



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"
Sección de Micología
Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

**Actividad antifúngica de terbinafina en hongos aislados fenotípica
y genotípicamente de personas con onicomiosis de la comunidad
de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla.**

Tesis que para obtener el grado de licenciatura
Químico Farmacobiólogo

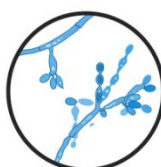
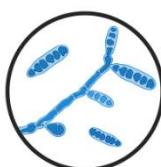
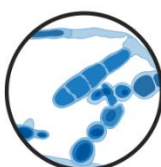
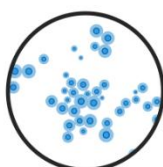
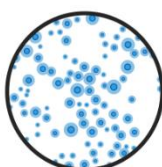
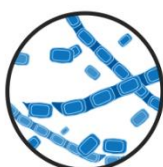
PRESENTA

Joel Alejandro Domínguez Velázquez
Erika Fabiola Hernández Rodríguez

Director de tesis
D.E.D. Edith Díaz Cabrera

Codirector de tesis
D.C. Alma Cuellar Sánchez
Colaborador Dr. Roberto Arenas Guzmán

05 de julio del 2023





OFICIO C.Q./CT 005P/2023

C. Joel Alejandro Domínguez Velázquez
PRESENTE

Toda vez que se cuenta con la aprobación de la Coordinadora de la Licenciatura en Q.F.B., le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

"Actividad antifúngica de terbinafina en hogos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con onicomiosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla"

ha sido autorizado, siendo:

D.E.D. Edith Díaz Cabrera, Directora de Tesis
D.C. Alma Cuéllar Sánchez, Codirectora de Tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 27 de febrero de 2023

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 4Lj.Cr"Rd#Sp!Eu!If.Dk,Le%Gt&Ec#Bn-Uo%Uw/Hz#Jp%Jl'Bh#Dx,Yy(Wk#Gm#Vm&El%Ms#Ot.Zq,Aq'Hg/Uz!Ll!Ns"Fc!Rd!Ig.Ha/Qm,Kg%Sk!Sp.Lt(Bk%Dk!Ak/Ed(Ur+Ib!Ju&Vj,Cp,Fn\$Tu*Dj-Nj/Nh/Qb,Hd(Rs"Al,Ti-Fl+No"Eg\$Wj(Pz%Nf!Ls"Zi(Jj+Oo/As*Ur)Xu)Ql*Md"Rn!Rv)Tw,Us"Ef(Ee+Yo*Pd.Xx(Lb&Xt'Yf!Zr'Ve+Nr/Hi'Iu(Ul(

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 006P/2023

C. Erika Fabiola Hernández Rodríguez
PRESENTE

Toda vez que se cuenta con la aprobación de la Coordinadora de la Licenciatura en Q.F.B., le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

"Actividad antifúngica de terbinafina en hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con oncomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla"

ha sido autorizado, siendo:

D.E.D. Edith Díaz Cabrera, Directora de Tesis

D.C. Alma Cuéllar Sánchez, Codirectora de Tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 27 de febrero de 2023

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 7Tm-Lz#Wa!Gz.Ym,Wz)Wx&Ve\$Ls-

Vc\$Qm"Ai/Im"Do!Ye.Mz/Fy&Xz+Eu#Ej+Pn"Bt"Yr,Hf&YI(Qm+Dg.Qi&Ae,Re(Sn"Hx)Fs-

Aq.Rx+Pt/Rw!Fm\$Hk*Wj)Cm+Vm%Vo&KI.Bb!Ge(Uj#RI.GI!Tb-Hn-Ie"Qh#Sr*Tb-

Zv*Gf%Nf#Ue!Oj\$Vz&Pi(Mp&Bf/Ur%Zo/Rt"Kd!Ce%Zt!Ju&Xn#Uh.Eh(Kt%Wb.Ta!Lg+Bb(Ke!Vv*Ak#Ba!Uj!Vq\$Fo.Mo,Ok!Lo"Uu-

Ic(Bj%

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



BUAP

“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

Al Dr. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS - BUAP

PRESENTE

Reciba un cordial saludo y al mismo tiempo, me permito informar que la Comisión Revisora de la Tesis, que presenta el estudiante de la Licenciatura en **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO, JOEL ALEJANDRO DOMÍNGUEZ VELAZQUEZ (matrícula: 201661306) y ERIKA FABIOLA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ (matrícula: 201659531)**, para obtener el Título de Licenciada en QUÍMICO FARMACOBIOLOGO, con la dirección de la **D.E.D EDITH DIAZ CABRERA** y Co-Directora **D.C. ALMA CUELLAR SÁNCHEZ**.

El título del proyecto es:

“Actividad antifúngica de terbinafina en hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con onicomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla.”

Estará integrada por:

Presidente: Dra. CLAUDY LORENA VILLAGRAN PADILLA

Secretario: Dra. ANA BERTHA ESCOBEDO LÓPEZ

Vocal: Mtro. CARLOS FRANCISCO ESPINOZA VAZQUEZ

Sin más por el momento quedo de Usted

H. Puebla de Z., a 20 de febrero de 2023

D.C. Verónica Liliana Ramírez Falcón

Coordinadora de la Licenciatura en QFB

FCQ-BUAP

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 010A/2023

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Joel Alejandro Domínguez Velázquez

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección de la D.E.D. Edith Díaz Cabrera y D.C. Alma Cuéllar Sánchez, con el siguiente título:

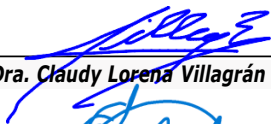
"Actividad antifúngica de terbinafina en hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con onicomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 8 de marzo de 2023.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 9 de marzo de 2023


Dra. Claudy Lorena Villagrán Padilla, Presidente


Dra. Ana Bertha Escobedo López, Secretario


M.C. Carlos Francisco Espinoza Vázquez, Vocal

c.c.p. Archivo

Cadena digital: 8Xy+Xr+Un/Rx)Mh-Ay&Vs+Ko)Oo)Kv-Bw(Ic'Pa,Hd'Le'Uu%oCv\$Bm-VI"Oe(Ld+Xx,Hd"Db,Uw+Hh%Dx*Ic)Xh'Xy\$Ig'De%Ln-Of!Xr(Dm#Ym#Zc,Ru*Hd,Sn,Jj"Sn+Kk%Dt(Ji!RI\$Kz#Zy\$Hg"Qu-Vs"Jm'Ov,Wd.Yz-UI(Jr,Xs&Mn/Lw+Sv+Jo*Wr"Um\$Zi"Al'Io*Dc+Wz/Gs'Vz+Uw+Of%Dy\$Uv\$Gp"Gr+Lx'Bh%Dw#Pf"Nu/He!Zi"Yk!Yp.Vj,Zu-Wy.Hx&Hb"

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 011A/2023

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Erika Fabiola Hernández Rodríguez

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección de la D.E.D. Edith Díaz Cabrera y D.C. Alma Cuéllar Sánchez, con el siguiente título:

"Actividad antifúngica de terbinafina en hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con oncomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 8 de marzo de 2023.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 9 de marzo de 2023


Dra. Claudy Lorena Villagrán Padilla, Presidente


Dra. Ana Bertha Escobedo López, Secretario


M.C. Carlos Francisco Espinoza Vázquez, Vocal

C.c.p. Archivo

Cadena digital:

4Iw\$Yy&Na"Uf,Pm"Ns/Jh*Lh+Xv*Ok.Bw*Vb\$To/Bu*Wn(Ii)Fd&Wx)Ax#My+Pp+Xp!Xw.Lx(Uw+Rm"Zh)Tn+Bs/Dk&St)Yv#Vo+Zt#
Ed\$Sp!MI\$Ni#Bi\$Ay+Iu)Bi%Iz#Lm-
Bj#Ze"Bw#Ce!Ps(Yb\$Pi,Nt'Ne&Wa+Gl#Ew(Ga"Qm.St+Lp%Ot,Bq!Ex/Ey)To(Cc.Fg&Ot,Ud"Uq.Uz&Ko&Ds#Lb&Xb,Oq"Yf(Ok\$Nc,
Oq-Qc\$Oj&Tu&Gm"Hh(Qw"He!Ce'Vv(Ti,Jn.Oi-

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



BUAP

"HUP, 50 años de enseñanza y salud"

Dr. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico a usted el nombre de los integrantes del H. Jurado del Examen Profesional que sustentará, **JOEL ALEJANDRO DOMINGUEZ VELAZQUEZ**, (matrícula: **201661306**), pasante de la carrera de **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO** el día **5 de julio** del año en curso, a las 17:00 h, Presencial en el **SUM FCQ9**.

J U R A D O

Presidente- Dra. Claudy Lorena Villagrán Padilla, Presidente

Secretario- Dra. Ana Bertha Escobedo López

Vocal-M.C. Carlos Francisco Espinoza Vázquez

Se extiende la presente para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

H. Puebla de Z., a 28 de junio del 2023

D.C. Veronica Liliana Ramírez Falcón

Coordinadora de la Licenciatura en QFB

FCQ-BUAP

Día: 5 de julio

Hora: 17:00 h

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

Dr. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico a usted el nombre de los integrantes del H. Jurado del Examen Profesional que sustentará, ERIKA FABIOLA HERNANDEZ RODRIGUEZ, (**matrícula:** 201659531), pasante de la carrera de **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO** el día **5 de julio** del año en curso, a las 17:00 h, Presencial en el **SUM FCQ9**.

J U R A D O

Presidente- Dra. Claudy Lorena Villagrán Padilla, Presidente

Secretario- Dra. Ana Bertha Escobedo López

Vocal-M.C. Carlos Francisco Espinoza Vázquez

Se extiende la presente para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

H. Puebla de Z., a 26 de junio del 2023

D.C. Veronica Liliana Ramírez Falcón

Coordinadora de la Licenciatura en QFB

FCQ-BUAP

Día: 5 de julio

Hora: 17:00 h

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390

AGRADECIMIENTOS

Al creador por tantas bendiciones.

A mi madre. Inés Rodríguez por ser mi fan número uno y por tanto amor.

A mis hijos. Ana Fabiola y Oscar Javier y mi esposo Oscar Flores por ser el gran motor que mueve mi mundo.

Ingeniera Adriana Rodríguez, Licenciado Carlos Alberto Carmona y Doctora Leticia Vargas. Sin su apoyo yo no hubiera llegado hasta aquí.

Joel Alejandro Velázquez Domínguez. Su apoyo fue clave para culminar. Por tanta ayuda y consejos, Gracias.

Maestra Ana Laura Amador López. Gracias por sembrar en mi la semilla del yo puedo más de lo que creo y merezco más de lo que tengo.

Erika Fabiola Hernández Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Queridos padres, Eleuteria Velázquez Ramos e Higinio Mejía Cruz, hermanos, Alberto Domínguez Velázquez y Rodolfo Domínguez Velázquez,

Quiero expresarles mi más sincero agradecimiento por el inmenso apoyo que me brindaron durante todo el proceso de culminación de mi tesis. Su presencia constante, palabras de aliento y confianza inquebrantable fueron fundamentales para alcanzar este importante logro en mi vida académica. Su dedicación y respaldo incondicional me impulsaron a superar los desafíos y dificultades que surgieron en el camino.

Asimismo, deseo extender mi gratitud al Dr. Roberto Arenas Guzmán, la Dra. Alma Cuéllar Sánchez y la Dra. Edith Díaz Cabrera por ser mis mentores en esta trascendental etapa de mi formación académica. Su sabiduría, orientación y paciencia fueron de un valor incalculable. Gracias por compartir su conocimiento y por brindarme la oportunidad de aprender de ustedes.

También quisiera reconocer a mis amigos, y en particular a Luz Elena Miranda Martínez y Luis Enrique Morales Márquez, por haberse convertido en los padrinos de mi tesis. La amistad y apoyo moral durante este proceso fueron realmente significativos. El aliento constante y la confianza que depositaron en mí me motivaron a dar lo mejor de mí mismo.

Erika Fabiola Hernández Rodríguez, quiero agradecerte por tu dedicación y por creer en mí, así como en nuestro proyecto. Tu presencia y apoyo han marcado una gran diferencia en mi vida académica y personal. Siempre estaré agradecido por todo lo que has hecho por mí.

En resumen, no tengo palabras suficientes para expresar mi gratitud hacia cada uno de ustedes. Me siento verdaderamente afortunado de contar con una familia, mentores y amigos tan maravillosos.

Con todo mi corazón, les agradezco profundamente por haber estado a mi lado en este importante logro. Espero poder devolverles algún día todo el apoyo y amor que me han brindado.

Con gratitud eterna,
Joel Alejandro Domínguez Velázquez

ÍNDICE

Contenido

1. Introducción	13
2. Marco teórico	14
2.1 Los hongos.....	14
2.2 Composición de los hongos microscópicos	14
2.3 Metabolismo fúngico.....	16
2.4 Onicomycosis	17
2.5 Factores de riesgo.....	19
2.6 Prevalencia.....	19
2.7 Antecedentes históricos	20
2.8 Agentes causales	20
2.8.1 Levaduras.....	20
2.8.2 Mohos no dermatofitos.....	20
2.8.3 Dermatofitos.....	21
2.9 Diagnóstico.....	22
2.9.1 Técnicas de diagnóstico de onicomycosis	22
2.9.2 Región ITS.....	23
2.10 Diversidad genética	24
2.11 Tratamiento	24
2.11.1 Terbinafina	25
2.12 Resistencia fúngica en onicomycosis	25
3. Marco de referencia	26
3.1 Región de estudio	27
4. Planteamiento del problema	27
5. Justificación	29
6. Objetivos	29
6.1 Objetivo general	29
6.2 Objetivos específicos.....	29
7. Diseño de la investigación	30
7.1 Tipo de estudio.....	30
7.2 Universo de estudio.....	30
7.3 Población de estudio.....	30
7.4 Tamaño de muestra.....	30
7.5 Sede y lugar de estudio	30
7.6 Criterios de inclusión.....	30

7.7 Criterios de exclusión	31
8. Metodología.....	31
8.1 Diagrama general de trabajo.....	31
8.2 Instrumentos de medición.....	33
8.3 Muestreo.....	33
8.4 Indicaciones al paciente	33
8.5 Condiciones del recolector y toma de muestra.....	33
8.6 Transporte y recolección.....	34
8.7 Examen directo	34
8.8 Cultivo.....	34
8.9 Microcultivo.....	34
8.10 Técnica de Rush-Munro.....	35
8.11 Resiembra.....	35
8.12 Liofilización.....	35
8.13 Extracción de ADN.....	35
8.14 Electroforesis	36
8.15 Amplificación de la región ITS.....	36
8.16 Reacción de la cadena polimerasa (REP-PCR).....	37
8.17 Purificación de ADN.....	38
8.18 Antifungigrama	38
8.19 Árbol filogenético.....	39
9. Resultados y discusión de resultados.....	41
9.1 Epidemiología.....	41
9.2 Factores de riesgo.....	42
9.3 Formas clínicas	43
9.4 Examen directo	44
9.5 Microcultivo.....	47
9.6 Biología molecular.....	50
9.7 Antifungigrama	52
9.8 Árbol filogenético.....	53
10. Conclusiones	54
11. Anexos	55
12. Bibliografía.....	60

1. Introducción

La onicomycosis es una infección ungueal más frecuente y crónica (Lladó, et al.2017) causada por hongos, sin embargo, es la enfermedad menos atendida y diagnosticada por las principales instituciones de salud. La onicomycosis es una enfermedad de alta frecuencia en zonas calurosas y tropicales (Mendoza, et al, 2012). México destaca por su diversidad climática; clima tropical, seco, templado y frío polar, siendo los factores ambientales, sociales y políticos, parte fundamental en el diagnóstico y tratamiento de la onicomycosis. En tiempos actuales, las dermatofitosis se tratan bajo un diagnóstico determinado por la manifestación clínica, dejando a un lado los resultados emitidos por el laboratorio clínico. El diagnóstico de la onicomycosis requiere de una confirmación de laboratorio, pues, el tratamiento tiene como factor la identificación de la especie causante de la afección (Gupta et al, 2020). En casos específicos, la onicomycosis provocada por hongos dematiáceos, el tratamiento convencional, sea oral o tópico, resulta pobre, debido a la resistencia ante los fármacos. Gupta y colaboradores (2003), en una revisión bibliográfica sobre tratamientos aplicados a pacientes con onicomycosis con agentes causales a; *Scopulariopsis* donde los pacientes interrumpieron tratamiento por daño hepático y no mostraba mejoría, con *Aspergillus* la mayoría presentaba mejoría después de 6 meses de tratamiento y con *Candida* se lograba recuperar la uña tras meses de tratamiento.

En este trabajo, se aislaron hongos en pacientes que presentaron alteraciones en las uñas, guiados bajo los criterios clínicos para onicomycosis. Cada paciente informó sobre las condiciones de vida que ayudan a predecir el origen de la enfermedad. En principio se realizó examen directo con negro de clorazol para determinar si el origen del daño en la uña es por hongo o en su defecto por algún otro factor.

El aislamiento de los agentes causales se realizó en medios de cultivo agar Mycosel, que inhibe el crecimiento de algún posible contaminante de la muestra o laboratorio. Las condiciones de crecimiento se realizaron a temperatura ambiente, seguida de una observación morfológica a nivel microscópico, luego se prosiguió a una identificación molecular finalizando con pruebas de sensibilidad antifúngica a la terbinafina.

2. Marco teórico

2.1 Los hongos

Los hongos o *Eumycota* son una clase definida de microorganismos, la mayor parte de los cuales son formas de vida libre, que actúan como putrefactores en el ciclo energético (Ryan, 2017). Los hongos en base a su morfología los podemos clasificar en dos grandes grupos: mohos y levaduras. Los mohos varían en forma y tamaño, son multicelulares y forman hifas y las hifas forman una estructura filamentosa (Wickes et al, 2018) que a su vez forman micelio. El micelio tiene una estructura porosa, que se forma por la expansión de la punta apical de la hifa partiendo de una espora o inóculo (Fricker et al, 2007). Luego de una fase de crecimiento isotrópico, comienza una ramificación aleatoria (figura 1) que da origen a colonias arbóreas fractales. La densidad y topología de la red se controlan por las condiciones nutricionales y ambientales (Osman Erkmen, 2021). El micelio determina la morfología colonial de los hongos que puede variar de color y de consistencia de especie en especie, mientras que los hongos levaduriformes colonias mucoides regulares y redondas.

