

Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos

Emilia Mellado, Manuel Cuenca-Estrella y Juan Luis Rodríguez-Tudela

Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

En los últimos años, la incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado de forma considerable. Además, las características de las micosis invasoras también están cambiando, ya que se describen nuevas especies patógenas y aparecen cada vez con más frecuencia cepas y especies resistentes a los antifúngicos. El desarrollo de resistencias a los antifúngicos en los hongos filamentosos es la consecuencia lógica e inevitable del uso de éstos para tratar las micosis invasoras, aunque la frecuencia y la relevancia clínica de esta observación se desconoce. En este texto se analizan los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos descritos hasta la fecha. El conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia a los distintos grupos de antifúngicos puede constituirse como la estrategia más adecuada para poder controlarla e incluso para diseñar moléculas más potentes y seguras que puedan evitarla. En espera de que esto suceda, es importante actuar utilizando de forma correcta las herramientas disponibles en la actualidad: los estudios de vigilancia epidemiológica sobre la aparición de resistencias y estrategias terapéuticas eficaces basadas en el diagnóstico precoz de las micosis invasoras.

Palabras clave: Hongos filamentosos. Mecanismos de resistencia. Antifúngicos.

Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in filamentous fungi

In the last years, the incidence of the invasive infection by moulds has increased. Also, the characteristics of invasive mycosis are changing due to the description of new pathogenic species and also because strains and species resistant to antifungal drugs are appearing. The development of mould antifungal drug resistance is the inevitable and logical consequence of their clinical use, although the frequency and clinical relevance of this is unknown. In this text current mould antifungal drugs resistance mechanisms are reviewed. The study of molecular mechanisms of antifungal drug resistance is the

most valuable strategy to resistance development control and also in helping to develop safer and more active molecules able to avoid them. In the meanwhile is important the correct use of the available tools: epidemiological surveillance of resistance emergence and to use all the efforts towards prompt diagnosis in order to accomplish an adequate and effective treatment.

Key words: Filamentous fungi. Resistance mechanisms. Antifungal drugs.

Introducción

En los últimos años, la incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente. Además, cada día nos enfrentamos a nuevos retos, ya que las características epidemiológicas de las micosis invasoras están cambiando debido a distintos factores que deben analizarse con detalle^{1,2}. Los adelantos tecnológicos han contribuido a solucionar muchos casos de enfermedades que se consideraban mortales hasta hace pocos años. Por ejemplo, los trasplantes de órgano sólido y de médula ósea han permitido sobrevivir a individuos que de otra forma iban a morir por su enfermedad primaria. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos concomitantes producen una inmunosupresión profunda que conlleva una susceptibilidad extrema a la invasión por cualquier microorganismo. España es uno de los países que realiza un mayor número de trasplantes de órgano sólido en el mundo y es en esta población, junto con la afectada por cánceres hematológicos y receptores de trasplantes de médula ósea, donde se produce un mayor número de infecciones fúngicas.

Tampoco se han librado de las infecciones fúngicas sistémicas los pacientes inmunocompetentes. Así, el aumento de la incidencia de este tipo de infecciones tras intervenciones quirúrgicas, sobre todo del tracto gastrointestinal, es notable. En Europa, la frecuencia de las infecciones causadas por hongos miceliales se desconoce, ya que no existe un registro central de éstas. Un estudio realizado en 1992 detectó que el 7% de los pacientes necropsiados habían fallecido por una infección fúngica. Alrededor del 70% fueron infecciones por hongos filamentosos y sólo el 30% por *Candida*³. En Estados Unidos, donde existen series más recientes, se ha observado la misma tendencia¹. Además, la mortalidad debida a las micosis invasoras ocupaba el décimo puesto en 1980 para alcanzar el séptimo en 1997, lo que pone de manifiesto su importancia y la necesidad de mejorar su diagnóstico y tratamiento⁴.

Correspondencia: Dr. E. Mellado.
Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. de Majadahonda-Pozuelo. 28220 Madrid. España.
Correo electrónico: emellado@isciii.es

Manuscrito recibido el 26-07-2002; aceptado el 26-07-2002.

La inmensa mayoría de las infecciones por hongos filamentosos están causadas por *Aspergillus fumigatus*^{5,6}, si bien *A. flavus*, *A. terreus*, *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp. y Mucorales también son patógenos frecuentes¹. La incidencia de la aspergilosis invasora en el paciente inmunocomprometido continúa aumentando y causa una mortalidad cercana al 100% si el paciente no recibe tratamiento. Incluso con el tratamiento adecuado, el índice de mortalidad se mantiene en el 50%³. En el nuevo milenio, la aspergilosis invasora emerge como el mayor problema clínico de la micología moderna. Las razones fundamentales son el aumento de los grupos de riesgo, la dificultad en su diagnóstico y la complejidad del tratamiento⁶. En la actualidad existen varios antifúngicos para tratar la aspergilosis invasora: anfotericina B, itraconazol y, desde hace poco, caspofungina y voriconazol (aprobados en Estados Unidos, aunque en breve estarán disponibles en Europa). Otros antifúngicos en desarrollo (posaconazol y ravuconazol) son potencialmente útiles pero se encuentran en fase experimental.

