VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Análisis de la expresión génica asociada a la resistencia y susceptibilidad antifúngica en aislados de *Sporothrix brasiliensis*

Gene expression analysis associated with antifungal resistance and susceptibility in Sporothrix brasiliensis isolates

Gabriela Guerra-Arroniz[1], Manuela Gómez-Gaviria[1], Leonardo Padró Villegas[1], Héctor Manuel Mora-Montes[1*]
[1] Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. *hmora@ugto.mx

Resumen

El género *Sporothrix* agrupa hongos dimórficos patógenos causantes de la esporotricosis, una micosis subcutánea de distribución mundial que representa un importante problema de salud pública en Latinoamérica. Entre sus especies, *Sporothrix brasiliensis* ha adquirido especial relevancia debido a su elevada virulencia, su eficiente transmisión zoonótica, principalmente a través de gatos infectados, y al incremento de casos reportados en los últimos años. Además, la variabilidad en la respuesta al tratamiento antifúngico y el limitado conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en este proceso resaltan la necesidad de profundizar en su estudio. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de los genes *CDR1, MDR1, ERG11* y *FKS1* en cepas de referencia y aislados clínicos de *S. brasiliensis* con diferentes perfiles de susceptibilidad frente a fluconazol, itraconazol y anfotericina B mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados evidenciaron una expresión diferencial de los genes evaluados entre los aislados clínicos, observándose una mayor expresión de *CDR1, MDR1* y *ERG11* en algunos aislados resistentes a los azoles, mientras que *FKS1* mostró un patrón de expresión más heterogéneo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la respuesta antifúngica en *S. brasiliensis* es un proceso multifactorial en el que participan diferentes mecanismos de adaptación y proporcionan información que contribuirá a una mejor comprensión de las bases moleculares de la resistencia antifúngica en esta especie.

Palabras clave: *Sporothrix brasiliensis*; Esporotricosis; Resistencia antifúngica; Expresión génica; *CDR1*; *ERG11*; *FKS1*; *MDR1*.

Introducción

Sporothrix brasiliensis es un hongo dimórfico considerado la especie más virulenta del complejo patogénico *Sporothrix* (Xavier *et al.,* 2023). Es el principal agente causal de la esporotricosis, una micosis cutánea y subcutánea que afecta tanto a humanos como a animales y que ha adquirido una creciente importancia en América Latina debido al aumento de casos de transmisión zoonótica (Xavier *et al.,* 2023). La infección se adquiere principalmente por la inoculación traumática del hongo presente en el suelo, la materia vegetal o el material orgánico; sin embargo, en las últimas décadas la transmisión a través de gatos infectados se ha convertido en la principal vía de contagio en regiones endémicas, particularmente en Brasil, donde *S. brasiliensis* representa el agente etiológico predominante de la esporotricosis humana y felina (Almeida-Paes *et al.,* 2014; Gómez-Gaviria *et al.,* 2023).

Como otros hongos dimórficos, *S. brasiliensis* presenta dos formas de crecimiento dependiendo de la temperatura: una fase micelial, que se desarrolla en el ambiente, y una fase de levadura, responsable de la infección en el hospedero. Esta transición constituye un paso esencial para el establecimiento de la enfermedad, la cual puede manifestarse desde formas cutáneas localizadas hasta cuadros graves y diseminados, incluso en individuos inmunocompetentes (Orofino-Costa *et al.,* 2017; Gómez-Gaviria *et al.,* 2023). Además de las lesiones características, algunos pacientes pueden desarrollar manifestaciones inmunológicas secundarias, como eritema nodoso, eritema multiforme, artralgia, mialgia, artritis y retinitis (Etchecopaz *et al.,* 2021).

El tratamiento de la esporotricosis depende de la presentación clínica y del estado inmunológico del paciente. El itraconazol constituye el antifúngico de primera elección; sin embargo, en algunos casos la respuesta terapéutica es limitada o insuficiente (Gremião *et al.,* 2020; Orofino-Costa *et al.,* 2022). En pacientes con formas graves, diseminadas o extracutáneas, la anfotericina B, especialmente en su formulación liposomal, representa el tratamiento de elección, aunque su uso se encuentra restringido por la necesidad de administración intravenosa y por sus efectos adversos, entre ellos la nefrotoxicidad (Orofino-Costa *et al.,* 2022). Por otra parte, el fluconazol ha sido empleado como alternativa terapéutica; sin embargo, presenta una actividad limitada frente a especies del complejo *Sporothrix*, por lo que suele requerir dosis elevadas y tratamientos prolongados. Además, se han descrito aislamientos con susceptibilidad reducida o resistencia a los azoles, lo que representa un desafío para el manejo clínico de la enfermedad (Etchecopaz *et al.,* 2021).

En este contexto, el estudio del genoma de *S. brasiliensis* constituye una herramienta fundamental para comprender los mecanismos moleculares relacionados con la virulencia y la respuesta a los antifúngicos. El genoma de esta especie, disponible desde 2015 en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), tiene un tamaño aproximado de 33.2 Mbp y contiene 9231 genes, de los cuales 9091 codifican proteínas y 140 corresponden a ARN funcionales (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_000820605.1/, consultada el 17 de julio de 2026). A pesar de la disponibilidad de esta información genómica, los mecanismos moleculares asociados con la resistencia antifúngica en *S. brasiliensis* aún son poco conocidos.

Diversos estudios en hongos patógenos han demostrado que la resistencia a los antifúngicos puede estar asociada con cambios en la expresión de genes involucrados en distintos mecanismos de supervivencia (Li *et al.,* 2025; Su *et al.,* 2025; Sui *et al.,* 2026). Entre los más estudiados se encuentran *CDR1* y *MDR1*, que codifican proteínas transportadoras capaces de expulsar los antifúngicos fuera de la célula, reduciendo así su efecto; *ERG11,* que participa en la biosíntesis del ergosterol, uno de los principales componentes de la membrana celular y blanco de los antifúngicos del grupo de los azoles; y *FKS1*, responsable de la síntesis del β-1,3-glucano, un polisacárido esencial de la pared celular fúngica. En especies del género *Candida*, la alteración en la expresión de estos genes se ha relacionado con la disminución de la susceptibilidad a diversos antifúngicos y con el desarrollo de mecanismos de resistencia (Li *et al.,* 2025). Sin embargo, en *Sporothrix* spp., y particularmente en *S. brasiliensis*, aún se conoce poco sobre el papel que desempeñan estos genes durante la respuesta al tratamiento antifúngico. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo analizar la expresión de *CDR1, MDR1, ERG11* y *FKS1* en una cepa de referencia y en aislados clínicos de *S. brasiliensis* con diferentes perfiles de susceptibilidad frente a itraconazol, anfotericina B y fluconazol mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Materiales y Métodos

Cepas y aislados clínicos de estudio

En este estudio se utilizaron 7 aislados clínicos provenientes de gatos infectados con *S. brasiliensis,* los cuales presentan perfiles de susceptibilidad antifúngica distintos a la cepa silvestre (WT1) de *S. brasiliensis*, que fue utilizada como cepa de referencia.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Tabla 1. *Cepas y aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis. La muestra M9 fue la cepa silvestre utilizada como control durante el proyecto.*

No. Muestra	*Nombre (cepa o aislado clínico)*
M1	Floginho
M2	Aninha
M3	*S. brasiliensis* Cepa Brasil
M4	João Tigre
M5	Mimi
M6	HO518
M7	HO514
M8	Bili
M9	*S. brasiliensis* 5110 ATCC MYA 4823

Crecimiento de aislados clínicos, medio y condiciones de cultivo

Las cepas de estudio indicadas en la Tabla 1 se cultivaron en 5 mL de medio líquido YPD con ajuste de pH 7.8 en tubos Falcon a 37 °C durante cuatro días para la obtención de levaduras (Lozoya-Pérez *et al.,* 2019). Posteriormente, se revisaron 10 µL de cada cultivo bajo microscopio de campo claro, en el objetivo 40x, con la finalidad de descartar contaminación bacteriana.

Extracción y tratamiento de ADN genómico

El ADN de la cepa silvestre de *S. brasiliensis* (WT1) se obtuvo a partir de cultivos líquidos de 5 mL de levaduras con cuatro días de crecimiento. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 9,485 *x g* durante 10 minutos, se descartó el medio. Una vez se obtuvo la pastilla celular, esta fue resuspendida en dos mililitros de agua estéril y se trasvasó a tubos Eppendorf estériles para lavar el medio restante en las células, centrifugando a 14881 *x g* 5 minutos, descartando el líquido. A continuación, se adicionaron 500 µL de buffer de extracción y perlas de vidrio a cada microtubo, se mezclaron en vórtex durante 10 minutos con la finalidad de romper las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 14881 *x g* para recuperar el sobrenadante en microtubos nuevos. La extracción continuó añadiendo 300 µL de una preparación fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando en vórtex y centrifugando a 14881 *x g* durante 30 minutos, la fase acuosa fue transferida a tubos nuevos a los cuales se adicionó 500 µL de cloroformo, nuevamente se mezcló en vórtex y se centrifugó 5 minutos. Nuevamente, la fase acuosa fue transferida a tubos nuevos, según el volumen obtenido, se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar en frío durante una hora. Transcurrido este tiempo, se mezcló por inversión y se obtuvo la pastilla centrifugando 5 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en volumen mínimo de agua MQ estéril (Raeder & Broda, 1985). El ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100V. al observar impurezas y residuos de ADN degradado y otros componentes, se optó por darle un tratamiento con RNasa (Lazameth-Diniz *et al.,* 2025).

