



INAOE

**Análisis del Efecto de la Inactivación
Fotodinámica con Diferentes
Fotosensibilizadores en la Inhibición
de *Sporothrix schenckii* spp**

por

Laura del Carmen Hernández Delesma

Tesis sometida como requisito parcial para
obtener el grado de

**Maestría en Ciencias y Tecnologías
Biomédicas**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

Marzo 2021

Tonantzintla, Puebla

Bajo la supervisión de:

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco
INAOE

M. C. Alejandra Paula Espinosa Taxis
BUAP

©INAOE 2021

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de
reproducir y distribuir copias de esta tesis en su
totalidad o en partes mencionando la fuente.



Resumen

La esporotricosis es una micosis subcutánea causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii*, hongos dimórficos de distribución mundial. En la República Mexicana es la micosis subcutánea más frecuente y está relacionada con la ocupación de la población. Debido a las limitantes y largos periodos de los tratamientos convencionales de la micosis, nos conduce a la búsqueda de una nueva alternativa terapéutica. Para ello nuestro estudio se basa en identificar la sensibilidad antifúngica y analizar el efecto de la inactivación fotodinámica (IFD) con diferentes fotosensibilizadores (FS) en levaduras de *S. schenckii* de diferentes procedencias (paciente, mascota y naturaleza). En este estudio, se utilizaron, ya sea, 50 µg/mL de ketoconazol o 25 µg/mL de fluconazol como fármacos antimicóticos y se siguió el método de difusión con discos. En cuanto a la IFD, se emplearon ya sea 5 µM de rosa de bengala (RB) y/o 20 µM de curcumina como FS y diodos emisores de luz (LED) como fuentes de luz con longitud de onda de 520 nm y 460 nm; se plantearon 4 grupos control; grupo no irradiado y sin FS (L-F-), grupo solo con FS (L-F+), grupo irradiado con y sin FS (L+F+, L+F-). Como resultado, todas las cepas de *S. schenckii* fueron resistentes a ketoconazol y fluconazol. La IFD redujo significativamente el crecimiento de *S. schenckii* empleando RB a 10 J/cm² e inhibió completamente al hongo con curcumina a 20 J/cm², cada uno con respecto al grupo L-F-. En conclusión, los fármacos antimicóticos no son efectivos en la eliminación de *S. schenckii* con las concentraciones empleadas en este estudio, mientras que la IFD con RB o curcumina en combinación con LED son efectivos en la inhibición de levaduras de *S. schenckii* en estudios *in-vitro*.

Palabras clave: esporotricosis, *Sporothrix schenckii*, fotosensibilizador, inactivación fotodinámica.

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous infection caused by species of the complex *Sporothrix schenckii*, dimorphic fungi of worldwide distribution. In the Mexican Republic it is the most frequent subcutaneous mycosis and is related to the occupation of the population. Due to the limitations and long periods of conventional mycosis treatments, it leads us to the search for a new therapeutic alternative. To do this, our study is based on identifying antifungal sensitivity and analyzing the effect of photodynamic inactivation (IFD) with different photosensitizers (FS) in *S. schenckii* yeast from different sources (patient, pet and nature). In the study, either 50 µg/mL of ketoconazole or 25 µg/mL of fluconazole were used as antifungal drugs and the method of disc diffusion was followed. As for the IFD, either 5 µM of Bengal Rose (RB) and 20 µM Curcumin were used as FS and light-emitting diodes (LED) as light sources with wavelengths of 520 nm and 460 nm; 4 control groups were proposed; non-irradiated group without FS (L-F-), group only with FS (L-F+), irradiated group with and without FS (L+F+, L+F-). As a result, all *S. schenckii* strains were resistant to ketoconazole and fluconazole. IFD significantly reduced *S. schenckii* using RB at 10 J/cm² and completely inhibited the fungus with curcumin at 20 J/cm², each with respect to the L-F- control group. In conclusion, antifungal drugs are not effective in eliminating *S. schenckii* at the concentrations used in this study, while IFD with RB or curcumin in combination with LED are effective in inhibiting *S. schenckii* yeasts in *in-vitro* studies.

Keywords: sporotrichosis, *Sporothrix schenckii*, photosensitizer, photodynamic inactivation.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis papás María y Artemio, y hermanos Rocío y Artemio, quienes son mi mayor motor a seguir adelante, por su gran amor y apoyo incondicional que me brindan en todo momento y en cada toma de mis decisiones.

A mi asesora, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco, quien me inspiró y aceptó como su tesista para trabajar en su área de investigación, que, con su paciencia, conocimiento y ayuda, me orientó en cada una de las etapas que conllevo el concluir esta tesis.

A la M. C Alejandra Paula Espinosa Taxis, quien, con su paciencia y tiempo, me asesoró y transmitió sus conocimientos.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, óptica y Electrónica (INAOE), por brindar recursos y herramientas necesarios para llevar a cabo el trabajo de investigación de esta tesis.

A Diana y Caroleny, por la amistad, motivación, consejo y apoyo que me brindan en todo momento.

A Mayra Félix Salazar Morales, por su disposición y apoyo en el proceso de desarrollo del trabajo de tesis en laboratorio de Terapia Fotodinámica.

A Erendira, Luis, Denisse, Jesús Miguel, Vania y Nayeli, que siempre estuvieron allí para darme palabras de aliento y apoyo.

Al grupo de biofotónica, por sus comentarios y sugerencias.

Por último, a mis amigas Alejandra, Anahí, Ivette y Elva por su apoyo y cariño brindado.

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla.

Tabla de Contenido

Resumen	II
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	IV
Tabla de Contenido.....	VI
Índice de Figuras	IX
Índice de Tablas.....	X
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del Problema	3
1.3 Justificación	4
1.4 Hipótesis	5
1.5 Objetivos	5
1.5.1 Objetivo General.....	5
1.5.2 Objetivos Específicos	5
Capítulo 2. Marco Teórico.....	6
2.1 Esporotricosis.....	6
2.1.1 Historia	6
2.1.2 Epidemiología.....	7
2.1.3 Morfología.....	9
2.1.4 Factor de Virulencia	10
2.1.5 Aspectos Clínicos	12

2.1.6	Diagnóstico.....	14
2.1.7	Tratamientos	17
2.2	TFD	18
2.2.1	Componentes de la TFD	19
2.3	Mecanismo de Acción de la TFD	25
2.4	Trabajos Relacionados	26
Capítulo 3. Metodología.....		28
3.1	Microorganismo.....	28
3.2	Preparación de los Medios de Cultivo.	28
3.2.1	Agar Mycosel	28
3.2.2	Agar BHI + Cloranfenicol	29
3.2.3	Caldo Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD) + Fosfomicina	29
3.2.4	Caldo BHI + Cloranfenicol	30
3.3	Optimización de las Condiciones de Cultivo de <i>S. schenckii</i> en la Obtención de Levaduras.....	30
3.4	Condiciones de Cultivo Optimizadas de <i>S. schenckii</i> en la Obtención de Levaduras	30
3.5	Optimización de la Concentración Celular para la IFD.....	31
3.6	Prueba de Sensibilidad Antifúngica.....	31
3.7	FS y Fuentes de Luz.....	32
3.8	IFD de Levaduras de <i>S. schenckii</i> spp	34
3.9	Análisis Estadístico.....	35

Capítulo 4. Resultados 36

 4.1 Optimización del Cultivo de Levaduras y Concentración Celular de *S. schenckii* 36

 4.2 Sensibilidad de *S. schenckii* ante Ketoconazol y Fluconazol 37

 4.3 Efecto de la IFD en Cepas de *S. schenckii*..... 40

Capítulo 5. Discusiones 45

Capítulo 6. Conclusiones y Trabajo a Futuro 53

 6.1 Conclusiones 53

 6.2 Trabajo a Futuro..... 53

Capítulo 7. Referencias..... 55

Índice de Figuras

Figura 1. Morfologías de la especie de <i>S. schenckii</i> spp	10
Figura 2. Espectro electromagnético	22
Figura 3. Diagrama de Jablonski.....	26
Figura 4. Morfologías obtenidas de <i>S. schenckii</i>	37
Figura 5. Resultados obtenidos del ensayo de sensibilidad antifúngica de cepas de <i>S. schenckii</i> en su fase de levadura.....	39
Figura 6. Pruebas de IFD con la cepa 303 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados.. ..	41
Figura 7. UFC de controles y tratamientos con la cepa 303 después de la IFD.	41
Figura 8. Pruebas de IFD con la cepa 521 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados.. ..	42
Figura 9. UFC de controles y tratamientos con la cepa 521 después de la IFD.	43
Figura 10. Pruebas de IFD con la cepa R-03-10-1 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados.....	44
Figura 11. UFC de controles y tratamientos con la cepa R-03-10-1 después de la IFD..	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones antifúngicas y valores de diámetro por una prueba de susceptibilidad en función de los puntos de corte establecidos en el documento M44-A....	32
Tabla 2. Concentraciones, longitudes de onda y densidad de energía para la IFD correspondientes para cada FS.	35
Tabla 3. Concentraciones celulares óptimas de las cepas de <i>S. schenckii</i> empleadas en ensayos de IFD.	37
Tabla 4. Perfil de sensibilidad de las cepas de <i>S. schenckii</i> ante ketoconazol y fluconazol con relación al diámetro de su halo de inhibición.	38
Tabla 5. IFD en especies de <i>S. schenckii</i> empleando diferentes FS.	47

Capítulo 1

Introducción

En este capítulo introductorio se mencionan los antecedentes de *S. schenckii* y sobre la IFD, así como el planteamiento del problema, la justificación y la importancia de llevar a cabo el trabajo de investigación, también incluye la hipótesis y los objetivos planteados para nuestro estudio.

1.1 Antecedentes

La esporotricosis es una infección micótica subcutánea y granulomatosa, de desarrollo subagudo o crónico causada por especies del hongo dimórfico *Sporothrix* (Corell, 2006), en su fase filamentosa habita en plantas y suelo a temperaturas menores de 37°C, en su fase de levadura sobre medios enriquecidos y en tejidos parasitados a temperaturas de 37°C. Su presencia es mundial y sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Ruiz & Guillén, 2006). El primer aislamiento de *S. schenckii* fue realizado por Benjamin Schenck en 1898 de un paciente de 36 años con lesiones primarias en el dedo índice, la cual se extendía hacia los canales linfáticos del brazo en la parte radial (Barros et al., 2011). En 1900, el nombre *S. schenckii* fue propuesto por el Dr. Hektoen junto con el Prof. Perkins, quienes lo describieron de un segundo caso con un paciente de 5 años de edad (Hektoen & Perkins, 1900). El primer caso de esporotricosis en México fue reportado a la Academia Nacional de Medicina en 1913 por Gayón (del Moral et al., 2007). Actualmente, es considerada como una micosis ocupacional (Mayorga-Rodríguez et al., 2018.; Zurabian & Hernández, 2019). Dada la resistencia del agente etiológico ante los tratamientos existentes, está la necesidad de buscar nuevos métodos para tratar la esporotricosis, por ello recurrimos a la terapia fotodinámica (TFD).

