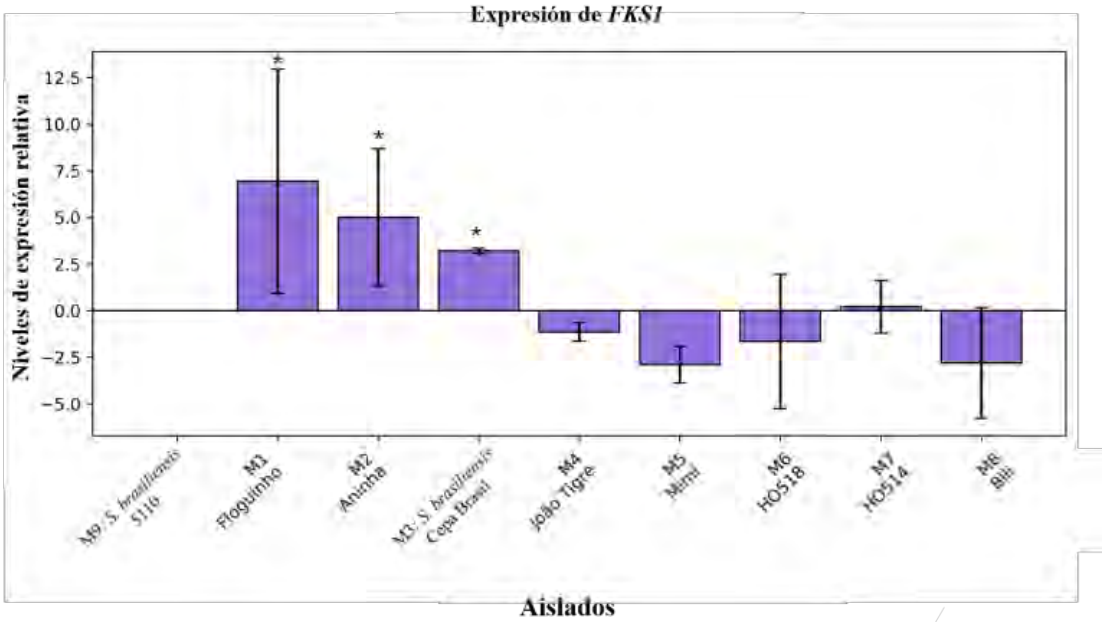


Figura 15. Niveles de expresión relativa de *FKS1* en cepa silvestre y aislados clínicos de *S. brasiliensis* evaluados mediante una prueba *t* de Student ($p < 0.05$) comparando contra la expresión de la cepa silvestre (M9); considerando diferencias estadísticamente significativas (*)

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

4. Discusión

La capacidad de *S. brasiliensis* para evadir el efecto de los antifúngicos representa un fenómeno multifactorial que involucra la activación coordinada de múltiples sistemas defensivos (Cowen y col., 2015). Los cambios en los perfiles de transcripción observados en los aislados clínicos podrían establecer vínculos potenciales entre la regulación génica y las variaciones fenotípicas documentadas en sus ensayos de susceptibilidad frente a itraconazol, fluconazol y anfotericina B (Tabla 2; resultados preliminares de nuestro grupo (datos no publicados)). Este panorama genómico heterogéneo sugiere que la adaptación de este patógeno no se limita a un mecanismo único, sino que emerge de la concurrencia de múltiples estrategias de defensa interrelacionadas.

Tabla 2. Perfiles de susceptibilidad a antifúngicos previamente determinados

Aislados	Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B
Floguinho	Resistente	Resistente	Resistente
Aninha	Resistente	Resistente	Resistente
S. brasiliensis Brasil	Susceptible dosis dependiente	Susceptible dosis dependiente	Susceptible dosis dependiente
João Tigre	Resistente	Resistente	Resistente
Mimi	Resistente	Susceptible dosis dependiente	Resistente
HO518	Susceptible	Susceptible	Susceptible
HO514	Susceptible	Resistente	Susceptible dosis dependiente
Bili	Susceptible	Susceptible	Susceptible dosis dependiente
S. brasiliensis 5110	Susceptible dosis dependiente	Susceptible dosis dependiente	Susceptible dosis dependiente

La vía de síntesis del ergosterol representa un destino central de los azoles (Flowers y col., 2015). La proteína codificada por *ERG11* (lanosterol 14α-desmetilasa) es el receptor principal de los fármacos azólicos. Investigaciones en *Candida* muestran que tanto la sobreexpresión de *ERG11* como los cambios mutacionales en su secuencia se