Para el tratamiento del ADN extraído se ocupó un microtubo de PCR en el que se colocaron 30 µL del ADN y 0.8 µL de RNasa, se incubó a 37°C por 5 minutos para activar la reacción y luego 5 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Nuevamente se llevó a cabo una electroforesis para garantizar la integridad del ADN.

Oligonucleótidos

Para este proyecto fueron previamente diseñados pares de oligonucleótidos tomando en cuenta una región de aproximadamente 250-350 pb de los genes de interés: *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1*. Las secuencias de estos oligonucleótidos iniciadores se presentan a continuación:

- ***CDR1:*** **Directo:** 5'-TCGTTTATGGGCACGGGC; **Reverso:** 5'-CGGGCAAGCGACTGGACA
- ***ERG11:*** **Directo:** 5'-GAGAACCGCAAGAAGTACGG; **Reverso:** 5'-TCGGAGATGATGTGGACGTA
- ***FKS1:*** **Directo:** 5'-ACGAACAACAGTATCACGATC; **Reverso:** 5'-TCGTAAAGTCGCTGAAGGTCT
- ***MDR1:*** **Directo:** 5'-TAGCACAAGCAGAGACTG; **Reverso:** 5'-TGCCGTCTCTTTGGATGC

Como control endógeno estandarizado se empleó el par de oligonucleótidos de *L6* (**Directo:** 5'-ATTGCGACATCAGAGAAGG; **Reverso:** 5'-TCGACCTTCTTGATGTTGG), cuyo tamaño de amplicón a partir de ADN genómico es de 303 pb y a partir de ADNc es de 224 pb.

Controles de oligonucleótidos

Utilizando el ADN genómico de la cepa silvestre de *S. brasiliensis* se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo final. Se hizo la mezcla siguiente: 2.5 µL del buffer 10X DreamTaq (MgCl2 20 mM), 0.2 µL de la enzima DreamTaq 5 U/µL (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPS) 2.5 mM (Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 22 µL con agua libre de DNasa y RNasa. Esta mezcla de reacción se repartió en 4 microtubos de PCR para los siguientes controles:

1. Control positivo: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL del oligonucleótido directo + 0.5 µL del oligonucleótido reverso + 1 µL de ADNg 100 ng/µL.
2. Control negativo directo: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL del oligonucleótido directo + 1 µL de ADNg 100 ng/µL.
3. Control negativo reverso: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL del oligonucleótido reverso + 1 µL de ADNg 100 ng/µL.
4. Control negativo: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL del oligonucleótido directo + 0.5 µL del oligonucleótido reverso.

Esto se realizó para cada par de oligonucleótidos. Las condiciones que se utilizaron para la amplificación del ADN fueron las siguientes: la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 8 µL. Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 29 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento de los cebadores a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 min, manteniéndose las reacciones a 12 °C hasta su posterior análisis. Se utilizó un termociclador T100 (Bio-Rad) para llevar a cabo la reacción.

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% a 100 V para comprobar la calidad de los pares de oligonucleótidos diseñados.

Curvas de calibración para oligonucleótidos

Se llevaron a cabo curvas de calibración por PCR tiempo real (qPCR) de los oligonucleótidos *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1*. De manera general, se utilizaron 5 diluciones diferentes de ADN genómico de S. brasiliensis previamente cuantificadas que iban desde 800 ng/µL hasta 1,28 ng/µL. La PCR se llevó a cabo en un termociclador de Applied Biosystems Step One™, siguiendo las instrucciones del kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). De manera general, la mezcla de reacción se hizo de la siguiente manera. Para la mezcla control (20 µL por reacción) se utilizó: 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Colorante SYBR Green I, ADN polimerasa AmpliTaq Fast, uracil-ADN glicosilasa, ROX, dNTPs y regulador de componentes optimizado), 0.5 µL de cada oligonucleótido y 9.5 µL de agua DEPC. Para la mezcla que contenía el material genético se agregaron las siguientes proporciones: 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix, 0.4 µL de cada oligonucleótido y 4.2 µL de agua DEPC. De esta mezcla se adicionaron 15 µL a cada pozo más 5 µL de la

dilución del ADNg. Finalmente, se cubrió la placa (MicroAmp® Fast Optical 96-well reaction plate, 0.1 mL, Life Technologies) con el film (MicroAmp® optical adhesive film, Life Technologies).

Extracción y tratamiento de RNA total

De cultivos líquidos de levadura de 4 días, se cosecharon las células de las muestras mencionadas en la Tabla 1. Se centrifugó a 5 min a 9,485 *x g*, desechando el sobrenadante; después, se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de agua estéril, se trasvasó la suspensión a tubos Eppendorf previamente etiquetados y se centrifugó a 11000 rpm durante 5 minutos para descartar el sobrenadante y repetir el lavado con agua estéril dos veces. El tubo con las células se congeló en nitrógeno líquido y la pastilla se pulverizó con nitrógeno en un mortero de porcelana estéril. El polvo obtenido se pasó a tubos Eppendorf con 1 mL de solución de TRIzol (Invitrogen) y la mezcla se homogenizó por inversión. Luego se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 200 µL de cloroformo y se procedió a agitar vigorosamente por inversión durante 15 seg, los tubos se incubaron nuevamente durante 5 min a temperatura ambiente y se llevaron a centrifugación a 14881 *x g* 4°C durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µL de isopropanol, para posteriormente incubar durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugar a 14881 *x g* 4°C por 10 min. La pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol al 70 % (v/v), se centrifugó por 3 min y se dejó secar. El RNA se resuspendió en un volumen mínimo de agua DEPC. Finalmente, para determinar la integridad del RNA obtenido se calentó 5 minutos a 60°C para separar las subunidades y se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) a 80V (Logemann, 1987) (Trujillo-Esquivel E, 2017).

El tratamiento de cada RNA obtenido se realizó en microtubos de PCR con la siguiente mezcla: 3µL del RNA, 1µL de buffer, 1µL de DNase y 5µL de agua DEPC. Se incubaron las preparaciones 15 minutos a temperatura ambiente y de adicionó 1µL de EDTA para posteriormente incubar 10 minutos a 65°C.

Validación de RNA por PCR punto final

Después de la extracción del RNA para cada muestra y su tratamiento con DNasa, se verificó la ausencia de contaminación con ADN genómico (ADNg) mediante PCR de punto final, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen L6, siendo este el control de referencia para S. brasiliensis. Para ello se hizo la siguiente mezcla de reacción: 7.5 µL del buffer 10X DreamTaq (MgCl2 20 mM), 0.6 µL de la enzima Dream Taq 5 U/µL (Thermo Fisher Scientific), 3 µL de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPS) 2.5 mM (Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 66 µL con agua libre de DNasa y RNasa. Esta mezcla de reacción se repartió en 11 microtubos de PCR para las siguientes pruebas:

1. Control positivo: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL oligonucleótido directo + 0.5 µL oligonucleótido reverso + 1 µL de ADNg 100 ng/µL.
2. Control negativo: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL oligonucleótido directo + 0.5 µL oligonucleótido reverso.
3. Controles de RNA: 5.5 µL de la mezcla de reacción + 0.5 µL oligonucleótido directo + 0.5 µL oligonucleótido reverso + 0.5 µL de RNA tratado (esta mezcla se hizo para cada una de las 9 muestras).

Las condiciones que se utilizaron para la amplificación del ADN fueron las siguientes: la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 8 µL. Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 29 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento de los cebadores a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 min, manteniéndose las reacciones a 12 °C hasta su posterior análisis. Se utilizó un termociclador T100 (Bio-Rad) para llevar a cabo la reacción.

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% a 100V para comprobar que el RNA de cada muestra no estaba contaminado con ADNg y por tanto, no se visualizaba amplificación.

Síntesis de ADNc

Hecha la validación del RNA, se hizo la síntesis de ADNc utilizando el kit SuperScript II, el cuál utiliza la enzima retrotranscriptasa. Para ello, en 9 microtubos de PCR se depositó 1 µg/µL del RNA obtenido previamente y se

mezcló con 1 µL del oligonucleótido dT20 (10 µM) y 1 µL de dNTPs (10 mM) y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua DEPC. Se incubó 5 min a 65 °C, y posteriormente, se colocó en hielo durante 1 min. La mezcla para la síntesis de ADNc se preparó en el orden indicado: 2 µL de buffer RT 10X, 4 µL de MgCl2 25 mM, 2 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de RNasa out, 1 µL SuperScript III Retrotranscriptasa, esto se agregó a cada uno de los tubos y se llevaron a incubación durante 50 min a 50 °C y después de este tiempo se incubó 5 min a 85 °C. Los tubos se incubaron en hielo y después se adicionó 1 µL de RNasa H y la reacción se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se cuantificó el ADNc obtenido y se le hizo una PCR amplificando un fragmento del gen *L6*, con la finalidad de comprobar su funcionalidad y descartar la contaminación con ADN genómico (Trujillo-Esquivel *et al.,* 2017).