Se sabe que desde los años 3000 a. de C. a 1699, Egipto, China, Grecia, Mesoamérica emplearon la luz para el tratamiento de lesiones, utilizaban plantas y semillas que contenían

psoraleno¹, los maceraban y las colocaban sobre la piel, posteriormente se exponían al sol. La empleaban para tratar la psoriasis, el vitíligo, cáncer de piel y otras enfermedades de la piel. En 1948 se descubrió que los psoralenos contenían ingredientes fotoactivos que participaban en la efectividad de la terapia (Gallegos, 2015). En el año 1900 en Munich, Alemania, Oscar Raab, estudiante de Von Tapeinner descubrió la TFD al observar la muerte de la infusoria (alga) causado por la combinación de naranja de acridina con luz, dicho efecto se le asoció a las propiedades del colorante con la fluorescencia. Para 1903 Tappeiner junto con Jesionek realizaron la primera aplicación clínica empleando la eosina como FS y fuente de luz blanca para tratar tumores de piel, así, un año más tarde junto con Jodlbauer demostraron la importancia de la presencia del oxígeno para los efectos ocasionados por el FS, ambos en 1907 introdujeron el término de “acción fotodinámica” (Hamblin & Huang, 2013; Laguna, 2019). En 1970 Thomas J. Dougherty fue el pionero de la aplicación clínica de la TFD (Juzeniene & Moan, 2007). La TFD implica el uso de un tinte sensible a la luz no tóxico llamado fotosensibilizador (FS) en combinación con luz visible de longitud de onda apropiada que coincida con el espectro de absorción del FS y con oxígeno ambiental, como resultado se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y oxígeno molecular excitado (¹O₂) (Laguna, 2019), las cuales son capaces de causar daños a los sistemas vivos y activar mecanismo de autodestrucción celular (Gallegos, 2015). El empleo de esta técnica para eliminar microorganismos patógenos (agentes que causan alguna enfermedad) se le llama Inactivación Fotodinámica (IFD) (Tegos & Mylonakis, 2012). Hay diversas investigaciones sobre la IFD en microorganismos, tanto en estudios *in-vitro* como *in-vivo* que ayudan al desarrollo de nuevos FS, a la optimización de protocolos y nuevas indicaciones para la IFD (Austin & Jagdeo, 2018) con el fin de ser empleados en tratamientos de enfermedades por

¹ Compuestos fotosensibilizantes que se encuentran en algunas plantas.

microorganismos patógenos. Para ello nuestro estudio se basa en la IFD de cepas de *S. schenckii* empleando diferentes FS.

1.2 Planteamiento del Problema

Actualmente, gracias a los métodos moleculares, se conoce que la esporotricosis es causada por un complejo de especies de *S. schenckii* de diferentes morfologías, niveles de virulencia, distribución, etc. En la República Mexicana la esporotricosis es la micosis subcutáneas más frecuentes (Zurabian & Hernández, 2019). Afecta a la población con nivel socioeconómico bajo, principalmente a la población que vive en zonas rurales, ya que se encuentran en constante contacto con plantas y suelo, las cuales son las principales fuentes en las que se contrae la micosis (Bravo, 2012; Estrada-Castañón et al., 2018, 2019; Rojas et al., 2018; Mayorga-Rodríguez et al., 2019). Con relación a los tratamientos, los fármacos más empleados son el yoduro de potasio (KI) por su bajo costo e itraconazol por su eficiencia, aunque es más costoso. El tiempo de tratamiento va de 2 hasta 12 meses. También, los fármacos pueden llegar a causar efectos secundarios, así como náuseas, sabor metálico, alergias, hiper e hipotiroidismo en el caso de KI; para itraconazol puede causar dolor de cabeza, desórdenes gastrointestinales, en pacientes con insuficiencia renal se reduce su eliminación a un 50%, su administración se restringe a las mujeres embarazadas y por ende se recurre a la anfotericina, sin embargo, por el largo tiempo de tratamiento puede llegar a causar toxicidad cardíaca y renal. Cabe señalar que las constantes administraciones de dichos fármacos dan como resultado posibles alteraciones y daños hepáticos al paciente (Mayorga-Rodríguez et al., 2018; Orofino-Costa et al., 2017; Rodrigues et al., 2014; Yao et al., 2019; Zeppone, 2015) o conlleven al desarrollo de resistencias del hongo ante los fármacos ocasionando fallas terapéuticas y remisión de micosis (Gilaberte et al., 2014; Tirado-Sánchez & Bonifaz, 2016).

1.3 Justificación

Considerando las limitantes, los efectos secundarios, los periodos de tratamientos actuales de la esporotricosis y al tipo de población mayormente afectada, se ve la necesidad de la búsqueda de una alternativa para el tratamiento antifúngico contra el agente etiológico de la micosis a fin de reducir costos, tiempos de tratamiento y reacciones adversas. Investigadores reportan lo prometedor que es el efecto de la IFD en microorganismos patógenos para el tratamiento de micosis subcutáneas y cutáneas de especies como *Candida* spp, *Trichophyton* spp, *Microsporium* spp, *Cryptococcus* spp, *Fonsecaea* (Calzavara-Pinton et al., 2005; Nosanchuk, 2015). En relación a estudios sobre la IFD tanto *in-vitro* como *in-vivo* han sido efectivos en la inhibición de especies del complejo *S. schenckii* (Gilaberte et al., 2014; Nunes et al., 2014; Li et al., 2019). En la IFD se emplean diferentes tipos de FS, entre ellos están los derivados de porfirinas, ftalocianinas, las sintéticas, orgánicas, entre otras, pero, hasta ahora, en *S. schenckii* solo se ha reportado estudios de IFD con el FS sintético azul de metileno (AM) y ácido aminolevulínico (ALA). Cabe mencionar que la investigación sobre la IFD en *S. schenckii* empezó hace menos de una década, por lo que actualmente existen pocos estudios reportados y es por ello que se requiere más investigación para poder confirmar el efecto y la eficacia de la IFD en la eliminación de *S. schenckii*. Mencionado lo anterior hemos optado el realizar estudios experimentales en la IFD en *S. schenckii* empleando FS de familias químicas distintas como rosa de bengala que es un FS sintético de la clase xanteno y curcumina un FS orgánico, para que en un futuro puedan llegar a ser una opción al tratamiento de la esporotricosis. Es importante mencionar que la IFD es de mínima invasión, los FS tienen la ventaja de ser poco o no tóxicos y han demostrado ser eficientes en la inhibición de otros microorganismos patógenos (Dovigo et al., 2013; Araújo et al., 2014; Quishida et al., 2016; Silva et al., 2018; Masoule et al., 2018; Tunccan et al., 2018; Picco et al., 2019).

1.4 Hipótesis

Es posible eliminar levaduras de *S. schenckii* a través de la IFD empleando rosa de bengala y/o curcumina como FS.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la IFD en ensayos *in-vitro* empleando diferentes FS en levaduras de *S. schenckii* spp.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones de cultivo y de la obtención de levaduras de *S. schenckii*.
- Evaluar la sensibilidad antifúngica de levaduras de *S. schenckii* a los fármacos ketoconazol y fluconazol.
- Determinar las concentraciones celulares óptimas de levaduras de *S. schenckii* para la IFD.
- Evaluar la IFD con RB y/o curcumina como FS en *S. schenckii* spp.
- Analizar la eficiencia de la IFD en *S. schenckii* a través de métodos estadísticos.

Capítulo 2

Marco Teórico

La esporotricosis es tema de investigación desde hace varias décadas junto con su agente etiológico *S. schenckii*. Gracias a los métodos moleculares ahora se sabe que *S. schenckii* es un complejo de especies la cual también es conocido como *S. schenckii sensu lato*. Se localiza principalmente en regiones con climas tropicales, vive en las plantas y suelo. Actualmente se conocen dos vías de transmisión de la micosis; por inoculación traumática de la piel con material contaminado y por transmisión zoonótica, principalmente de gatos. La micosis tiene varias manifestaciones clínicas, las más reportadas son la cutánea linfangítica y fija. En este capítulo se abordarán temas relacionados con la micosis y el complejo *S. schenckii*, como la epidemiología, morfología, presentaciones clínicas, factores de virulencia, métodos de diagnósticos y tratamientos. Por otra parte, se tratarán temas relacionados con la TFD, una técnica empleada para el tratamiento de células cancerígenas y enfermedades de la piel, su aplicación en microorganismos se le conoce como IFD. También se describirán los tipos y propiedades que deben cumplir tanto los FS como las fuentes de luz para la eficacia de la TFD, su mecanismo de acción y su aplicación en *S. schenckii*.

2.1 Esporotricosis

La esporotricosis afecta a nivel subcutáneo por inoculación traumática, en la gran mayoría se presentan lesiones en los miembros superiores y cara, puede extenderse hacia los músculos, fascia, huesos y en algunos órganos, también se puede adquirir por la inhalación de esporas la cual puede afectar al pulmón.