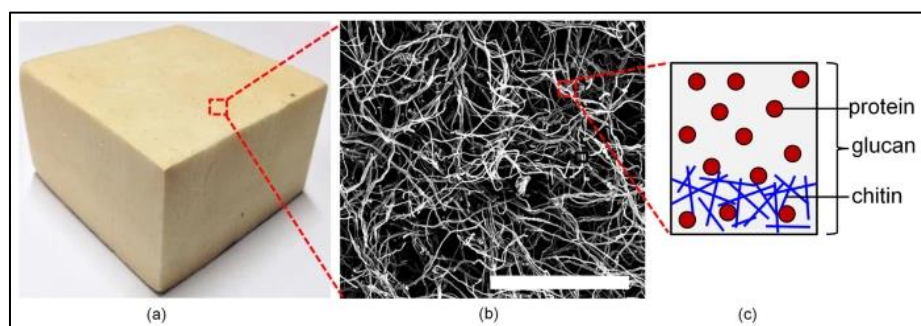


Figura 1. Micelio en varias escalas de longitud: (a) vista a macroescala (5 cm × 5 cm × 5 cm), (b) imagen SEM de la microestructura; barra de escala 100, y (c) esquema que muestra la estructura de la pared de una sola hifa (Osman Erkmen, 2021)

2.2 Composición de los hongos microscópicos

Los hongos son organismos eucariotas, conformados estructuralmente por quitina, manano y glucano. En la pared celular fúngica la matriz de quitina y glucano se entrecruzan, formando una matriz quitina/glucano, de la cual, la fracción de glucano contiene β 1,3-glucano como principal elemento, y β 1,6-glucano, α 1,3-glucano como otro tipo de glucanos secundarios (Free, 2013). En la figura 2 se muestra la estructura básica de la pared celular fúngica. La quitina conforma entre el 1% y el 15% de la masa de la pared celular de los hongos, donde las levaduras tienen alrededor del 1% a 2% de quitina, mientras que los mohos poseen 15% de quitina (Free, 2013). La quitina se sintetiza por la quitina sintasa asociada a la membrana plasmática. Las enzimas necesitan UDP-N-acetilglucosamina contenido al lado del citoplasma de la

membrana, para utilizarlo como sustrato en la síntesis de moléculas de quitina lineal. (Free, 2013). La cantidad de proteína contenida en los hongos filamentosos está conformada entre 20% a 30% de la pared celular en masa (Bowman et al, 2006). Las proteínas más comunes en la pared de los hongos son las glicoproteínas. Dentro de sus funciones, es dar mantenimiento a su forma, ayudan en los procesos de adhesión en caso de unión a células huésped, también sirven de protección frente a sustancias extrañas y transmisión de señales (Pontón, 2008).

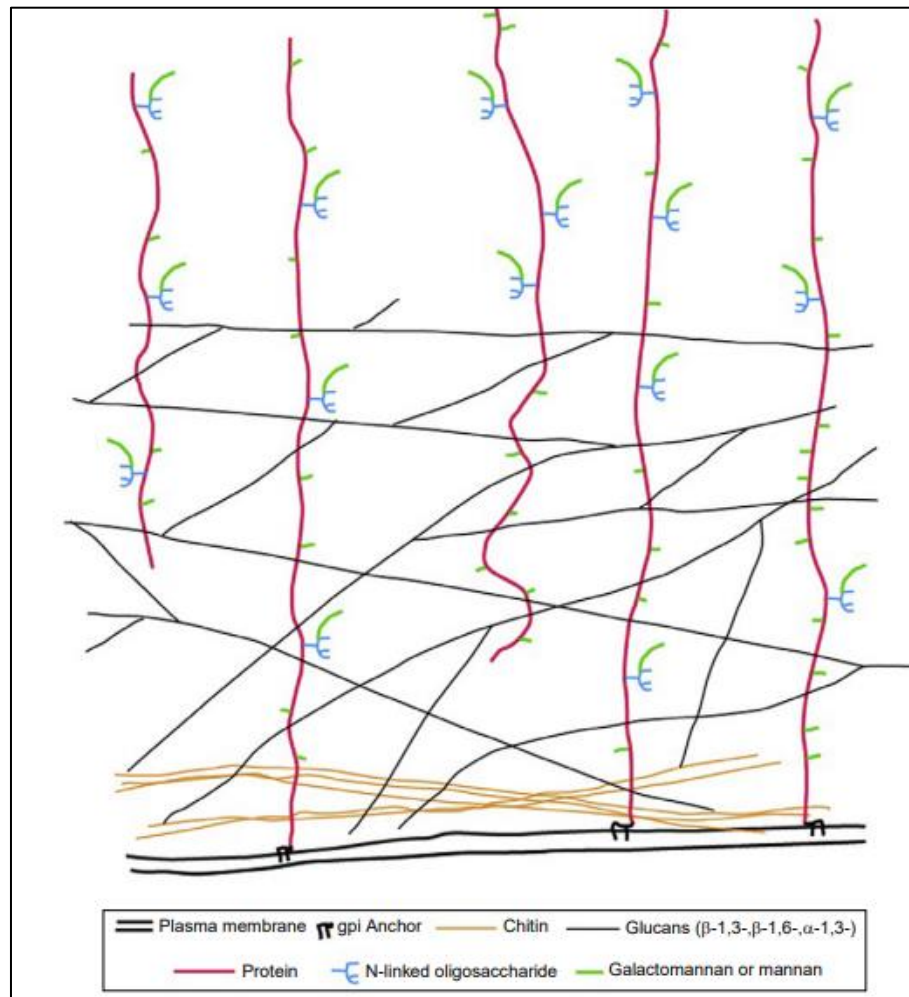


Figura 2. Estructura básica de la pared celular fúngica. (Free, S. J., 2013)

2.3 Metabolismo fúngico

El metabolismo fúngico se basa en procesos aerobios o anaerobios facultativos, además de ser organismos heterótrofos, ya que no son capaces de hacer sus propios nutrientes (Trujillo, 2020). Su nutrición está basada en absorción de sustancias simples o complejas, a comparación de las bacterias, los hongos son capaces de utilizar azúcares complejos como fuente de energía (Trujillo, 2020). Los elementos que requieren en concentraciones milimolares son: el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio; los micronutrientes suministrados en concentraciones micromolares, comprenden oligoelementos como calcio, hierro, cobre, manganeso y zinc (Walker et al,2017). En la Tabla 1 muestras los elementos requeridos y su función en los hongos. Muchos hongos necesitan vitaminas que pueden estar presentes en las impurezas de la peptona y del azúcar o en ocasiones en medios de cultivos (Arenas y Torres, 2020. Micología Médica Ilustrada).

Tabla 1. Requerimientos nutricionales de los hongos. (Walker et al,2017).

Elemento	Fuentes comunes	Función celular
Carbono	azúcar	Fuente de energía. Elemento estructural de células fúngicas en combinación con H, N y O.
Hidrógeno	Protones de ácido en el ambiente.	Fuerza motriz de protones transmembrana vital para la nutrición fúngica. Mantenimiento de pH ácido intracelular necesario para el metabolismo fúngico.
Oxígeno	O ₂ , aire	Sustrato para vías respiratorias. Función de enzimas oxidativas. Síntesis de ergosterol y ácidos grasos insaturados.
Nitrógeno	NH ₄ ⁺ , sales, urea, aminoácidos.	Estructural y funcionalmente como nitrógeno amino orgánico en proteínas y enzima.
Fósforo	Fosfatos	Traducción de energía, ácidos nucleicos y estructura de membrana.
Potasio	K ⁺	Equilibrio iónico. Actividad enzimática.
Magnesio	Mg ⁺	Actividad enzimática, estructura celular y de organelos.
Azufre	Sulfatos y metionina	Aminoácidos sulfidril y vitaminas
Hierro	Sales férricas. Fe ³⁺ es quelado por	Hemoproteínas y citocromo.

	sideróforos y liberado como Fe^{2+} dentro de la célula	
Cobre	Sales cúpricas	Pigmentos redox.
Manganeso	Mn^{2+} , sales	Actividad enzimática
Zinc	Zn^{2+} , sales	Actividad enzimática

2.4 Onicomycosis

De las más de 90 000 especies de hongos conocidas, menos de 200 se han reportado como causantes de enfermedades en humanos. Estos trastornos tienen características clínicas y microbiológicas singulares y se le denomina micosis (Ryan, 2017). Las micosis o tiña son las infecciones ocasionadas por organismos pertenecientes al reino fungí y para su estudio se dividen en dos grupos, micosis superficiales y micosis profundas (Saúl, 2015). Las micosis superficiales afectan principalmente la queratina de la piel. Las tiñas superficiales se clasifican de acuerdo con el sitio de parasitación de los dermatofitos, su frecuencia de presentación es la siguiente: Tiña de la cabeza 4-10%, del cuerpo (piel lampiña) 15%, de la ingle 4%, de la mano 2%, de los pies 30-45%, de las uñas (onicomicosis dermatofíticas) 30% (del Carmen Padilla, 2003).

La palabra onicomycosis proviene del griego *onyx* y *mykes* que significa uña y hongo, respectivamente (Marín et al, 2019)). La onicomycosis es la infección de la uña causada por hongos, y estos pueden ser de tres especies diferentes: dermatofitos, mohos o levaduras (Totosa y Sánchez-Regaña, 2011). El agente etiológico más importante de esta enfermedad es *Trichophyton rubrum* (Carrillo-Dover et al, 2009). Las infecciones por dermatofitos restantes son causadas por *Epidermophyton floccosum*, especies de *Microsporum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton soundanense*, *Trichophyton kraidenii*, *Trichophyton equinum* y especies de *Arthroderma* (Leung et al, 2020).

La onicomycosis presenta cinco formas clínicas: onicomycosis subungueal distal y lateral (figura 3), aquí, el hongo inicialmente invade el hiponiquio y luego progresa hasta afectar la parte inferior del borde libre distal de la lámina ungueal (Zaias, 1992). Onicomycosis blanca superficial (figura 3), se caracteriza por una localización superficial de hongos en la superficie dorsal de la placa ungueal (Piraccini y Tosti, 2004). Onicomycosis subungueal proximal (figura 3), aquí la uña presenta una coloración blanquecina en su tercio proximal, con afectación de la matriz y, en ocasiones, hiperqueratosis subungueal u onicolisis (González-López et al, 2017).

Endonyx onicomycosis (figura 3), afecta la superficie interna de la placa ungueal sin inflamación del lecho ungueal, onicolisis o hiperqueratosis subungueal (Bunyaratavej et al, 2015). Onicomycosis distrófica total (figura 3), es la forma más grave de la

onicomicosis, donde la superficie de la uña está difusamente engrosada, friable y amarillenta. (Gupta et al, 2020).



Figura 3. Formas clínicas de onicomicosis. A) Onicomicosis subungueal lateral distal del dedo gordo del pie. Coloración amarillenta (Torres-Sangiao et al, 2006). B). Onicomicosis blanca superficial por *Trichophyton interdigitale* infección. Pequeñas manchas blanquecinas, opacas y friables se extienden sobre la superficie (Piraccini y Tosti, 2004). C) Onicomicosis subungueal proximal en primer dedo del pie derecho (González-López et al, 2017) D) Coloración blanca lechosa de la superficie de la uña sin cambios en la superficie en la onicomicosis endonyx (Bunyaratavej et al, 2015). E) Onicomicosis total: la lámina ungueal está completamente invadida por hongos y friable (Gupta et al, 2020).

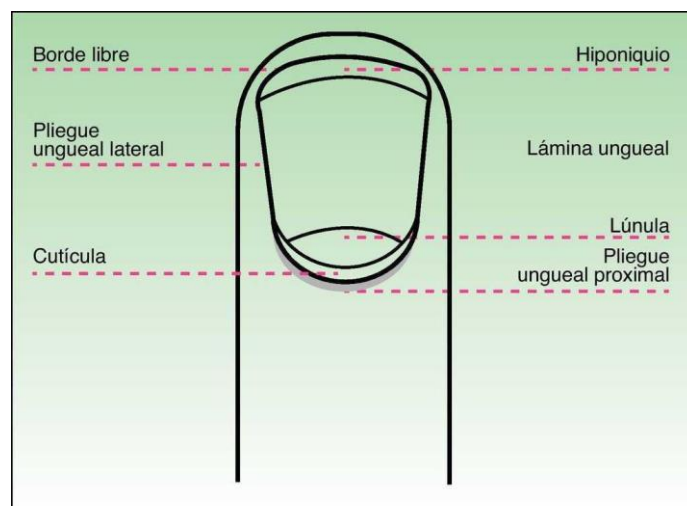


Figura 4. Esquema que muestra los elementos anatómicos del aparato ungueal en una visión frontal. (Martin, B. ,2013)

2.5 Factores de riesgo

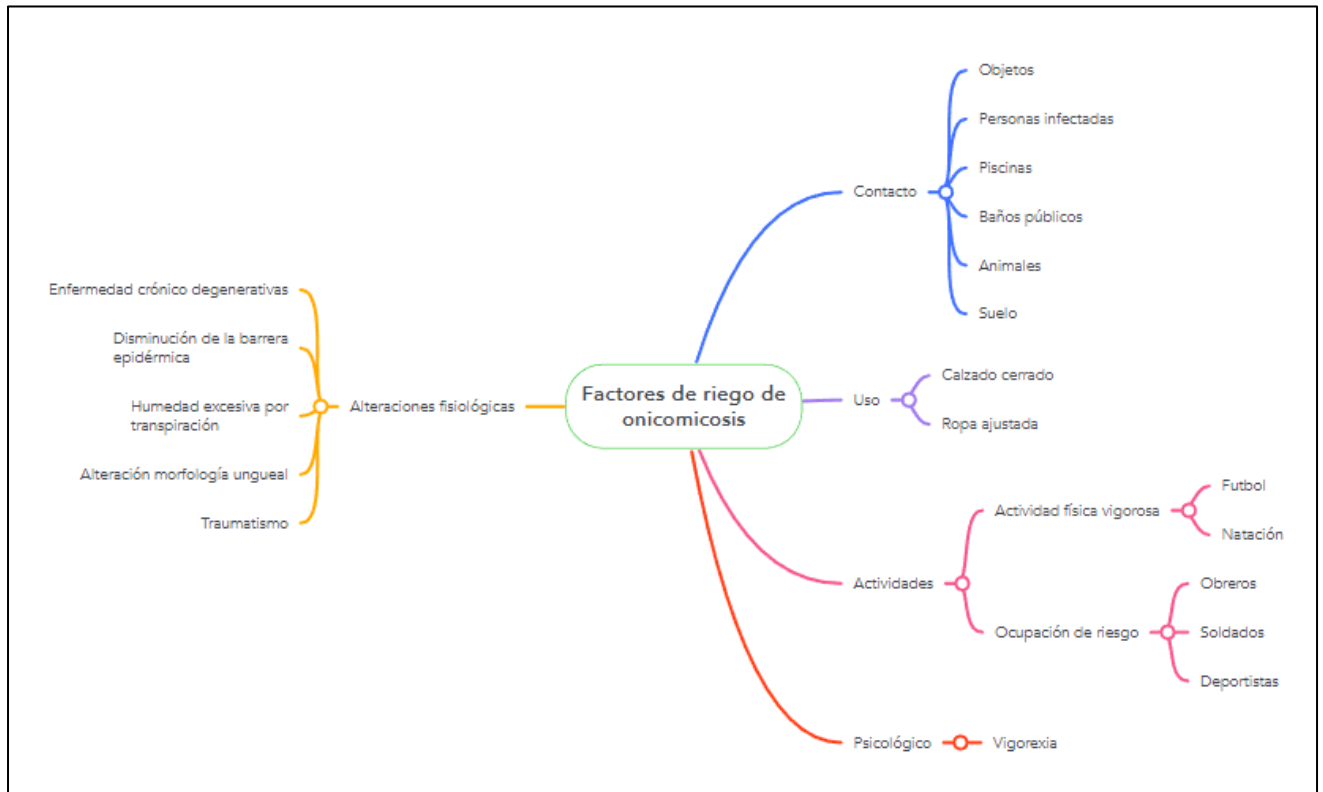


Figura 4. Factores de riesgo en onicomycosis. La onicomycosis puede ser causada por factores tales como alteraciones fisiológicas, por contacto, por determinadas actividades o de alguna índole psicológica.

2.6 Prevalencia

La onicomycosis es la enfermedad más frecuente de las uñas, representa de 18% a 50% de todas las onicopatías, y 30% de las infecciones de piel, se estima una prevalencia de 3 a 13.8% en la población general (Lladó et al, 2017). Aproximadamente el 10% de la población general, el 20% de la población mayor de 60 años, hasta el 50% de las personas mayores de 70 años y hasta un tercio de los diabéticos tienen onicomycosis (Thomas et al, 2010).

En cuanto al sexo, Arenas, R. (2002) informan que los hombres resultan más afectados en la mayoría de los estudios, aunque en un reciente trabajo se reportó que la onicomycosis por levaduras es más común en mujeres, mientras que en varones era más común la infección por dermatofitos. Esta enfermedad es menos común en niños que en adultos, con una prevalencia promedio menor a 2% probablemente debido a un menor contacto con el hongo (Cortés et al, 2020).

El envejecimiento de la población, el aumento del uso de medicamentos inmunosupresores, el aumento de la prevalencia de enfermedades subyacentes (VIH y diabetes) que suprimen el estado inmunitario de los pacientes, el aumento de la exposición a spas y piscinas públicas, el uso de zapatos ajustados para la moda se ha reconocido como un factor para el aumento de las micosis (Bitew y Wolde, 2019)

2.7 Antecedentes históricos

En 1853, la onicomycosis fue descrita e informada por primera vez por Meissner, un estudiante de medicina alemán (Thomas et al, 2010). Las infecciones de las uñas y pliegues ungueales causadas por levaduras del género *Cándida* fueron descritas por Dubendorfer entre 1904 y 1910 (Rippon JW., 1990). La micosis microsporia se describió en 1842 y la tricofitia en 1845 (Götz H, 1962), mientras que Sabouraud hizo una descripción clínico-micológica de las enfermedades producidas por dermatofitos, denominando tiña ungium a la infección de las uñas por estos microorganismos (Ballesté et al, 2003)

2.8 Agentes causales

2.8.1 Levaduras

Las levaduras siguen en frecuencia a los dermatofitos y son responsables de 5% a 17% de las onicomycosis en general (Ballesté et al, 2003). La especie más frecuentemente aislada según Cabañes (2018) es *Candida albicans*; aunque esta especie forma parte de la flora normal y no se encuentra habitualmente colonizando la piel puede encontrarse en condiciones específicas comúnmente asociado a inmunosupresión. Otras especies causantes de onicomycosis son *C. parasilopsis*, *C. guilliermondi*, *C. tropicalis*, *C. ciferrii*, *C. sake*, *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. krusei*, y *C. tropicalis* (Ballesté et al, 2003).

Las levaduras del género *Trichosporon* forman parte de la flora de piel y tracto digestivo. En 2011 se reportó el primer caso de onicomycosis causadas por este agente (Rizzitelli et al, 2016). Dentro del género, sólo ciertas especies son capaces de parasitar al hombre (Ballesté et al., 2003), especifican que dentro de ellas se encuentra *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon ovoides*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides* y *Trichosporon mucoides*.

2.8.2 Mohos no dermatofitos

Hobak y Gómez (2017) describen los mohos como agentes de onicomycosis en dos grupos: los mohos hialinos y los mohos dematiáceos. Estos pueden encontrarse asociados a dermatofitos y levaduras, en estos casos no se les da valor como agente causal y se les considera como contaminantes.

La frecuencia de onicomycosis por este grupo de hongos oscila según diferentes autores entre 1%-10% dependiendo de la región geográfica E Casanova-Claure (2018). Algunos mohos no dermatofitos que causan infecciones de las uñas incluyen especies de *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Onychocola canadensis* (Gupta et al, 2003).

2.8.3 Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo extenso y homogéneo de hongos con características taxonómicas, antigénicas, fisiológicas y patogénicas similares, distinguiéndose entre sí por sus características macroscópicas y microscópicas (Sánchez-Saldaña et al, 2009). Hay (1989) describe a los dermatofitos como hongos filamentosos, septados y hialinos, cuyas hifas penetran en el estrato córneo de piel y uñas produciendo proteasas queratinolíticas que les permite invadir estas células. Los dermatofitos que causan enfermedad se han descrito ampliamente, dentro de los géneros universales se encuentra; *Trichophyton*, *Paraphyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Ctenomyces* y *Guarromyces* (de Hoog et al, 2017). En México los dermatofitos más frecuentes son (Trujillo, 2020):

Tabla 2. Frecuencia de hongos dermatofitos causantes de onicomycosis en México.

1	<i>Trichopyton rubrum</i>	70%
2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>T. interdigitale</i>	10%
3	<i>Microsporum canis</i>	13%
4	<i>Trichophyton tonsurans</i>	3%
5	<i>Epidermophyton floccosum</i>	1%

Estos microorganismos se pueden transmitir de persona a persona (organismos antropofílicos), otros viven y se transmiten a los humanos a partir del suelo (organismos geofílicos) y otros se disemina a través de animales (organismos zoofílicos) (Hainer, 2003).