Validación de ADNc por PCR punto final

El ADNc sintetizado del RNA de las 9 muestras de estudio, se sometió a validación mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de L6. Como control de esta PCR se utilizó ADNg de *S. brasiliensis,* siguiendo el mismo protocolo utilizado para la validación de RNA.

El producto de la PCR se verificó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% a 100 V para comprobar la calidad del ADNc sintetizado para cada muestra. A continuación, el ADNc fue cuantificado y ajustado con los cálculos respectivos a 200 ng/µL.

Análisis de expresión por PCR tiempo real

Una vez corroborado que los pares de oligonucleótidos generaban un solo producto de amplificación, se procedió a realizar la medición de los niveles de expresión de los genes *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1*. Para realizar esta medición se empleó el ADNc sintetizado y validado de cada una de las muestras, el cual fue ajustado y cuantificado a una concentración final de 200 ng/µL. La qRT-PCR se realizó en un termociclador de Applied Biosystems Step One™, siguiendo las instrucciones del kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los datos de expresión se normalizaron usando el gen L6 como control endógeno y utilizando la cepa silvestre de *S. brasiliensis* (WT1) como control para la diferenciación entre los 7 aislados clínicos.

De manera general, por cada gen, la mezcla de reacción se hizo de la siguiente manera. Para la mezcla de control (20 µL por reacción) se utilizó: 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix (colorante SYBR Green I, ADN polimerasa AmpliTaq Fast, uracil-ADN glicosilasa, ROX, dNTPs y regulador de componentes optimizado), 0.5 µL de cada oligonucleótido y 9.5 µL de agua DEPC. Para la mezcla que contenía el material genético se agregaron las siguientes proporciones: 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix, 0.4 µL de cada oligonucleótido y 4.2 µL de agua DEPC. De esta mezcla se adicionaron 15 µL a cada pozo más 5 µL del ADNc ajustado a 200 ng/µL. Cada blanco y mezcla con ADNc se colocó por duplicado. Finalmente, se cubrió la placa (MicroAmp® Fast Optical 96-well reaction plate, 0.1 mL, Life Technologies) con el film (MicroAmp® optical adhesive film, Life Technologies). Este experimento fue realizado por duplicado para cada uno de los genes estudiados.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La separación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal. La concentración de agarosa podía variar según las necesidades, de 1 % (p/v) a 1,5 % (p/v). La agarosa fue resuspendida en TAE 1X (Tris 40 Mm, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), con la adición de 20 ng/µL de bromuro de etidio, dejándola polimerizar. Las muestras por cargar en los geles se prepararon con una alícuota del ácido nucleico de interés y 2 µL de amortiguador de carga 6X [0.25 % (p/v) de Orange G y 30 % (v/v) de glicerol estéril en agua desionizada estéril] en proporción 3:1. Como regulador de corrida de la electroforesis se empleó TAE 1X y como marcador de tamaño se empleó el marcador lineal de 1.0 kb (Fermentas). El desplazamiento electroforético se realizó a 100 V o 80 V (para muestras de RNA), hasta que se observó que el regulador de carga alcanzaba el borde inferior del gel. Los geles se analizaron bajo luz UV en un fotorregistrador ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Cuantificación de ácidos nucleicos

El ADN genómico, RNA total y ADNc se midieron por espectrofotometría, utilizando un NanoDrop One 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). Se utilizó 1 µL de muestra para realizar la medición, utilizando agua DEPC como blanco. Una vez se midió la concentración en ng/µL, el ADN fue ajustado a 100 ng/µL, el RNA a

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

1000 ng/µL y el ADNc a una concentración en rangos variables alrededor de 200 ng/µL, 180 ng/µL o 150 ng/µL según el caso.

Análisis estadístico

Los ensayos de expresión génica se realizaron en dos experimentos biológicos independientes. Los niveles relativos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando la cepa WT de *S. brasiliensis* como calibrador. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar (DE). Las diferencias entre los aislados clínicos y la cepa de referencia se evaluaron mediante una prueba *t* de Student, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Crecimiento de aislados clínicos y cepas WT de *S. brasiliensis*

Los siete aislados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* y las cepas silvestres WT1 y WT2 crecieron satisfactoriamente en medio líquido YPD pH 7.8 a 37°C durante cuatro días. La observación al microscopio de campo claro (40x) permitió visualizar la fase levaduriforme característica del género, la requerida para los experimentos posteriores. De manera general, se observó una morfología de levaduras ovaladas y alargadas, acompañadas de algunos segmentos miceliales, si evidencia de contaminación bacteriana. A continuación, se presentan las micrografías tomadas a las nueve muestras utilizadas durante el proyecto Figura 1.

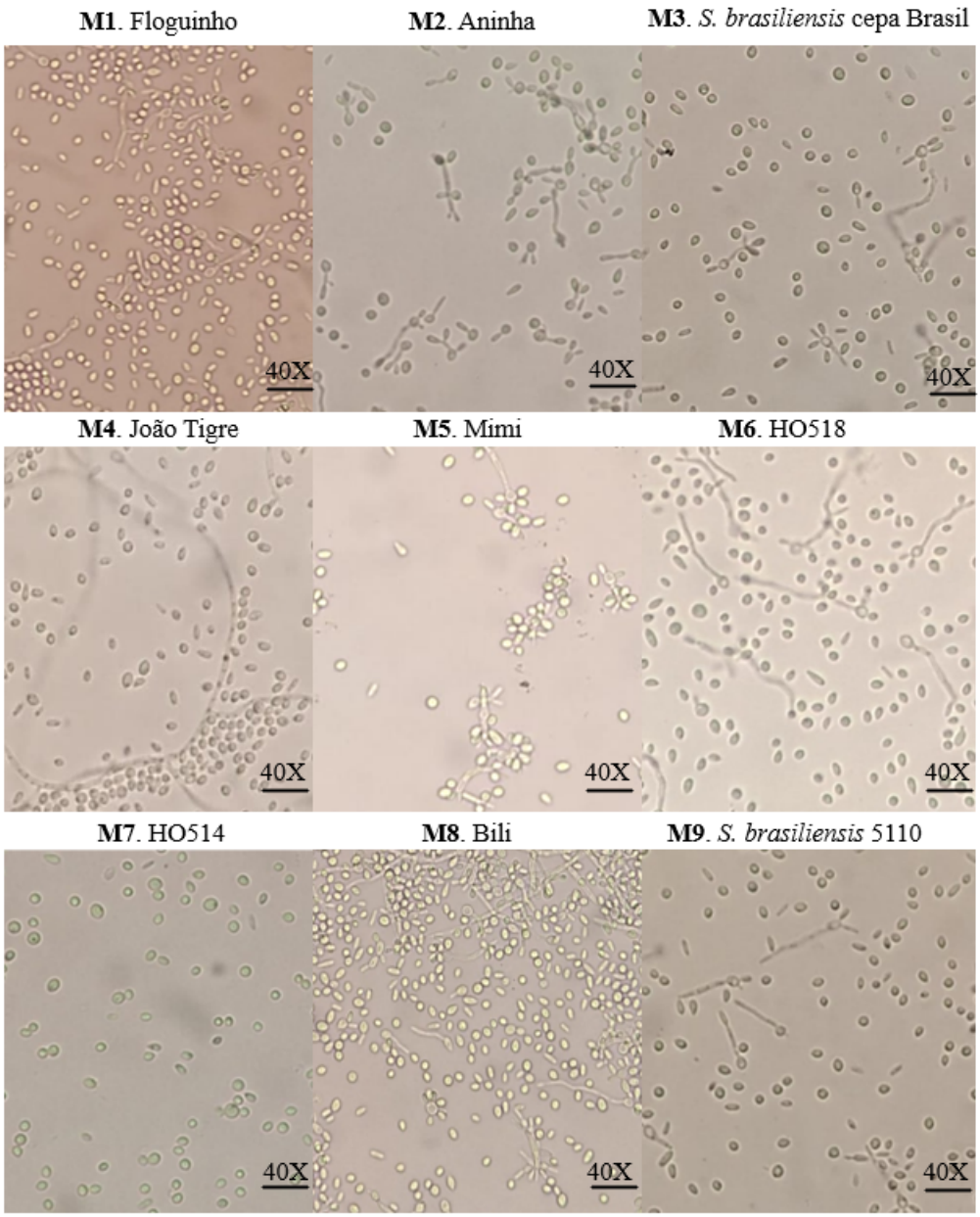

Figura 1. Cultivos de levaduras de S. brasiliensis observados al microscopio de campo claro. Se observó el crecimiento levaduriforme en medio YPD de las muestras de estudio M1 – M9, sin contaminación bacteriana.

Extracción de ADN genómico y RNA total

Se obtuvo ADNg de la cepa silvestre WT1 (M9) mediante extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. La integridad del ADN se evaluó con electroforesis (80V) en gel de agarosa al 1.5 %, donde se observó una banda de alto peso molecular observada en la Figura 2. Inicialmente se detectó la presencia de ARN residual, por ello se trató con RNasa, obteniéndose ADNg de buena calidad (Figura 3.) para su utilización como control en los ensayos posteriores.