2.1.1 Historia

De acuerdo a los resultados obtenidos del primer aislamiento de *S. schenckii*, el Dr. Erwin F. Smith del departamento de agricultura de Washington asignó tentativamente al hongo al género *Sporotrichum* (Hektoen & Perkins, 1900). Años más tarde, Langeron y Vanbreuseghem dividieron en periodos las etapas de la esporotricosis; los primeros dos descubrimientos realizados por Benjamin Schenck, y Hektoen con Perkins, lo llamaron

“periodo americano”, el siguiente periodo fue en 1903 con el primer caso de esporotricosis en Francia, descrita por Beurmann y Gougerot, está le denominaron “periodo francés” (Flores et al., 1982), ellos emplearon por primera vez el yoduro de potasio (KI) para tratar la esporotricosis, a su vez se creyó que era una nueva especie, la cual Matruchot y Ramond denominaron “*Sporotrichum beurmanni*” (Taylor, 1913). En 1907 Lutz y Splendore reportaron el primer caso de esporotricosis en animales, en ratas infectadas de Brasil (Barros et al., 2011). El tercer periodo fue denominado “periodo sud-africano”, inició en 1947 donde se reportaron 3000 casos de mineros contagiados con esporotricosis en Witwatersrand, esto ayudó a confirmar previos estudios inconsistentes (Flores et al., 1982). En 1961 Howard describió los cambios morfológicos en *S. schenckii* al pasar de su fase filamentosa a levadura (Howard, 1961). Sin embargo, hasta esa fecha se tenía un error sobre su asignación al género *Sporotrichum* y fue Carmichael quien corrigió dicha equivocación, puesto que no había ningún parecido entre las especies (Carmichael, 1962). Por décadas se consideró a *S. schenckii* como morfos asexuales de *Ophiostoma stenoceras* hasta que de Beer y colaboradores realizaron estudios filogenéticos de *S. schenckii* y *O. stenoceras* aislados de diferentes sustratos y con base a los resultados obtenidos concluyeron que son especies distintas (de Beer et al., 2003; de Meyer et al., 2008). Más tarde, mediante la identificación molecular y el análisis morfológico de *S. schenckii* de diferentes regiones geográficas se descubrió que son de distintas especies y a su conjunto le llamaron, complejo de *S. schenckii sensu lato*, el complejo la conforma especies capaces de infectar a humanos y animales las cuales son: *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* y *S. luriei* (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2008; de Meyer et al., 2008; Rodrigues et al., 2016; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017).

2.1.2 Epidemiología

La esporotricosis se encuentra distribuida en todo el mundo, en regiones tropicales con temperaturas de 25-28 °C con humedad relativa entre 80-95%. Los países con mayor

predominio de esta micosis son Estados Unidos, Brasil, México, Colombia, Perú, Guatemala, Uruguay, Costa Rica, El Salvador, Venezuela, Argentina, Bolivia, China, Japón, India y Oceanía, en Europa se reporta un menor número de casos (López-Romero et al., 2011; Chakrabarti et al., 2014; Orofino-Costa et al., 2017; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017). No obstante, la endemicidad de los agentes etiológicos de la esporotricosis se limita a ciertas regiones (Lopes-Bezerra et al., 2018). El Sur-Sureste de Brasil se considera como una región endémica de esporotricosis en felinos y humanos, siendo *S. brasiliensis* el agente etiológico de mayor predominio. En dicha región los gatos son los animales más infectados a causa de su estilo de vida callejera y a su vez favorece la transmisión entre su misma especie, a perros y a humanos. Los felinos llegan a presentar lesiones en la cavidad nasal, cavidad oral y en uña (Seyedmousavi et al., 2018). Espíritu Santo y Río de Janeiro presentan el mayor número de casos de gatos infectados (mayores de 500 y 1000 casos, respectivamente), debido a ello la infección en humanos en el sur-sureste de Brasil está más relacionada con la transmisión zoonótica que a la transmisión por inoculación traumática con material contaminado, la cual está asociada a la ocupación de la población, tal como sucede al norte, noreste y centro de Brasil, donde *S. schenckii* es el hongo de mayor prevalencia, también se reporta el aislamiento de *S. mexicana* (Rodrigues et al., 2014). En Asia (China, India y Japón), *S. globosa* es la especie prevaleciente, se ha aislado en Europa, Sudamérica (Rodrigues et al., 2014; Orofino-Costa et al., 2017; Moussa et al., 2017) y en México (Rojas et al., 2018). Un estudio realizado en Jilin, al norte de China, reveló un aumento en el número de casos de esporotricosis durante 2010-2018, puesto que se reportaron 2,968 casos de infección con un promedio de 330 casos por año (Lei Yao et al., 2018). Por otra parte, siendo *S. schenckii* ampliamente distribuido, hasta el momento, en China, solo se han reportado cuatro aislamientos (Lopes-Bezerra et al., 2018). En 2011 un grupo de mineros al Sur de África se infectaron de esporotricosis causados por la especie *S. schenckii*, se cree que la fuente de infección fue el suelo y madera podrida contaminada, localizados en los niveles subterráneos de la mina (Govender et al., 2015). En Analamanga, Madagascar, la prevalencia es de 0.27 casos por 100,000 habitantes (Rasamoelina et al., 2019). En Estados Unidos, en el periodo de 2000-2013 se estimaron

1,471 hospitalizaciones asociadas con esporotricosis en personas mayores de 18 años, el rango de edad con más casos fue de 45-64 años con mayor predominio de hospitalizaciones al sexo masculino. La mayor parte de los casos se encontraban en la zona Sur, así mismo, el mayor y menor número de incidencia fue en primavera e invierno, respectivamente (Gold et al., 2016). En la República Mexicana las regiones de endemia son la zona centro, centro-occidente y regiones costeras. Los estados de Jalisco, Ciudad de México, Oaxaca y Puebla ocupan los primeros lugares con mayor número de casos reportados. La población afectada se dedica a la agricultura, alfarería, albañilería, carpintería, florería, producción de café e inclusive a las amas de casa y estudiantes (Bravo, 2012; Pérez et al., 2007; Estrada-Castañón et al., 2018, 2019; Rojas et al., 2018; Mayorga-Rodríguez et al., 2019). Jalisco y Puebla, cuentan con reportes de más de 1000 casos y 25 casos/1000 habitantes, respectivamente, afectando un 30% a niños y un 70% a adultos (Chakrabarti et al., 2014). En un análisis de casos de esporotricosis en el periodo de 1960 al 2017, se reporta una frecuencia de 20.80 casos por año en la República Mexicana. Jalisco resalta con un 93.20% de todos los casos. Para los años 90, se observó un descenso en el número de casos, la cual asocian con la mejora de medidas de protección laboral y/o socioeconómicas (Mayorga-Rodríguez et al., 2018), no obstante, como se ha venido mencionando, la esporotricosis sigue siendo considerada como una de las micosis subcutáneas más frecuente en México (Zurabian & Hernández, 2019). *S. schenckii* s. s. se presenta un 90% y las especies *S. globosa* y *S. mexicana* un 10% (Rodrigues et al., 2014).

2.1.3 Morfología

S. schenckii es un hongo dimórfico, en su estado saprófito o en cultivos a temperatura de 25 °C se encuentra en forma filamentosa, tiene hifas delgadas, hialinas y septadas de 1-2 µm con ramificaciones que dan a conidióforos con pequeñas vesículas y en su extremo distal se encuentran dentículos en forma de ramillete que dan lugar a los conidios. A vista macroscópica se observan colonias filamentosas, lisas y arrugadas de color blanco a crema,

después de un tiempo se torna de color grisáceo a negro debido a la producción de melanina. En su estado parasitario o en cultivos enriquecidos como BHI a 37 °C se producen colonias levaduriformes de varios tamaños, son ovaladas de 2-6 μm y elongadas en forma de cigarro. Macroscópicamente son lisas y de color blanco a crema. Los factores de la atmósfera influyen en la obtención de levaduras en cultivos *in-vitro*, la más importante es la temperatura (Lopes-Bezerra et al., 2006; Barros et al., 2011; Morales et al., 2014) (figura 1).

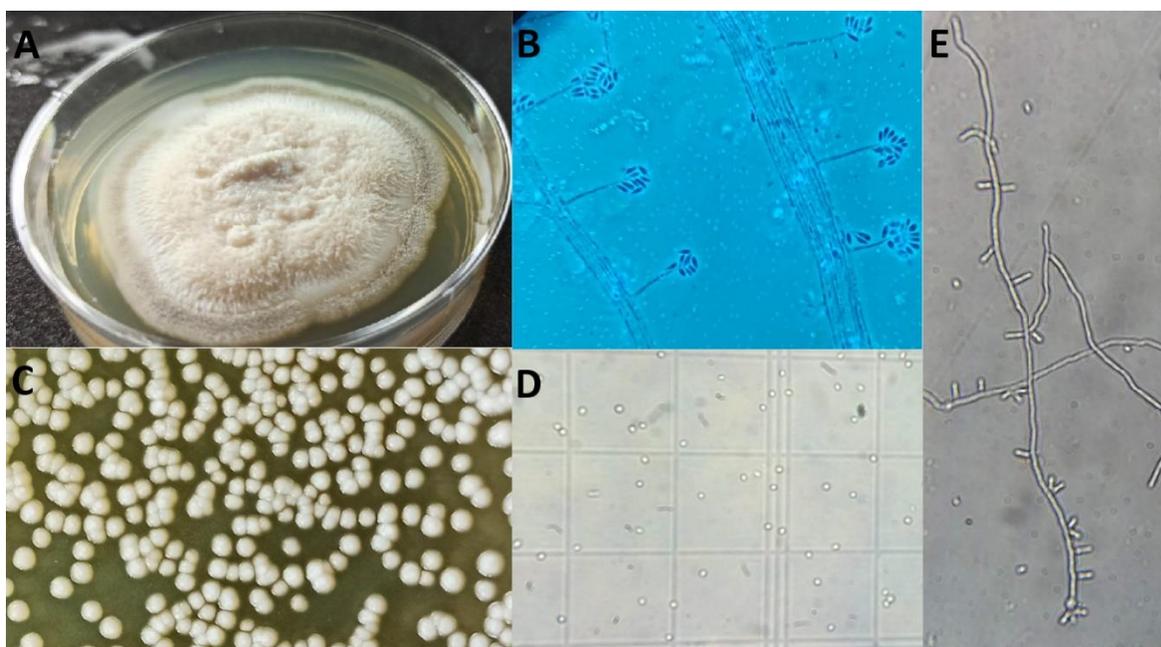


Figura 1. Morfologías de la especie de *S. schenckii* spp. (A) Fase filamentosa obtenida en agar Mycosel a 28°C con tres semanas de crecimiento; (B) Conidios en forma de ramilletes que salen de hifas; (C) Fase levaduriforme obtenida en medio agar BHI a 37°C con 7 días de crecimiento; (D) Levaduras a nivel microscópico; (E) Pseudomicelio (Elaboración propia).