Para aislar este tipo de agentes causales de onicomycosis, se debe extraer una muestra del sitio dañado, pero, dicho espécimen puede tener contaminantes, por lo que se utilizan medios con antibióticos (cloranfenicol y/o gentamicina) y cicloheximida junto con agar dextrosa Sabouraud, comercialmente Agar Mycosel (Larone, 1996). Cuando crecen en medios, los dermatofitos pueden producir tres tipos de conidios asexuales: macroconidios, microconidios y arthroconidios (Moskaluk y VandeWoude, 2022). En 2001 Guillot et al, demostraron que la temperatura ideal de crecimiento para dermatofitos es entre 24°C o 27°C.

2.9 Diagnóstico

Los exámenes micológicos clásicos siguen siendo las técnicas más baratas, las que ofrecen más información y se han mantenido como el estándar de oro. El examen directo conduce a un diagnóstico de presunción, mientras que el cultivo permite confirmar el diagnóstico e identificar el agente causal, aunque, a pesar de ello, la sensibilidad de estas técnicas no es del todo satisfactoria y se estima que los falsos negativos pueden alcanzar hasta el 30% (Fernández-Chico et al, 2008).

El Instituto Mexicano del seguro Social, en su guía de referencia rápida, describe los criterios de exploración para el diagnóstico de onicomycosis, los cuales son por:

1. Topografía. - uñas de manos y pies
2. Morfología. - paquioniquia (engrosamiento), estrías, fragilidad, cambios en coloración, onicolisis o hiperqueratosis subungueal.

En el diagnóstico con fines epidemiológicos según Mendoza y colaboradores (2012), es necesaria realizar pruebas de morfología colonial y microscópica con KOH al 10% para identificar las estructuras específicas de cada especie y hablando a un nivel más riguroso se pueden realizar pruebas bioquímicas y moleculares.

Durante la observación clínica es importante la consideración del diagnóstico diferencial, tal es el caso de:

1. Paroniquia crónica
2. Verrugas virales
3. Dermatitis crónica
4. Liquen planus
5. Psoriasis
6. Distrofia de las 20 uñas
7. Trauma por calzado o manipulación
8. Tumores

2.9.1 Técnicas de diagnóstico de onicomycosis

Además del método de cultivo existen diversos métodos para identificar el microorganismo causante de la onicomycosis. En la siguiente figura se muestran los diversos métodos en la actualidad.

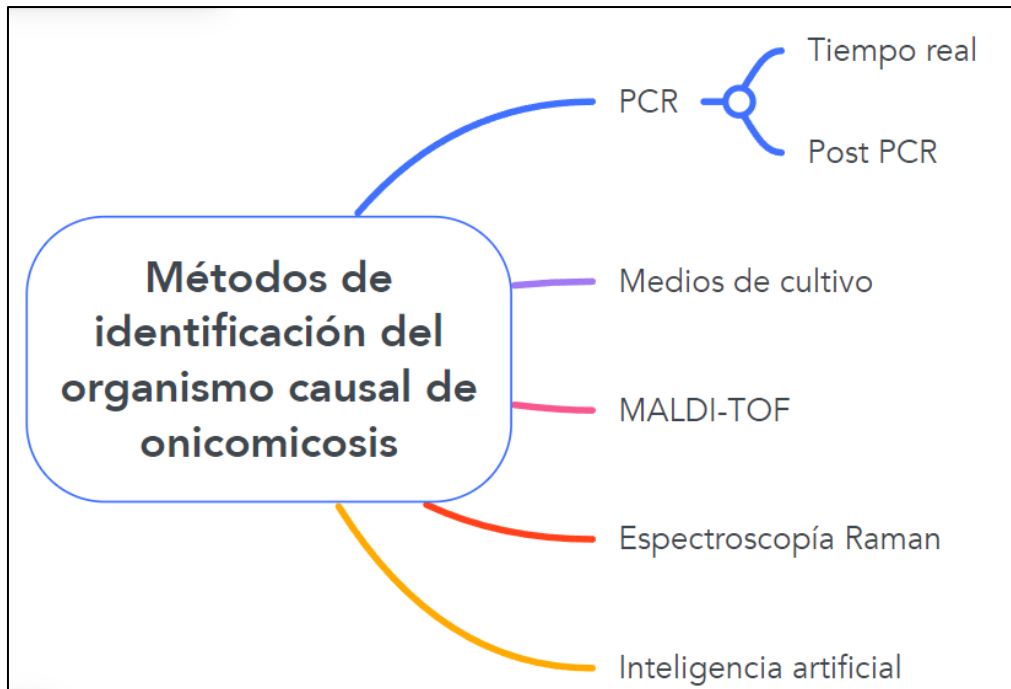


Figura 5. Métodos actuales utilizados para la identificación del agente causal de onicomicosis (Gupta et al,2022).

Durante mucho tiempo se ha utilizado los métodos micológicos convencionales por su bajo costo, sin embargo, su precisión diagnóstica del método oscila entre 50% y 70%, debido principalmente a contaminaciones (Petinataud et al, 2014). La biología molecular ofrece ahora herramientas para una sensibilidad superior, velocidad y precisión en el área diagnóstica. Dentro de las técnicas de biología molecular se menciona; PCR en tiempo real o post PCR (Watanabe y Ishida, 2017), siendo los métodos sencillos y aparentemente económicos en comparación con las otras técnicas.

La mayoría de los métodos basados en ADN usan PCR para amplificar secuencias específicas de hongos de ADN ribosómico u otros genes conservados. Algunos de las secuencias utilizados son: secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 28S rRNA y/o el espaciador transcrito interno (espacios intergénicos ITS1 e ITS2 que incluyen al gen 5.8S) que ahora permite a muchos laboratorios identificar especies con precisión (Kurtzman, 2014).

2.9.2 Región ITS

Es la región más utilizada en PCR ya que tiene una organización conservada en el genoma de todos los eucariotes, también tiene un gran número de copias lo que facilita su amplificación y contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S), lo que ha permitido un fácil diseño de iniciadores (Tovar et al, 2004).

El gen ribosomal 28S es una región polimórfica del gen ribosomal, cuyo extremo 5' es otro punto de identificación por ser más informativo debido a su variabilidad.

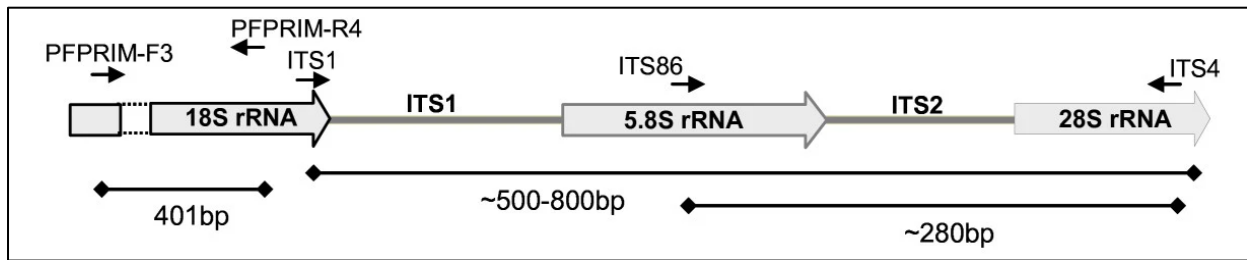


Figura 6. Representación esquemática del gen 18S rRNA ribosomal fúngico y regiones ITS con ubicaciones de unión de cebadores. ITS- Región espaciadora transcrita interna (Embong et al, 2008).

2.10 Diversidad genética

La REP-PCR es una técnica denominada huella genómica basada en secuencias repetitivas (rep)-PCR, se basa en amplificación mediada por PCR de secuencias de ADN ubicadas entre secuencias repetidas intercaladas específicas en genomas procarióticos (Louws et al, 1998). Usando estas secuencias ha sido posible, discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (López-Ramírez 2018).

2.11 Tratamiento

El tratamiento por onicomicosis suele ser difícil. Se deben considerar algunos factores antes de iniciar el tratamiento, como gravedad, microorganismo causal, medicamentos que recibe el paciente, edad, enfermedades concomitantes, preferencia del paciente, número de uñas afectadas, localización, subtipo clínico y otros factores pronósticos (Mendoza et al, 2012). Actualmente existen tres estrategias farmacológicas, tratamiento oral, tratamiento tópico y terapia combinada.

El tratamiento oral consiste en itraconazol, fluconazol o terbinafina por tiempos que van de los seis a los nueve meses. El itraconazol puede usarse de dos formas: 200 mg a diario después del desayuno por tres a seis meses, o en forma de pulsos: 400 mg diarios (cuatro tabletas) por siete días, descanso de tres semanas, tratamiento por tres meses. El fluconazol se usa a dosis de 150 mg cada ocho días por 30 a 40 semanas, la terbinafina 250 mg al día también por tres a seis meses (Saúl ,2015).

Dentro del tratamiento tópico, las lacas, son formulaciones que permiten la penetración hasta la lámina ungular (Carrillo-Muñoz et al., 2010). Para aumentar la penetración de los fármacos tópicos se hace por medio de oclusión, o se elimina la queratina infectada mediante extirpación quirúrgica parcial, limado continuo de la

lámina ungueal, o bien la aplicación de removedores químicos, como la urea al 40% (vaselina, 25 g; lanolina, 25 g; cera blanca, 10 g, y urea, 40 g), o la combinación, disponible en el comercio, de bifonazol al 2% y urea al 40% en un vehículo muy aceptable desde el punto de vista estético (Guzmán ,2019).

En la terapia combinada, es frecuente la combinación de antifúngicos tópicos (tioconazol, amorolfina o ciclopirox) y sistémicos (terbinafina o itraconazol). Diversos estudios señalan que son más eficaces estos tratamientos combinados que cualquiera de sus componentes en monoterapia (Fernández-Chico et al, 2008).

2.11.1 Terbinafina

La terbinafina es una alilamina sintética (figura 7), estructuralmente similar al fármaco tópico naftifina. Actúa inhibiendo el escualeno epoxidasa fúngica y de esta manera reduce la biosíntesis de ergosterol.

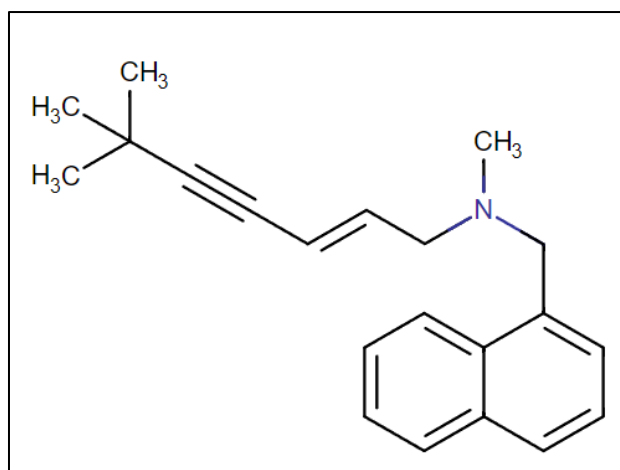


Figura 7. Estructura química de la terbinafina (Drugbank, número de acceso DB00857)

La terbinafina se absorbe bien, pero la biodisponibilidad es de 40%, aproximadamente, debido al metabolismo de primer paso en el hígado. El fármaco se acumula en la piel, las uñas y el tejido adiposo. La vida media inicial es de aproximadamente 12 h pero se extiende hasta 200 a 400 h en estado de equilibrio (Hilal-Dandan y Brunton, 2015, Manual de farmacología y terapéutica).

2.12 Resistencia fúngica en onicomycosis

La resistencia antifúngica se clasifica en resistencia clínica o microbiológica. La resistencia clínica se define como la falta de inhibición de un microorganismo en el sitio de infección, relacionado con diferentes factores como el fármaco o el paciente, mientras que la resistencia microbiológica es dada por las características del microorganismo y se subdivide en primario o intrínseco (García-Effron, 2021).

Recientemente han surgido dermatofitosis resistentes al tratamiento causadas por *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton indotineae* como un problema de salud pública mundial (Sacheli y Hayette, 2021).

En el año 2003, Murkherjee y colaboradores registraron el primer caso de resistencia primaria a la terbinafina en un paciente con onicomicosis con agente causal: *Trichophyton rubrum*. En el caso de *Trichophyton*, la resistencia alberga mutaciones en SQLE (Rogers et al, 2022).

3. Marco de referencia

Camacaro y De Arbeloa (2019) mencionan que desde 1906 cuando se describió por primera vez la tiña unguium se ha buscado la forma de tratar adecuadamente estas infecciones, cuyo reto principal se ha vuelto evitar la reincidencia de estas colonizaciones pues en la gran mayoría de los pacientes se ha encontrado una reinfección después de haber concluido con el tratamiento.

A través de la historia se ha logrado identificar a los agentes causales de la también llamada onicomicosis, Brillowska-Dabrowska (2007) encontraron que tanto hongos filamentosos como levaduriformes y mohos pueden afectar la epidermis produciendo descamación y un aspecto poco estético de la uña afectada, lo que en realidad es el síntoma más incómodo de la infección, acompañada de comezón y engrosamiento de la uña además de un cambio de coloración.

Legarraga et al (2013) señalan que gracias a la innovación de las técnicas para la identificación de hongos y levaduras se pudo diferenciar por morfología microscópica obtenida mediante el examen en fresco con hidróxido de potasio al 10% y la tinción con azul de algodón, pues estas pruebas arrojaron que los hongos que colonizaron el área infectada tenían esporas puntiagudas septadas y un micelio hialino típicas de *Trichophyton rubrum* el hongo filamentoso más común en cuanto a infección se refiere.

Si bien la descripción morfológica de género y especie de los agentes causales deberían ayudar a ofrecer un tratamiento más específico. Para Garmedia et al (2008) la realidad es que el tratamiento para la onicomicosis, generalmente se receta de manera indiscriminada para cualquier agente causal, además de que no se ha avanzado demasiado con los estudios genéticos moleculares en comparación con otro tipo de microorganismos patógenos que quizás representan un riesgo mayor para la salud pública.

La falta de especificidad en cuanto a tratamiento se refiere, es el factor más importante mediante el cual la reinfección o reincidencia se presenta de manera total en los casos de onicomicosis sin importar edad, sexo o raza, sin dejar a un lado que en algunos países ha empezado a registrar resistencia en hongos dermatofitos.

El tratamiento debe ser dirigido al tipo de microorganismos identificado, ya sea hongo filamentoso o levadura, puesto que cada uno responderá de manera diferente a cierto principio activo, debido a que su metabolismo y composición varía de especie en especie. El proceso adecuado debería ser una exhaustiva investigación sobre la necesidades metabólicas, estructurales y biológicas de cada especie, para administrar medicamentos más específicos de cada agente etiológico, lo que se reflejaba en una disminución en la reincidencia de la onicomycosis.

3.1 Región de estudio

San Jerónimo Xayacatlán, corresponde a un municipio del Estado de Puebla, ubicado en la parte centro-sur del Estado (paralelos 18° 07'30" y 18° 21'00" de latitud norte y los meridianos 97° 52'36" y 97° 58'36" de longitud occidental). Cuenta con una superficie de 142.48 km². Se identifican dos tipos de clima; semicálido subhúmedo con lluvias en verano distribuido en las zonas montañosas del norte y suroeste. Clima cálido subhúmedo con lluvias en verano distribuido en la zona centro.

El municipio cuenta con 2 juntas auxiliares y 10 inspecciones (Figura 8). La comunidad tiene como actividad económica principal la siembra de maíz, frijol y calabaza. Otras actividades laborales comunes son la albañilería y el comercio de frutas por temporada.

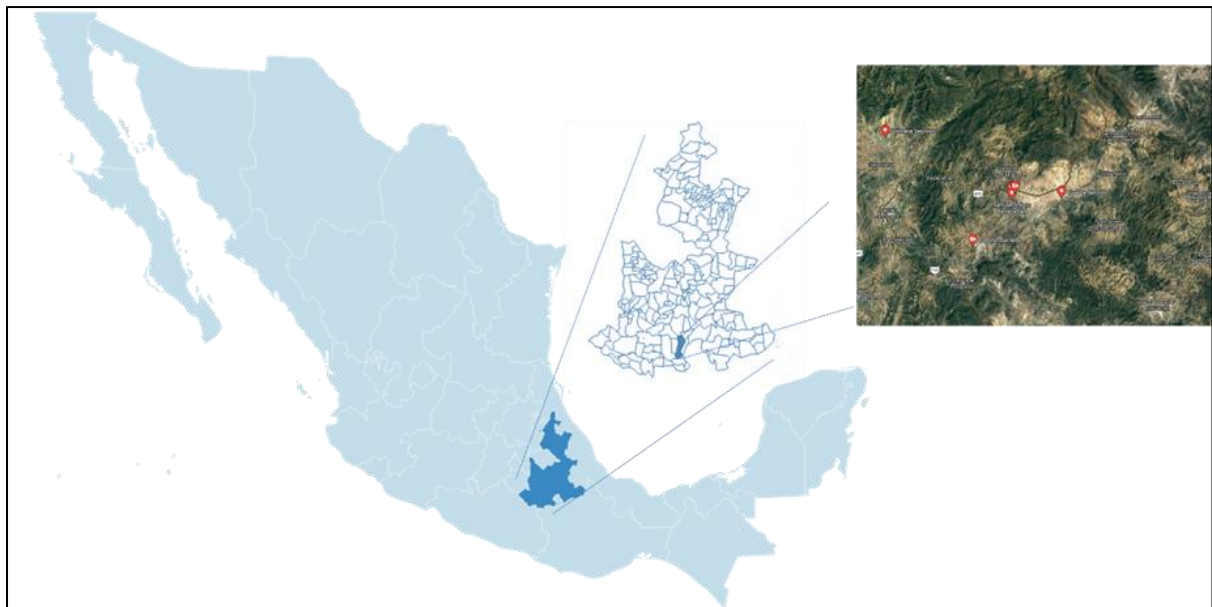


Figura 8. Ubicación de San Jerónimo Xayacatlán (Estado de Puebla, México).

4. Planteamiento del problema

La identificación correcta de los hongos en la onicomycosis resulta importante para un tratamiento idóneo y a pesar de esto, 1 de cada 5 personas se cura (Ballesté et al,

2003). Antes de iniciar un tratamiento hay que tomar en cuenta muchos factores, tales como la gravedad, microorganismo causal, medicamentos que recibe el paciente, edad, enfermedades concomitantes, preferencia del paciente, número de uñas afectadas, localización, subtipo clínico y otros factores pronósticos, por tal se debe recabar información útil de la persona que complementa este panel informativo, de esta manera se alcanza una tasa de éxito alta en el tratamiento (Mendoza et al, 2012). Sin embargo, la búsqueda de atención a la salud no es frecuente, debido a la voluntad de las personas, el conocimiento que tengan sobre las cosas que les hacen enfermar o su interés por permanecer sanas, ya que una gran variedad de sucesos y fenómenos quedan fuera de su control y por ende sólo tienen como recurso el ajustarse a las circunstancias en que viven (Aburto López y Freyre Galicia, 2018).