De manera simultánea, se extrajo el RNA total de cada una de las cepas y aislados clínicos descritos en la Tabla 1 mediante el método de pulverización con nitrógeno líquido.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

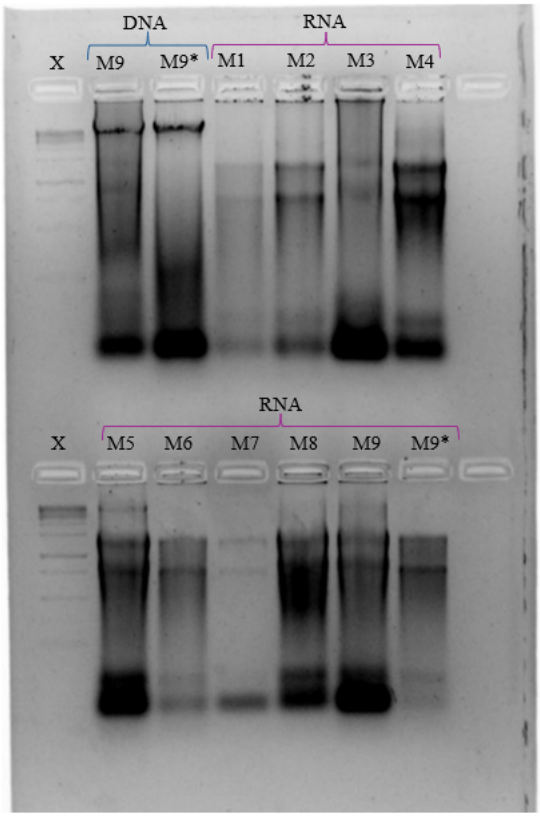

Figura 2. Evaluación de la integridad del ADN genómico y del ARN total de Sporothrix brasiliensis mediante electroforesis en gel de agarosa. En la parte superior, segundo y tercer carril, se observa la banda correspondiente para el ADNg de la cepa silvestre, M9 y M9 siendo la segunda un duplicado proveniente de un cultivo diferente de la misma cepa. El resto de las muestras que fueron corridas en el gel corresponden al RNA total de cada cepa o aislado indicado, en estos carriles se aprecian dos bandas de las subunidades ribosomales 28s y 18s, material genético residual y RNA degradado. La señalización con X en el primer carril de la parte superior e inferior pertenece al marcador de tamaño.*

Después del tratamiento enzimático, la electroforesis mostró una disminución de los residuos de ARN, conservándose la integridad del ADN genómico, el cual fue utilizado para las pruebas de validación de los oligonucleótidos.

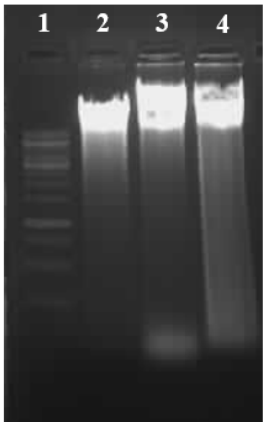

Figura 3. Evaluación de ADN genómico de la WT1 de S. brasiliensis (M9) tratado con RNasa. En el primer carril se colocó el marcador de tamaño, mientras que en los carriles 2, 3 y 4 se corrieron alícuotas de ADNg tratado, en estos carriles se pudo observar la banda de ADNg.

Validación de pares de oligonucleótidos

Los pares de oligonucleótidos diseñados para los genes *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1* se evaluaron exitosamente mediante PCR de punto final utilizando el ADN genómico para el control positivo y el par de oligonucleótidos de L6 como un gen ya validado y estandarizado. En la comprobación de esta PCR por electroforesis, en todos los casos el control positivo presentó un único producto de amplificación del tamaño esperado, los resultados obtenidos en la electroforesis de esta PCR se observan en la Figura 4.

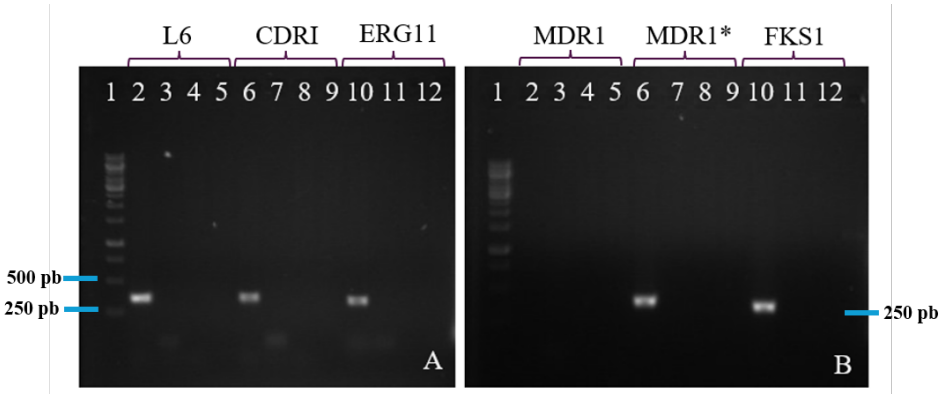

Figura 4. Controles de los oligonucleótidos de CDR1, ERG11, MDR1 y FKS1 mediante PCR punto final. Para cada gen se corrieron 4 carriles con los siguientes controles: control positivo, ADNg + oligonucleótido diercto + oligonucleótido reverso; control negativo 1, ADNg + oligonucleótido directo; control negativo 2, ADNg + oligonucleótido reverso; control negativo 3, oligonucleótido directo + oligonucleótido reverso. En el gel A se observan los resultados obtenidos para L6, donde solo el control positivo (carril 2) muestra una banda de amplificación definida de 303 pb, en el caso del gen CDR1 y ERG11 solo se observó amplificación en el control positivo (carril 6 y 10), el tamaño del amplicón para CDR1 es de 319 pb y para ERG11 de 272 pb. Para el gel B se optó por correr muestras de dos pares de oligonucleótidos del gen MDR1, lo cual reflejo ausencia de amplificación en el control positivo del primer par (carril 2), mientras que en el segundo par MDR1 si se observó la banda de amplificación correspondiente a este gen (carril 6) en 287 pb. Finalmente, para FKS1 se obtuvo banda de amplificación únicamente en el control positivo (carril 10) con un tamaño esperado de 280 pb. El carril 1 en ambos geles corresponde al marcador de tamaño.*

Curvas de calibración de los oligonucleótidos

Tras la validación de los pares de oligonucleótidos por PCR de punto final, se obtuvieron las curvas de calibración de estos (*CDR1, ERG11, FKS1, MDR1*) mediante qPCR en tiempo real, utilizando diluciones de ADN preparadas según se indica en el apartado de métodos. A continuación, se presentan las curvas de disociación y los porcentajes de eficiencia para cada par de oligonucleótidos (Figuras 5 a 9).

Los oligonucleótidos dirigidos al gen *CDR1* presentaron una adecuada linealidad durante la curva de calibración con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997 y una pendiente de -3.5924 (Figura 5). La eficiencia de amplificación calculada fue del 93 %, valor dentro del rango recomendado para ensayos de PCR en tiempo real, lo que indica un desempeño adecuado para la cuantificación de la expresión génica. El análisis de la curva de disociación, Melt Curve (Figura 5) mostró un único pico de expresión o fusión con una temperatura aproximada a los 87°C sin evidencia de picos secundarios, confirmando la especificidad del par de cebadores diseñados para *CDR1*.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

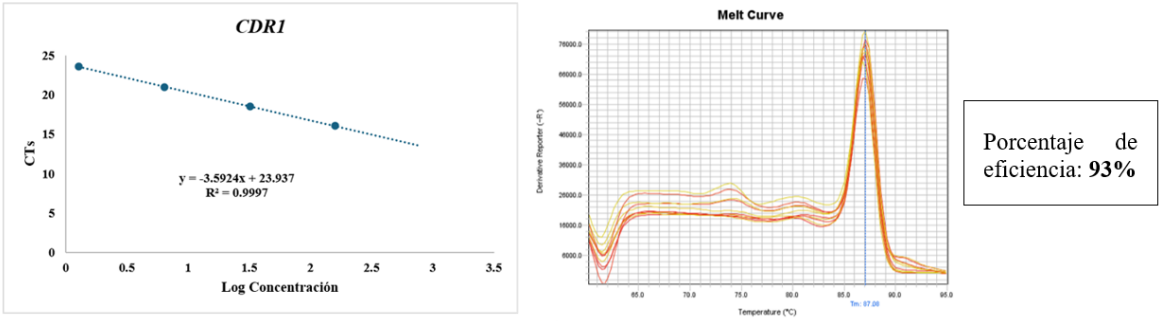

Figura 5. Curva de calibración y curva de disociación (Melt Curve) del par de oligonucleótidos del gen CDR1. La curva de calibración presenta una pendiente de -3.5924, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997 y una eficiencia de amplificación del 93 %. La curva de disociación muestra un único pico de fusión (Tm ≈ 87.06 °C), correspondiente al producto específico de amplificación.

En el caso del gen *ERG11*, mediante la curva de calibración se calculó un porcentaje de eficiencia del 97% un valor dentro del rango óptimo. A su vez, la curva de disociación (Figura 6) reflejó un solo producto de amplificación a los 85°C, indicando que los oligonucleótidos funcionan de manera óptima para su uso en el análisis de expresión.