2.1.4 Factor de Virulencia

La patogenicidad de los hongos está relacionada con la producción de factores de virulencia, estos participan en la adhesión, invasión y evasión del sistema inmune de su hospedero. En un estudio, se compararon la patogenicidad de las especies del complejo *S. schenckii* en

modelos murinos, en la cual *S. brasiliensis* fue la especie más virulenta, seguidos las especies *S. schenckii* s. s. y *S. globosa*, las menos o nada virulentas fueron *S. mexicana* y *S. pallida* (antes *S. albicans*) (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). El dimorfismo se presenta en todas las especies del complejo y la temperatura es un factor importante en su capacidad de cambiar a las formas mencionadas anteriormente (Lopes-Bezerra et al., 2006), gracias a ello, le confiere la habilidad de adaptarse a los cambios ambientales (Chakrabarti et al., 2014; Tellez et al., 2014). La termotolerancia es otro factor de virulencia (Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017), se ha visto que *S. schenckii* puede resistir a bajas temperaturas (Bravo, 2012). Se conoce que algunos aislamientos son capaces de tolerar una temperatura de 35°C y otros hasta 37°C; los aislamientos de lesiones cutáneas diseminadas o extracutáneas son más tolerantes que los aislamientos de lesiones cutáneas fijas (Teixeira et al., 2009; Barros et al., 2011). *S. globosa* no tiene la habilidad de desarrollarse a 37 °C, por ello es menos virulenta (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Moussa et al., 2017; Rojas et al., 2018). Por otra parte, el polimorfismo en los cromosomas y la variación de la diversidad genética de algunas especies se relaciona con su nivel de virulencia (Rodrigues et al., 2014; Sasaki et al., 2014). Es importante mencionar que la pared celular de los hongos patógenos es el primer contacto con el huésped, por lo tanto, su estructura y sus componentes juegan un papel muy importante en la adhesión de la membrana extracelular del huésped. *S. schenckii* y *S. brasiliensis*, ambos presentan una bicapa en su pared celular con microfibrillas en la capa externa. *S. brasiliensis* tiene una capa más gruesa debido a un aumento del 20% y 100% más de quitina y ramnosa (componentes de la pared celular), respectivamente, a comparación de *S. schenckii* (Lopes-Bezerra, Walker, et al., 2018). La expresión de las adhesinas participa en la adherencia y colonización en el ambiente y a su huésped con la finalidad de establecer una infección (Tellez et al., 2014). *S. schenckii* tiene la capacidad de adherirse a la fibronectina, laminina y colágeno tipo II de la matriz extracelular del hospedero (Lima et al., 1999; Teixeira et al., 2009) y el calcio (Ca²⁺) participa en su capacidad de adherencia (Lima et al., 2001). La presencia de antígenos también son los responsables en la adhesión (Saúl & Bonifaz 2011). Otro factor de virulencia es la producción de enzimas de *S. schenckii*, le proporcionan

resistencia contra el estrés oxidativo en la defensa de las ROS y su papel en la supervivencia en el huésped (Tellez et al., 2014; Ruiz-Baca et al., 2019). En su fase levaduriforme producen proteinasas I y II, capaces de hidrolizar el estrato córneo, colágenas y elastina (Bravo, 2012). La melanina, otro factor de virulencia, es un pigmento de color marrón oscuro o negro producido por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos con la función de proteger la pared celular de los hongos de la radiación UV, enzimas líticas y oxidantes y de las temperaturas extremas (Jacobson, 2000; Langfelder et al., 2003). La melanina en *S. schenckii* solo se encuentra en conidios (Barros et al., 2011). También existen especies albinas en *S. schenckii*, estas presentan fallas en la producción del pigmento y por ende son más susceptibles ante los estresores ambientales y al sistema inmune del huésped. Existen diferentes rutas en la producción de melanina, se conoce la ruta de la 1-8-dihydroxynaphthalene (DHN) y de la 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) (Langfelder et al., 2003). La DHN- melanina en *S. schenckii*, le provee protección contra la radiación UV, a temperaturas extremas, resistencia ante fármacos antifúngicos, menor susceptibilidad a la degradación de enzimas, resistencia a la fagocitosis y a los radicales libres (Tellez et al., 2014). En un estudio, se observó que *S. brasiliensis* produce más rápido la DHN- melanina que *S. schenckii*, además de que produce los tres tipos de melanina (DHN- melanina, piomelanina y eumelanina) en agar papa dextrosa a 37 °C (Almeida-Paes et al., 2016).

2.1.5 Aspectos Clínicos

La esporotricosis es una micosis polimórfica, es decir, que se manifiesta en varias formas clínicas, la cual no depende del agente causal, sino, de la respuesta inmune del huésped, el sitio y profundidad de inoculación (Saúl & Bonifaz 2011; Bravo, 2012; Ribeiro et al., 2015). La gran mayoría de los autores la clasifican en cuatro formas; la más común es la forma linfocutánea con un 70% de los casos, la forma cutánea fija con un 25 % de los casos, las formas cutáneas diseminadas y extracutáneas son menos frecuentes. Las dos primeras formas

clínicas mencionadas son muy comunes en personas inmunocomprometidas, mientras que las últimas dos, son más vistas en personas inmunodeprimidas (Saúl & Bonifaz 2011; Yagnik, 2017). La forma linfocutánea o linfangítica es crónica y asintomática, el periodo de incubación es de 1-4 semanas y regularmente afecta a manos, pies y cara. En el sitio de inoculación se forma el chancro esporotricósico (aparición de nódulos), luego se ulceran y presentan bordes eritematosos. Hay casos en los que se presenta en forma de placas verrugosas, eritematoescamosas y ulcerosa, tras días o semanas después aparecen nódulos secundarios de manera escalonada siguiendo al tracto linfático regional (Armenteros, 1966; Saúl & Bonifaz 2011; Carrasco-Zuber et al., 2016; Ackermann et al., 2017; Méndez-Tovar et al., 2019).

La forma cutánea fija es crónica, la lesión es inaparente y permanece en el sitio de inoculación en la piel. Se observa como nódulo, chancro, placas verrugosas con bordes limitados, úlceras, con halo eritematoso, cubierta de escamas y costras. La mayoría de las lesiones se presentan en cara y extremidades (Bravo, 2012; Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017; Taninratapat & Srisuttiyakorn, 2019).

En la forma extracutánea se encuentra la esporotricosis pulmonar, es una de las menos frecuentes, generalmente se reporta en regiones de alta endemia y es adquirida mediante la inhalación de esporas o por diseminación hematogena en inmunodeprimidos. El tipo más común es el crónico en el cual el 98% de los casos son asintomáticos; en los casos sintomáticos se presenta neumonía con tos leve y expectoración mucopurulenta. En las radiografías se observan pequeñas opacidades nodulares, cavidades grandes o infiltrados tipo miliar sobre los lóbulos. El de tipo crónico y progresivo afecta en la mayoría al traqueo-bronquial que pueden llegar a obstruir los bronquios (de Olivera et al., 2017; Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017; Rojas, 2017; Farooqui & Youness, 2018).

Esporotricosis diseminada (sistémica) se manifiesta en la cavidad abdominal, sistema nervioso central (Ferreira, 2019), en membranas mucosas y en otros órganos. Se desarrollan

placas verrucosas, nódulos ulcerados, lesiones líticas (Al-Tawfiq & Wools, 1998; Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017).

Esporotricosis osteoarticular, es inusual, derivada de la diseminación hematógena e inicia como lesiones cutáneas eritematosas supuradas y nodulares en miembros superiores o inferiores, se presenta dolor que va progresando a poliartritis, sinovitis o periostitis y fiebre. En radiografías se ha observado lesiones líticas con halo esclerótico. Los sitios de afección suelen ser rodillas, fémur, huesos del carpo, metacarpo, tibia, radio, peroné, y costillas (Bravo, 2012; Ribeiro et al., 2015).

2.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la esporotricosis no se basa en sus manifestaciones clínicas, debido a que son múltiples, además, existen otras infecciones causadas por bacterias u hongos patógenos que presentan manifestaciones clínicas con características similares a la esporotricosis. Por ello es necesario realizar un diagnóstico diferencial. Algunas enfermedades a considerarse son sífilis, tuberculosis, furunculosis, VIH, hepatitis (Dearborn, 1999), ántrax cutáneo, leishmaniasis, nocardiosis, blastomicosis, cromoblastomicosis, paracoccidiomicosis, eumicetomas, tularemia, sarcoidosis (Reiss et al., 2011; Bravo, 2012), osteomielitis, leucemia, linfoma óseo multifocal primario o neuroblastoma metastásica (Ribeiro et al., 2015).

A continuación, se mencionan los tipos de diagnósticos mayormente utilizados:

El diagnóstico más empleado es el aislamiento del agente etiológico del huésped para su identificación. La muestra se obtiene de lesiones de la piel, biopsias, pus, abscesos, secreciones y fluidos producidos por el tejido infectado (Orofino-Costa et al., 2017).

La microscopía directa: es un examen directo de la muestra aislada, para ello se emplea hidróxido de potasio (KDI), se realiza una observación microscópica minuciosa con el fin de

observar la presencia de levaduras del hongo con la ayuda de medios de tinción como Gram, Giemsa, CAS y PAS (Zurabian & Hernández, 2019), aunque el método es de bajo costo, es considerado de baja especificidad y sensibilidad, debido a ello no es viable para el diagnóstico de muestras aisladas de lesiones cutáneas fijas y linfangítica por la poca presencia de levaduras (5% y 10%) (Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017). Una alternativa es la tinción con calcoflúor o inmunofluorescencia (Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017). Se señala que los aislados de animales, infecciones diseminadas y extracutáneas de humanos presentan una mayor cantidad de levaduras y por lo tanto son útiles para su diagnóstico (Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017; Orofino-Costa et al., 2017). En el examen se observan cuerpos asteroides formados de levaduras centrales y únicas, rodeadas de clavav radiales de diferentes tamaños y en infecciones tempranas se presentan levaduras alargadas (Bravo, 2012).

Cultivo: es considerado como el método estándar de oro, se realiza por identificación fenotípica. Las muestras son obtenidas de exudados de lesiones, escamas y fragmentos de la piel, pus, sangre y otras secreciones del tejido infectado, posteriormente son cultivados en medios enriquecido (Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017). Los cultivos se realizan en medios agar Sabouraud dextrosa (SDA) con antibióticos o en agar Mycosel a temperaturas entre 25-28 °C. A los 3-5 días de crecimiento se observan colonias filamentosas, blancas, lisas, ligeramente secas con surco radial y pigmento gris en el centro (Morales et al., 2014; Carrasco-Zuber et al., 2016). También es importante comprobar su dimorfismo, las muestras se cultivan en medios como: agar BHI, gelosa sangre o agar chocolate (para distinguirlas de bacterias) a 37 °C. A nivel microscópico se observan blastoconidios elongados y blastosporas (Saúl & Bonifaz 2011; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017). El diagnóstico se hace después de 14 días de crecimiento del hongo (Rojas, 2017).