Las comunidades rurales en situación de pobreza suelen ser las más propensas a contraer esta enfermedad, debido al constante contacto con lugares húmedos (Adams et al, 2015), así como la interacción con animales (Chang et al, 2022) y el total desconocimiento de un servicio de salud. Del mismo modo, se tienen registros que la población cuenta con altos índices de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes mellitus, insuficiencia renal o problemas cardíacos, situaciones que condicionan a las personas para ser infectados por hongos. Si estas condiciones de la comunidad favorecen la enfermedad, ¿Por qué no hay atención especializada en tratar este padecimiento? Las micosis no tienen el suficiente financiamiento público para tratarlas y prevenirlas. Esto hace que el costo de atención privada sea elevado. Un cultivo de uña oscila entre los 300 a 400 pesos, mientras un tratamiento con terbinafina cuesta alrededor de los \$1500.00 pesos. Todo esto sin contar los honorarios de atención privada. Por lo tanto, a una persona de bajos recursos, designar cierta cantidad de dinero por un problema ungueal no suele ser viable para su economía, dejando sin tratar su problema de salud, sin tomar en cuenta los daños fisiológicos, físicos, psicosociales y ocupacionales que conllevan (Adams et al, 2015). Esto ha generado que en regiones de pobreza como San Jerónimo Xayacatlán, no haya reporte alguno en el sector salud sobre casos diagnosticados de onicomiosis. Dicho esto, es importante reportar la frecuencia de la enfermedad para así lograr un impacto sobre la atención del sector salud.

Los microorganismos que se aíslan de las personas pueden proporcionar datos importantes sobre la variabilidad. Esta variabilidad permite identificar la supervivencia de la especie a largo plazo. Del mismo modo, podemos determinar la cercanía que tienen los hongos que parasitan a cada persona con esta enfermedad y de esta manera poder establecer formas de prevención. El hecho de que la población tenga como actividad primaria la agricultura, permite un contacto duradero con microorganismos que tienden a tener interacciones variables. Una de estas interacciones es su adaptabilidad a las condiciones climáticas por el exceso de calor, así como su interacción con fungicidas en los cultivos de plantas, que pueden generar resistencia en ciertas cepas. A todo esto, nos permitimos plantear si ¿existe actividad

antifúngica de hongos aislados de personas con onicomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán?

5. Justificación

La onicomicosis es una enfermedad que año tras año va en aumento, de la misma manera que ciertos factores predisponentes como enfermedades crónicas, inmunosupresión en las personas o cambio climático, por tal, debe ser atendida oportunamente para disminuir esas tasas altas de incidencia. Informar a la población sobre un estudio micológico resalta la importancia de este tipo de examen para el correcto diagnóstico de la onicomicosis. Para la comunidad, el sector salud puede replantear estrategias que permitan dar un mejor seguimiento a esta enfermedad, del mismo modo, favorecen a la recepción de fármacos contra los hongos de interés médico.

En una vida laboral, las personas que presentan onicomicosis pueden ser sometidas a ciertas consideraciones por ser un factor de posible contaminación, tal es el caso de aquellas que deben manipular alimentos, trabajadores de centros deportivos, estilistas, entre otras, que impide un desarrollo total de sus actividades. Las personas también reflejan daño emocional y social de gran impacto, siendo posible erradicar la vergüenza por ser señalados como personas con malos hábitos de higiene, mientras que no es un factor único. Sus compañeros adquieren el miedo a contraer la enfermedad a través de la persona, lo que se ve reflejado en su autoestima, alcanzando un aislamiento social y hasta laboral.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Demostrar la actividad antifúngica de hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas con onicomicosis de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla

6.2 Objetivos específicos

1. Identificación clínica de la onicomicosis
2. Identificación y análisis de las características epidemiológicas de cada persona.
3. Aislamiento e identificación fúngica, fenotípica y genotípicamente en personas con onicomicosis

4. Determinar la susceptibilidad fúngica a la terbinafina.

7. Diseño de la investigación

7.1 Tipo de estudio

Se efectuará un estudio observacional, experimental; casos y controles

Es un estudio observacional y descriptivo.

7.2 Universo de estudio

Habitantes de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla.

7.3 Población de estudio

Personas que presentan alteraciones de las uñas, de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla.

7.4 Tamaño de muestra

Se incluyeron 70 pacientes con alteraciones en las uñas, de manera aleatoria, y que cumplieron con los criterios de inclusión, de ambos sexos y con un rango de edad de 20 a 80 años.

7.5 Sede y lugar de estudio

Las muestras se obtienen de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla para posteriormente analizarlas y llevarlas al laboratorio. Los aislamientos y procedimientos microbiológicos se realizaron en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de la Secretaría de Salud ubicado en la Delegación Tlalpan de la Ciudad de México, en la Sección de Micología.

El diagnóstico molecular y antifungigramas se realizó en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Puebla.

7.6 Criterios de inclusión

Pacientes con alteraciones de las uñas y con diagnóstico clínico de onicomycosis.

7.7 Criterios de exclusión

Personas que no presenten alteraciones ungueales.

8. Metodología

Se invitó a los pacientes a participar en el estudio. Se les leyó y se les dio a firmar un consentimiento informado.

Anexo al documento se llenó una encuesta que permite identificar el tipo de daño en las uñas, así como predecir el origen de onicomycosis. Seguido a esto se identifica la morfología a través de diversos métodos y técnicas en el laboratorio.

8.1 Diagrama general de trabajo

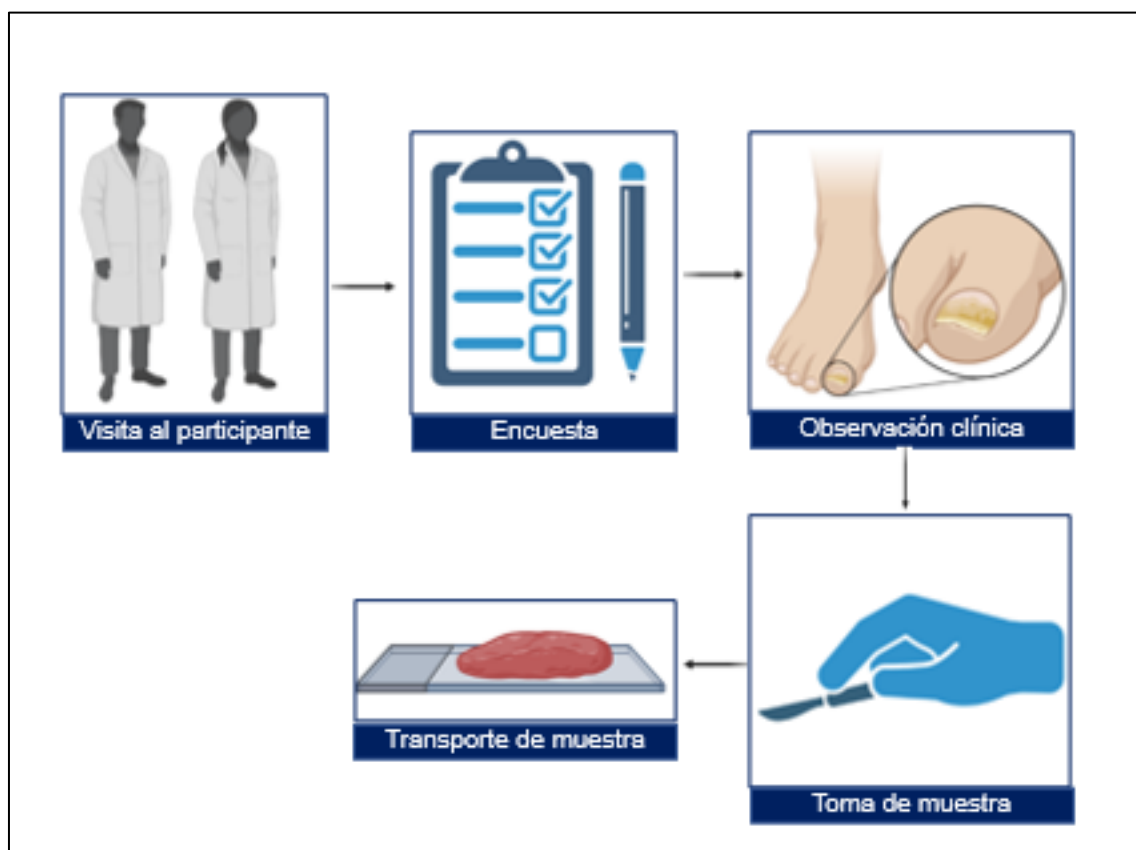


Diagrama 1. Procedimiento para toma de muestra y obtención de datos epidemiológicos y examen directo.

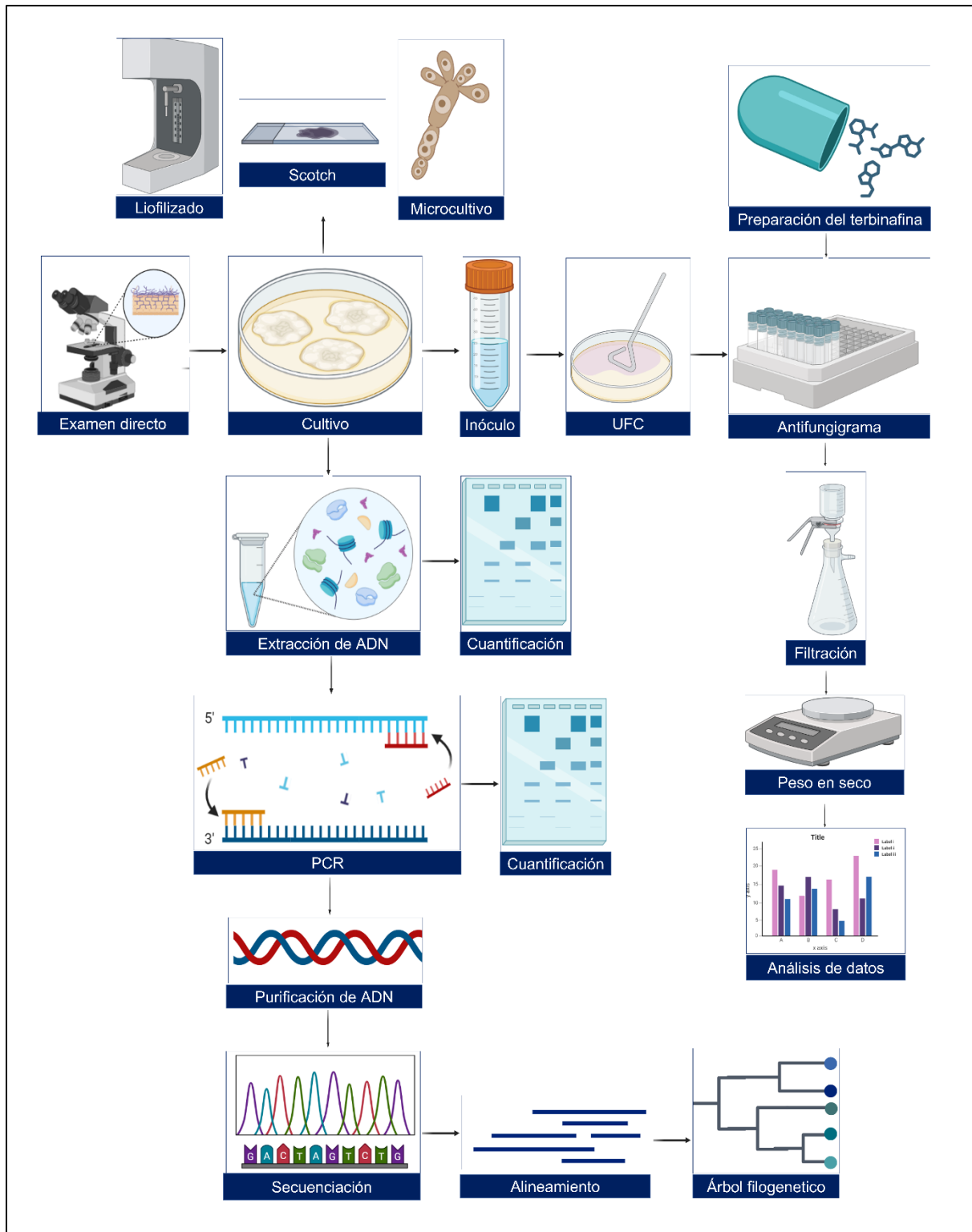


Diagrama 2. Diagrama de trabajo para PCR, antifungigrama y elaboración de árbol filogenético.

8.2 Instrumentos de medición

Se aplicó un cuestionario que principalmente contiene cuatro aspectos:

- I. Epidemiología
- II. Factores de riesgo
- III. Formas clínicas
- IV. Datos del laboratorio

La epidemiología consideraba las variables de edad, sexo, nivel de escolaridad y ocupación.

Dentro de los factores de riesgo incluyó preguntas para las variables: trauma en los pies, uso de medicamentos esteroides, enfermedad adjunta, actividades al aire libre, uso compartido de fómites, exposición a lugares con agua corriente o contenida, contacto con animales, uso de calzado cerrado por más de 5 horas al día y si lleva o no algún tratamiento actual.

Las formas clínicas de incluyen las subungueal dada por forma distal, lateral o proximal, blanca superficial, blanca proximal subungueal, distrófica total y mixta.

Datos del laboratorio se indicaron las preguntas que orientan al resultado en el examen directo con negro de clorazol, así como la determinación del agente etiológico.

8.3 Muestreo

Para la recolección de las muestras, es importante considerar varios puntos importantes. Las muestras deben estar debidamente recolectadas, identificadas y transportadas, así como procesarse lo antes posible después de llegar al laboratorio (Murray et al, 2007)

8.4 Indicaciones al paciente

La persona debe suspender todo tipo de medicación antifúngica tópica durante un lapso no inferior a 5 días antes. Suspender el uso de remedios caseros, talcos, tinturas y otras sustancias que enmascaran la presencia, inhiben o alteran la viabilidad de los hongos. Las uñas deben estar en condiciones higiénicas y no deben estar pintadas.

8.5 Condiciones del recolector y toma de muestra

La persona para realizar la toma de muestra debe estar capacitada ante cualquier situación que pueda ocurrir. De la misma manera, debe tener las medidas de bioseguridad necesarias para evitar la contaminación de las muestras y, sobre todo,

el cuidado personal de su salud. La toma de muestra comienza con una limpieza del dedo y la uña con una torunda embebida de agua y jabón (para eliminar suciedad y polvo), se espera el secado para proseguir con otra limpieza usando alcohol al 70% en la placa ungueal descolorida o distrófica. Al final con la navaja de bisturí se hacen cortes de 2 a 3 mm de espesor aproximadamente y se recolectan en un portaobjetos cubierto con papel vegetal (Leelavathi y Tzar, 2011).

8.6 Transporte y recolección

La muestra obtenida por raspado se recogerá entre las dos laminillas, sellando los bordes con cinta adhesiva transparente para evitar la pérdida del material y envolviéndolos en papel albanene de material vegetal. Conservar a temperatura ambiente.

8.7 Examen directo

El examen directo de las muestras se realizó con negro de clorazol, el cual es un colorante biológico, utilizado para observar hongos en estado parasitario, ya que es selectivo para la quitina, sustancia presente en las hifas, las cuales se tiñen sobre un fondo oscuro. Se toma en cuenta las siguientes consideraciones al momento de observar la uña; evitar confundir hifas con artefactos, como burbujas de aire, restos de algodón, polen, entre otros objetos que pueden parecerse a las levaduras e hifas.

8.8 Cultivo

Para el aislamiento del agente causal, el espécimen se sembró en agar mycosel por la técnica de punto, esperando el crecimiento a partir de los 8 días. En este medio de cultivo, la peptona y la dextrosa, son nutrientes para el desarrollo de microorganismos. Contiene cicloheximida, la cual inhibe el crecimiento de la mayoría de los hongos saprófitos, además, en su formulación hay cloranfenicol, un antimicrobiano de amplio espectro capaz de combatir bacterias Gram positivas y negativas, por lo que es considerado un medio selectivo.

8.9 Microcultivo

Esta técnica permite una mejor observación de la estructura fúngica. Para su realización, se monta en una caja petri de 100 mm una tapa de metal, sobre de ella un portaobjetos de vidrio. De una placa de agar mycosel vertida a 4mm de profundidad se corta un bloque de agar de 1x1 cm con un bisturí estéril. Se transfiere el bloque de agar Mycosel al centro del portaobjetos de vidrio y con un asa se inocula el hongo en los centros de los cuatro lados del bloque de agar y sobre de este se coloca un cubreobjetos, se agrega una solución de agua/ glicerol al 50% y se dejan en la

oscuridad. Una vez el crecimiento, se retira el agua/glicerol y se ponen 10 mL de formaldehído, durante 15 minutos permitimos la fijación y se tiñen para observar.

8.10 Técnica de Rush-Munro

La realización de esta técnica comenzó con hacer cortes de cinta adhesiva transparente y se pega en la parte terminal del asa micológica. Con cuidado se introduce el asa en el medio y se pasa la cinta sobre la colonia. Esta cinta se coloca en el portaobjetos que contiene previamente una gota azul de lactofenol.

8.11 Resiembra

Este procedimiento permite mantener la cepa en buenas condiciones para su utilización en procedimientos futuros. Utilizando un asa micológica se recolectó un fragmento de la colonia para luego depositarlo en placas con agar mycosel, almacenada a temperatura ambiente, en oscuridad y con un frasco de agua al lado para dar humedad al lugar. De igual forma se siembra una asada del crecimiento en el agar Mycosel y se siembra en caldo Dextrosa Sabouraud para la extracción de ADN.

8.12 Liofilización

La liofilización consiste en la eliminación del agua presente en una sustancia congelada. Este proceso partió con la elaboración de una solución protectora de leche semi descremada (tamariz) al 10%. Al vial de 2 mL se le agregó una asada de la colonia aislada en caldo dextrosa Sabouraud, junto con 0.4 mL de solución lioprotectora. Posteriormente se introdujo a congelación (-77.3 °C, Congelador Deep Freezer; DFU-558 CUS(S)). Las muestras congeladas se introdujeron en tubos de vidrio de liofilizador en campana de flujo laminar. Se montaron las muestras en el liofilizador (FreeZone 4.5; catálogo 7750021). Luego de 2 días se retiraron las muestras.

8.13 Extracción de ADN

El kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (D6005) está diseñado para el aislamiento simple y rápido del ADN de hongos difíciles de lisar, incluidos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, también como bacterias Gram positivas y/o negativas, algas y protozoos. El procedimiento es fácil y puede completarse en minutos. Las muestras de hongos y bacterias se lisan de manera rápida y eficiente.

En un inicio se obtiene una porción del micelio para suspender en agua estéril. La fracción del micelio es extraída a través de cortes finamente realizados. De esta

suspensión con micelio, que llega a los 200 microlitros, se pasa a un tubo de lisis (ZR BashingBead™) más, 750 µL de Buffer BashingBead™ para luego mezclar en un Vortex Mixer, con 3400 rpm, siendo su velocidad máxima, durante un tiempo de 5 minutos logrando así la ruptura de la pared fúngica. Post mezcla se centrifuga (Spectrafuge™ 24D) a 10000x g durante un minuto. Del tubo lisis ZR BashingBead™ se pasan 400 µL a un tubo de filtrado (Zymo-Spin™ III-F) colocado sobre un tubo recolector, seguida de otra centrifugación a 8000 x g durante 1 minuto. Al tubo recolector, donde se encuentra el filtrado, se le pone 1200 µl de Buffer de lisis genómica. Se obtiene una nueva mezcla, para luego transferir 800 µl a una columna Zymo-Spin™ IICR con su respectivo tubo de recolección y se centrifuga a 10000 x g por 1 minuto. Se desecha el sobrenadante del tubo de recolección y nuevamente agregamos 800 µL a la columna Zymo-Spin™ IICR, centrifugamos a 10000 x g por 1 minuto. Pasado esto, se elimina el tubo de recolección para colocar uno nuevo y así añadir a la columna Zymo-Spin™ IICR 200 µl de Buffer de prelavado de ADN; se centrifuga a 10000 x g por 1 minuto. Por último, se adiciona 500 µL de Buffer de lavado g-DNA en la columna Zymo-Spin™ IICR terminando con una centrifugación a 10000 x g durante 1 minuto.