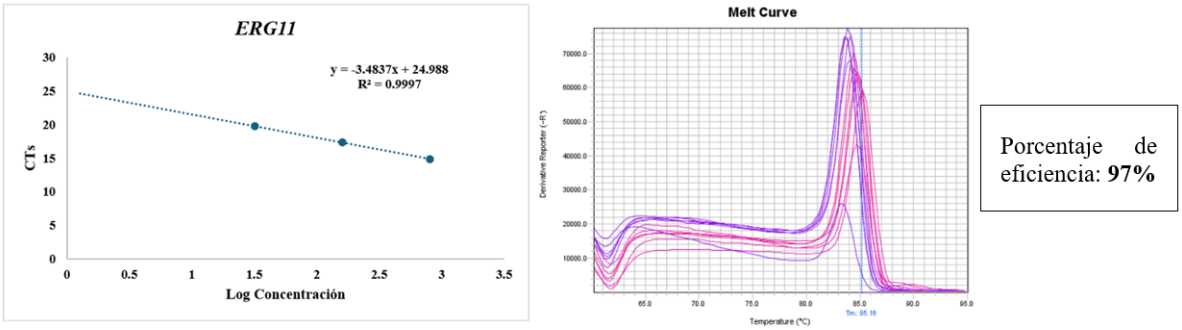

Figura 6. Curva de calibración y curva de disociación (Melt Curve) del par de oligonucleótidos del gen ERG11. La curva de calibración presenta una pendiente de -3.4837, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997 y una eficiencia de amplificación del 97 %. La curva de disociación muestra un único pico de fusión (Tm ≈ 85.16 °C), correspondiente al producto específico de amplificación.

El par de oligonucleótidos diseñados para *FKS1* tuvo buenos resultados tras la qRT-PCR, la curva de calibración (Figura 7) dio parámetros que tras el cálculo arrojaron como resultado un 105% de eficiencia en la amplificación para este par de cebadores. En la Melt Curve se identificó un solo pico de expresión a los 82.92°C, demostrando su funcionamiento ideal.

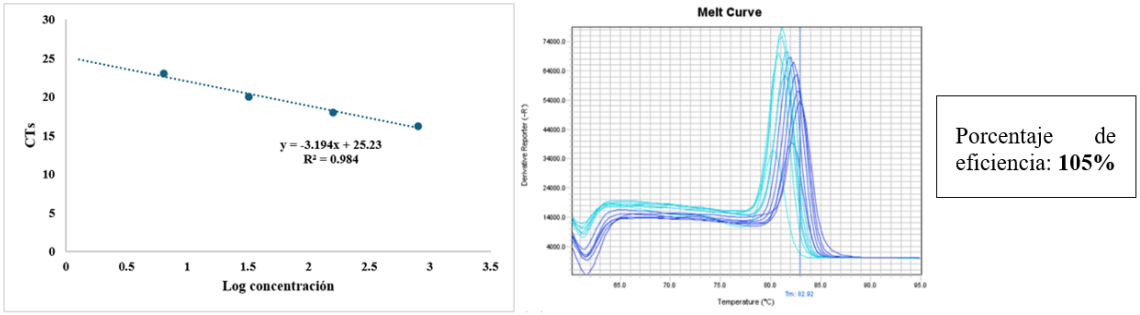

Figura 7. Curva de calibración y curva de disociación (Melt Curve) del par de oligonucleótidos del gen FKS1. La curva de calibración presenta una pendiente de -3.194, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.984 y una eficiencia de amplificación del 105 %. La curva de disociación muestra un único pico de fusión (Tm ≈ 82.92 °C), correspondiente al producto específico de amplificación.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Finalmente, en el caso de los oligonucleótidos para el gen *MDR1*, se observa la amplificación específica del fragmento esperado en la curva de disociación (Figura 8). La gráfica del coeficiente R^2 y la pendiente reflejaron un porcentaje de eficiencia del 89%, si bien sale del rango esperado, su funcionamiento sigue siendo adecuado para este tipo de análisis.

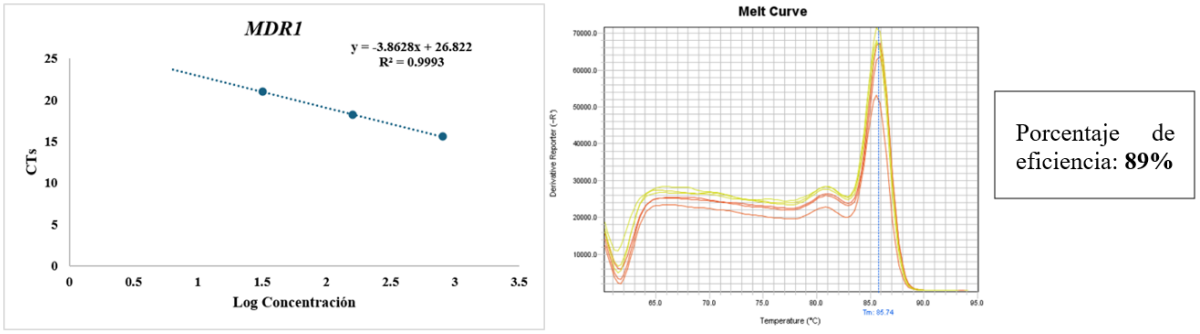

Figura 8. Curva de calibración y curva de disociación (Melt Curve) del par de oligonucleótidos del gen MDR1. La curva de calibración presenta una pendiente de -3.8628, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9993 y una eficiencia de amplificación del 89 %. La curva de disociación muestra un único pico de fusión (Tm ≈ 85.74 °C), correspondiente al producto específico de amplificación.

Tratamiento de ARN y síntesis de ADNc

Una vez validados y calibrados los pares de oligonucleótidos diseñados, se trató el RNA total extraído previamente (Figura 2) con DNasa, eliminando el ADNg restante, mejorando la calidad de las muestras. Se validó el estado del RNA tratado mediante PCR en punto final utilizando los oligonucleótidos del gen *L6*, los resultados de esta corroboración se observan en la Figura 9. El control positivo con ADNg de la cepa WT de *S. brasiliensis* 5110 presentó amplificación, mientras que los controles negativos y las muestras de ARN tratadas con DNasa, no mostraron ningún producto de amplificación, indicando que el ARN obtenido estaba libre de ADN genómico, por tanto, era apto para la síntesis de ADN complementario.

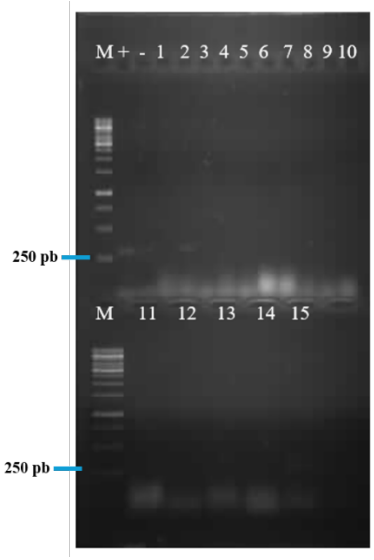

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% para PCR punto final de RNA tratado. Fueron utilizados los oligonucleótidos de L6 para dicha PCR. En la parte superior del gel se observa el control positivo (+) con ADNg de la cepa silvestre de S. brasiliensis (M9) el cual presenta la amplificación esperada de 303 pb, y el control negativo sin banda. Además, los carriles marcados del 1 al 15 son los correspondientes a la PCR de RNA total, ninguno muestra banda de amplificación, indicando una buena calidad del RNA de todas las muestras.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

El RNA tratado, validado y cuantificado se empleó para la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit SuperScript II, siguiendo la metodología indicada. La funcionalidad del ADNc se evaluó por PCR punto final utilizando los cebadores del gen control *L6*. En la electroforesis se observó el producto de amplificación esperado para las 9 muestras (Figura 10). Posterior a su validación, el ADNc fue cuantificado y ajustado a 200 ng/µL.

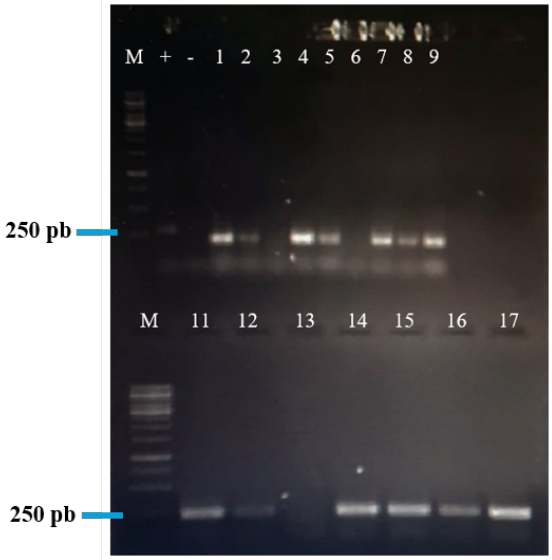

Figura 10. Validación del ADN complementario (ADNc) sintetizado a partir del RNA total de las cepas y aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis mediante PCR de punto final utilizando los oligonucleótidos del gen L6. Se observa la amplificación del fragmento esperado alrededor de las 250 pb en las muestras que presentaron ADNc funcional, carriles numerados del 1 al 17. El control positivo con ADNg de S. brasiliensis (+) mostró amplificación, mientras que el control negativo (−) no presentó producto de PCR, confirmando la ausencia de contaminación en la reacción. M: marcador de tamaño.