Por otra parte, la infección fúngica tiene un gran impacto en la estancia media hospitalaria y por extensión en el coste sanitario⁵. Las cifras indican que este coste seguirá aumentando. Actualmente se hacen más de 600.000 trasplantes anuales en el mundo y el incremento anual es del 1,5%. Como ejemplo, más del 20% de los trasplantados de pulmón sufren una infección por *Aspergillus* o *Candida*. Por lo tanto, no es sorprendente que el mercado de antifúngicos haya aumentado el 12% anual durante los últimos 10 años. Si a este panorama se añade que la introducción de los triazoles (fluconazol e itraconazol) transformó el tratamiento de las infecciones por *Candida* y mejoró el de *Aspergillus* y el de las micosis endémicas, se puede entender que los antifúngicos se utilicen a la menor sospecha de infección. Por desgracia, por los datos disponibles, la situación no ha mejorado con las nuevas formulaciones de anfotericina B, que si bien han reducido la toxicidad de la preparación original de este fármaco, han tenido poco impacto en la supervivencia del paciente^{3,7}. Además, las herramientas diagnósticas disponibles para las infecciones fúngicas sistémicas tienen un bajo rendimiento, por lo que para paliar este déficit, el protocolo de tratamiento de la enfermedad base incluye la profilaxis con antifúngicos. Es evidente que esta situación va a facilitar el desarrollo de resistencias secundarias a los fármacos empleados, como ya ha ocurrido con *A. fumigatus* que ha desarrollado resistencia al itraconazol. Además, otro motivo de preocupación es el aumento de las micosis causadas por especies multiresistentes (*Fusarium*, *Scedosporium*) o por especies resistentes a la anfotericina B (*A. flavus* y *A. terreus*)¹.

Resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos: definición

Como con otros microorganismos, la resistencia de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que puede clasificarse en resistencia microbiológica y resistencia clínica. La primera se puede subdividir en:

1. *Resistencia intrínseca o innata*. Es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico.

2. *Resistencia primaria*. Es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.

3. *Resistencia secundaria o adquirida*. Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

La resistencia clínica puede definirse como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en éste existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión. La resistencia clínica está relacionada con distintos factores dependientes del fármaco, del paciente o de ambos. En el mundo de las micosis oportunistas, este tipo de resistencia se manifiesta fundamentalmente en pacientes con defectos inmunológicos profundos y persistentes que han recibido varios tratamientos antifúngicos, en portadores de material protésico (válvulas, catéteres, etc.) y en enfermos con bajos niveles de fármaco en sangre debido a interacciones de los propios fármacos entre sí o con otros compuestos.

Aunque la resistencia adquirida o secundaria no puede considerarse un problema significativo en los hongos filamentosos, ya se han descrito cepas de *A. fumigatus* resistentes al itraconazol y, además, se ha comprobado que esta resistencia es cruzada para otros azoles (voriconazol, ravuconazol o posaconazol)⁸. La resistencia de *Aspergillus* a los azoles podría estar relacionada con el uso masivo de antifúngicos en tratamientos empíricos y en profilaxis, utilización comprensible si se tiene en cuenta el mal pronóstico de algunas de estas infecciones. Las razones por las cuales *A. fumigatus*, siendo resistente intrínsecamente al fluconazol, se podría convertir en resistente a otros antifúngicos han empezado a estudiarse. Ya se ha postulado que el uso del fluconazol, aunque ineficaz con los hongos filamentosos, podría inducir una regulación positiva en la expresión de algunos genes, y esto implicaría cambios en su patrón de resistencia o tolerancia frente a otros antifúngicos normalmente eficaces. Esta hipótesis se ha demostrado *in vitro* con *A. fumigatus*⁹. No hay duda de que los pacientes tratados durante mucho tiempo con azoles desarrollan resistencia a éstos, pero además, las cepas resistentes podrían generarse en el ambiente y después infectar al paciente. Una gran preocupación es el uso masivo de azoles en agricultura ya que, además de favorecer la aparición de cepas resistentes, podría desplazar las especies sensibles y cambiar la población de hongos que infectan al ser humano. El peligro real supondría la ocupación del nicho ecológico cercano al ser humano por especies resistentes, lo que podría aumentar el mal pronóstico de estas infecciones¹⁰.

Antifúngicos disponibles y mecanismo de acción

El número de antifúngicos disponibles para tratar las micosis invasoras por hongos filamentosos es muy escaso y además la eficacia de éstos para el tratamiento de las micosis sistémicas graves es limitada. Esto puede explicarse por la falta de técnicas que diagnostiquen la infección de forma precoz, por la toxicidad y las limitaciones que presenta la dosificación de algunos fármacos (como la anfotericina B convencional), por las escasas alternativas terapéuticas y por la aparición de cepas con resistencia secundaria a los antifúngicos o de especies con resistencia intrínseca. A continuación se van a revisar los antifúngicos que se emplean en el tratamiento de las micosis invasoras por hongos filamentosos y las nuevas moléculas que aún se encuentran en desarrollo pero que estarán disponibles en un futuro próximo^{11,12} (tabla 1).