8.14 Electroforesis

La electroforesis consiste en una técnica que permite la separación de biomoléculas según su movilidad y naturaleza en un campo eléctrico sobre una matriz porosa, es una de las técnicas de biología molecular más utilizadas ampliamente en el laboratorio, ya que a través de la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra.

El gel de agarosa para la electroforesis se prepara a partir de un 0.8.% de agarosa en 50 ml de tampón TAE (Tris, acetato, EDTA) 1x. Se monta el equipo de electroforesis (tanque electroforesis RELS-MIDI), en el primer pozo se le coloca 2 µL de RED (GelRed® Prestain Plus 6X DNA Loading) más 2 µL de marcador de peso molecular (Axygen® DNA LADDER 100BP), y en los siguientes pozos 8 µL de muestra mezclado con 2 µL de RED. La electroforesis se corre a 90 V por 1 hora.

8.15 Amplificación de la región ITS

Para cada reacción se depositan 25 µL de Dreamtaq PCR Mix, 1 µl del forward primer (ITS1; 5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'), 1 µL del reverse primer (ITS4; 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), 21.5 µL de agua libre de nucleasas y 1.5 µL de ADN por cada muestra. Se mezcla bien. Las condiciones del termociclador (Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax) se muestran en la figura 8 donde se dejó 1 hora para la reacción. A su finalización se realizó electroforesis para la observación del ADN amplificado.

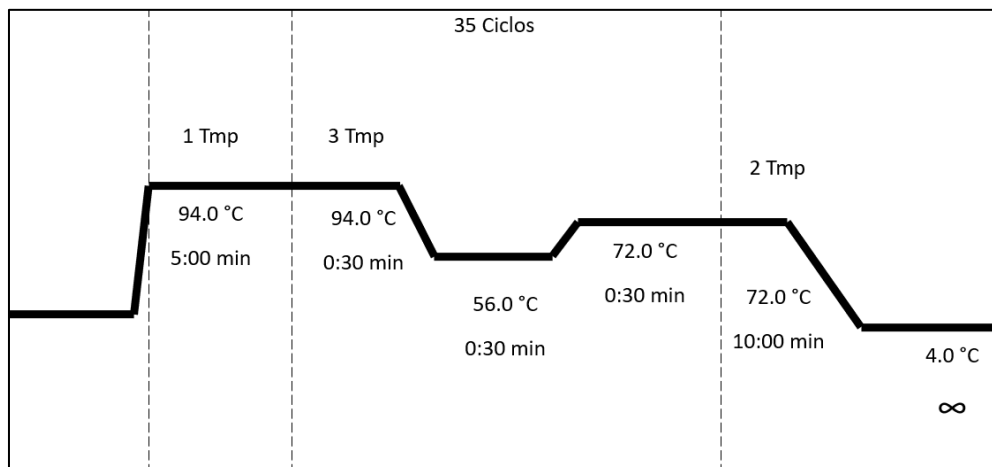


Figura 9. Esquema de PCR para la amplificación de la región ITS.

8.16 Reacción de la cadena polimerasa (REP-PCR)

Para cada reacción se depositan 25 µL de Dreamtaq PCR Mix, 1 µL del forward primer (REP1; 5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'), 1 µL del reverse primer (REP2; 5'-ICG ICT TTA TCI GGC TAC-3'), 21 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADN por cada muestra. Se mezcla bien. Las condiciones del termociclador (Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax) se muestran en la figura 9 donde se dejó 9 horas con 47 minutos para la reacción. A su finalización se realizó electroforesis para la observación del ADN amplificado.

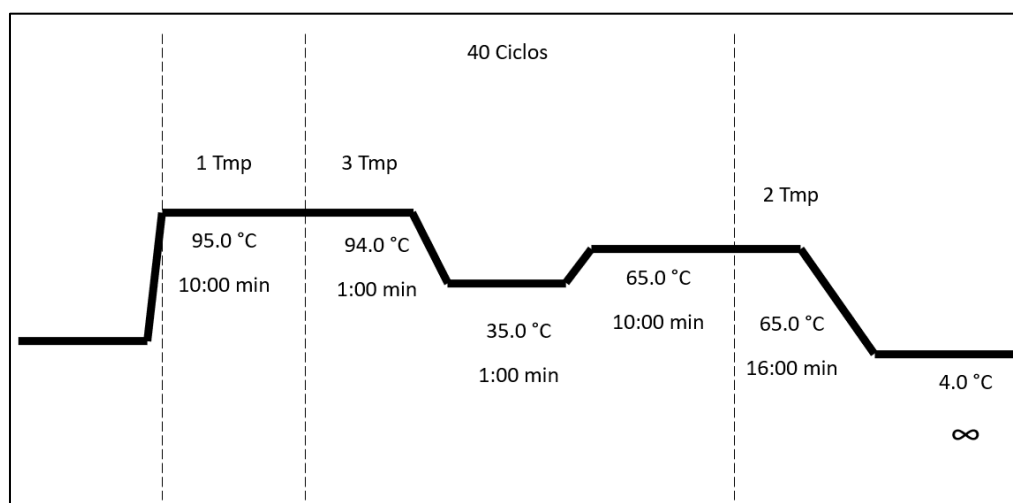


Figura 10. Esquema de PCR para la amplificación de las regiones conservadas.

8.17 Purificación de ADN

El wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System está diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de 100 pb a 10 kb de geles de agarosa estándar o de baja fusión o para purificar productos directamente de PCR y otras reacciones comunes, como digestos de restricción.

Los productos de PCR deben purificarse para sólo contener DNA, a estos productos se le agrega un volumen igual de solución de unión a membrana, para la muestra 1 añadimos 44 µl, y para las muestras 1 a la 7 se agrega 47 µl. El volumen total se traspa a una minicolumna SV con su respectivo tubo de recolección. Se mete a la centrífuga (Microcentrífuga de laboratorio Labnet Prism™ R) a 13500 x g durante 1 minuto, se elimina el flujo del tubo de recolección. Para el lavado del ADN, se agrega 700 µl de solución de lavado de membrana y centrifugar a 13500 x g durante un minuto, se elimina el flujo del tubo de recolección. Se hace nuevamente otro lavado, pero ahora la centrifugación es de 5 minutos. Se vacía el tubo de recolección y se lleva a centrifugar por un minuto sin la tapa de la microcentrífuga. Para la elución transferimos cuidadosamente la columna a un tubo limpio eppendorf de 1.5 ml, se le agrega 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna, se deja incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugamos a 13500 x g durante un minuto. Se desecha la minicolumna y se almacena el ADN. Se cuantifica el ADN en el Nanodrop.

8.18 Antifungigrama

Se trituró una tableta de terbinafina 250 mg en un mortero. La tableta se disuelve en 78.12 ml de alcohol etílico, se mezcla. Luego se esteriliza por medio de filtración con un filtro de 20mm. La concentración de esta solución es de 3200 µg.

De la solución madre se toman 1.5 µL y se disuelven en 20 mL de alcohol etílico, se mezcla. Se obtiene una concentración de 0.125 µg/mL. Se conserva en refrigeración.

Se toma una asada del cultivo sembrado en caldo Dextrosa Sabouraud y se introduce en 10 mL de agua esteril. Se mezcla en el vortex por 15 segundos.

Después de esto se toma 1 mililitro de la suspensión y se introduce en otro tubo con 9 mL de agua, así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10⁻³. En la figura se muestra las diluciones que se realizaron. De la dilución 10⁻³ se siembran 1000 µL en placas con agar Dextros Sabouraud para la cuantificación de las UFC.

El montaje de antifungigrama fue con la concentración por duplicado, un control positivo y un control negativo para cada muestra. En tubos con 10 ml de agar papa Dextrosa se agregan 2000 µL de inóculo para control positivo, para el tubo control negativo agregamos 250 µL de antifúngico a 0.125 µg/ml y en los tubos de duplicado añadimos 3000 µL de inóculo más 1000 µL de antifúngico. Se observan los medios cada día hasta observar crecimiento.

Luego de observar el crecimiento en los tubos de control positivo se procede a obtener el peso en seco de cada muestra.

En charolas de metal se coloca un filtro de fibra de vidrio con diámetro de 47 mm para pesarla en la balanza analítica y así obtener el peso. Con el equipo de filtración se pasan los tubos con su contenido, al cabo de unos minutos se retira el papel filtro con su respectiva charola para colocar en la estufa a 100°C.

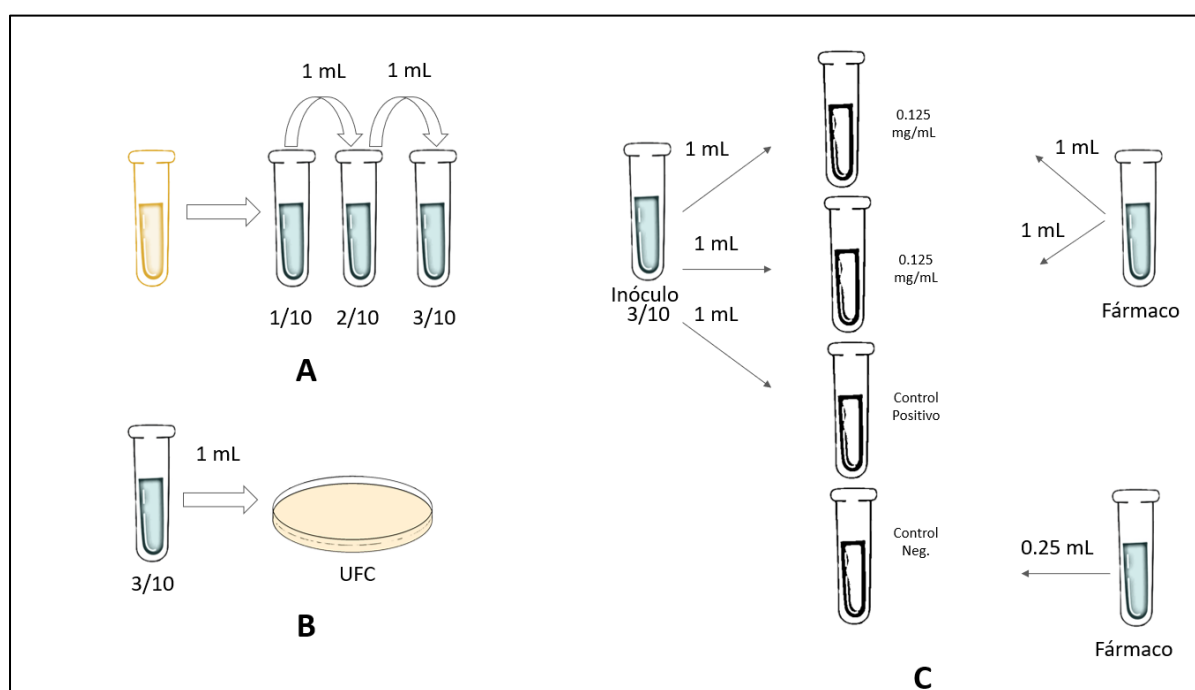


Figura 11. A) Preparación de inóculo. B) Contabilización de UFC. C) Serie de tubos por muestra.

8.19 Árbol filogenético

Se tomaron varias cepas de la base de datos del NCBI con amplificación del gen 18s. En la tabla 2 y 3 se muestran las cepas utilizadas. Estas secuencias se copian en un archivo Word para luego copiarlo en block de notas y guardarlo con la extensión txt. Las secuencias con archivo txt se sometieron a la aplicación Clustal X2 para realizar alineamiento. Luego se selecciona la prueba de Bootstrap con un número de réplicas de 1000. Se descarga el archivo en formato phb. El documento se abre en MEGA7 y se obtiene el árbol filogenético.

Tabla 3. Cepas obtenidas del National Center for Biotechnology information

Microorganismo	Número de cepa	pb
<i>Trichophyton tonsurans</i>	144891.1	606
<i>Trichophyton interdigitale</i>	144900.1	639
<i>Trichophyton simii</i>	103706.1	720
<i>Trichophyton erinacei</i>	149340.1	675
<i>Keratinophyton indicum</i>	145203.1	646
		645
<i>Keratinophyton evolceanui</i>	159740.1	
<i>Keratinophyton hubeiense</i>	173359.1	599
<i>Beauveria asiatica</i>	111596.1	555
<i>Beauveria caledonica</i>	077147.1	575
<i>Beauveria varroae</i>	111599.1	556
<i>Wardomyces anomalus</i>	146268.1	622
<i>Wardomyces inflatus</i>	146270.1	585
<i>Acaulium acremonium</i>	146260.1	563
		534
<i>Acaulium retardatum</i>	170022.1	
<i>Acaulium peruvianum</i>	170021.1	551
<i>Scopulariopsis cordiae</i>	132958.1	647
<i>Scopulariopsis</i>	156620.1	597
<i>alboflavescens</i>		
<i>Scopulariopsis fusca</i>	145258.1	642
<i>Aphanoascus mephitalis</i>	154665.1	586
<i>Aphanoascus jingzhouensis</i>	158334.1	602
		585
<i>Aphanoascus verrucosus</i>	131309.1	
<i>Agaricus sylvaticus</i>	144984.1	684

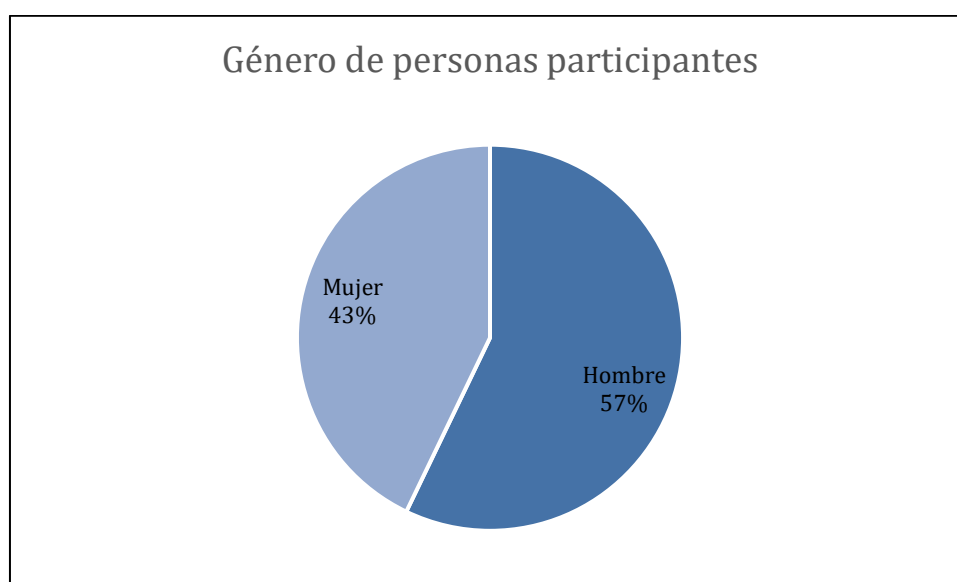
Tabla 4. Cepas secuenciadas.

Microorganismo	pb
M1. <i>Trichophyton rubrum</i>	603
M2. <i>Trichophyton rubrum</i>	640
M3. <i>Aphanoascus verrucosus</i>	543
M4. <i>Trichophyton rubrum</i>	645
M5. <i>Trichophyton rubrum</i>	636
M6. <i>Beauveria Bassiana</i>	522
M7. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	578

9. Resultados y discusión de resultados

9.1 Epidemiología

En la gráfica 1 se muestra que, el 43% de personas corresponden a mujeres, es decir, 30 de los participantes. El 57% está dado por hombres con un total de 40 personas. De los 12 casos positivos, 8 personas son hombres y 4 son mujeres. La participación de las personas fue voluntaria por lo que el género fue obtenido aleatoriamente. El género es un punto importante ya que Arenas, R. (2002) reporta que esta enfermedad es más frecuente en hombre que en mujeres.



Gráfica 1. Relación porcentual de hombres y mujeres.

Munguia-Perez y colaboradores en el 2018 realizaron un estudio sobre la diversidad etiológica de onicomycosis en Puebla, y el conjunto de personas que más analizaron fueron aquellos que realizaban actividades en agricultura, trabajadores del hogar y estudiantes. Nuestra encuesta indica que la mayoría de nuestra población son campesinos, seguidos de amas de casa y, en tercer lugar: albañiles (Tabla 5). Aunque las actividades se clasifican, las amas de casa suelen realizar tareas que realizan los campesinos, desde cortar pasto, recolectar leña, siembra de algunas semillas en su propio patio. Por otra parte, los participantes cuentan con otros factores predisponentes (tabla 5) en la adquisición de la enfermedad, como es el caso del contacto a suelos, traumatismo, compartir fómites entre otros. Dichos factores son reafirmados por Thomas y colaboradores (2010).

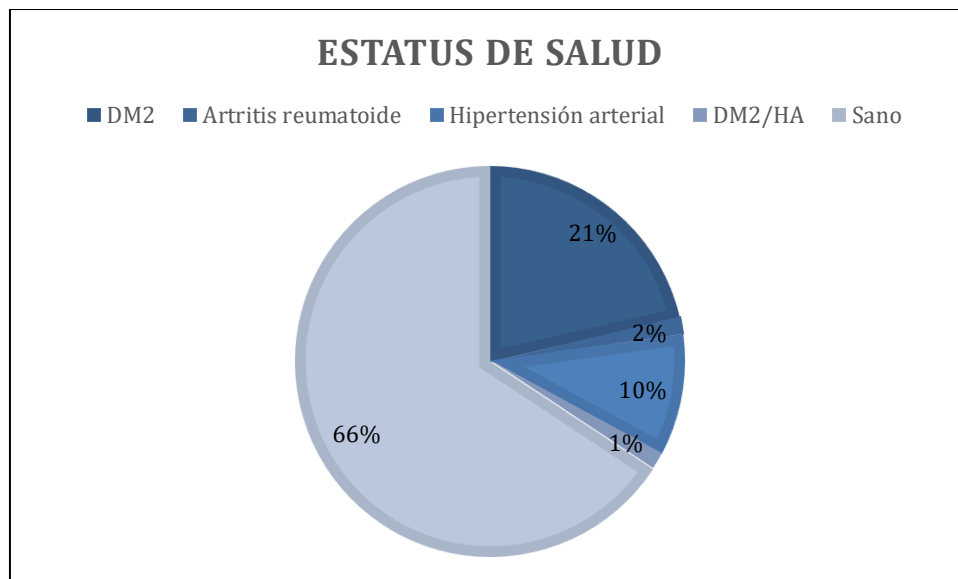
Tabla 5. Factores de riesgo tomados en cuenta para selección de participantes

Oficio	
Albañil	9
Ama de casa	26
Comerciante	4
Campesino/a	27
Profesionista	2
Estudiante	1
Carpintero	1
Contacto con animales	
Contacto	66
No contacto	4
Exposición a suelos o baños	
Exposición	61
No exposición	9
Traumatismo	
Si	22
No	48
Fómites compartidos	
Si	33
No	37

9.2 Factores de riesgo

Del total de personas entrevistadas, solo 12 arrojaron un resultado positivo a onicomycosis. El 50% de las personas presentaba como factor de riesgo una enfermedad crónica actual y diagnosticada, como se muestra en la gráfica 2. Dentro de esas enfermedades están el Diabetes mellitus tipo 2, artritis reumatoide, hipertensión arterial y la mezcla de Diabetes mellitus con hipertensión arterial. Un estudio realizado en el Hospital General de México “Dr Eduardo Liceaga” indicó las

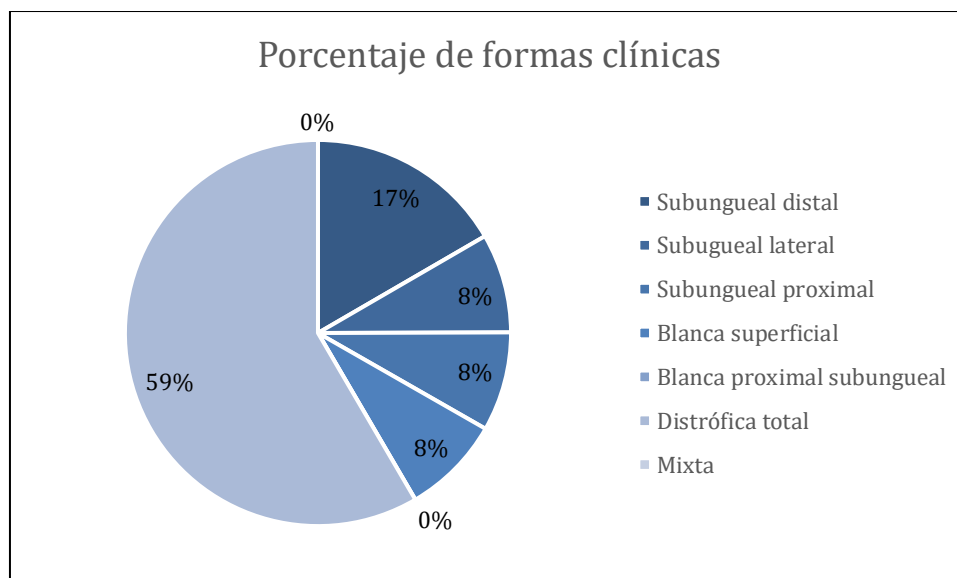
comorbilidades más frecuentes en la onicomycosis, dentro de las que destaca Hipertensión arterial y Diabetes mellitus, que a menudo complican los resultados del tratamiento y afectan la calidad de vida (Araiza-Santibáñez et al, 2016).