Histología: en ella se realiza una biopsia punch o también llamada biopsia por punción, de lesiones cutáneas, la muestra se fija a formaldehído al 10%, se puede teñir con hematoxilina-eosina, PAS o metenamina-plata de Gomori. Se observan estructuras de cuerpos asteroides

y cúmulos de levaduras redondas y elongadas (Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017). Los cuerpos asteroides lo forman las levaduras únicas rodeadas de eosinófilos, neutrofilos, plasmocitos y linfocitos. También se emplean anticuerpos específicos como la fluoresceína o avidina-peroxidasa y con ello se observan levaduras de color verde amarillo (Bravo, 2012; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017; Orofino-Costa et al., 2017).

Pruebas serológicas: se realiza inmunoelectroforesis, pruebas de aglutinación con látex, inmunodifusión. Las pruebas ELISA y Western Blot, se utilizan para detectar anticuerpos específicos de lesiones cutáneas empleando los biomarcadores antígeno Gp70 o Gp60. Se reporta que los anticuerpos pueden llegar a tardar en establecerse o desaparecen después de un tiempo, por ello estas pruebas son consideradas de baja especificidad y de sensibilidad (Acha & Szyfres, 2003; Bravo, 2012; Orofino-Costa et al., 2017; Zurabian & Hernández, 2019).

Prueba intradérmica con esporotricina: es empleada para lesiones cutáneas mediante la inyección de un antígeno péptido polisacárido. La lectura se realiza después de 48 horas de la aplicación, resulta positiva cuando hay presencia de una induración (tejido duro) de 5 mm o mayor. El resultado puede llegar a dar positivo si se ha tenido contacto con el hongo sin necesidad de tener la infección. La prueba intradérmica es el método de diagnóstico más empleado con fines epidemiológicos (Bravo, 2012; Bonifaz & Tirado-Sánchez, 2017; Zurabian & Hernández, 2019).

Métodos moleculares: el empleo de este método ha ayudado en la identificación de las especies de *S. schenckii* mediante el empleo de genes codificadores de proteínas como β -tubulina (BT2), calmodulina (CAL) y el factor de elongación (EF- α 1), por la secuenciación de la transcripción interna espaciadora (ITS) y del PCR en la amplificación de genes como quitina sintasa, ADN de topoisomerasa II, ADNr 28s y 18s. Los métodos moleculares son empleados con fines de investigación y epidemiológicos en la identificación de especies (López-Romero et al., 2011; Orofino-Costa et al., 2017; Zurabian & Hernández, 2019).

2.1.7 Tratamientos

El tratamiento para la esporotricosis dependerá de la gravedad de la infección, localización, ya sea cutánea, diseminada o en órganos (Yagnik, 2017) y del tipo de paciente (niños, mujeres embarazadas o inmunodeprimidos). La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y otros autores tiene recomendaciones para el tratamiento de pacientes infectados con la micosis.

Los tratamientos son los siguientes (Kauffman et al., 2007):

Para la esporotricosis linfocutánea y cutánea se recomienda la administración oral de 200 mg/día de itraconazol que va de 3-6 meses dependiendo de la respuesta al tratamiento, si la lesión persiste, la dosis aumenta. El tratamiento inicial también puede ser terbinafina de 500 mg o la ingesta de KI iniciando con bajas dosis e ir aumentando hasta 40-50 gotas, dependiendo de la tolerancia del paciente. Si se presenta intolerancia, se recomienda cambiar a fluconazol a mayor dosis que itraconazol. En el caso de mujeres embarazadas se recomienda anfotericina B (3-5 mg/kg) o anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg). En niños se recomienda itraconazol (6-10 mg/kg o a 400 mg) o KI a pequeñas dosis.

Con respecto a la esporotricosis osteoarticular se recomienda la administración oral de itraconazol (200 mg) hasta por 12 meses, las alternativas son la anfotericina B o anfotericina B desoxicolato a mismas dosis ya mencionadas y cuando la respuesta es favorable, se cambian por el tratamiento con itraconazol.

En el tratamiento de la esporotricosis pulmonar y diseminada se recomienda anfotericina B, también se ha tratado con anfotericina B desoxicolato (de Oliveira-Esteves et al., 2017), si el tratamiento muestra efecto o si la lesión es menos severa, se recomienda itraconazol (200 mg) dos veces al día por 12 meses y en casos de lesiones localizadas se sugiere la cirugía en combinación con anfotericina B. En niños se recomienda anfotericina B 0.7 mg/kg diarios

como terapia inicial y posteriormente con itraconazol a 6-10 mg/kg a un máximo 400 mg, a los pacientes se les recomienda realizar estudios radiológicos después del tratamiento (Farooqui & Youness, 2018).

En casos de esporotricosis meningeal el tratamiento inicial es con anfotericina B con dosis de 5 mg/kg diarios por 4-6 semanas, si se muestra mejoría se administra itraconazol (200 mg) dos veces al día por 12 meses.

Los casos de esporotricosis diseminada y meningeal en pacientes inmunodeprimidos se recomienda itraconazol 200 mg al día y deben llevar un control de los niveles séricos² e igual con los demás tratamientos con esta terapia.

Ketoconazol ha sido poco usado para el tratamiento de la micosis en humanos, se ha administrado en pacientes con esporotricosis linfocutánea y cutánea a dosis de 100-400 mg por 6 semanas. Sin embargo, es el antimicótico más empleado y reemplaza a itraconazol en el tratamiento de esporotricosis en perros (5-10 mg/kg/ cada 12-24 horas) y gatos (50-100 mg/cada 12-24 horas) (Naqvi et al., 1993; Zeppone Carlos, 2015).

2.2 TFD

La TFD es una técnica de mínima invasión que consiste en la aplicación de un FS no tóxico al tejido afectado para ser irradiada con luz visible, la cual da inicio a reacciones fotoquímicas y produce efectos citotóxicos (daño a las células causado por sustancias). La TFD se emplea con el fin de tratar células cancerígenas, degeneración macular, tratar enfermedades dermatológicas como psoriasis, queratosis actínica (Wilson & Patterson, 2008), acné, rosácea, varices, leishmaniasis, infecciones localizadas por bacterias, virus y hongos,

² Examen de sangre para medir la cantidad de fármaco en el cuerpo.

enfermedades de otras áreas médicas como en gastroenterología, neurocirugía, neumología, urología, entre otros (Arias, 2007), también se emplea en el área agrícola como insecticida y herbicida (Gallegos, 2015).

2.2.1 Componentes de la TFD

La TFD consta de tres componentes principales que son el FS, la luz y el oxígeno molecular.

2.2.1.1 Oxígeno

Es el elemento más abundante y se encuentra en el aire, también se puede obtener mediante procesos químicos con la ayuda de catalizadores (sustancias que influyen en procesos químicos sin su gasto). Es incoloro, inodoro, insípido y tiene una alta capacidad de reacción. La reacción directa del oxígeno con los elementos (a excepción del flúor, cloro, bromo, gases y/o metales nobles) produce oxidación (Christen, 1975). Es el elemento más importante en el proceso de la respiración celular aerobia, aunque puede llegar a dañar a los microorganismos con sus formas tóxicas; oxígeno singulete, radicales libres superóxidos, peróxido de hidrógeno, radicales de hidroxilo y otros compuestos oxidativos, pero también, son componentes que participan en la defensa de algunos microorganismos contra patógenos en el proceso de fagocitosis (Tortora et al., 2007).

2.2.1.2 Fotosensibilizador

Un fotosensibilizador (FS) es un cromóforo sensible a la luz, la cual tiene una longitud de onda específica de mayor absorción para ser excitada mediante su interacción con los fotones de la luz causando un aumento de su nivel de energía, donde es capaz de ceder sus electrones a biomoléculas para generar ROS (Molina, 2004; Laguna, 2019).

Los primeros FS empleados en el área clínica fueron las porfirinas y sus derivados, estas fueron llamadas FS de primera generación. Las más empleadas fueron las hematoporfirinas y derivados, se activan en el rango de los 400 nm-630 nm. Son derivados de la porfirina y

presentan diferentes propiedades en cuanto a su polaridad, fotosensibilidad y su localización en el tejido blanco, a pesar de que se desarrolló con el fin de mejorar su eficacia en la TFD para el tratamiento de tumores (Juzeniene & Moan, 2007), las porfirinas presentaron algunas desventajas como: fototoxicidad cutánea, citotoxicidad en oscuridad, baja penetración y menor absorción de la luz roja, entre otros, eso conllevó al desarrollo de los FS de segunda generación, las cuales son de diferentes familias químicas. Los FS de segunda generación son compuestos basados en la estructura del tetrapirrol (por la reducción de sus dobles enlaces en sus anillos) como las porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, otros son las sales de fenotiazinas, xantenos halogenados, las ftalocianinas, benzoporfirinas, benzofenotiazinas, entre otros. Dichos compuestos mostraron ser muy eficientes por su gran absorción de la luz roja (>630 nm), efectivos en la producción de oxígeno singulete, menos fototóxicos, de rápida eliminación, minimizando los efectos de fotosensibilidad, por su mayor selectividad en organelos celulares y a su afinidad por el tejido blanco (Taylor et al., 2011; Abrahamse & Hamblin, 2016; de Freitas & Hamblin, 2016). Lo siguiente fue el desarrollo de FS de tercera generación, con el objetivo de tener mayor selectividad de acumulación en tejido y/o célula diana, estos se encapsulan en liposomas, micelas o nanopartículas (de Freitas & Hamblin, 2016) que actúan como vehículos. Se han desarrollado FS conjugados con anticuerpos o moléculas específicas contra células tumorales o vías metabólicas de microorganismos (Konan et al., 2002; Taylor et al., 2011). Algunas nanopartículas actúan como FS, uno de ellos son los fulerenos, capaces de generar ROS por más tiempo, pero tienen la desventaja de que su absorción óptima se encuentre en el rango UVA y de que en el rango visible sea baja, siendo esta la más empleada en la TFD (de Freitas & Hamblin, 2016). También están los puntos cuánticos, estos tienen mayor absorción de luz y un mayor rendimiento en la generación del estado triplete, pero su costo es elevado y no es biodegradable (Vázquez-Hernández et al., 2018).

Existen FS naturales, la mayoría se han aplicado en la IFD como la hipericina, obtenida de una planta medicinal, la riboflavina obtenida de la vitamina B2, la curcumina, los derivados

de tiófenicos que se encuentran en especies vegetales, aunque no todos llegan a ser efectivos en la IFD. También las antraquinonas de plantas de la especie *Heterophyllaea lycioides* se comportan como agentes FS en la IFD (Abrahamse & Hamblin, 2016; Comini & Montoya, 2016; Dimmer, 2018).