Polienos

Los polienos se unen a los esteroides de membrana (fundamentalmente ergosterol) y esta unión genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas. La anfotericina B se mantiene como fármaco de primera línea en el

tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras, ya que tiene un perfil de actividad muy amplio (levaduras, hongos miceliales y hongos patógenos primarios como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, etc.). La principal limitación de su uso es su elevada toxicidad. Sin embargo, muy pocas especies muestran resistencia intrínseca (*Scedosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Trichosporon* spp. y probablemente *A. terreus* y *A. flavus*) y pocas cepas han desarrollado resistencia secundaria, aunque este hecho es difícil de demostrar como se discutirá posteriormente.

Azoles

Este grupo de antifúngicos revolucionó la micología médica por su espectro de actividad y sus limitados efectos adversos. El único inconveniente de los mismos es la escasa utilidad que hasta la fecha han demostrado en las infecciones invasoras graves por hongos miceliales, así como la aparición de cepas con resistencia secundaria. Los azoles bloquean la síntesis del ergosterol uniéndose fundamentalmente a la enzima 14- α demetilasa y de esta forma se acumulan esteroides metilados que resultan tóxicos para la célula (fig. 1). No obstante, este bloqueo de la síntesis del ergosterol inhibe el crecimiento de la célula pero no la mata. Fluconazol y ketoconazol no tienen ninguna utilidad en las infecciones fúngicas por hongos

TABLA 1. Principales antifúngicos en uso (o en desarrollo clínico) utilizados frente a hongos filamentosos

Grupos	Mecanismo de acción	Compuestos licenciados	Compuestos en ensayos clínicos	Diana específica	Presentaciones
Polienos	Unión a esteroides de membrana	Anfotericina B		Ergosterol de membrana	Parenteral (distintas formulaciones)
Triazoles	Inhibición de la síntesis de ergosterol	Itraconazol	Voriconazol Ravuconazol Posaconazol	14- α esteroil demetilasa	Oral y parenteral
Alilaminas	Bloqueo de la síntesis de ergosterol	Terbinafina		Escualeno epoxidasa	Oral
Equinocandinas	Inhibición de la síntesis del 1,3 β -glucano	Caspofungina	Micafungina Anidulafungina	β -glucano sintetasa	Parenteral

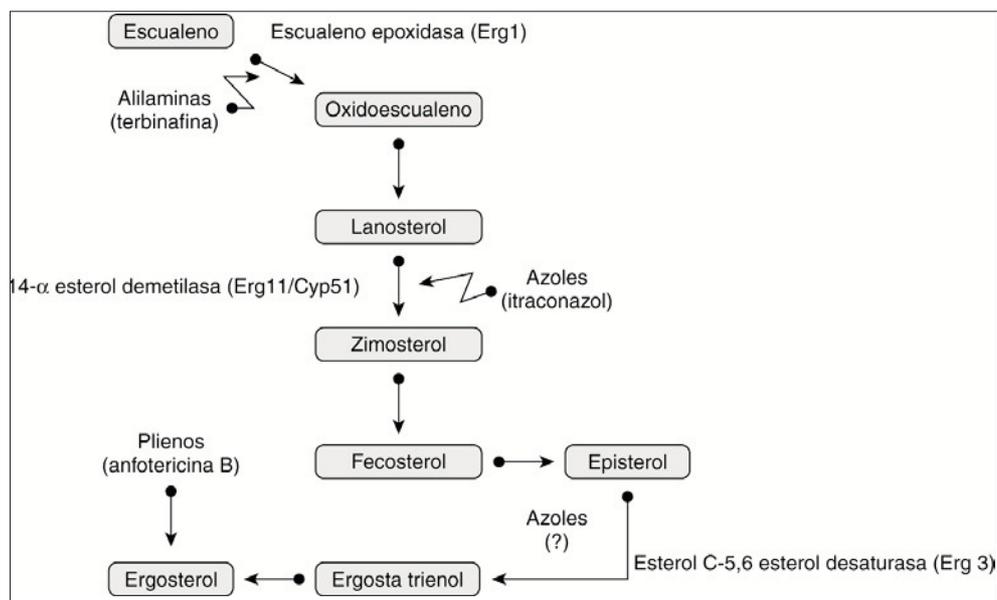


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergosterol. Las enzimas diana y los genes implicados están indicados.

filamentosos, puesto que la mayoría de ellos presentan resistencia intrínseca a estos fármacos. Itraconazol, con un espectro de actividad amplio frente a levaduras y numerosos hongos miceliales, es el fármaco más utilizado después de la anfotericina B para el tratamiento de infecciones fúngicas invasoras por hongos filamentosos. También se utiliza como profilaxis y en terapias de refuerzo o de mantenimiento. Existen otros derivados triazólicos en fase de desarrollo, voriconazol (Pfizer), posaconazol (Schering-Plough) y ravuconazol (Bristol-Myers Squibb), aunque el voriconazol será comercializado en breve tanto en formulación oral como parenteral. Todos ellos muestran un espectro de actividad similar a la del itraconazol, por lo que podrían ser utilizados en la infecciones fúngicas invasoras.