Gráfica 2. Enfermedades crónicas asociadas a onicomycosis en personas de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla. DM: Diabetes mellitus tipo 2. DM2/HA: Diabetes mellitus tipo 2/Hipertensión arterial.

9.3 Formas clínicas

Dentro de las formas clínicas, la más común encontrada en los pacientes fue una distrofia total de la uña, correspondiente al primer dedo del pie tanto izquierdo como derecho. Arenas y colaboradores en 2010 en una encuesta del sector privado a nivel Nacional encontraron que la mayoría de los pacientes ambulatorios atendidos, poseían daño en las uñas de los primeros dedos de los pies, así como de los pulgares. Las formas clínicas más comunes son la onicomycosis subungueal lateral y distal, onicomycosis subungueal proximal y onicomycosis blanca superficial. La frecuencia que más se tuvo en la encuesta fue una onicomycosis distrófica total, la cual, en su momento pudo ser una onicomycosis subungueal y llegó a la etapa más grave.



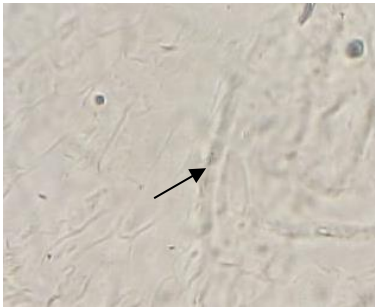
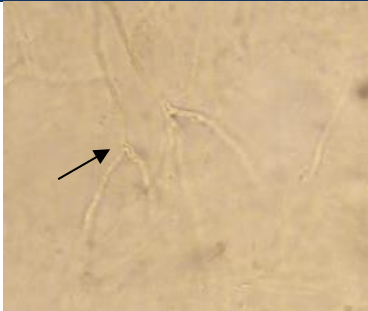
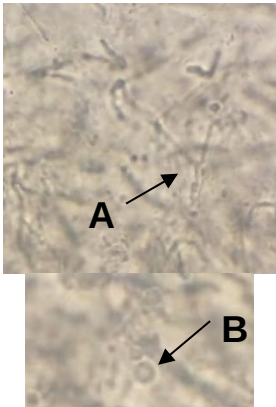
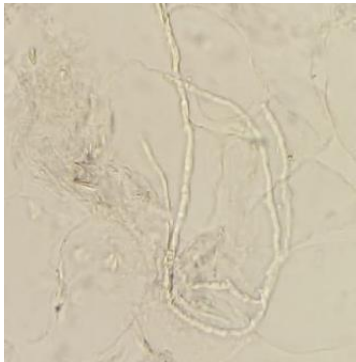
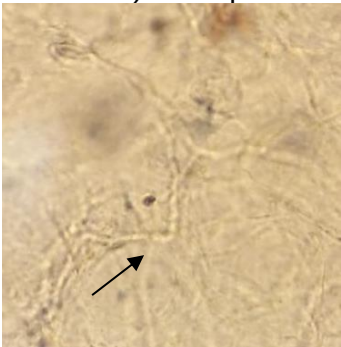
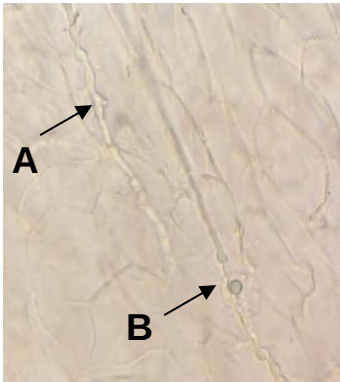
Gráfica 3. Representación de las formas clínicas presentadas por los pacientes con onicomycosis.

9.4 Examen directo

Uno de los estudios primordiales es el examen directo, pues ha continuado como el estándar de oro para el diagnóstico de onicomycosis, por lo que es importante realizarlo (Arreaza, 2008). Dentro del examen directo se logran observar varias formas de parasitación del microorganismo. En particular a los dermatofitos se les asocia con la presencia de artroconidios sueltos o en cadenas, así como hifas con o sin ramificación (Tangarife-Castaño et al 2015), aunque no siempre siguen este patrón. De acuerdo con nuestros resultados, en el examen directo sólo dos muestras presentaron artroconidios como (tabla 6), de las cuales sólo una muestra logró crecer en cultivo, identificado como dermatofito (figura 22), esto, debido a que las artrosporas se han asociado con el género *Trichophyton*. Por otra parte, la presencia de artrosporas a veces requiere un tratamiento con una dosificación elevada, que va de 10 a 100 veces más. La diferencia en la susceptibilidad entre microconidios y artroconidios depende del fármaco y de la cepa, y puede ser una de las causas del fracaso terapéutico (Coelho et al, 2008), por lo que suele ser una razón para evaluar la terbinafina en hongos que presentan la formación de artrosporas.

Nueve muestras mostraron la presencia de hifas hialinas, ramificadas y alargadas, mientras que 3 muestras sólo se observó una porción de hifa. Del total de participantes examinados, se obtuvieron 12 muestras positivas, con un crecimiento en medios de cultivo en un 58.3%.

Tabla 6. Resultados de examen directo en uñas con negro de clorazol

Número de participante	Resultado	Número de participante	Resultado
1	 Figura 11. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.	29	 Figura 16. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.
7	 Figura 12. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. A) Hifa presente en uña. B) Artrospora.	33	 Figura 17. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.
11	 Figura 13. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.	45	 Figura 18. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. A) Hifa presente en uña. B) Artrospora.

12

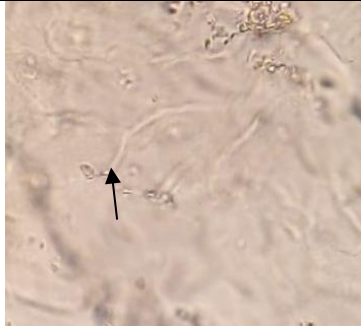


Figura 14. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

48



Figura 19. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

16

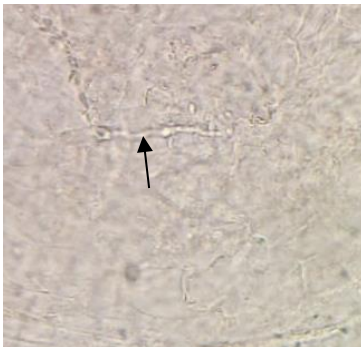


Figura 15. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

50

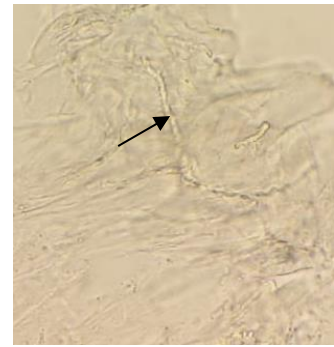


Figura 20. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

17

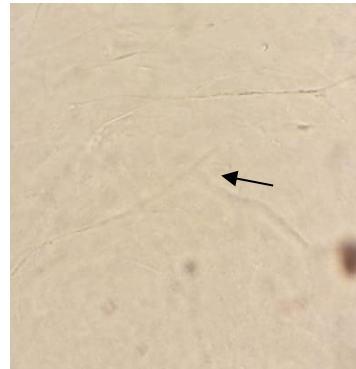


Figura 16. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

60

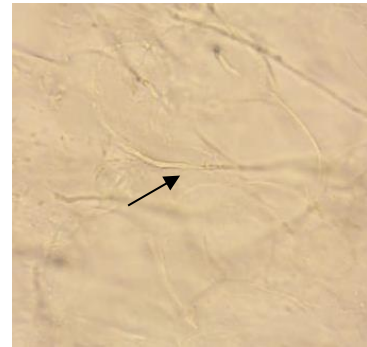


Figura 21. Objetivo 40 x, observación con negro de clorazol. Hifa presente en uña.

9.5 Microcultivo

Trujillo en 2020 describe al agente dermatofítico más común en México a *Trichophyton rubrum*, con un 70% en los casos de onicomiosis. En los resultados se puede observar que este agente ocupa hasta un 57% como agente causal y un 43% corresponde a agentes no dermatofitos. Los dermatofitos, en especial del género *Trichophyton rubrum*, se caracterizan por la pigmentación que proporciona al medio de cultivo, sin embargo, presenta variaciones en la pigmentación del cultivo debido principalmente a tres factores: el genoma, la epigenética y el medio ambiente. Oliver Blechert (2019) en su publicación menciona como *Trichophyton rubrum* presenta variaciones en la pigmentación al medio, fenómeno que depende de la fuente de energía que contenga cada medio de cultivo, ya que el hongo es capaz de manipular el pH del medio de cultivo, lo que le da la capacidad de generar cierto pigmento o no.

El agente no dermatofito más frecuente en México basados en el trabajo de Morales Cardona (2014) es *Scopulariopsis brevicaulis*, con una prevalencia de 1.5%, por lo tanto, es posible aislarlo en personas con esta enfermedad, en la figura 28 se muestra la colonia de *Scopulariopsis brevicaulis* aislado en la uña. Por otro lado, se identificaron otros mohos como *Aphanoascus verrucosus*. Un estudio realizado por Cano et al en 1991, demostró la actividad queratolítica de *Aphanoascus verrucosus* en cabello humano dicha investigación muestra su capacidad para utilizar la queratina como fuente de energía, lo que refleja capacidad para invadir y colonizar los tejidos queratinosos (Nosratabadi et al, 2017). Fatahinia y colaboradores (2017) realizaron un estudio epidemiológico de onicomiosis en la provincia de Juzestán, Irán, donde obtuvieron en sus cultivos a agentes causales no dermatofitos a *Aphanoascus verrucosus*, por lo que es reconocido como causante de onicomiosis. En la figura 24 se observa el cultivo de *Aphanoascus verrucosus*, identificado durante el estudio. Con respecto a *Beauveria Bassiana* (Figura 27) no se ha registrado como agente causal de onicomiosis, pero si se han descrito enfermedades asociadas a este hongo, como lo es queratitis, caracterizada por ser difícil de erradicar (Ducange et al, 2021). A pesar de esto, se han realizado investigaciones donde comprueban su actividad enzimática dirigida a queratina (Rodrigues Marcondes et al, 2008), reforzando así su capacidad de poder parasitar la uña.

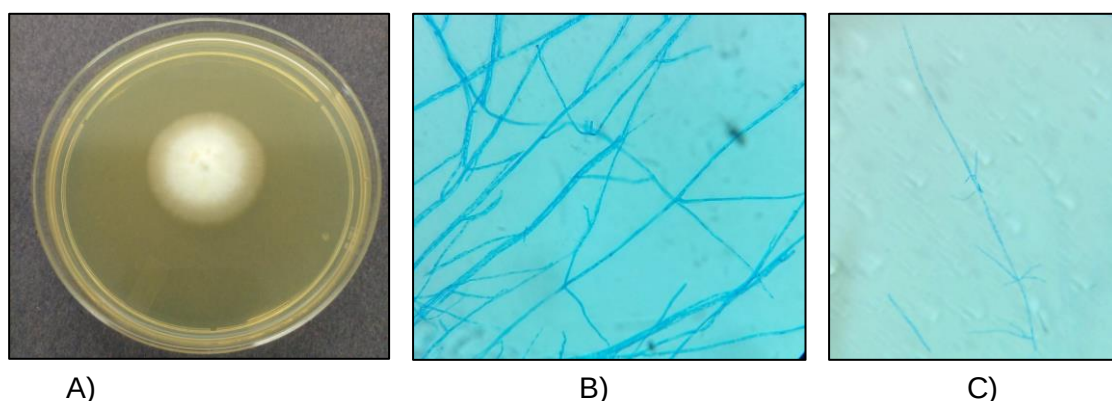
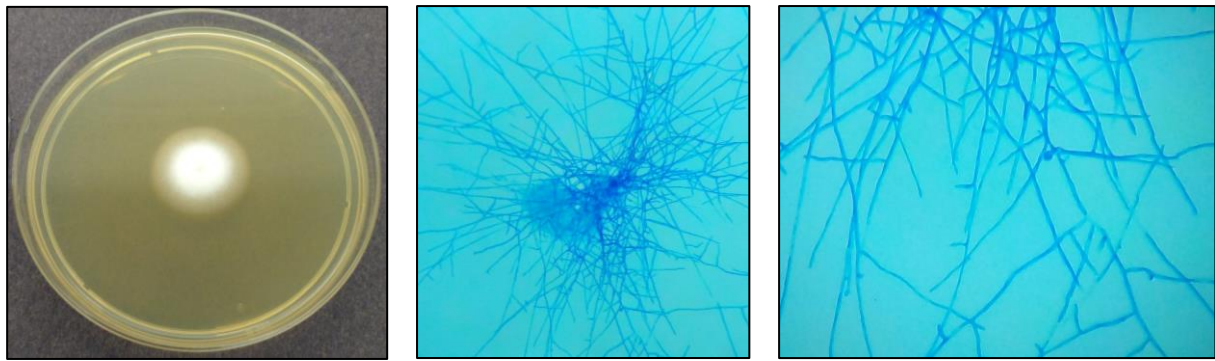


Figura 22. A) Descripción macroscópica de *Trichophyton rubrum* con 22 días de crecimiento en agar Mycosel. Colonia blanca vellosa, opaca, crecimiento radial sin pigmento al medio. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol, hifa hialina, con ausencia de macroconidios y microconidios. C) Objetivo 40X con azul de lactofenol, hifas tabicada y ramificada.



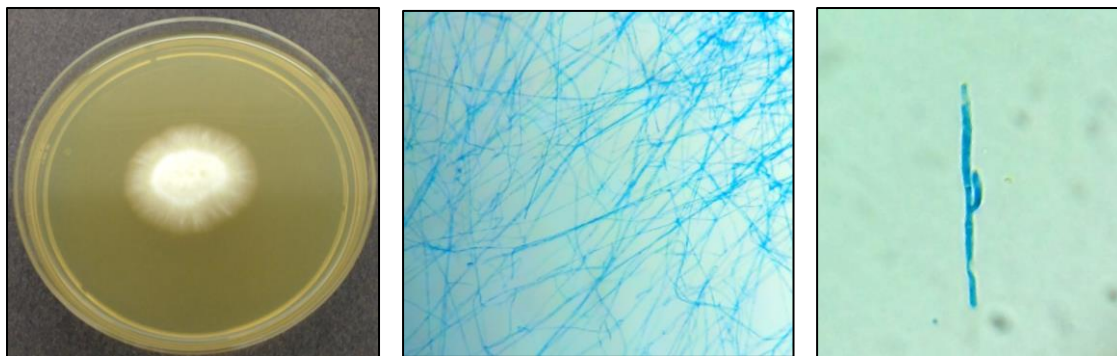
A) B) C)

Figura 23. A) Colonia con 14 días de crecimiento de *Trichophyton rubrum* en agar Mycosel. Colonia color blanco, vellosa, crecimiento radial sin pigmento al medio. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina, tabicada. C) Objetivo 4x con azul de lactofenol. Microconidio.



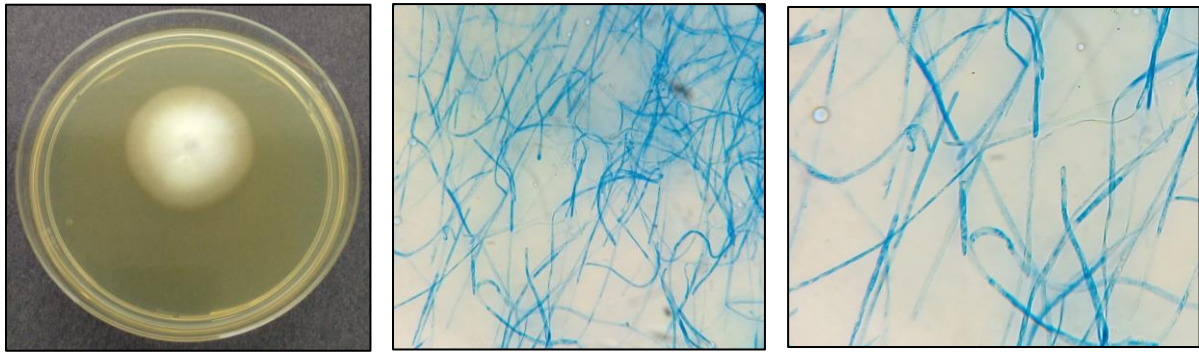
A) B) C)

Figura 24. Descripción macroscópica de *Aphanoascus verrucosus* con 18 días de crecimiento en agar Mycosel. Colonia blanca aterciopelada, crateriforme, crecimiento radial, opaca, sin pigmento al medio. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol, hifa hialina emergiendo de las conidias. C) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Presencia de conidios con formas circulares y piramidales.



A) B) C)

Figura 25. Descripción macroscópica de *Trichophyton rubrum* con 17 días de crecimiento en agar Mycosel. Colonia de color blanco, vellosa, crecimiento radial, opaca, sin pigmento al medio. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina, ramificada sin presencia de macroconidios y microconidios. C) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina tabicada.

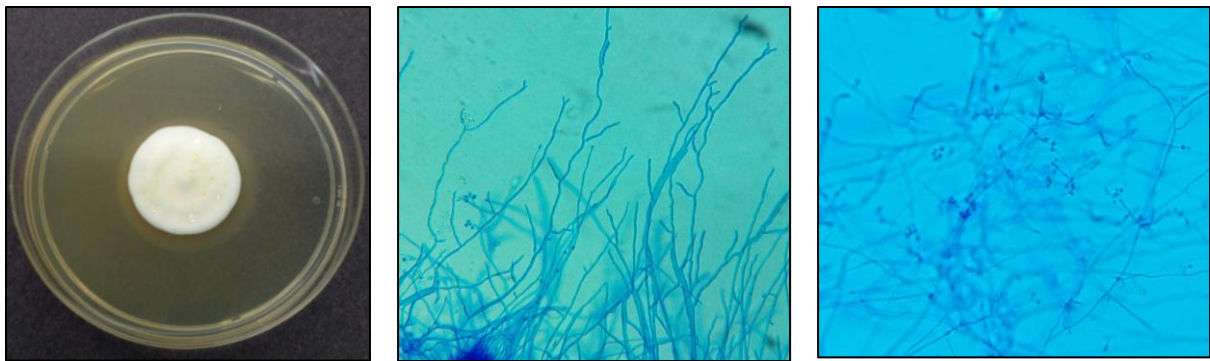


A)

B)

C)

Figura 26. A) Descripción macroscópica de *Trichophyton rubrum* con 17 días de crecimiento en agar Mycosel. Colonia blanca vellosa, crecimiento radial, opaca, sin pigmentación al medio. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifas hialinas, ramificadas, sin conidios. C) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina tabicada.