Análisis de los niveles de expresión de *CDR1, ERG11, FKS1 y MDR1* en aislados de *Sporothrix brasiliensis*

Los resultados obtenidos para cada gen en la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el ADNc de las 9 muestras en una concentración de 200 ng/µL (M9: cepa de referencia) están representados en las siguientes figuras.

La expresión relativa del gen *CDR1* mostró una marcada variación entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* en comparación con la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). El aislado M1 Floguinho presentó el mayor nivel promedio de expresión (6.50 ± 4.53), seguido de 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, M6 HO518 y M8 Bili presentaron valores promedio negativos, de −3.02 ± 2.23, −2.95 ± 1.63 y −1.60 ± 0.99, respectivamente. La cepa de referencia M9 mostró un promedio de −0.80 ± 0.14. En conjunto, estos resultados evidencian diferencias en el patrón de expresión de *CDR1* entre los aislados analizados (Figura 11).

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

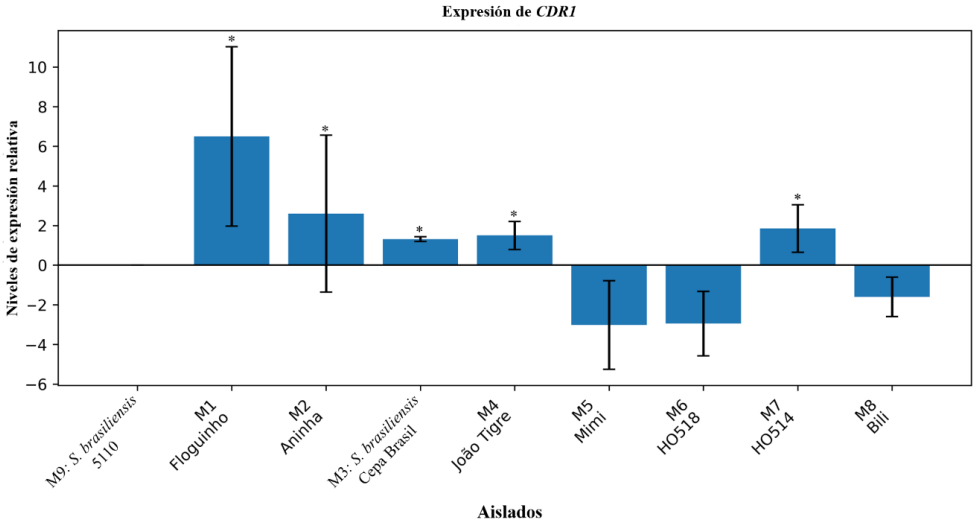

Figura 11. Expresión relativa del gen CDR1 en aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis. Los niveles de expresión de CDR1 se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en ocho aislados clínicos y se compararon con la cepa de referencia M9 (S. brasiliensis 5110). Las barras representan la media ± desviación estándar de dos experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada aislado y la cepa de referencia se analizaron mediante la prueba t de Student, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando p < 0.05.

La expresión relativa del gen *ERG11* mostró diferencias entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* con respecto a la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). El aislado M8 Bili presentó el mayor nivel promedio de expresión (6.40 ± 1.27), seguido de 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). Los aislados M7 HO514 y M4 João Tigre mostraron niveles de expresión cercanos a la cepa de referencia, con promedios de 0.90 ± 2.12 y 0.05 ± 0.92, respectivamente. En contraste, M5 Mimi fue el único aislado que presentó una disminución en la expresión relativa de *ERG11*, con un promedio de −2.65 ± 0.92 (Figura 12). El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student mostró diferencias significativas únicamente para los aislados M2 Aninha, M3 *S. brasiliensis* Brasil, M6 H0518, M8 Bili con respecto a la cepa de referencia ($p < 0.05$).

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

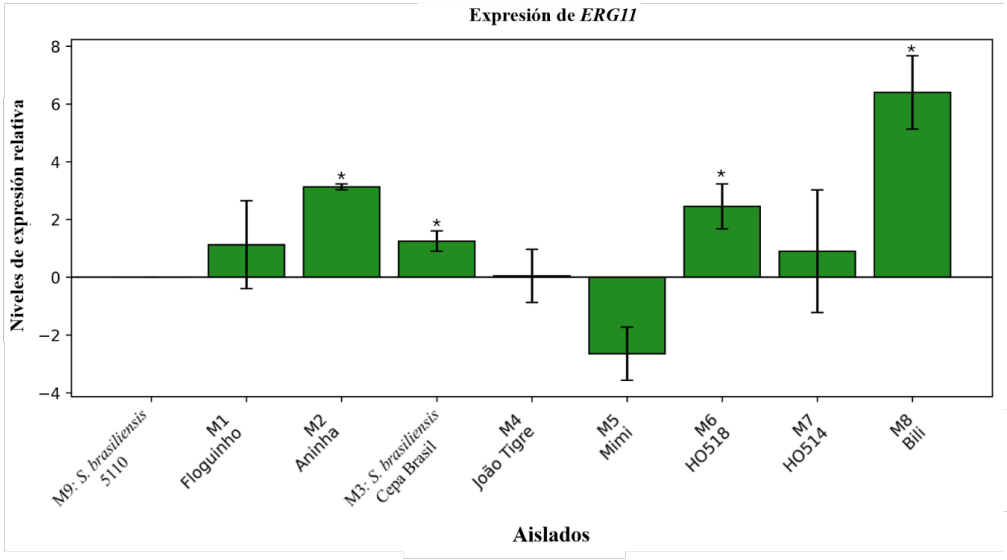

Figura 12. Expresión relativa del gen ERG11 en aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis. Los niveles de expresión de ERG11 se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en ocho aislados clínicos y se compararon con la cepa de referencia M9 (S. brasiliensis 5110). Las barras representan la media ± desviación estándar de dos experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada aislado y la cepa de referencia se evaluaron mediante la prueba t de Student, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando p < 0.05. Los valores positivos indican una mayor expresión relativa, mientras que los valores negativos corresponden a una menor expresión con respecto a la cepa de referencia.

La expresión relativa del gen *FKS1* mostró una amplia variación entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* en comparación con la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). El aislado M1 Floguinho presentó el mayor nivel promedio de expresión (6.95 ± 6.01), seguido de M2 Aninha (5.00 ± 3.68) y M3 *S. brasiliensis* Brasil (3.20 ± 0.14). En contraste, los aislados M5 Mimi, M8 Bili, M6 HO518 y M4 João Tigre presentaron valores promedio negativos de expresión, con promedios de −2.90 ± 0.99, −2.80 ± 2.97, −1.90 ± 1.70, −1.65 ± 3.61 y −1.15 ± 0.49, respectivamente. Por su parte, el aislado M7 HO514 mostró un nivel de expresión cercano al de la cepa de referencia, con un promedio de 0.20 ± 1.41 (Figura 13).

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

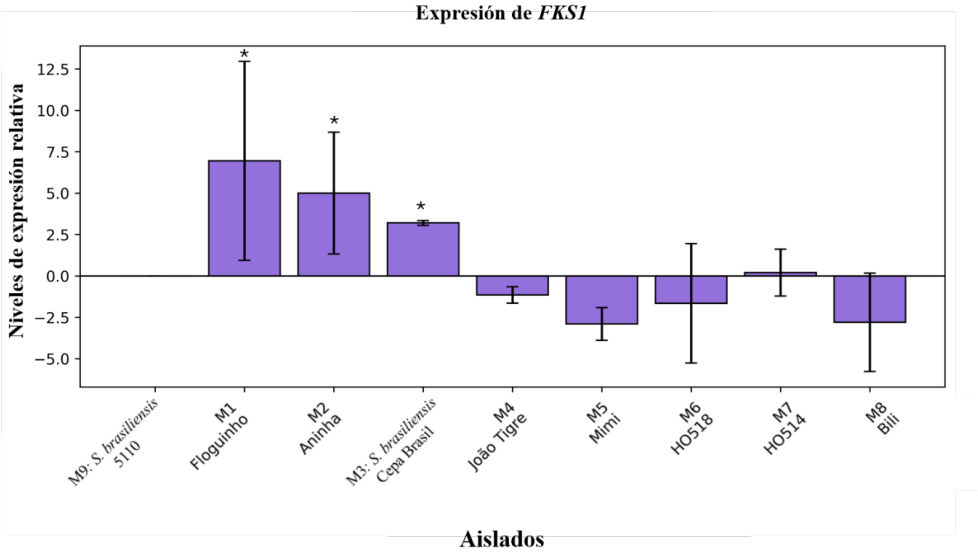

Figura 13. Expresión relativa del gen FKS1 en aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis. Los niveles de expresión de FKS1 se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en ocho aislados clínicos y se compararon con la cepa de referencia M9 (S. brasiliensis 5110). Las barras representan la media ± desviación estándar de dos experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada aislado y la cepa de referencia se evaluaron mediante una prueba t de Student, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $p < 0.05$. Los valores positivos indican una mayor expresión relativa, mientras que los valores negativos corresponden a una menor expresión con respecto a la cepa de referencia.