Equinocandinas

Es una nueva clase de antifúngicos que actúa inhibiendo la síntesis del 1-3 β -glucano, uno de los principales componentes de la pared celular. Este mecanismo de acción le confiere ciertas ventajas, ya que no muestra resistencia cruzada con los antifúngicos que actúan sobre la membrana y por ello se podrían utilizar en terapia combinada con azoles o anfotericina B. Sólo un fármaco de este grupo ha sido aprobado recientemente en Estados Unidos y otros países, la caspofungina. Su espectro de acción incluye especies de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Pneumocystis carinii*, aunque no es activa frente a *Fusarium* spp., ni *Cryptococcus* spp. Según varios estudios preliminares ha demostrado eficacia sobre todo en el tratamiento de rescate de la aspergilosis invasora^{13,14}.

Alilaminas

Esta clase de antifúngicos sintéticos ejerce su acción mediante la inhibición de la escualeno epoxidasa, una enzima implicada en la síntesis del ergosterol (fig. 1). Terbinafina, el único fármaco comercializado de esta clase en forma de presentación oral, presenta actividad frente a dermatofitos y también frente a levaduras y hongos filamentosos, además de mostrar efectos sinérgicos con los azoles¹⁵. Esta actividad puede determinar que la

terbinafina se considere en un futuro como una alternativa terapéutica en algunas micosis sistémicas.

Detección de la resistencia: del laboratorio al paciente

Los estudios de sensibilidad *in vitro* se realizan para detectar las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos. Estos estudios ayudan a elegir la mejor alternativa de tratamiento reduciendo la posibilidad de que aparezca un fallo terapéutico. El estándar propuesto por el National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (documento M38-P) constituye el método de referencia y es el que más se ha utilizado para realizar estudios de correlación con la clínica¹⁶. Los estudios de sensibilidad muestran una serie de limitaciones para su aplicación asistencial. En primer lugar, existen dudas sobre si estos métodos son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a la anfotericina B, y hasta la fecha no se han podido establecer puntos de corte fiables para diferenciar ambas poblaciones¹⁷. En segundo lugar, se trata de técnicas que no pueden ser utilizadas en la mayoría de los laboratorios asistenciales, debido a su complejidad metodológica. No obstante, es necesario puntualizar que estas técnicas sí son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a los azoles^{18,19} y, de hecho, ya se han descrito cepas resistentes a los azoles en Holanda, Inglaterra, Suecia, Estados Unidos y España²⁰⁻²². En lo que se refiere a la correlación *in vitro-in vivo* con los azoles, los datos disponibles indican que sí existe relación entre la resistencia *in vitro* y el fallo terapéutico, pero no entre sensibilidad y curación clínica²³.

Mecanismos de resistencia

Tras la caracterización fenotípica de la resistencia, es obligado un análisis molecular y bioquímico que identifique los mecanismos de resistencia, análisis que se encuentra en su fase inicial en los hongos filamentosos. En términos generales, los mecanismos identificados hasta ahora, por los que una célula inicialmente sensible se hace refractaria a agentes citotóxicos son:

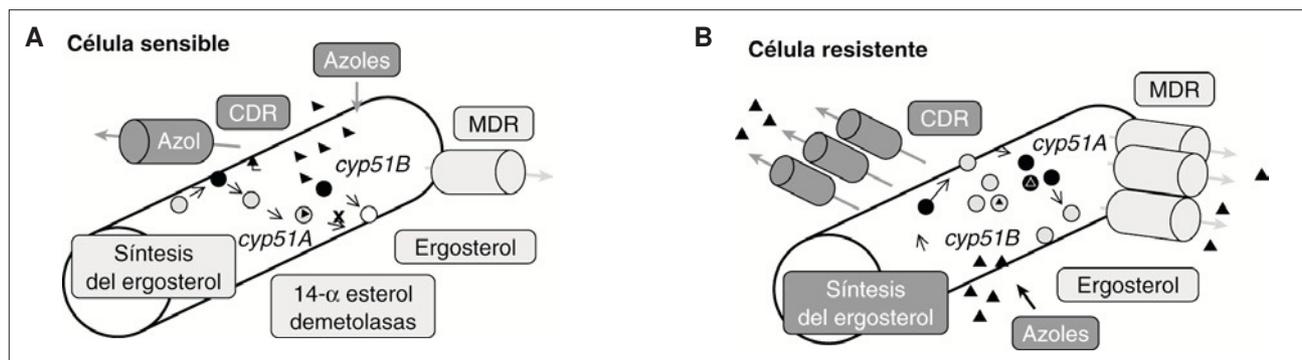


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de resistencia de los hongos frente a los azoles. A) En el hongo sensible el antifúngico interacciona con la diana (14- α esterol demetilasa, producto del gen *CYP51*) bloqueando las síntesis del ergosterol e inhibiendo el crecimiento del mismo. B) el hongo resistente puede defenderse: aumentando las bombas de eliminación activa (MDR y CDR) lo que disminuiría la concentración intracelular del fármaco; aumentando el número de copias de la diana (*CYP51A* y/o *CYP51B*) o modificando la diana (mutaciones en los genes *CYP51A* y/o *CYP51B*) de forma que la interacción del fármaco con la diana sea ineficiente.

1. Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.

2. Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones).

3. Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas.

4. Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco.

En el caso de los hongos filamentosos sólo se han descrito los tres primeros mecanismos (fig. 2). Asimismo, se sabe que muchos de estos mecanismos pueden coexistir en una misma célula^{12,24,25}.

Polienos

La resistencia a polienos (anfotericina B) se ha descrito en levaduras y hongos filamentosos, pero los mecanismos que subyacen a la misma están por elucidar. En levaduras, la mutación de la enzima C-5, 6 esterol desaturasa (producto del gen *ERG3*) implicada en la síntesis del ergosterol, confiere resistencia moderada a la anfotericina B. Sin embargo, esta mutación siempre se ha acompañado de mutaciones de gen *ERG11*, lo que implica la existencia de resistencia cruzada a la anfotericina B y a los azoles²⁶. En *Aspergillus* la situación es más complicada ya que, a pesar de detectarse numerosos fallos terapéuticos, no existe ninguna metodología que sea capaz de relacionar dichos fallos con la resistencia fenotípica a la anfotericina B mediante la detección de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) elevadas¹⁷. En el laboratorio tampoco se han conseguido avances que posibiliten el estudio de las cepas resistentes. Así, no se han podido seleccionar mutantes espontáneos de *A. fumigatus* resistentes a anfotericina B. Sólo ha sido posible conseguir mutantes, con diferentes niveles de resistencia a este antifúngico, irradiando esporas con luz ultravioleta. Esta resistencia parece ser específica para polienos, ya que los mutantes no presentaban resistencia cruzada con azoles ni equinocandinas²⁷. En *A. flavus* también se ha descrito el aislamiento de una cepa resistente a anfotericina B (y otros polienos) mediante pases con concentraciones crecientes de anfotericina B²⁸. Se ha postulado que el escaso número de cepas con resistencia a los polienos esta relacionado con dos factores: *a*) la toxicidad de estos fármacos, que obligan a utilizarlos en tratamientos cortos, y *b*) la asociación de la resistencia con la deficiencia en ergosterol lo que supondría una desventaja evolutiva y por tanto con menos posibilidades de seleccionarse *in vivo*²⁹.

Azoles

En caso de *Candida* los mecanismos de resistencia frente a los azoles están mejor estudiados y así se conocen 15 determinantes genéticos asociados con la resistencia a estos antifúngicos^{24,26,30}. El mecanismo de resistencia descrito con más frecuencia está relacionado con la disminución de las concentraciones de fármaco, debido al aumento de expresión o activación de los genes que codifican bombas de eliminación activa²⁶. Las mutaciones del gen *ERG11* que afectan a la diana de los azoles constituye el segundo mecanismo en frecuencia de las resistencias de levaduras a los azoles^{26,30}. Como ya se ha

comentado, se desconocen la mayoría de los mecanismos moleculares y bioquímicos que explican la resistencia frente a los antifúngicos de los hongos filamentosos. Estudios realizados en fitopatógenos sugieren mecanismos similares a los descritos para levaduras³¹. Asimismo, se ha comprobado que la resistencia a los antifúngicos en fitopatógenos es un proceso gradual y, por lo tanto, posiblemente controlado por diferentes genes. En estos hongos se han empezado a estudiar los siguientes aspectos:

Aumento de expresión de las bombas de eliminación activa

En levaduras se ha relacionado la resistencia secundaria a los azoles con el aumento de expresión de dos tipos de transportadores: transportadores ABC (*CDR1* y *CDR2*) responsables de resistencia a casi la totalidad de los azoles y los transportadores denominados MSF (*MDR1*) que serían los responsables de la resistencia a fluconazol^{29,30}. En distintos hongos filamentosos se han descrito genes homólogos a los descritos para levaduras: *A. fumigatus* (*MDR1* y *MDR2*), *A. flavus* (*MDR1*), *A. nidulans* (*atrA*, *atrB* y *atrC*) y *Penicillium digitatum* (*PMR1*, *PMR5*), todos estos genes pertenecen a la familia de los transportadores ABC. El aumento de su expresión se relaciona con la resistencia a diversos compuestos con actividad antifúngica, pero no directamente con la resistencia a azoles de uso clínico³².