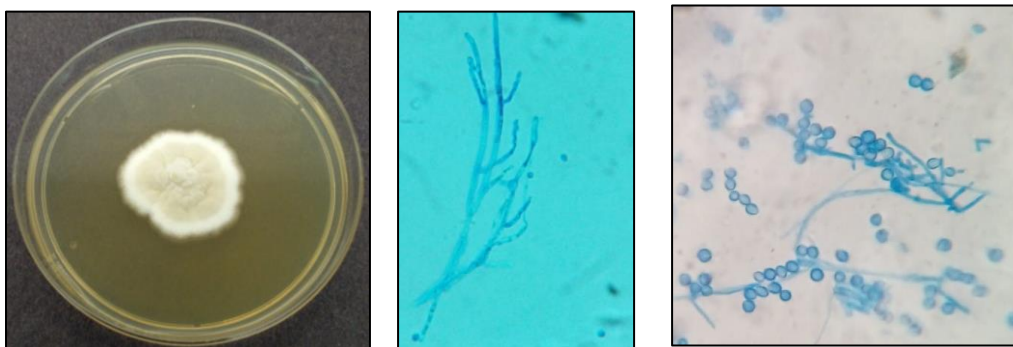


A)

B)

C)

Figura 27. A) Descripción macroscópica de *Beauveria Bassiana* con 14 días de crecimiento en agar Mycosel. Colonia blanca. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina. C) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Radulosporas con disposición simpodial.



A)

B)

C)

Figura 28. A) Descripción macroscópica de *Scopulariopsis brevicaulis* con 7 días de crecimiento en agar Mycosel. B) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Hifa hialina. C) Objetivo 40x con azul de lactofenol. Anelosporas.

9.6 Biología molecular

Las pruebas convencionales siguen siendo importantes, pero, en el caso del examen directo, solo presenta una sensibilidad que oscila entre el 67%-93%, mientras que el medio de cultivo tiene una sensibilidad que va entre 31%-59% (Velazquez Aguedo, 2017) y una especificidad de 83-100%, esto debido a que se requiere de ojos expertos para una identificación idónea, además que ciertos microorganismos suelen compartir morfología similar. Por lo tanto, la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación genética, son altamente sensibles y específicas, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100%. Esto significa que pueden detectar similares incluso pequeñas cantidades de material genético fúngico y diferenciar entre especies de hongos. En contraste, los medios de cultivo tradicionales pueden tener limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad. Nuestros resultados muestran esa diferencia entre las pruebas convencionales y las moleculares, puesto que la secuenciación nos da de forma certera el nombre del agente, tal como se muestra en la tabla 8.

Durante la obtención de ADN genómico, las concentraciones fueron variadas, la mayoría por arriba de los 10 ng/ μ L, siendo esta, una concentración idónea, mientras que en el caso de la muestra 1 (tabla 7), se obtuvo una concentración de 4.2 ng/ μ L, considerando que una concentración buena para PCR oscila entre los 5-50 ng/ μ L, pero al obtener la secuenciación no se tuvo inconveniente (tabla 8). La valoración de este ADN genómico es sin duda importante ya que permite ver la viabilidad para los siguientes procesos. Para determinar su pureza, es necesario conocer la relación de absorbancias A260/280 y A260/230. La relación A260/280 considera que un ADN es de pureza óptima si se tiene un valor entre 1.8-2.0, mientras que A260/230 se sitúa en torno 1.8-2.2 (Koetsier y Cantor, 2019). En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de ADN genómico con su respectiva relación entre las absorbancias. La mayoría de las absorbancias en la relación 260/230 presentan impurezas en las muestras. Bao et al (2018) para identificación de hongos dermatofitos utilizó el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit, D6005, obteniendo buenos resultados en la identificación de hongos dermatofitos y no dermatofitos.

La PCR en tiempo real arrojó amplicones en las bandas correspondientes entre 800 a 1000 pb (figura 18), de acuerdo con la bibliografía, el tamaño promedio de la región ITS varía en los 550 pb (Nilsson et al, 2008), por lo que nuestros valores están dentro del rango promedio, que al mismo tiempo concuerdan con el tamaño de amplificación en la secuenciación.

Para el caso de la rep-PCR, las bandas obtenidas son iguales para la muestra 1 y 2 con bandas correspondientes a 2200 pb, 1700 pb, 1200 pb, 1000 pb, 800 pb, 700, 500, 300 y 200 pb. Para la cepa 4 y 5 se observan bandas que oscilan entre las 700 pb, mientras que la cepa 3 muestra una banda de aproximadamente 500 pb y la cepa 7 tiene bandas de 600 pb. Estas regiones rep han tenido un gran auge en la actualidad, ya que se ha propuesto la creación de pruebas de diagnóstico de onicomycosis usando estas regiones palindrómicas, basando técnicas de flujo lateral, como lo describe Gupta y colaboradores 2022.

Tabla 7. Concentración de ADN genómico.

Número de muestra	ng/ μ L	A260/A280	A260/A230
1	4.2	1.53	0.03
2	27.5	1.64	0.38
3	42.4	1.83	1.07
4	32.4	1.76	1.04
5	36.7	1.80	1.00
6	11.5	1.69	0.37
7	29.1	1.74	0.94

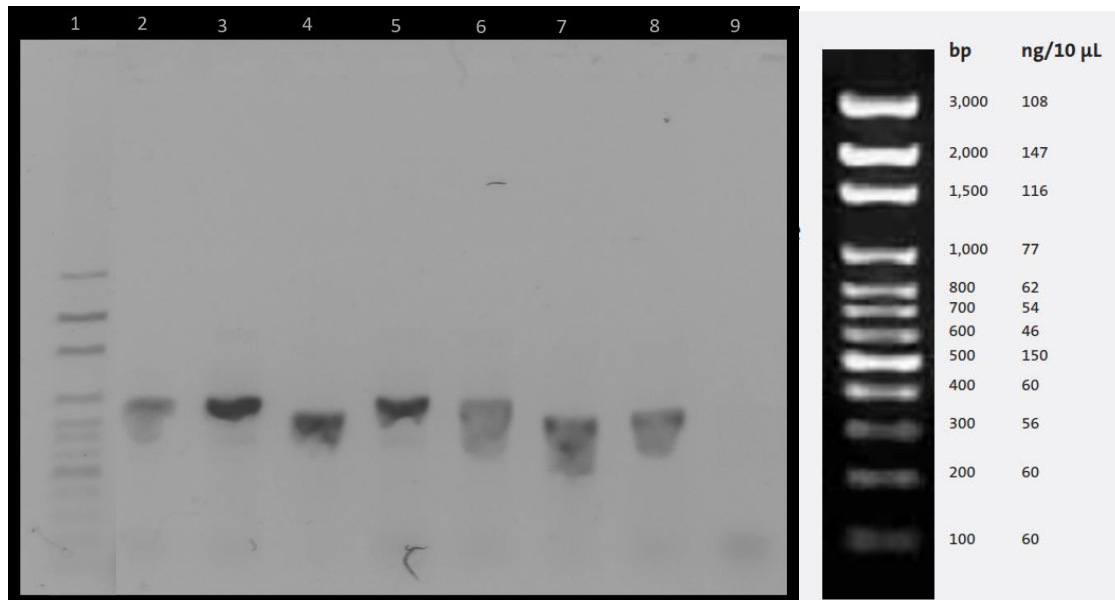


Figura 18. ADN de la PCR tiempo real para la región ITS 1) Marcador de peso molecular. 2) Muestra 1. 3)Muestra 2. 4)Muestra 3. 5) Muestra 4. 6) Muestra 5. 7) Muestra 6. 8)Muestra 7. 9) Blanco negativo.

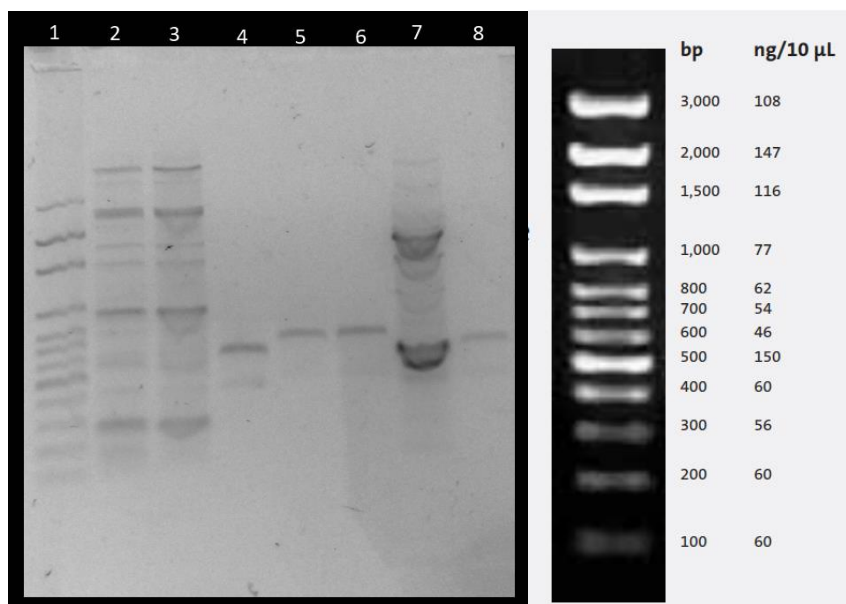


Figura 19. ADN de la REP-PCR para la región palindrómica de cada cepa 1) Marcador de peso molecular. 2) Muestra 1. 3) Muestra 2. 4) Muestra 3. 5) Muestra 4. 6) Muestra 5. 7) Muestra 6. 8) Muestra 7.

Tabla 8. Resultados de la secuenciación.

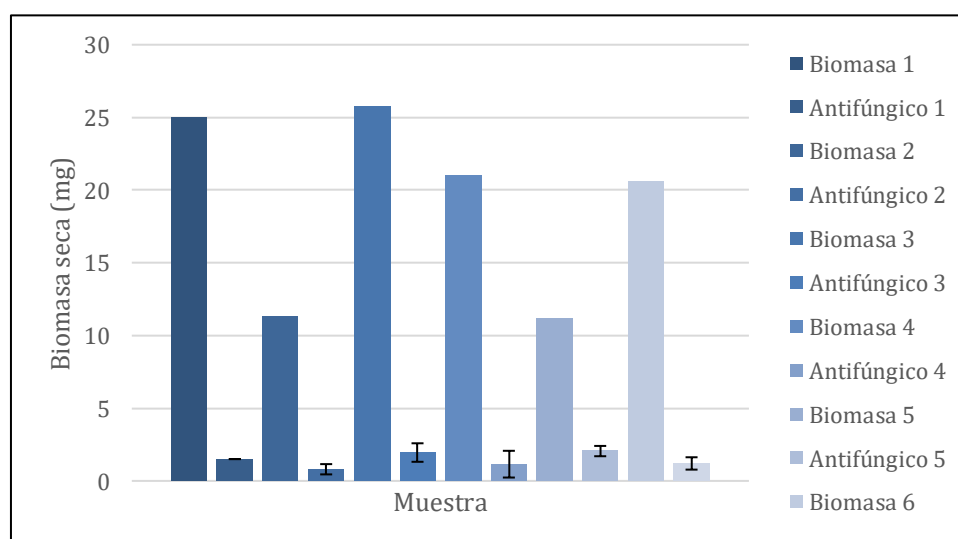
Número de muestra	Microorganismo	pb
1	<i>Trichophyton rubrum</i>	603
2	<i>Trichophyton rubrum</i>	640
3	<i>Aphanoascus verrucosus</i>	543
4	<i>Trichophyton rubrum</i>	645
5	<i>Trichophyton rubrum</i>	636
6	<i>Beauveria Bassiana</i>	522
7	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	578

9.7 Antifungigrama

A la fecha no existe una prueba estandarizada para la aplicación de sensibilidad a hongos dermatofito y no dermatofitos. La UFC obtenidas para el control positivo fueron de 4×10^{-3} . En este trabajo se aplicó el procedimiento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A. En el antifungigrama los microorganismos mostraron sensibilidad ante la terbinafina. *Trichophyton rubrum*, en el trabajo de Lana et al (2018) mostró una sensibilidad a la terbinafina en una concentración de 0.12 mg/mL.

Los hongos no dermatofitos suelen presentar resistencia a los antifúngicos convencionales, sin embargo, un trabajo realizado por Carrillo et al 2015 mostró una sensibilidad de *Scopulariopsis brevicaulis* en una concentración de 0.35 mg/L en el día 3, mientras que en este trabajo obtuvimos una concentración a 0.125 mg/mL

Figura 6. Resultados del antifungigrama con Terbinafina al 0.125 mg/uL



9.8 Árbol filogenético

La construcción de un árbol filogenético permite una identificación precisa de las especies de hongos presentes en las muestras clínicas. Esto es fundamental, ya que el tratamiento puede variar dependiendo de la especie, y algunas especies pueden requerir terapias antifúngicas específicas. El árbol filogenético que se obtuvo (figura 20) muestra la homología de las cepas aisladas, obteniendo, monofilia para cada una de las cepas, enlazados con *Agaricus*. Los nodos presentes en el árbol filogenético muestran divergencia entre las diferentes cepas encontradas, dividiendo el árbol en dos partes, la primera enlaza a los dermatofitos que tienen una cercanía con *Aphanoascus verrucosus*, por ser un hongo queratinofilico. La otra parte está conformada por mohos.

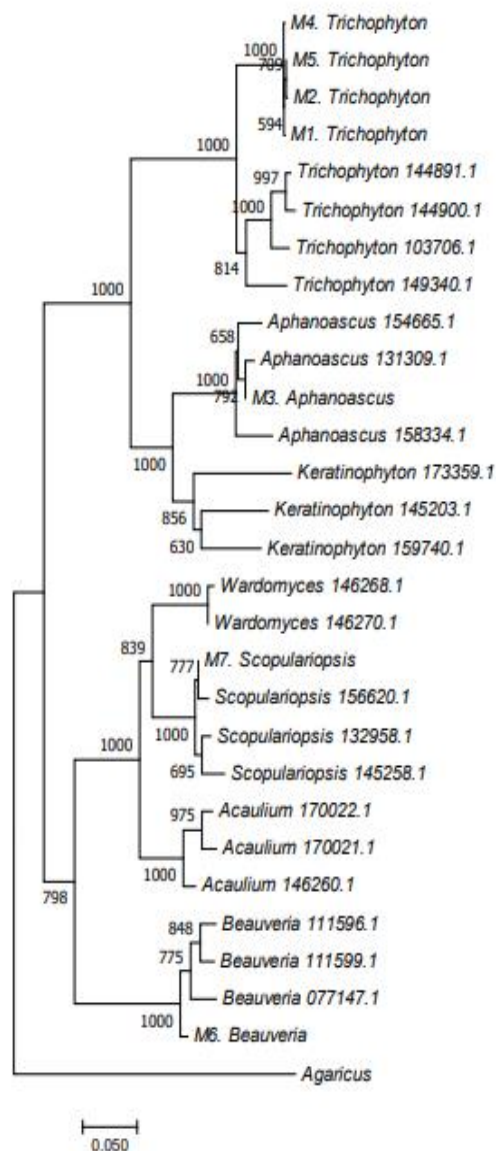


Figura 20. Árbol filogenético de las muestras aisladas.

10. Conclusiones

- Las cepas identificadas presentaron sensibilidad a la terbinafina en una concentración de 0.125 mg/mL.
- Se obtuvo uñas con distrofia total como la forma clínica más frecuente, seguida de onicomycosis subungueal distal y onicomycosis subungueal lateral, proximal y superficial
- Los factores de riesgo más identificados fueron: alteraciones fisiológicas, factores de ocupación de riesgo y contacto.
- Se identificaron hongos dermatofitos y no dermatofitos, mencionando la parasitación por *Beauveria Bassiana*.

11. Anexos

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Actividad antifúngica de hongos aislados fenotípica y genotípicamente de personas de la comunidad de San Jerónimo Xayacatlán, Puebla

De acuerdo con las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud, Título Quinto "Investigación para la Salud", Capítulo Único, artículo 100, fracción IV; así como del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos" Capítulo I, Disposiciones Comunes, artículo 13 que señala que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, artículos 14 fracción V, 20, 21 y 22 de dicho Reglamento; y, de conformidad con los principios éticos contenidos en la Declaración de Helsinki, se me ha explicado e informado que:

I. Los hongos dermatofitos son la principal causa de enfermedad de uña en los países desarrollados y semidesarrollados, a nivel mundial se ha encontrado un incremento en los últimos años teniendo un impacto en la sociedad debido al rechazo por el mal aspecto que presenta la zona afectada por este tipo de tiña. La tinea unguium es una enfermedad muy difícil de diagnosticar y tratar, ya que uno de cada cinco pacientes diagnosticados logra recuperarse de la enfermedad.

II. El objetivo del presente estudio es:

- Determinar el agente etiológico que infecta al paciente.
- Observar la efectividad de algunos antifúngicos comerciales

III. Para realizar la toma de muestra se basó en los lineamientos del manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico de la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, bajo el siguiente procedimiento:

1. Lavado previo de manos o pies con jabón y agua seguido de un secado completo.
2. Recorte del borde extremo de la uña, si es posible descartar la parte más distal del material
3. Desinfección con alcohol al 70% de la lámina externa, borde y pliegues de la uña
4. Raspado con cucharilla o con bisturí evitando efectuar cortes o erosiones
Recoger suficiente material en recipiente (placa Petri vacía, dos portaobjetos de vidrio limpios, un contenedor de orina, sobrecito fabricado con papel o cartulina)

IV. Las recomendaciones que debe llevar a cabo el paciente son cruciales para evitar resultados alterados y se vean afectados nuestros resultados esperados.

Fundado en el Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, se hacen las siguientes recomendaciones y cuidados para obtener una muestra de calidad.

- No aplicar ningún tratamiento fúngico oral o tópico por lo menos 3 días antes.
- No aplicar cremas, ungüentos o polvos en el sitio de la toma de la muestra.
- La toma de la muestra debe ser realizada por personal experto. No debe tener esmalte aplicado en las uñas.

V. Para la toma de esta muestra no hay complicaciones que puedan considerarse relevantes, puede presentarse dolor en la uña por el corte dado en zonas muy afectadas, pero siempre se evita generar riesgos.

VI. Estimado(a) Señor/Señora:

Usted ha sido invitado a participar en el presente proyecto de investigación, el cual es desarrollado por el estudiante Joel Alejandro Domínguez Velázquez. El estudio se realizará en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Si Usted decide participar en el estudio, es importante que considere la siguiente información. Siéntase libre de preguntar cualquier asunto que no le quede claro.

VII. Toda la información proporcionada para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

VIII. Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de decidir qué muestras son las que están de acuerdo en proporcionar o de negarse a participar o de retirar su participación en el estudio en el momento en que desee. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al investigador responsable del estudio el Dr. Roberto Arenas Guzmán.

IX. Los datos personales que le solicitaremos serán utilizados exclusivamente para las finalidades expuestas en este documento. Usted puede solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto o al siguiente número de teléfono 9531043878 o al correo electrónico: joel.dominguezv@alumno.buap.mx

San Jerónimo Xayacatlán Puebla, Puebla.