Finalmente, la expresión relativa del gen *MDR1* mostró diferencias entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis* con respecto a la cepa de referencia M9 (*S. brasiliensis* 5110). Los aislados M5 Mimi, M1 Floguinho y M2 Aninha presentaron los mayores niveles promedio de expresión, con valores de 6.05 ± 0.64, 3.40 ± 0.28 y 2.90 ± 1.41, respectivamente. En contraste, los aislados M6 HO518, M4 João Tigre, M8 Bili, M7 HO514 y M3 *S. brasiliensis* Brasil mostraron una disminución en la expresión relativa de *MDR1*, con promedios de −4.40 ± 5.23, −4.30 ± 3.25, −2.60 ± 0.71, −1.85 ± 0.21 y −1.65 ± 2.05, respectivamente (Figura 14).

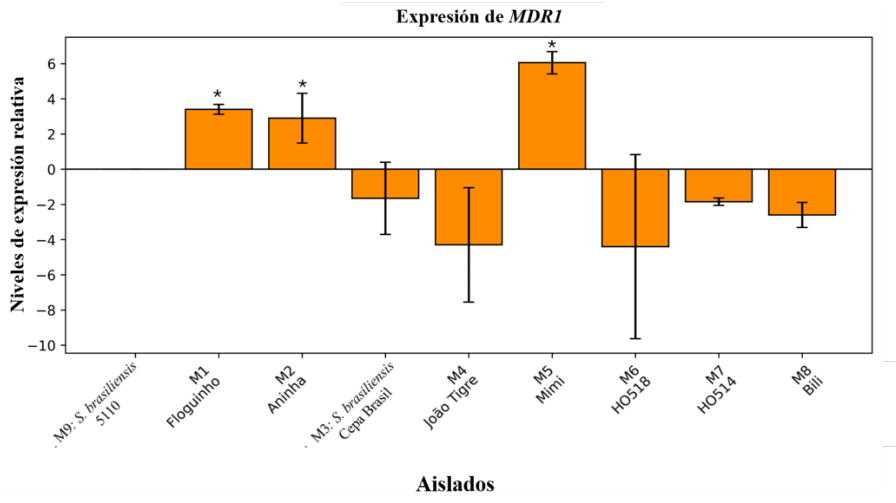

Figura 14. Expresión relativa del gen MDR1 en aislados clínicos de Sporothrix brasiliensis. Los niveles de expresión de MDR1 se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en ocho aislados clínicos y se compararon con la cepa de referencia M9 (S. brasiliensis 5110). Las barras representan la media ± desviación estándar de dos experimentos biológicos independientes. Las diferencias entre cada aislado y la cepa de referencia se evaluaron mediante una prueba t de Student, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $p < 0.05$. Los valores positivos indican una mayor expresión relativa, mientras que los valores negativos corresponden a una menor expresión con respecto a la cepa de referencia.

En conjunto, los resultados evidenciaron una expresión diferencial de los genes *CDR1, ERG11, FKS1* y *MDR1* entre los aislados clínicos de *S. brasiliensis*. Se observaron patrones de expresión heterogéneos, con aislados que presentaron sobreexpresión de uno o varios genes, mientras que otros mostraron niveles de expresión reducidos con respecto a la cepa de referencia. Estos hallazgos sugieren que la respuesta molecular frente a los antifúngicos puede variar entre los aislados clínicos y respaldan la existencia de mecanismos de adaptación potencialmente asociados con diferencias en la susceptibilidad a los tratamientos antifúngicos.

Discusión

La resistencia a los antifúngicos es un fenómeno multifactorial que puede involucrar la activación de bombas de eflujo, alteraciones en la biosíntesis del ergosterol y cambios en la composición y remodelación de la pared celular (Cowen *et al.,* 2015; López-Ávila *et al.,* 2016). En el presente estudio, los perfiles de expresión génica observados en los aislados clínicos de *S. brasiliensis* sugieren que estos mecanismos podrían contribuir, al menos en parte, a las diferencias en los perfiles de susceptibilidad frente a itraconazol, fluconazol y anfotericina B. Previamente, los aislados incluidos en este estudio fueron caracterizados de acuerdo con su perfil de susceptibilidad frente a estos tres antifúngicos, identificándose cepas resistentes, susceptibles y con susceptibilidad dependiente de la dosis (Tabla 2). Esta variabilidad fenotípica proporcionó un marco de referencia para explorar si existía una relación entre la expresión de genes asociados con la respuesta antifúngica y el comportamiento observado durante los ensayos de susceptibilidad.

Tabla 2. Perfiles de susceptibilidad a antimicóticos previamente establecidos.

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

En este contexto, los aislados de Floguinho y Aninha, resistentes a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, presentaron la sobreexpresión simultánea de varios de los genes evaluados, particularmente *CDR1*, *ERG11*, *FKS1* y *MDR1*. Este hallazgo sugiere que la activación coordinada de diferentes mecanismos celulares podría contribuir al fenotipo de resistencia observado. En contraste, otros aislados con perfiles de susceptibilidad similares presentaron patrones de expresión diferentes, lo que indica que la resistencia antifúngica en *S. brasiliensis* probablemente sea el resultado de la interacción de múltiples mecanismos moleculares y no únicamente de la regulación transcripcional de estos genes.

Entre los mecanismos de resistencia mejor caracterizados en hongos patógenos destacan las bombas de eflujo, cuya sobreexpresión constituye una de las principales estrategias para reducir la acumulación intracelular de antifúngicos, especialmente de los azoles (Lu *et al.,* 2025). Estas proteínas pertenecen principalmente a las familias ATP-Binding Cassette (ABC) y Major Facilitator Superfamily (MFS), codificadas por los genes *CDR1* y *MDR1*, respectivamente (Fuentes *et al.,* 2014). En especies del género *Candida*, la sobreexpresión de *CDR1* constituye uno de los principales mecanismos asociados con la resistencia a múltiples azoles, incluyendo fluconazol e itraconazol, mientras que *MDR1* se ha relacionado principalmente con la resistencia al fluconazol (Nouraei *et al.,* 2025). La sobreexpresión de estos genes incrementa la capacidad de la célula para expulsar los antifúngicos, disminuyendo su concentración intracelular y, en consecuencia, su eficacia terapéutica (Prasad & Rawal, 2014). Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes, en parte, con este mecanismo. La mayoría de los aislados que presentaron resistencia o susceptibilidad dependiente de la dosis frente al itraconazol mostraron una mayor expresión de *CDR1*, particularmente Floguinho, Aninha y *S. brasiliensis* Brasil. De manera similar, los aislados Floguinho, Aninha y Mimi, resistentes al fluconazol, presentaron una sobreexpresión de *MDR1*, lo que coincide con el papel descrito para este gen en la disminución de la susceptibilidad a este antifúngico en *Candida albicans*. Aunque la evidencia disponible sobre estos mecanismos en *S. brasiliensis* aún es limitada, nuestros resultados sugieren que las bombas de eflujo podrían representar uno de los mecanismos implicados en la respuesta frente a los azoles en esta especie. No obstante, la asociación entre la expresión de *CDR1* y *MDR1* y el fenotipo de resistencia no fue absoluta. Algunos aislados

presentaron perfiles de expresión que no coincidieron completamente con su comportamiento frente a los antifúngicos. Por ejemplo, HO514 mostró una mayor expresión de *CDR1* a pesar de no presentar resistencia simultánea a los azoles evaluados, mientras que João Tigre, resistente a fluconazol e itraconazol, no exhibió una sobreexpresión marcada de *MDR1*. Estas observaciones indican que la regulación de las bombas de eflujo constituye solo uno de los mecanismos que participan en la respuesta antifúngica y que otros procesos, como mutaciones en genes blanco, cambios en factores reguladores o alteraciones en otras rutas metabólicas, también podrían contribuir al fenotipo observado.

Otro de los mecanismos ampliamente asociados con la resistencia a los azoles involucra alteraciones en la vía de biosíntesis del ergosterol (López-Ávila *et al.,* 2016). El gen *ERG11* codifica la enzima lanosterol 14α-desmetilasa (CYP51), principal blanco molecular de los antifúngicos azólicos. En *Candida* spp., tanto la sobreexpresión de *ERG11* como la presencia de mutaciones en su secuencia se han relacionado con una disminución de la susceptibilidad a estos compuestos, ya que incrementan la cantidad de enzima disponible o reducen la afinidad del antifúngico por su sitio de acción (Flowers *et al.,* 2015). En el presente estudio, la expresión de *ERG11* mostró un comportamiento heterogéneo entre los aislados analizados. Los aislados Floguinho, Aninha y *S. brasiliensis* Brasil, que presentaron resistencia o susceptibilidad dependiente de la dosis frente al itraconazol, mostraron una mayor expresión de este gen, lo que sugiere que la regulación de la vía del ergosterol podría contribuir a la disminución de la susceptibilidad a los azoles. Sin embargo, esta asociación no fue consistente en todos los aislados. Por ejemplo, Bili presentó una elevada expresión de *ERG11* a pesar de mantener un perfil susceptible frente a itraconazol y fluconazol, lo que indica que la sobreexpresión de este gen, por sí sola, no es suficiente para explicar el fenotipo de resistencia. Estos resultados coinciden con lo descrito en *Candida* spp., donde la resistencia a los azoles raramente depende de un único mecanismo (Sanglard *et al.,* 2009; Flowers *et al.,* 2015). Además de la regulación transcripcional de *ERG11,* se ha demostrado que mutaciones puntuales en este gen, variaciones en su número de copias y alteraciones en factores reguladores de la vía del ergosterol pueden contribuir al desarrollo de resistencia. En consecuencia, es probable que en *S. brasiliensis* la expresión de *ERG11* actúe de manera conjunta con otros mecanismos celulares, como la actividad de bombas de eflujo u otras modificaciones aún no caracterizadas, para determinar el fenotipo final de susceptibilidad.