Las características óptimas que deben de tener los FS para la TFD son los siguientes (Gallegos, 2015; Hamblin, 2016; Liang et al., 2016; Laguna, 2019):

- No ser tóxico en oscuridad sobre las células sanas, ni sus subproductos.
- Ser selectivo para las células dianas (células cancerígenas o patógenas) en un corto tiempo de incubación.
- Acumulación rápida en la célula diana (para evitar toxicidad sistémica).
- No producir efectos mutagénicos (al ser irradiado o no irradiado).
- Degradación rápida y adecuada (metabolización).
- Distribución homogénea en las células diana.
- Ser puro, fotoestable y estable químicamente.
- Tener un alto coeficiente de absorción molar a una longitud de onda específica sobre el tejido y donde la penetración de luz sea buena.
- Tener alto rendimiento cuántico en la generación de ROS.
- Ser de administración tópica, oral e intravenosa.
- Rentable.
- Tener cargas catiónicas para su fácil solubilidad en agua, su transporte y efectiva penetración en capas lipídicas (idealmente de átomos de nitrógeno cuaternarios o grupos amino básicos).

En la búsqueda de mejorar la eficacia y potenciar la muerte microbiana *in-vitro* se emplean FS unidos con polímeros policatiónicos como polietilenimina, sales inorgánicas como aniones de azida, bromuro y KI, aunque algunos no han mostrado resultados

efectivos, también se ha optado en utilizar FS con compuestos orgánicos como riboflavina y curcumina, entre otros (Hamblin, 2016).

2.2.1.3 Luz

La luz es una onda electromagnética que se propaga e interacciona con la materia, posee naturaleza dual como onda-partícula. La partícula de la luz se describe como paquetes de energía llamados fotones (Prasad, 2004). Esa energía se relaciona con una frecuencia f (número de oscilaciones por segundo) y longitud de onda λ (distancia entre dos crestas). El conjunto de frecuencias de una radiación se le llama espectro y puede analizarse en función al número de ondas o a las longitudes de onda que la componen (García & Rovira, 1999; Tipler & Mosca, 2005), se divide en varias regiones que va desde λ corta a λ larga (figura 2). La luz empleada en la TFD se encuentra entre los 600-1200 nm del espectro electromagnético, debido a su mayor capacidad de penetración en el tejido, y para la obtención de altos rendimientos cuánticos se limita a los 800 nm, también se utiliza luz desde 400 nm (Gallegos, 2015; Laguna, 2019).

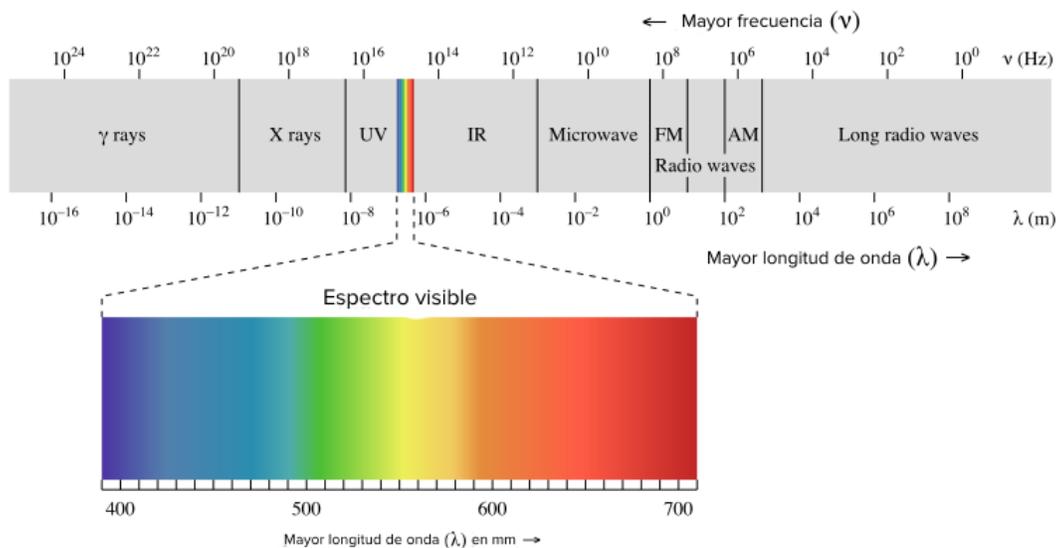


Figura 2. Espectro electromagnético. Recuperado de (La luz, Khan Academy).

2.2.1.3.1 Conceptos Cuantitativos de la Luz

A continuación, se mencionan algunos de los conceptos básicos de las magnitudes de luz empleada en la TFD (Cromer, 1986; Prasad, 2004).

Energía de la luz: se expresa en J o en mJ (1×10^{-3} J).

Potencia: es la energía de la luz que emite por unidad de tiempo. Se expresa en Joule por segundo (J/s) o en Watt (W).

Irradiancia o densidad de potencia: es la potencia por unidad de área, es decir, la energía de la luz que incide sobre la unidad de superficie normal al flujo en una unidad de tiempo. Se expresa en W/cm^2 .

Fluencia o densidad de energía: es la energía suministrada por la luz por unidad de área. Se expresa en J/cm^2 .

2.2.1.3.2 Tipos de Fuentes de Luz Empleadas para la TFD

No existe una fuente de luz ideal para la TFD, sin embargo, la potencia y el espectro de la fuente de luz son parámetros importantes para la activación del FS (el tipo de fuente de luz a utilizar son establecidas por el FS), así como la vía de entrega, la ubicación y propiedades físico-biológicas del tejido diana. Las lámparas, LED y láseres son los tipos de fuentes de luz empleados en la TFD (Wilson & Patterson, 2008; Gallegos, 2015).

Fuentes láser

Láser, por sus siglas en inglés significa amplificación de luz por emisión estimulada de radiación, es un tipo de fuente muy empleada en la TFD. Su estrecho ancho de banda le da la capacidad selectiva de excitación de un FS, es de alta potencia y se puede acoplar a fibras ópticas, lo cual es una ventaja, debido a que permite tratar áreas pequeñas o zonas intersticiales, también tiene aplicación en zonas superficiales mediante su acoplamiento a expansores de haz láser que permiten cubrir mayor área del tejido a tratar con irradiación uniforme (Mordon, 2012; Wong & Ilgner, 2016).

Las fuentes láser empleados para la TFD son (Mang, 2004; Prasad, 2004; Kim & Darafsheh, 2020):

- Láser de colorante.
- Láser argón/colorante.
- Láser YAG/de colorante.
- Láser de vapor de oro/cobre.
- Diodo láser.
- Láser de estado sólido.

Fuentes LED

Las fuentes LED son diodos semiconductores, en la TFD se emplean para irradiar zonas superficiales en el tratamiento de enfermedades de la piel. Tienen un amplio rango de emisión (350-1100 nm) de onda continua, en el mercado existen fuentes LED con λ específica, por lo tanto, puede coincidirse con las λ de absorción del FS, su ancho de banda es de 5-10 nm, son de baja potencia (150 mW/cm²), se fabrican de varios tamaños, se pueden diseñar en forma de matrices y obtener mayor potencia, son portables y de bajo costo. Los arreglos en matrices se usa en endoscopios y permite su aplicación en zonas intersticiales (Brancaleon & Moseley, 2002; Mang, 2004; Kim & Darafsheh, 2020).

Fuentes de lámpara

El tipo de fuente de luz empleado inicialmente para la TFD fueron las lámparas. Estas tienen la ventaja de tener un diseño simple, portátil, de fácil uso y ser de bajo costo. Su banda de irradiación es amplia con rango de 300-1200 nm, por ello, es necesario el uso de filtros para coincidir su espectro con la del espectro del FS para su óptima activación, además ayudan a la eliminación de bandas innecesarias (infrarrojo y ultravioleta) que puedan afectar el resultado de la terapia. También pueden ser acopladas a guías de luz, sin embargo, esto conlleva a sufrir pérdidas de acoplamiento (Brancaleon & Moseley, 2002). Se ha utilizado para tratar lesiones superficiales y cavidades orales. Los tipos de lámparas empleados en la

TFD son los siguientes (Brancaleon & Moseley, 2002; Gallegos, 2015; Wong & Ilgner, 2016):

- Lámpara incandescente.
- Lámpara fluorescente.
- Lámpara de haluro metálico.
- Lámpara de arco.

2.3 Mecanismo de Acción de la TFD

El mecanismo de acción de la TFD consiste en la absorción de energía de un fotón de luz visible de longitud de onda apropiada mediante su interacción con moléculas de un FS en tejido, la cual induce su excitación y se da un cambio de nivel de energía (Liang et al., 2016). Las moléculas del FS pasarán de un estado fundamental (FS) a un estado excitado ($^1\text{FS}^*$) llamado singulete con un rango de tiempo de vida de 10^{-9} - 10^{-6} segundos, en el trayecto a su estado fundamental, se pierde energía mediante procesos de fluorescencia, generación de calor por conversión interna o por un cruce de intersistema, llevando la molécula a un nivel de energía menor y más estable, llamado estado triplete ($^3\text{FS}^*$), el tiempo de vida de su energía es más larga (10^{-3} - 10^{-2} segundos) lo que permite su interacción con moléculas para generar ROS, capaz de causar daño celular (Nosanchuk, 2015). En el estado $^3\text{FS}^*$ suceden dos tipos de reacciones que pueden ocurrir al mismo tiempo; tipo I y tipo II (de Freitas & Hamblin, 2016). La reacción tipo I se da mediante la transferencia de electrones o hidrógeno a biomoléculas, la cual produce radicales libres como aniones de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales de hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y nitratos de peróxido ($\text{ONOO}\cdot$) (Nosanchuk, 2015); la reacción tipo II se da mediante la transferencia de energía del $^3\text{FS}^*$ al O_2 en su estado basal, llamado estado triplete ($^3\text{O}_2$) que lo induce a un estado excitado singulete ($^1\text{O}_2$). Todas estas moléculas producidas son llamadas ROS, las cuales, son altamente reactivas capaces de causar daños irreversibles a la célula (figura 3) (Konan

et al., 2002; Hamblin, 2016; Liang et al., 2016). Si el $^1\text{O}_2$ reacciona con el mismo FS, se reducirá la efectividad de la producción de compuestos tóxicos, debido al inicio de un proceso de degradación del FS llamado fotoblanqueamiento (de Freitas & Hamblin, 2016).