Modificación de la diana de los azoles

El otro mecanismo de resistencia estudiado y directamente relacionado con la resistencia a azoles, es la alteración estructural de la enzima 14- α esterol desmetilasa (diana de los azoles y enzima clave en la síntesis del ergosterol). En la vía metabólica de la síntesis del ergosterol, el lanosterol y sus derivados son el sustrato para la enzima 14- α lanosterol desmetilasa (producto del gen *CYP51/ERG11*). Esta enzima ha sido purificada a partir de hígado de rata y también de *Saccharomyces cerevisiae*. En la actualidad es la diana más estudiada y contra la que se han diseñado un gran número de antifúngicos, que se han empleado para controlar la infección fúngica en plantas, animales y seres humanos. Los genes de la superfamilia de las enzimas del citocromo P-450 (CYP) se encuentran en numerosos organismos eucariotas y procariotas. De las 36 familias de CYP descritas, siete (CYP51-57) existen en distintas especies fúngicas. La familia del CYP51 codifica proteínas que catalizan la 14- α desmetilación del lanosterol³³. En la actualidad están disponibles las secuencias del gen *CYP51* de mamíferos (ser humano, rata, ratón), plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*), varias levaduras (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Ustilago maydis*) y cinco hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*, *Erysiphe graminis* y *Uncinula necator*). Ya se han detectado algunas mutaciones puntuales relacionadas con la resistencia a inhibidores de la 14- α esterol desmetilasa en hongos fitopatógenos^{34,35}. El conocimiento de la secuencia de la 14- α esterol demetilasa en levaduras y hongos filamentosos ha facilitado el descubrimiento de que esta enzima está codificada por dos genes diferentes (*CYP51A* y *CYP51B*) en *Aspergillus*

spp.³⁶. La existencia de dos genes que codifican 14- α esterol desmetilasas en *Aspergillus* sugiere que lo mismo puede suceder en otros hongos filamentosos. Este hallazgo supone un cambio radical sobre los posibles mecanismos de resistencia a los azoles en *A. fumigatus* y desde el punto de vista hipotético, explica, por ejemplo, por qué estos antifúngicos tienen CIM más elevadas frente a *A. fumigatus* que frente a *C. albicans*. El análisis de los genes *CYP51A* y *CYP51B* de cepas de *A. fumigatus* de origen clínico resistentes al itraconazol ha puesto de manifiesto la existencia de una mutación puntual relacionada con la misma. Además, se ha demostrado que esta resistencia es cruzada sólo con algunos de los nuevos triazoles. La existencia de otras cepas con resistencia cruzada para todos los azoles demuestra que en *A. fumigatus* al menos existen dos mecanismos completamente diferentes, responsables de la resistencia a los azoles (datos de los autores no publicados).

Aumento del número de copias de la diana de los azoles (14- α esterol demetilasa)

El aumento del número de copias de *CYP51* o de su expresión puede originar resistencia a los azoles. En levaduras se ha demostrado un aumento de la transcripción del gen *ERG11 (CYP51)* durante la exposición a los azoles, incluso en las células sensibles. Se piensa que este aumento se debe a la respuesta de la célula a la disminución de ergosterol o a la acumulación de esteroides tóxicos²⁵. En hongos filamentosos los cambios en los niveles de expresión de *CYP51* pueden ocasionar el desarrollo progresivo de resistencia a los azoles³⁷. En concreto, en cepas de *P. digitatum* resistentes a triflumizol (azol de uso en agricultura) se ha demostrado la existencia de un activador de la transcripción en el promotor del *CYP51*. El número de copias de esta secuencia repetida en tándem se correlaciona directamente con la CIM a triflumizol³⁷. En *A. fumigatus* se ha comprobado que la transformación con un plásmido que contenga el gen *CYP51* confiere resistencia al itraconazol³⁸. Así pues, parece claro que la resistencia a los azoles en hongos filamentosos podría estar producida por amplificación o hiperexpresión de la diana de los azoles.

Prevención de la resistencia: posibles estrategias

Las estrategias para evitar y disminuir la resistencia a los antifúngicos son complejas. Además, existen dificultades adicionales como la agresividad de las micosis invasoras y la debilidad de los enfermos que las padecen. Por ello, la prevención tiene que hacerse actuando en todos los niveles, epidemiológicos, diagnósticos, profilácticos y terapéuticos²⁹.

Estudios epidemiológicos para conocer la frecuencia de la resistencia

Los estudios de vigilancia ayudan a determinar la frecuencia de la resistencia con lo que se puede alertar a los clínicos y aconsejar sobre los tratamientos iniciales más adecuados. A pesar de que la resistencia clínica de los

hongos filamentosos a los antifúngicos no es un problema comparable a lo que ocurre con los antibacterianos, hay que tener en cuenta que se están empleando de forma masiva inhibidores de la 14- α desmetilasa, es decir azoles, en el control de los fitopatógenos¹⁰. Los hongos filamentosos patógenos humanos son ubicuos y por tanto, comparten nichos ecológicos con los fitopatógenos. Si a este hecho añadimos el aumento de la utilización de antifúngicos en clínica humana, podemos predecir un incremento de cepas resistentes en un futuro próximo.