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

correlacionan con la reducción de la sensibilidad, mediante el incremento de moléculas diana disponibles o la disminución de la afinidad del agente terapéutico (Flowers y col., 2015). Los resultados obtenidos para *ERG11* revelaron un patrón de expresión heterogéneo entre los aislados analizados. Floguinho, Aninha y la cepa de *S. brasiliensis* de Brasil presentaron una mayor expresión de este gen, consistente con su menor susceptibilidad al itraconazol. En contraste, el aislado Bili mostró una elevada expresión de *ERG11* a pesar de ser susceptible tanto a itraconazol como a fluconazol, lo que indica que la expresión de este gen, por sí sola, no explica el fenotipo de susceptibilidad observado. Resultados similares se han descrito en *Candida*, donde la resistencia a los azoles es un fenómeno multifactorial que no depende exclusivamente de la sobreexpresión de *ERG11* (Sanglard y col., 2009). Además de los cambios en la expresión génica, otros mecanismos, como mutaciones en *ERG11*, variaciones en el número de copias génicas o la sobreexpresión de transportadores de eflujo, pueden contribuir a modular la respuesta a los azoles (Li y col., 2025).

Las bombas de eflujo constituyen uno de los principales mecanismos mediante los cuales los hongos reducen la concentración intracelular de compuestos antifúngicos, favoreciendo así la disminución de su eficacia (Lu y col., 2025). La sobreexpresión de los genes que codifican estos transportadores incrementa la expulsión de los fármacos hacia el exterior de la célula, limitando su acción. Entre ellos, *CDR1*, perteneciente a la superfamilia ATP-Binding Cassette (ABC), utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar antifúngicos fuera de la célula, mientras que *MDR1*, miembro de la Major Facilitator Superfamily (MFS), emplea el gradiente de protones para llevar a cabo este proceso (Fuentes y col., 2014).

En especies de *Candida*, la sobreexpresión de *CDR1* se ha asociado con una menor susceptibilidad a diversos azoles, entre ellos fluconazol e itraconazol, mientras que *MDR1* se ha relacionado principalmente con la resistencia al fluconazol (Nouraei y col., 2025). En el presente estudio, los resultados mostraron una asociación parcial con este comportamiento. Los aislados Floguinho, Aninha y la cepa de *S. brasiliensis* de Brasil presentaron una mayor expresión de *CDR1*, en concordancia con su menor susceptibilidad al itraconazol. De manera similar, Floguinho y Aninha mostraron una elevada expresión de *MDR1*, consistente con su resistencia al fluconazol. Sin embargo, esta relación no fue

uniforme en todos los aislados. Por ejemplo, HO514 presentó una elevada expresión de *CDR1* sin exhibir una disminución evidente de la susceptibilidad, mientras que João Tigre mostró resistencia a los azoles sin un incremento importante en la expresión de *MDR1*. Estos resultados sugieren que la respuesta a los antifúngicos no depende exclusivamente de la actividad de las bombas de eflujo, sino de la interacción con otros mecanismos moleculares, como alteraciones en *ERG11*, variaciones genómicas y procesos de adaptación celular, que en conjunto determinan el fenotipo de susceptibilidad observado (López-Ávila y col., 2016).

Finalmente, aunque los polienos, como la anfotericina B, no inhiben directamente la biosíntesis del ergosterol, se ha propuesto que alteraciones en la expresión de *ERG11* podrían modificar la composición de los esteroles de membrana y contribuir de manera indirecta a la respuesta celular frente al estrés inducido por estos antifúngicos (Lee y col., 2020; Zobi y Algül, 2025). En este estudio, Floguinho, Aninha y la cepa de *S. brasiliensis* de Brasil presentaron una mayor expresión de *FKS1*. Particularmente, Floguinho y Aninha también mostraron resistencia a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, acompañada de la sobreexpresión simultánea de *CDR1, MDR1* y *ERG11*. Estos resultados sugieren que la remodelación de la pared celular podría formar parte de una respuesta adaptativa coordinada frente al estrés antifúngico (Ibe & Munro, 2021; Widanage et al., 2024).

No obstante, esta interpretación debe realizarse con cautela, ya que en este estudio no se evaluó la susceptibilidad a equinocandinas, grupo de antifúngicos cuyo principal blanco molecular es *FKS1*. En especies de *Candida*, la resistencia a las equinocandinas se ha asociado principalmente con mutaciones localizadas en regiones conservadas (*hot spots*) de *FKS1*, más que con cambios en su nivel de expresión (Desnos-Ollivier y col., 2008). Por ello, la sobreexpresión observada en algunos aislados de *S. brasiliensis* podría reflejar una respuesta general al estrés celular inducido por los antifúngicos, hipótesis que deberá confirmarse mediante estudios funcionales y el análisis de variantes genéticas en este gen.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la disminución de la susceptibilidad antifúngica en *S. brasiliensis* es un fenómeno complejo y multifactorial. Mientras algunos aislados presentaron la sobreexpresión simultánea de genes relacionados con el