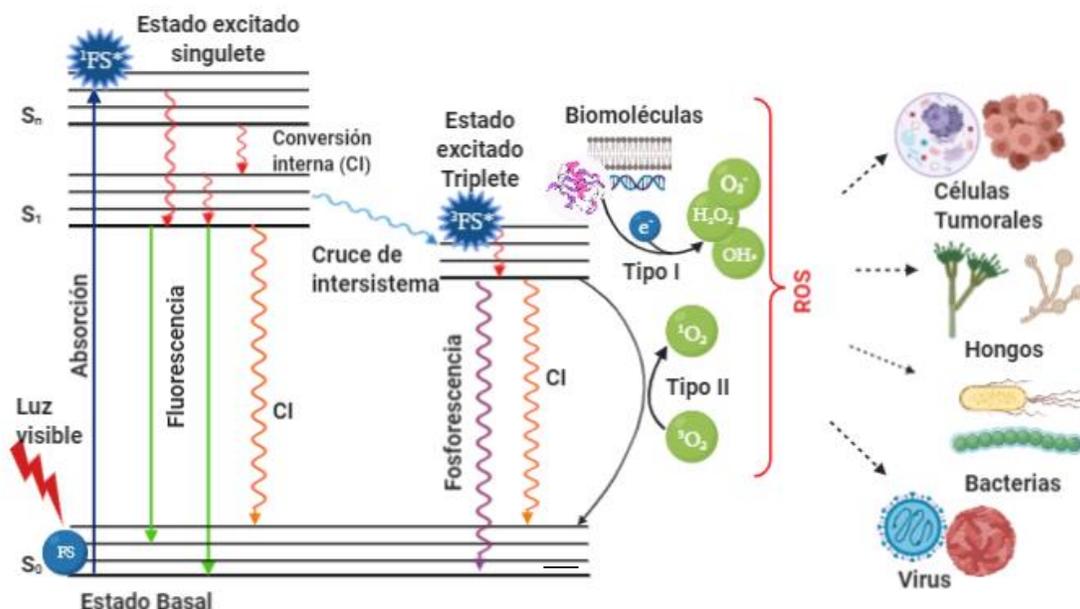


Figura 3. Diagrama de Jablonski. Al irradiar un FS con longitud de onda específica cambia de su estado basal a un estado excitado singlete $^1\text{FS}^*$, su energía es muy inestable por lo que regresa a su estado basal ya sea por conversión interna (CI), fluorescencia o que el $^1\text{FS}^*$ pase por un cruce de intersistema, está cambiando de su estado $^1\text{FS}^*$ a un estado excitado triplete $^3\text{FS}^*$. El $^3\text{FS}^*$ seguirá perdiendo energía por CI, fosforescencia o por la transferencia de sus electrones a biomoléculas o por la transferencia de energía al O_2 . El producto de los dos últimos procesos de pérdida de energía mencionados se obtiene ROS, capaces de causar daño citotóxico a hongos, bacterias, virus y eliminar células tumorales. S_1 , S_n : estados electrónicos excitados); S_0 : estado basal o fundamental (Konan et al., 2002; Hamblin, 2016; Liang et al., 2016).

2.4 Trabajos Relacionados

Desde hace menos de una década se empezó a realizar la IFD en especies del complejo de *S. schenckii sensu lato*, la cual ha sido efectiva tanto en ensayos *in-vitro* como *in-vivo*. Se reporta que un paciente con esporotricosis cutánea fija en el brazo recibió tratamiento oral con los fármacos itraconazol y terbinafina obteniendo una mejora parcial. Se le aplicó IFD

al aislamiento utilizando metil aminolevulinato (MAL), AM y nuevo AM (NAM) como FS. Los FS AM y NAM fueron más efectivos en comparación con MAL. Con base a ese resultado se aplicó IFD *in-vivo* con 1% de AM intralesional en combinación intermitente del antimicótico itraconazol a bajas dosis, se obtuvo una respuesta clínica completa (Gilaberte et al., 2014). En otro estudio de IFD con las especies del complejo *S. schenckii*, se emplearon tres concentraciones de AM, con las que se obtuvo una reducción significativa en el crecimiento del hongo, no mostrando diferencia significativa entre cada concentración del FS, excepto en una cepa donde el tratamiento con la concentración mayor de AM fue la más efectiva (Nunes et al., 2014). También se ha demostrado la reducción completa del hongo con el empleo de 0.1 mg/mL de AM a 26.3 J/cm² (Guirado et al., 2018). Recientemente se reportaron dos estudios de IFD en *S. globosa*; en el primero, IFD *in-vitro* con 0.1 mL de 10 mM/L de AM e IFD *in-vivo* en ratones BALB/c con 2 mg/mL de AM, ambos irradiados con fuente de luz LED de 640 nm y densidad de energía de 40 J/cm² inhibieron el crecimiento del hongo, aunque el tratamiento más eficaz se mostró en la aplicación de la IFD en combinación con itraconazol a concentraciones de 1 µg/mL y 4 mg/mL, respectivamente (Li et al., 2019); en el segundo señala que la IFD con 1.19 M de ALA a 162 J/cm² inhibe un 97% a conidios y un 100 % a levaduras en ensayos *in-vitro* (Chen et al., 2020). Por otra parte, se ha reportado que la fotobiomodulación es efectiva para el tratamiento de esporotricosis en ratones (Guirado et al., 2018).

Capítulo 3

Metodología

A continuación, se mencionan los procedimientos llevados a cabo en la optimización del cultivo de *S. schenckii* para la obtención de levaduras y concentración celular a fin de poder realizar la IFD. También se presentan los procedimientos llevados a cabo para realizar la prueba de sensibilidad antifúngica utilizando diferentes fármacos antimicóticos, e IFD con diferentes FS. Todos los trabajos se realizaron en el laboratorio de TFD del Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE).

3.1 Microorganismo

En nuestro estudio se emplearon 3 cepas de *S. schenckii*; una cepa aislada de paciente (303), una de mascota (R-03-10-1) y una de naturaleza³ (521). Las cepas fueron donadas por el laboratorio de micología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

En este trabajo se conservaron las cepas de *S. schenckii* en su fase filamentosa. El hongo se cultivó en agar Mycosel (Becton Dickinson®, México) a temperatura ambiente por 7 días, posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4°C, se realizó una resiembra cada 3 semanas para tener un stock de células viables.

3.2 Preparación de los Medios de Cultivo.

Todos los medios de cultivos empleados en este estudio, se prepararon según las indicaciones del fabricante (se agregaron antibióticos según se especifica).

3.2.1 Agar Mycosel

1. Se suspendieron 36 g de polvo agar Mycosel en 1 litro de agua destilada y se mezcló.

³ Cepa aislada de planta y/o suelo.

2. Se calentó agitando constantemente hasta hervor y que el polvo se disolviera por completo.
3. Se vertieron 10 mL del medio en tubos de ensayo y se tapó.
4. Se esterilizó a 118°C por 15 minutos.
5. Se dejó enfriar con los tubos inclinados.

3.2.2 Agar BHI + Cloranfenicol

(MCD LAB Edo. de México; Sigma-Aldrich, St. Louis)

1. Se suspendieron 37 g de polvo BHI en 1 litro de agua destilada.
2. Se agregaron 50 mg de cloranfenicol en 1 litro de agua destilada.
3. Se agregaron 1.2 % de agar bacteriológico (MCD LAB Edo. de México).
4. Se calentó agitando constantemente hasta hervor y que los polvos estuvieran disueltos completamente.
5. Se esterilizó a 118°C por 15 minutos.
6. En un área limpia y estéril, el medio se vertió en placas Petri (SYM Laboratorios) estéril y se dejó enfriar.

3.2.3 Caldo Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD) + Fosfomicina

(MCD LAB Edo. de México; Senosian laboratorios, México D.F)

1. Se suspendieron 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa o glucosa en 1 litro de agua destilada y se mezcló.
2. Se agregaron 50 mg de fosfomicina en 1 litro de agua destilada.
3. Se vertió en tubos falcón de 15 mL y se taparon.
4. Se esterilizó en autoclave por a 118°C por 15 minutos.
5. El tubo se tapó completamente y se dejó enfriar.

3.2.4 Caldo BHI + Cloranfenicol

1. Se suspendieron 37 g de polvo infusión cerebro corazón en 1 litro de agua destilada.
2. Se agregó cloranfenicol (50 mg/L).
3. Se agitó constantemente hasta que los polvos estuvieran disueltos.
4. Se vertió en tubos falcón de 15 mL y se tapó.
5. Se esterilizó a 118°C por 15 minutos y se dejó enfriar.

3.3 Optimización de las Condiciones de Cultivo de *S. schenckii* en la Obtención de Levaduras

Para la obtención de levaduras de *S. schenckii*, se inició cultivando el microorganismo en su fase filamentosa a tubos falcón de 15 mL, con 7 mL de caldo YPD + fosfomicina (5 mg/L) y se incubó a 37°C por 7 días. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó una observación en el microscopio óptico (VELAB, México) para ver la presencia de levaduras. Debido a que se obtenían más micelios que levaduras, se procedió a realizar más resiembras tomando 500 mL del inóculo sedimentado. Se realizaron hasta 5 resiembras de la muestra previa.

3.4 Condiciones de Cultivo Optimizadas de *S. schenckii* en la Obtención de Levaduras

Para la obtención de las levaduras se tomó una asada⁴ de las cepas en su fase filamentosa y se cultivó en tubos falcón de 15 mL con 7 mL de caldo BHI + cloranfenicol (50 mg/L), se incubaron a 37°C por 7 días.

⁴ Arrastre, transporte y transvase de microorganismos.

3.5 Optimización de la Concentración Celular para la IFD

En la búsqueda de la concentración celular óptima con la finalidad de obtener un conteo de células viables posterior a la IFD, se realizaron varios cultivos de las levaduras (con 7 días de crecimiento) a diferentes concentraciones celulares: 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 3×10^5 y 1×10^6 . Se empleó una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) para realizar el conteo celular. El cultivo se realizó en placas de agar BHI + cloranfenicol y se incubó a 37°C por 7 días. (las concentraciones óptimas se mencionan en la sección 4.1).

3.6 Prueba de Sensibilidad Antifúngica

Los ensayos se realizaron con modificación del procedimiento del documento M44-A por el CLSL (Clinical and Laboratory Standards Institute), el cual indica el método estandarizado para la prueba de sensibilidad antifúngica de levaduras.