Además de las alteraciones en el transporte de fármacos y en la biosíntesis del ergosterol, la remodelación de la pared celular constituye una estrategia ampliamente utilizada por los hongos para adaptarse a condiciones de estrés ambiental, incluyendo la exposición a antifúngicos (Lee *et al.,* 2020; Zobi & Algul, 2025). Aunque *FKS1* se asocia clásicamente con la resistencia a equinocandinas, su expresión también puede modificarse durante la respuesta al estrés inducido por otros antifúngicos como parte de procesos de remodelación de la pared celular (Desnos-Ollivier *et al.,* 2008). En el presente estudio, los aislados Floguinho, Aninha y *S. brasiliensis* Brasil presentaron una mayor expresión de *FKS1*. En particular, los dos primeros también mostraron un fenotipo de resistencia frente a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, además de la sobreexpresión simultánea de *CDR1, MDR1* y *ERG11*. Estos hallazgos sugieren que la remodelación de la pared celular podría formar parte de una respuesta adaptativa más amplia frente al estrés antifúngico y no representar un mecanismo aislado. No obstante, debido a que en este trabajo no se evaluó la susceptibilidad frente a equinocandinas, no es posible establecer una relación directa entre la expresión de *FKS1* y la resistencia a este grupo de antifúngicos. En *Candida* spp. y otros hongos patógenos, la resistencia a las equinocandinas se asocia principalmente con mutaciones localizadas en las regiones *hot spot* de *FKS1*, más que con cambios en su nivel de expresión (Desnos-Ollivier *et al.,* 2008). Por lo tanto, la sobreexpresión observada en algunos aislados de *S. brasiliensis* podría reflejar un proceso general de adaptación celular al estrés, cuya relevancia funcional deberá confirmarse mediante estudios que incluyan equinocandinas y el análisis de mutaciones en este gen.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la respuesta de *S. brasiliensis* frente a los antifúngicos es un proceso complejo en el que participan múltiples mecanismos celulares. Mientras algunos aislados presentaron la activación coordinada de genes relacionados con bombas de eflujo, biosíntesis del ergosterol y remodelación de la pared celular, otros mostraron perfiles de expresión distintos a pesar de compartir fenotipos de susceptibilidad similares. Esta heterogeneidad sugiere que la resistencia antifúngica en *S. brasiliensis* no depende de un único mecanismo molecular, sino de la interacción de diversas vías de adaptación cuya contribución relativa puede variar entre los aislados clínicos.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la respuesta de *S. brasiliensis* frente a los antifúngicos es un proceso complejo y multifactorial, en el que participan distintos mecanismos moleculares relacionados con el transporte de fármacos, la biosíntesis del ergosterol y la remodelación de la pared celular. La expresión diferencial de los genes *CDR1, MDR1, ERG11* y *FKS1* entre los aislados clínicos evidenció que algunos perfiles de susceptibilidad, particularmente en los aislados resistentes a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, podrían estar asociados con la activación simultánea de múltiples mecanismos de adaptación. Sin embargo, la ausencia de una relación uniforme entre la expresión génica y el fenotipo de resistencia en todos los aislados sugiere que estos genes constituyen solo una parte de la respuesta antifúngica y que otros procesos moleculares también participan en este fenómeno.

Estos hallazgos representan una de las primeras aproximaciones al estudio de la expresión de genes asociados con la respuesta a los antifúngicos en *S. brasiliensis* y aportan información que contribuye a comprender la diversidad de estrategias utilizadas por este hongo para sobrevivir a la presión ejercida por los tratamientos antifúngicos. En este sentido, futuras investigaciones deberán ampliar el número de aislados clínicos analizados e incorporar estudios funcionales que permitan evaluar el papel de otros genes relacionados con la resistencia, identificar mutaciones en genes blanco como *ERG11* y *FKS1*, así como caracterizar los mecanismos reguladores que controlan la expresión de *CDR1* y *MDR1*. Asimismo, la inclusión de otros grupos de antifúngicos, como las equinocandinas, permitirá comprender con mayor profundidad los mecanismos de adaptación de *S. brasiliensis*. A largo plazo, este conocimiento podría contribuir al desarrollo de herramientas moleculares que faciliten la detección temprana de aislados con menor susceptibilidad a los antifúngicos y favorezcan el diseño de estrategias terapéuticas más eficaces para el tratamiento de la esporotricosis.

Agradecimientos

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

Bibliografía

Almeida-Paes, R., de Oliveira, M. M. E., Freitas, D. F. S., do Valle, A. C. F., Zancopé-Oliveira, R. M., & Gutierrez-Galhardo, M. C. (2014). Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 8(9), e3094. 10.1371/journal.pntd.0003094

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

Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Raoux, D., Hoinard, D., Dromer, F., & Dannaoui. (2008). Mutations in the *fks1* Gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* Correlate with Elevated Caspofungin MICs Uncovered in AM3 Medium Using the Method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 52(9). https://doi.org/10.1128/aac.00088-08

Etchecopaz, A., Toscanini, M. A., Gisbert, A., Mas, J., Scarpa, M., Iovannitti, C. A., Bendezú, K., Nusblat, A. D., Iachini, R., & Cuestas, M. L. (2021). *Sporothrix brasiliensis*: A Review of an Emerging South American Fungal Pathogen, Its Related Disease, Presentation and Spread in Argentina. 10.3390/jof7030170

Flowers, S. A., Colón, B., Whaley, S. G., Schuler, M. A., & 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. 10.1128/AAC.03470-14

Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falconer, M. A., Amaro, J., & Tapia, C. (2014). Characterization of azole resistance mechanisms in Chilean clinical isolates of *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 aspects in *Sporothrix brasiliensis* basic aspects. *Journal of Fungi,* 9(5), 533. 10.3390/jof9050533

Gremião, I. D. F., da Rocha, E. M., Montenegro, H., Carneiro, A. J. B., Xavier, M. O., de Farias, M. R., Monti, F., Mansho, W., de Mancedo Assunção Pereira, R. H., Pereira, S. A., & Lopes-Bezerra, L. M. (2020). Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology,* 52(1), 107-124. 10.1007/s42770-020-00365-3

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., & 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. 10.3390/ani15152318

Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. (2020). 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., & Rahman, K. M. (2025). Understanding the mechanisms of resistance to azole antifungals in *Candida* species. *JAC Antimicrobial Resistance,* 7(3), dlaf106. 10.1093/jacamr/dlaf106

López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & 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

Lozoya-Pérez, N. E., Casas-Flores, S., de Almeida, J. R. F., Martínez-Álvarez, J. A., López-Ramírez, L. A., Jannuzzi, G. P., Trujillo-Esquivel, E., Estrada-Mata, E., Almeida, S. R., Franco, B., Lopes-Bezerra, L. M., & Mora-Montes, H. M. (2018). Silencing of *OCH1* unveils the role of *Sporothrix schenckii N*-linked glycans during the host-fungus interaction. *Infection and Drug Resistance,* 28(12), 67-85. 10.2147/IDR.S185037

Lu, X., Zhou, J., Ming, Y., Wang, Y., He, R., Li, Y., Feng, L., Zeng, B., Du, Y., & Wang, C. (2025). Next-generation antifungal drugs: Mechanisms, efficacy, and clinical prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica,* 15(8), 3852-3887. 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., & Pakshir, K. (2025). Overexpression of efflux pump and biofilm associated genes in itraconazole resistant *Candida albicans* isolates causing onychomycosis. *Scientific Reports,* 15, 31292. 10.1038/s41598-025-17359-6

Orofino-Costa, R., de Macedo, P. M., Rodrigues, A. M., & Bernardes-Engemann, A. R. (2017). Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia,* 92(5), 606-620. 10.1590/abd1806-4841.2017279

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

Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*; 1, 17–20. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x

Sanglard, D., Coste, A., & 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., & Li, Y. (2025). Insight into the Mechanisms and Clinical Relevance of Antifungal Heteroresistance. *Journal of Fungi,* 11(2), 143. 10.3390/jof11020143

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

Trujillo-Esquivel, E., Martínez-Álvarez, J. A., Clavijo-Giraldo, D. M., Hernández, N. V., Flores-Martínez, A., Ponce-Noyola, P., & Mora-Montes, H. M. (2017). The *Sporothrix schenckii* gene encoding for the ribosomal protein L6 has constitutive and stable expression and works as an endogenous control in gene expression analysis. *Frontiers in Microbiology,* 8, 1676. 10.3389/fmicb.2017.01676

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Xavier, M. O., Poester, V. R., Trápaga, M. R., & Stevens, D. A. (2023). *Sporothrix brasiliensis:* epidemiology, therapy, and recent developments. *Journal of Fungi,* 9(9), 921. 10.3390/jof9090921

Zobi, C., & 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. 10.1111/cbdd.70045