Desarrollo del laboratorio de microbiología/micología

El laboratorio debe implantar técnicas que ayuden al diagnóstico precoz de las micosis, así como identificar los hongos a nivel de especie, ya que en la actualidad muchas especies tienen una sensibilidad predecible a los antifúngicos. El reto del clínico sigue siendo la instauración de un tratamiento efectivo que mejore la evolución de los pacientes con micosis oportunistas. Para ello es necesario que mejoren las técnicas de detección y diagnóstico precoz. Además, se están describiendo nuevas especies fúngicas como causantes de micosis oportunistas y muchas de ellas presentan multiresistencia frente a los antifúngicos de uso clínico.

Pruebas de sensibilidad

El desarrollo de pruebas de sensibilidad que puedan predecir la resistencia *in vivo* es una de las necesidades más acuciantes en micología médica. Además, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos tienen mayor utilidad en determinados casos, como por ejemplo en cepas procedentes de enfermos en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en aquellos que han recibido profilaxis antifúngica previa y en cepas pertenecientes a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su patrón de sensibilidad *in vitro*. En estos casos, las pruebas de sensibilidad pueden ayudar a elegir la mejor alternativa farmacológica y ofrecer información para aumentar la dosis o iniciar una terapia combinada.

Establecimiento de estrategias antifúngicas que consideren todos los beneficios (a corto y a largo plazo)

En este sentido se ha empezado a considerar la posibilidad de que la profilaxis con fluconazol, a pesar de su falta de actividad frente a hongos filamentosos, podría producir un incremento en la regulación de algunos genes y ocasionar resistencia o tolerancia a los antifúngicos sin alterar la virulencia⁹. Actualmente esta hipótesis está siendo discutida, y aunque se desconoce si este hecho se está produciendo, lo cierto es que se ha constatado una disminución en las infecciones por levaduras y un aumento de las infecciones por hongos filamentosos. Por lo tanto, los mecanismos de regulación génica del tipo descrito no pueden descartarse totalmente⁹.

Disponibilidad de terapias más efectivas

En este punto pueden distinguirse tres estrategias:

1. Aumento de las dosis o de nuevas formulaciones menos tóxicas y más efectivas.

2. Búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con mejor actividad o la identificación de nuevas dianas fúngicas.

3. Estudio de combinaciones entre antifúngicos, inmunomoduladores y antifúngicos o incluso antimicrobianos y antifúngicos^{39,40}.

Conclusión

El desarrollo de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos es la consecuencia lógica e inevitable del uso de los mismos para tratar las micosis invasoras, aunque la frecuencia y la relevancia clínica de esta observación se desconoce. El estudio a nivel molecular de los mecanismos de resistencia de los hongos frente a los distintos grupos de antifúngicos es la estrategia más importante para poder evitar las consecuencias que el desarrollo de la resistencia puede ocasionar a largo plazo, y para desarrollar moléculas más potentes y seguras que las eviten. En espera de que esto suceda, es vital actuar utilizando las herramientas disponibles como la vigilancia epidemiológica de la resistencia y las técnicas diagnósticas precoces que puedan facilitar un tratamiento adecuado y eficaz.

Bibliografía

- Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:909-17.
- Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: Predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001;33:1692-6.
- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781-805.
- McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001;33:641-7.
- Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalisations in the United States. *Clin Infect Dis* 2000;31:1524-8.
- Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: An update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:161-72.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiol Rev* 1999;12:310-50.
- Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 556-7.
- Kontoyiannis DP. Why prior fluconazole use is associated with an increased risk of invasive mold infections in immunosuppressed hosts: An alternative hypothesis. *Clin Infect Dis* 2002;34:1281-3.
- Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2987-90.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Antifúngicos de uso sistémico y tópico. Nuevas moléculas antifúngicas. En: *Medicine. Programa de educación médica continuada en medicina asistencial*. Barcelona: Doyma 2002; 8ª serie. n.º 68: p. 3651-3660.
- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-17.
- Groll AH, Walsh TJ. Caspofungin: Pharmacology, safety and therapeutic potential in superficial and invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1545-58.
- Denning DW. Echinocandins: A new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:889-91.
- Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of *in vitro* interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:702-7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility. Testing of filamentous fungi: proposed standard. Document M38-P, NCCLS. Villanova: 1998.
- Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, Moore CB, Warn P, Warnock DW, et al. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:85-93.
- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:401-14.
- Dannaoui E, Borel E, Persat F, Monier MF, Piens MA. *In vivo* itraconazole resistance of *Aspergillus fumigatus* in systemic murine aspergillosis. EGBA Network. European research group on Biotypes and Genotypes of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 1999;48:1087-93.
- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1364-8.
- Chryssanthou E. *In vitro* susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. Acquired Resistance to Itraconazole. *Scand J Infect Dis* 1997;29:509-12.
- Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:333-40.
- Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioter* 2000;13:161-6.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 2002;8:76-81.
- Sanglard D. Clinical Relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enf Infect Microbiol Clin* 2002. En prensa.
- Manavathu EK, Alangaden GJ, Chandrasekar PH. *In vitro* isolation and antifungal susceptibility of amphotericin B-resistant mutants of *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:615-9.
- Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol* 1999;43: 1017-25.
- Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002;359:1135-44.
- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:73-85.
- Hollomon DW. Resistance to azole fungicides in the field. *Biochem Soc Trans* 1993;21:1047-51.
- Andrade AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JG, Waard MA. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major