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

transporte de fármacos (*CDR1* y *MDR1*), la biosíntesis del ergosterol (*ERG11*) y la integridad de la pared celular (*FKS1*), otros mostraron perfiles de expresión distintos a pesar de compartir fenotipos de susceptibilidad similares. Estos hallazgos sugieren que la regulación de la expresión génica constituye solo uno de los mecanismos implicados en la respuesta a los antifúngicos y que su contribución probablemente interactúa con otros factores, como mutaciones, variaciones en el número de copias génicas y procesos de adaptación celular, cuya importancia puede variar entre los diferentes aislados clínicos (Su y col., 2025; Sui y col., 2026).

5. Conclusiones

El análisis de la expresión de los genes *ERG11, CDR1, MDR1* y *FKS1* evidenció una respuesta transcripcional heterogénea entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* con diferentes perfiles de susceptibilidad frente a fluconazol, itraconazol y anfotericina B. La sobreexpresión simultánea de algunos de estos genes en determinados aislados con menor susceptibilidad sugiere que procesos relacionados con el transporte activo de fármacos, la biosíntesis del ergosterol y la remodelación de la pared celular podrían participar en la respuesta antifúngica de esta especie. Sin embargo, la variabilidad observada entre aislados indica que la disminución de la susceptibilidad antifúngica constituye un fenómeno complejo y multifactorial, que no depende exclusivamente de la regulación de la expresión génica.

Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en la respuesta antifúngica de *S. brasiliensis* y amplían el conocimiento disponible sobre esta especie, cuya biología molecular permanece menos estudiada que la de otros hongos patógenos. No obstante, estos hallazgos representan una aproximación inicial y deberán complementarse con estudios que incluyan un mayor número de aislados clínicos, la evaluación de otros genes relacionados con la respuesta antifúngica, el análisis de mutaciones y mecanismos regulatorios, así como la caracterización de la susceptibilidad frente a otros grupos de antifúngicos, como las equinocandinas.

En conjunto, este trabajo proporciona información que contribuirá a comprender con mayor precisión los procesos moleculares asociados con la respuesta a los antifúngicos en *S. brasiliensis*, generando una base para

futuras investigaciones orientadas al desarrollo de herramientas de vigilancia molecular y estrategias que favorezcan un manejo más eficaz de la esporotricosis.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el apoyo de la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación [Ciencia de Frontera 2019-6380 y CBF2023-2024-655].

Referencias bibliográficas

Angulo Rodríguez, A. y Santos Ortiz, M. F. (2022) Antifúngicos actuales y futuros enfoques terapéuticos: artículo de revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 20(4), 469-477.

Cowen, L.E., Sanglard, D., Howard, S.J., Rogers, P.D., y Perlin, D.S. (2015) Mechanisms of antifungal drug resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in *Medicine*, 5(7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019752

de Aguiar Freire, C.E., y Moreira Reis, R. (2025) Remergence of zoonotic sporotrichosis in Brazil as a public health threat. *Discover Public Health*, *22*, 187. https://doi.org/10.1186/s12982-025-00598-3

Etchecopaz, A., Toscanini, M.A., Gisbert, A., Mas, J., Scarpa, M., Iovannitti, C.A., Bendezú, K., Nusblat, A.D., Iachini, R., y Cuestas, M.L. (2021) A review of an emerging South American fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi*, 7, 170. https://doi.org/10.3390/jof7030170

Flowers, S.A., Colón, B., Whaley, S.G., Schuler, M.A., y Rogers, P.D. (2014) Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 450–460. https://doi.org/10.1128/AAC.03470-14

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). http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000500001

Gómez-Gaviria, M., Martínez-Álvarez, J.A., Mora-Montes, H.M. (2023) Current progress in *Sporothrix brasiliensis* Basic aspects. *Journal of Fungi*, 9, 533. https://doi.org/10.3390/jof9050533

Ibe, C., y Munro, C.A. (2021) Fungal cell wall proteins and signaling pathways forma cytoprotective network to combat stresses. *Journal of Fungi*, 7 (9), 739. 10.3390/jof7090739

Lazameth-Diniz, N.F., de Almeida, D.B., da Silva Fernandes, F., da Silva Queiroz, A.O., de Souza, É.S., Cruz, K.S., Matsuura, A.B.J., Frickmann, H., y de Souza, J.V.B. (2025). Clinical and Molecular Characterization of Feline Sporotrichosis in the Brazilian Amazon: PCR-Based Identification of Sporothrix brasiliensis. *Animals*, 15 (15). 2318. https://doi.org/10.3390/ani15152318

Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., y Cowen, L.E. (2021) Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in Candida albicans and beyond. *Chemical Reviews*, 121(6). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199

Li, Y., Hind, C., Furner-Pardoe, J., Sutton, J.M., y Rahman, K.M. (2025) Understanding the mechanisms of resistance to azole antifungals in Candida species. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 7(3), dlaf106. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf106

López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K.R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J.J., y Zavala-Castro, J.E. (2016) Mechanisms of antifungal resistance of azoles in Candida albicans: A review. *Revista Biomédica*, 27(3). https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i3.541

Lu, X., Zhou, J., Ming, Y., Wang, Y., He, R., Li, Y., Feng, L., Zeng, B., Du, Y., y Wang, C. (2025) Next-generation antifungal drugs: Mechanisms, efficacy, and clinical prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 15(8), 3852–3887. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2025.06.013

Nouraei, H., Amirzadeh, N., Khodadadi, H., Ghahartars, M., Zareshahrabadi, Z., Nasr, R., Hashemi, S.J., Diba, K., Zomorodian, K., y Pakshir, K. (2025) Overexpression of efflux pump and biofilm-associated genes in itraconazole-resistant Candida albicans isolates causing onychomycosis. *Scientific Reports*, 15, 31292. https://doi.org/10.1038/s41598-025-17359-6

Prasad, R., y Rawal, M.K. (2014) Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 202. https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00202

Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A.U., y Manzano-Gayosso, P. (2020) Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de*

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

Medicina, 63(2). http://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02

Rojas, A.E., Cárdenas, L.Y., García, M.C., y Pérez, J.E. (2023) Expression of *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* and *CDR1* genes in *Candida tropicalis.*

Rossow, J.A., Queiroz-Telles, F., Caceres, D.H., Beer, K.D., Jackson, B.R., Pereira, J.G., Ferreira Gremião, I.D., y Pereira, S.A. (2020) A One Health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. *Journal of Fungi*, 6(4), 247. https://doi.org/10.3390/jof6040247

Sanglard, D., Coste, A., y Ferrari, S. (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1029–1050. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x

Su, Y., Li, Y., Yi, Q., Xu, Y., Sun, T., y Li, Y. (2025) Insight into the mechanisms and clinical relevance of antifungal heteroresistance. *Journal of Fungi*, 11(2), 143. https://doi.org/10.3390/jof11020143

Sui, Y., Nizamani, M.M., Tarafder, E., Zhang, H.L., Zhang, Q., Acharya, K., Sarkar, J., Muhae-Ud-Din, G., y Wang, Y. (2026) Interconnected worlds: A comprehensive review of fungal defenses, antimicrobial resistance, and their evolutionary dynamics. *IMA Fungus*, 17, e171995. https://doi.org/10.3897/imafungus.17.171995

Teixeira, M.M., Almeida-Paes, R., Bernardes-Engemann, A.R., Nicola, A.M., de Macedo, P.M., Valle, A.C.F., Gutiérrez-Galhardo, M.C., Freitas, D.F.S., Barker, B.M., Matute, D.R., Stajich, J.E., y Zancopé-Oliveira, R.M. (2022) Single nucleotide polymorphisms and chromosomal copy number variation may impact the *Sporothrix brasiliensis* antifungal susceptibility and sporothricosis clinical outcomes. *Fungal Genetics and Biology*, 163, 103743, https://doi.org/10.1016/j.fgb.2022.103743

Téllez, M.D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Quinello, C., Bonne-Hernández, R., y Carlos, I.Z. (2014) *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*, 160(11), 2352-2365. https://doi.org/10.1099/mic.0.081794-0

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

Widanage, M.C.D., Gautam, I., Sarkar, D., Mentink-Vigier, F., Vermaas, J.V., Ding, S.Y., Lipton, A.S., Fontaine, T., Latgé, J.P., Wang, P., Wang, T. (2024) Adaptative survival of Aspergillus fumigatus to echinocandins arises from cell wall remodeling beyond β-1,3-glucan synthesis inhibition. *Nature Communications*, 15 (1), https://doi.org/10.1038/s41467-024-50799-8

Xavier, M.O., Poester, V.R., Trápaga, M.R., y Stevens, D.A. (2023) *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, therapy, and recent developments. *Journal of Fungi*, 9, 221. https://doi.org/10.3390/jof9090921

Zobi, C., y Algul, O. (2025) The significance of mono- and dual-effective agents in the development of new antifungal strategies. *Chemical Biology & Drug Design*, 105(1), e70045. https://doi.org/10.1111/cbdd.70045