Dirección: _____

Fecha: ____/____/____/

_____ en forma voluntaria consiento que el C. **Joel Alejandro Domínguez Velázquez** y C. **Erika Fabiola Hernández Rodríguez** pasantes de la licenciatura en Químico Farmacobiólogo de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** me realicen una toma de muestra en uñas de pie para participar en el estudio a realizar.

Estoy satisfecho a/o con la información recibida, quien me ha dado la oportunidad de preguntar y resolver las dudas, y todas ellas han sido resueltas a satisfacción. En tales condiciones consiento que se me realice la toma de muestra.

Nombre y firma del participante

HOJA DE DESCRIPCIÓN

Nombre:	Nº de muestra:
Parte afectada: Pie.	Sexo:

1.- Número de uñas afectadas:

1____/. 2____/. 3____/. 4____/. 5____/. Otra cantidad: _____/

2.- Descripción de la uña o zona afectada:

Color: Blanco____/. Amarilla____/. Café____/ Verde____/. Negra____/

Otra: _____

3.- Apariencia de la uña:

Opaca____/. Quebradiza____/. Polvosa____/. Pérdida de consistencia al borde____/

4.- Forma clínica:

- I. Subungueal: Distal____/. Lateral____/. Proximal____/
- II. Blanca superficial____/
- III. Blanca proximal subungueal____/
- IV. Distrófica total____/
- V. Mixta____/

5.- Ubicación de la uña afectada en pie:

1____/

2____/

3____/

4____/

5____/



Pie izquierdo



Pie derecho

- 1 – Pulgar
- 2 – Índice
- 3 – Corazón
- 4 – Anular
- 5 – Meñique

CUESTIONARIO

1.- ¿Padece alguna enfermedad crónica? SI____/NO____/

¿Cuál? _____

2.- ¿Ha tomado medicamentos en los últimos tres meses? SI____/NO____/

¿Cuáles? _____

3.- ¿Realiza alguna actividad al aire libre? SI____/NO____/

¿Cuál? _____

4.- ¿Tiene contacto con animales domésticos? SI____/NO____/

¿Cuál? _____

5.- ¿Comparte sábanas, zapatos o calcetines con algún otro familiar? SI____/NO____/

Sábana____/Zapato____/Calcetines____/

6.- ¿Utiliza zapato cerrado? SI____/NO____/

¿Cuánto tiempo? _____

7.- ¿Ha estado expuest o/a a suelos de baños o piscinas? SI____/NO____/

8.- ¿Tuvo algún traumatismo en la zona afectada? SI____/NO____/

9.- Presenta algún otro tipo de tinea ajena a la tinea unguium? SI____/NO____/

¿Cuál? _____

10- ¿Cuánto tiempo lleva con el problema de la uña u la onicomicosis? _____

11.- Actualmente lleva algún tratamiento para la onicomicosis? SI____/NO____/

¿Cuál? _____

12. Bibliografía

1. Lladó, D. C., Arias, L. F., Mendoza, I. A., & Bonifaz, A. (2017). La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 14(4), 318-327.
2. Mendoza N., Palacios C., Cardona, N., & Gómez, L. M. (2012). Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 20(2), 149-158.
3. Gupta A. K., Stec N., Summerbell R. C., Shear N. H., Piguet V., Tosti A., and Piraccini B. M. (2020). Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1972-1990.
4. Gupta A. K., Ryder J. E., Baran R., and Summerbell R. C. (2003). Non-dermatophyte onychomycosis. *Dermatologic clinics*, 21(2), 257-268.
5. Saúl A. (2015). *Micosis*. Saúl A(Ed.), Saúl. Lecciones de dermatología, 16e. McGraw Hill.
6. Wickes, Brian L, Wiederhold, Nathan P (2018). Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature communications*, 1-13, 9(1).
7. : Ryan KJ, Ray C. eds. Sherris. (2017). *Hongos. Conceptos básicos. Microbiología médica*, 6e. McGraw Hill.
8. del Carmen Padilla, M. (2003). Micosis superficiales. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(4), 134-137.
9. Fricker M., Boddy L. and Bebbler (2007) Springer. En *Biología de la célula fúngica* 309–330.
10. Osman Erkmen. (2021) Practice 24. Morphological characteristics of yeasts and molds. *Laboratory practices in Microbiology*, 221-230.
11. Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in genetics*, 81, 33-82.
12. Bowman, S. M., and Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
13. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
14. Trujillo A. eds (2020). *Propiedades generales de los hongos. Micología Médica Básica*, 6e. McGraw Hill.
15. Walker, Graeme M., and Nia A. White (2017). *Introduction to fungal physiology. Fungi: biology and applications*: 1-35.
16. Arenas Guzmán R, Torres Guerrero E. eds (2022). *Hongos. Micología Médica Ilustrada*, 6e. McGraw Hill.
17. Marín, G. M. G., Rivadulla, R. R., Díaz, Y. G., Cánovas, L. P. L., and Álvarez, L. Y. O. (2019). Onicomycosis, factores predisponentes, características y dermatosis asociadas. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 23(3), 380-386.
18. Totosaus, H. C. y Sánchez-Regaña, M. (2011). Distrofias ungueales. Etiología y novedades terapéuticas. *Revista española de podología*, 22(3), 116-121.

19. Carrillo-Dover, P. J., Gross-Martinez, N. T., and Salas-Campos, I. (2009). Onicomycosis por hongos fuliginosos. *Acta Médica Costarricense*, 51(4), 241-244.
20. Leung, A. K., Lam, J. M., Leong, K. F., Hon, K. L., Barankin, B., Leung, A. A., and Wong, A. H. (2020). Onychomycosis: an updated review. *Recent patents on inflammation and allergy drug discovery*, 14(1), 32-45.
21. Zaias, N. (1992). Clinical manifestations of onychomycosis. *Clinical and experimental dermatology*, 17, 6-7.
22. Piraccini, B. M., and Tosti, A. (2004). White superficial onychomycosis: epidemiological, clinical, and pathological study of 79 patients. *Archives of dermatology*, 140(6), 696-701.
23. González-López, L., Monteagudo-Sánchez, B., Mosquera-Fernández, A., González-Vilas, D., and Ordóñez, P. (2017). Onicomycosis subungueal proximal en paciente tratado con inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa. *SEMERGEN, Sociedad Española Medica Rural Gen. (Ed. Impr.)*, 245-246.
24. Bunyaratavej, S., Bunyaratavej, S., Muanprasart, C., Matthapan, L., Varothai, S., Tangjaturonrusamee, C., and Pattanaprichakul, P. (2015). Endonyx onychomycosis caused by *Trichophyton tonsurans*. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 81(4), 390.
25. Martin, B. (2013). Histopatología de la uña. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 104(7), 564-578.
26. Torres-Sangiao, E., Velasco-Fernández, D., y Villanueva-González, R. (2006). Onicomycosis subungueal lateral y distal en mujer de 71 años. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 24(8), 527-528.
27. Lladó, D. C., Arias, L. F., Mendoza, I. A., y Bonifaz, A. (2017). La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 14(4), 318-327.
28. Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., y Sharpe, C. (2010). Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35(5), 497-519.
29. Arenas, R. (2002). Dermatofitosis en México. *Revista Iberoamericana Micología*, 19(2), 63-67.
30. Cortés, E. R., Montes, E. E. S., Guzmán, R. A., y Santos, F. S. (2020). Onychomycosis in pediatric patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 39(1), 28-35.
31. Bitew, A., and Wolde, S. (2019). Prevalence, risk factors, and spectrum of fungi in patients with onychomycosis in Addis Ababa, Ethiopia: a prospective study. *Journal of Tropical Medicine*, 2019.
32. Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., and Sharpe, C. (2010). Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35(5), 497-519.
33. Rippon, J. W. (1988). *Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes* (No. Ed. 3). WB Saunders company.

34. Götz H (1962) Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. In: Handbuch der Hautund Geschlechtskrankheiten. J. Jadassohn. Ergänzungswerk. Hrsg. A. Marchionini. Springer, Berlin.
35. Ballesté, R., Mousqués, N., y Gezuele, E. (2003). Onicomycosis: Revisión del tema. Revista Médica del Uruguay, 19(2), 93-106.
36. Sánchez-Saldaña, L., Matos-Sánchez, R., y Kumakawa Sena, H. (2009). Infecciones micóticas superficiales: (revisión). Dermatol. peru, 226-266.
37. de Hoog, GS, Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M. y Gräser, Y. (2017). Hacia una novedosa taxonomía filogenética multilocus para los dermatofitos. Mycopathologia, 182 (1), 5-31.
38. Hay, R. J. (1989). Fungal skin infections. Pharmacology of the Skin II, 383-393.
39. Trujillo A. (eds) Dermatofitosis, 2020. Micología Médica Básica, 6e. McGraw Hill.
40. Hainer, B. L. (2003). Dermatophyte infections. American family physician, 67(1), 101-108.
41. Larone, D. H. (1996). Culture and identification of dermatophytes. Clinical Microbiology Newsletter, 18(5), 33-38.
42. Moskaluk, A. E., and VandeWoude, S. (2022). Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. Pathogens, 11(9), 957.
43. J. Guillot; L. Latié; M. Deville; L. Halos; R. Chermette (2001). Evaluation of the dermatophyte test medium RapidVet-D., 12(3), 123-12.
44. Ballesté, R., Mousqués, N., y Gezuele, E. (2003). Onicomycosis: Revisión del tema. Revista Médica del Uruguay, 19(2), 93-106.
45. Rizzitelli, G., Guanziroli, E., Moschin, A., Sangalli, R., and Veraldi, S. (2016). Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. International Journal of Infectious Diseases, 42, 61-63.
46. Hobak, L. R., Gómez-Sáenz, A., Sánchez, D. C. V., y Arenas, R. (2017). Onicomycosis por mohos no dermatofitos. Una revisión. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica, 15(3), 184-195.
47. Casanova-Claure, E., y Navarrete-Mejía, P. (2018). Perfil epidemiológico y características clínicas de la onicomycosis en población militar. Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana, 45(3), 191-194.
48. Fernández-Chico, N., García-Fernández, D., y Aguilar, J. L. (2008). Estrategias terapéuticas en las onicomycosis. Piel, 23(5), 268-272.
49. Hilal-Dandan R y Brunton L.L.(Eds.), 2015. Antimicóticos. Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica, 2e. McGraw Hill.
50. Mendoza, N., Palacios, C., Cardona, N., y Gómez, L. M. (2012). Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica, 20(2), 149-158.
51. Petinataud, D., Berger, S., Contet-Audonneau, N., and Machouart, M. (2014). Molecular diagnosis of onychomycosis. Journal de mycologie medicale, 24(4), 287-295.

52. Watanabe, S., and Ishida, K. (2017). Molecular diagnostic techniques for onychomycosis: validity and potential application. *American journal of clinical dermatology*, 18(2), 281-286.
53. Kurtzman, C. P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(parte 2), 325-332.
54. Tovar, A. R., Cásarez, B. X., y Valdés, M. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(3), 267-278.
55. Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A. and Fulbright, D. W. (1998). rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88(8), 862-868.
56. López-Ramírez, K. L., Díaz-Maldonado, K. C., Vergara Espinoza, M. A., Santamaría-Veliz, O., Serquén-López, L. M., Canelo Olinda, B. y Aguilar-Gamboa, F. R. (2018). Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria. Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(2), 11-18.
57. Saúl A., 2015. Micosis. Saúl A(Ed.), Saúl. Lecciones de dermatología, 16e. McGraw Hill
58. Guzmán R(Ed.), 2019. Tiñas. Guzmán R(Ed.) Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento, 7e. McGraw Hill.
59. Garcia-Effron, G. (2021). Molecular markers of antifungal resistance: potential uses in routine practice and future perspectives. *Journal of Fungi*, 7(3), 197.
60. Sacheli, R., and Hayette, M. P. (2021). Antifungal resistance in dermatophytes: genetic considerations, clinical presentations and alternative therapies. *Journal of Fungi*, 7(11), 983.
61. Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., and Ghannoum, M. A. (2003). Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47(1), 82-86.
62. Rogers, T. R., Verweij, P. E., Castanheira, M., Dannaoui, E., White, P. L., and Arendrup, M. C. (2022). Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(8), 2053-2073.
63. Camacaro, L., De Arbeloa, M., Fernández, A., Cavallera, E., y Alvarado, P. (2019). PCR multiplex en la detección de *Tinea unguium* en pacientes de Caracas–Venezuela. *Invest Clin*, 60(2), 160-170.
64. Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, S. S., Nielsen, H. V., and Arendrup, M. C. (2010). Optimized 5-hour multiplex PCR test for the detection of *tinea unguium*: performance in a routine PCR laboratory. *Sabouraudia*, 48(6), 828-831.

65. Garmendia, J. L., Viedma, P. I., y Arza, J. M. (2008). Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud.
66. Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumarán, C., y García, P. (2013). Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 140-146.
67. Aburto López, I. A., y Freyre Galicia, J. (2018). Principales problemas de Salud Pública en México.
68. Adams, C., Athanasoula, E., Lee, W., Mahmudova, N., and Vlahovic, T. C. (2015). Environmental and genetic factors on the development of onychomycosis. *Journal of Fungi*, 1(2), 211-216.
69. Chang, C. C., Wechtaison, W., Chen, S. Y., Cheng, M. C., Chung, C. S., Lin, L. S., and Tsai, Y. L. (2022). Prevalence and Risk Factors of Zoonotic Dermatophyte Infection in Pet Rabbits in Northern Taiwan. *Journal of Fungi*, 8(6), 627.
70. Del Castillo Saiz, A., Álvarez Sánchez, B., y Guzmán Quilo, C. (2000). Las onicomycosis. *Medicina integral* (Ed. impr.), 36(1), 29-33.
71. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller (2007). Specimen Collection, Transport, and Processing: Mycology, Deanna A. Sutton (Ed) specimen processing (pp. 1730-1731) Washington, DC. Editorial Board.
72. Leelavathi, M., and Tzar, M. N. (2011). Brief report: nail sampling technique and its interpretation. *Malaysian family physician: the official journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia*, 6(2-3), 58.
73. Araiza-Santibáñez, J., Tirado-Sánchez, A., González-Rodríguez, A. L., Vazquez-Escorcia, L., Ponce-Olivera, R. M., and Bonifaz, A. (2016). Onychomycosis in the elderly. A 2-year retrospective study of 138 cases. *Revista Médica del Hospital General de México*, 79(1), 5-10.
74. Arenas, R., Bonifaz, A., Padilla, M. C., Arce, M., Atoche, C., Barba, J., ... and Ocampo, J. (2010). Onychomycosis. A mexican survey. *European Journal of Dermatology*, 20(5), 611-614.
75. Munguia-Perez, R., Rivera, A., Duarte-Escalante, E., Ortiz-Segura, G., Castañeda-Antonio, D., Avelino-Flores, F., and Castañeda-Roldan, E. (2018). Etiologic Diversity of Onychomycosis in Mexican Patients with Chronic-Degenerative Diseases. *Journal of PurE and aPPLiEd Microbiology*, 12(3), 1215-1219.
76. Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., and Sharpe, C. (2010). Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35(5), 497-519.
77. Arreaza, F. (2008). Onicopatías con paraqueratosis determinada por examen directo con Negro de Clorazol. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 36(2), 72-75.

78. Tangarife-Castaño, V. J., Flórez-Muñoz, S. V., y Mesa-Arango, A. C. (2015). Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina y Laboratorio*, 21(5-6), 211-242.
79. Coelho, LM, Aquino-Ferreira, R., Maffei, CML y Martínez-Rossi, NM (2008). Susceptibilidades a fármacos antimicóticos in vitro de microconidias y arthroconidias de dermatofitos. *Revista de quimioterapia antimicrobiana*, 62 (4), 758-761.
80. Blechert, O., Zheng, H., Zang, X., Wang, Q., and Liu, W. (2019). Influence of the cultivation medium and pH on the pigmentation of *Trichophyton rubrum*. *Plos one*, 14(9)
81. Morales-Cardona, C. A., Valbuena-Mesa, M. C., Alvarado, Z., and Solorzano-Amador, A. (2014). Non-dermatophyte mould onychomycosis: a clinical and epidemiological study at a dermatology referral centre in Bogota, Colombia. *Mycoses*, 57(5), 284-293.
82. Cano, J., Guarro, J., and Figueras, M. J. (1991). Study of the invasion of human hair in vitro by *Aphanoascus spp*. *Untersuchungen zur Invasion des Menschenhaars in vitro durch Aphanoascus spp*. *Mycoses*, 34(3-4), 145-152.
83. Nosratabadi, M., Kordbacheh, P., Kachuei, R., Safara, M., Rezaie, S., and Afshari, M. A. (2017). Isolation of keratinophilic fungi from the soil of Greater Tunb, Abu-Musa, and Sirri islands in the Persian Gulf, Iran. *Current Medical Mycology*, 3(2), 13.
84. Ducange, P., Verdina, T., Stiro, F., Grottola, A., Orlando, G., Delvecchio, G., and Mastropasqua, R. (2021). *Beauveria bassiana* keratitis: Management of an atypical clinical presentation. *Medical Mycology Case Reports*, 33, 1-4.
85. Rodrigues Marcondes, N., Ledesma Taira, C., Cirena Vandresen, D., Estivalet Svidzinski, T. I., Kadowaki, M. K., and Peralta, R. M. (2008). New feather-degrading filamentous fungi. *Microbial Ecology*, 56, 13-17.
86. Fatahinia, M., Jafarpour, S., Rafiei, A., Taghipour, S., Makimura, K., and Rezaei-Matehkolaei, A. (2017). Mycological aspects of onychomycosis in Khuzestan Province, Iran: A shift from dermatophytes towards yeasts. *Current medical mycology*, 3(4), 26.
87. Velasquez-Agudelo, V., and Cardona-Arias, JA (2017). Metanálisis de la utilidad del cultivo, la biopsia y el examen con KOH directo para el diagnóstico de la onicomycosis. *BMC enfermedades infecciosas*, 17 (1), 1-11.
88. Koetsier, G. y Cantor, E. (2019). Una guía práctica para analizar la concentración y pureza de ácidos nucleicos con espectrofotómetros de microvolúmenes. *Nueva Inglaterra Biolabs Inc* , 1-8.
89. Bao, F., Fan, Y., Sun, L., Yu, Y., Wang, Z., Pan, Q. y Zhang, F. (2018). Comparación de la tinción fluorescente fúngica y la secuenciación basada en PCR de ITS rDNA con métodos convencionales para el diagnóstico de la onicomycosis. *Revista de la Academia Europea de Dermatología y Venereología*, 32 (6), 1017-1021.
90. Nilsson, RH, Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N. y Larsson, KH (2008). Variabilidad ITS intraespecífica en el reino Fungi tal como se expresa en las

bases de datos de secuencias internacionales y sus implicaciones para la identificación de especies moleculares. *Bioinformática evolutiva*, 4 , EBO-S653.

91. Gupta, AK, Hall, DC, Cooper, EA y Ghannoum, MA (2022). Diagnóstico de onicomicosis: ¿Qué hay de nuevo? *Revista de hongos*, 8 (5), 464.
92. Lana, AJD, Pippi, B., Carvalho, AR, Moraes, RC, Kaiser, S., Ortega, GG. y Silveira, GP (2018). Efecto aditivo in vitro de combinaciones de griseofulvina y terbinafina contra dermatofitos multirresistentes. *Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas*, 54.
93. Carrillo Muñoz, A. J., Tur Tur, C., Cárdenes, D., Rojas, F. D., y Giusiano, G. E. (2015). Perfil de sensibilidad antifúngica in vitro de *Scopulariopsis brevicaulis* aislados de onicomicosis.