ANEXO 1. Mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos

- 1. El aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas invasoras puede deberse a:**
 - a) Aumento del número de pacientes susceptibles y/o mayor supervivencia de los mismos.
 - b) Mayor uso de fármacos inmunodepresores.
 - c) Incremento de pacientes con profilaxis antibiótica.
 - d) Desarrollo y aumento del número de trasplantes de órganos/médula ósea.
 - e) Todos los anteriores son factores de riesgo de infección fúngica.

- 2. El cambio en las características epidemiológicas de la infección fúngica invasora puede deberse a:**
 - a) Incremento de profilaxis con antifúngicos azólicos, especialmente fluconazol.
 - b) Mejora de las técnicas de diagnóstico e identificación.
 - c) Erradicación de las infecciones por levaduras.
 - d) Utilización de terapias inmunosupresoras menos agresivas.
 - e) Las respuestas a) y b) son correctas.

- 3. El principal hongo filamentosos responsable de micosis invasora es:**
 - a) *Aspergillus flavus*.
 - b) *Aspergillus fumigatus*.
 - c) *Scedosporium prolificans*.
 - d) *Fusarium* spp.
 - e) Mucorales.

- 4. La resistencia secundaria a los antifúngicos se define como:**
 - a) La resistencia que presentan todos los miembros de una especie a un determinado antifúngico.
 - b) La resistencia que presentan algunos miembros de una especie a un determinado antifúngico sin previo contacto con el mismo.
 - c) La resistencia que presentan algunos miembros de una especie a un determinado antifúngico después de haber estado en contacto con el mismo.
 - d) La falta de respuesta clínica aunque en el foco de infección existan concentraciones terapéuticas del antifúngico.
 - e) Cualquiera de las anteriores definiciones podría considerarse resistencia secundaria.

- 5. ¿Cuál de los siguientes grupos de antifúngicos no actúa sobre esteroides de membrana o sobre su síntesis?**
 - a) Anfotericina B.
 - b) Azoles.
 - c) Alilaminas.
 - d) Equinocandinas.
 - e) Las respuestas c) y d) son ciertas.

- 6. Los estudios de sensibilidad *in vitro* han permitido establecer punto de cortes fiables para diferenciar cepas de hongos filamentosos sensibles y resistentes para los siguientes antifúngicos:**
 - a) Itraconazol.
 - b) Anfotericina B.
 - c) Caspofungina.
 - d) Todas las respuestas son correctas.
 - e) Ninguna de las respuestas es correcta.

- 7. En los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los azoles están implicados:**
 - a) Aumento de expresión de bombas de flujo de membrana (MDR, CDR).
 - b) Mutaciones del gen (*CYP51*) que codifica la enzima diana (14- α esterol demetilasa).
 - c) Aumento de expresión del gen que codifica la 14- α esterol demetilasa (*CYP51*).
 - d) Todos los mecanismos anteriores se han demostrado a nivel molecular.
 - e) Ninguno de los anteriores se ha constatado en cepas de origen clínico.

- 8. Señale lo correcto referente al fluconazol:**
 - a) *Aspergillus fumigatus* presenta resistencia secundaria a este azol.
 - b) Su espectro de acción es igual que el de itraconazol.
 - c) Los hongos filamentosos son intrínsecamente resistentes al fluconazol.
 - d) *A. flavus* es sensible *in vitro* a este azol.
 - e) La diana del fluconazol se encuentra en la pared fúngica.

- 9. En los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los polienos están implicados:**
 - a) Operan los mismos mecanismos que se han descrito en la resistencia a los azoles.
 - b) La resistencia a polienos siempre es cruzada con resistencia a los azoles.
 - c) Alteraciones de la diana de los polienos (1-3 β glucano sintetasa).
 - d) Todas las respuestas anteriores son falsas.
 - e) Todas las respuestas anteriores son correctas.

- 10. Las estrategias futuras para evitar la resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos incluyen:**
 - a) Mejora del diagnóstico y un tratamiento dirigido e individualizado.
 - b) Vigilancia epidemiológica de la aparición de la resistencia.
 - c) Profilaxis con azoles a todo enfermo con sospecha de infección fúngica.
 - d) Todas las respuestas anteriores son ciertas.
 - e) Solamente las respuestas a) y b) son ciertas.

Véanse respuestas a las preguntas de formación continuada en pág. 539.