En la prueba de sensibilidad antifúngica se emplearon las cepas de *S. schenckii* aisladas de paciente (303), naturaleza (521) y la de mascota (R-03-10-1) en su fase levaduriforme. El medio de cultivo empleado para el ensayo fue agar BHI + cloranfenicol. Se preparó el inóculo a una concentración celular de $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. El recuento celular se realizó con la cámara de Neubauer, el protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se prepararon soluciones madre de los antifúngicos; ketoconazol (200 mg/mL) (Novag Ingancia, México) y fluconazol (150 mg/mL) (Laboratorios PiSA, México). Las concentraciones antifúngicas finales empleadas se muestran en la tabla 1.
2. Se añadió un control solo con agua estéril. La siembra se realizó por dispersión con hisopo, la cual constó en sumergir un hisopo de algodón estéril en el inóculo, previamente preparado y se retiró el exceso.
3. El inóculo se extendió de forma masiva sobre el agar para obtener una distribución uniforme.

4. Para la preparación de los discos de prueba, se emplearon discos de papel filtro grado 2 (Whatman® qualitative) con diámetro de 5 mm y se impregnaron de antifúngicos y de agua estéril según correspondía.
5. Los discos se colocaron sobre el agar después de 15 minutos de su inoculación con el hongo, se aplicó con la ayuda de una pinza estéril en el centro de cada placa Petri y se realizó una ligera presión para asegurar su contacto.
6. Las placas Petri inoculadas se incubaron a 37°C por 72 horas en forma invertida, para evitar contaminaciones.

Para evaluar la efectividad de los antifúngicos se tomaron interpretaciones con base al diámetro del halo de inhibición como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1

Concentraciones antifúngicas y valores de diámetro generados por una prueba de susceptibilidad en función de los puntos de corte establecidos en el documento M44-A.

Antifúngico	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Categoría interpretativa		
		Diámetro (mm)		
		R	I	S
Ketoconazol	50	≤ 14	15-19	≥ 20
Fluconazol	25			

*R: Resistente; *I: intermedio; *S: sensible.

3.7 FS y Fuentes de Luz

Se emplearon dos FS de diferentes familias químicas a diferentes concentraciones cada una; 5 μM de RB (MEYER, Cd. de México) y 20 μM de curcumina (Sigma-Aldrich, St. Louis). Las concentraciones del FS se establecieron según trabajos previos en el laboratorio de TFD

del INAOE empleando otros microorganismos (Torres-Hurtado et al., 2019; González, M. E. 2020).

Para cada FS se preparó un stock de 200 micromolar (μM), la cual se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$m = (M) (PM) (V)$$

Donde;

m = Cantidad requerida de FS

M = Concentración molar

PM = Peso molar

V = Volumen

Para la preparación de la solución de RB se siguieron los siguientes pasos:

1. Se calculó la cantidad necesaria de RB.
$$g = (2 \times 10^{-6}) (1017.65 \text{ g/L}) (0.05 \text{ L}) = 10.1 \text{ mg}$$
2. El RB se disolvió con 50 mL de tampón fosfato salino (PBS)⁵ estéril pH 7.4.
3. Se filtró con una membrana estéril de 0.45 μm (Agilent Technologies).

Para la preparación de la solución de curcumina se siguieron los siguientes pasos:

1. Se calculó la cantidad necesaria de curcumina.
$$g = (2 \times 10^{-6}) (368.38 \text{ g/L}) (0.05 \text{ L}) = 3.683 \text{ mg}$$
2. Se emplearon 50 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis) al 100% como solvente de la curcumina. La concentración final empleada para la solución de curcumina fue diluida con 10% de DMSO (diluido con PBS pH 7.4).

⁵ PBS por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline, es una solución amortiguadora de ácidos.

Ambos FS se protegieron de la luz y se mantuvieron en refrigeración.

Para las fuentes de luz, se emplearon dos dispositivos con arreglos de LED diseñados en el INAOE.

1. Dispositivo 1: λ de 520 nm.
2. Dispositivo 2: λ de 460 nm.

3.8 IFD de Levaduras de *S. schenckii* spp

Para la IFD, se tomaron levaduras con 7 días de crecimiento, se agitó con el vortex. Se empleó la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular. Posteriormente, se realizó una dilución de la muestra de levaduras con PBS para obtener una concentración de $2.5 - 3 \times 10^5$ cel/mL (tabla 3).

Se analizaron cuatro grupos:

- Grupo sin irradiación y sin FS (L-F-).
- Grupo con FS y sin irradiación (L-F+).
- Grupo con irradiación y sin FS (L+F-).
- Grupo con irradiación y FS (L+F+).

De la dilución de levaduras, se tomaron 50 μ L y se depositaron en los pozos de la microplaca de 96 pozos, se les añadieron 50 μ L de la solución del FS para los grupos L-F+ y L+F+, y 50 μ L de PBS para los grupos L-F- y L+F-. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37°C en obscuridad. Los grupos L-F- y L-F+ se inocularon en placas Petri con agar BHI + cloranfenicol después de la incubación y los grupos L+F- y L+F+ se irradiaron con LED por 3 minutos con 25 segundos a 10 J/cm² para el tratamiento con RB, y 3 minutos con 55 segundos a 20 J/cm² para el tratamiento con curcumina. Posterior a la irradiación de los grupos correspondientes, se cultivaron en las mismas condiciones de los grupos no irradiados, en placas de agar BHI + cloranfenicol a 37°C por 7 días para UFC. Se empleó el

conteo de UFC para la evaluación de la efectividad de la IFD. Las dosis se establecieron según trabajos previos en el laboratorio de TFD del INAOE empleando otros microorganismos (Torres-Hurtado et al., 2019; González, M. E. 2020) (tabla2).

Tabla 2

Concentraciones, longitudes de onda y densidad de energía para la IFD correspondientes para cada FS.

FS	Concentración μM	Dispositivos LED	Densidad de energía (J/cm^2)
RB	5	Verde (520 nm)	10
Curcumina	20	Azul (460 nm)	20

3.9 Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico empleando Anova de un solo factor con el método Tukey con una $p < 0.05$ con el Software OriginPro versión 9.4.

Capítulo 4

Resultados

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad antifúngica, la optimización de las condiciones de cultivo y la selección de la concentración celular más adecuada de las levaduras de *S. schenckii* para las pruebas de IFD. También se presenta el grado de sensibilidad de las cepas de *S. schenckii* a los antimicóticos empleados y el efecto de la IFD en la inhibición de *S. schenckii* con los FS evaluados.

4.1 Optimización del Cultivo de Levaduras y Concentración Celular de *S. schenckii*

Para la obtención de levaduras de *S. schenckii*, los dos tipos de medio de cultivo evaluados fueron caldo YPD y caldo BHI, y los antibióticos analizados fueron fosfomicina y cloranfenicol. El cultivo de *S. schenckii* en caldo YPD con fosfomicina por 7 días, produjo en su gran mayoría micelios y pseudo-micelios, por tal motivo se recurrió a realizar hasta 5 resiembras constantes y con ello se logró obtener a *S. schenckii* en su fase de levadura, lo cual conllevó más tiempo del esperado (figura 4 (A)). En cuanto al cultivo de *S. schenckii* en caldo BHI + cloranfenicol por 7 días, no requirió resiembras de cultivos previos como en el caso del cultivo en caldo YPD, debido a que el medio favoreció el desarrollo de suficientes levaduras a la primera siembra, las observaciones cualitativas muestran cerca de un 40% más levaduras en caldo BHI que en caldo YPD (figura 4 (B)).

A continuación, se buscó la concentración óptima de levaduras apropiada para realizar la IFD y poder evaluar su eficiencia a través del conteo de UFC en placa Petri. En el proceso de obtención de la concentración celular óptima, se observaron 30-90 UFC a los 7 días de crecimiento en placa Petri con agar BHI + cloranfenicol con las concentraciones celulares de 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 1×10^5 y con la concentración celular de 1×10^6 hubo demasiadas UFC lo que en consecuencia limitó su conteo en la placa Petri, mientras que, las concentraciones celulares de 2.5×10^5 y 3×10^5 permitieron ser contables de manera confiable (400-450 UFC) por lo que mostraron ser las óptimas. La cepa 303 desarrolló mayor cantidad de UFC en

comparación con las cepas 521 y R-03-10-1 por ello se decidió emplear diferentes concentraciones celulares dependiendo de la cepa, en la tabla 3 se muestran las concentraciones óptimas encontradas para cada cepa.

Tabla 3

Concentraciones celulares óptimas de las cepas de S. schenckii empleadas en ensayos de IFD.

Cepas	303	521	R-03-10-1
No. cel/mL	2.5×10^5	3×10^5	3×10^5

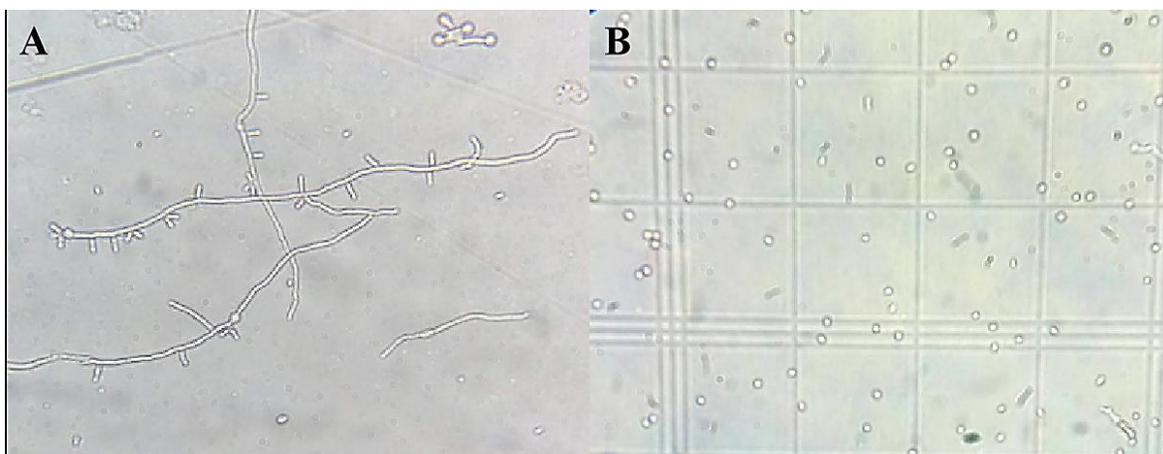


Figura 4. Morfologías obtenidas de *S. schenckii*. (A) Pseudo-micelios y levaduras obtenidas del cultivo en caldo YPD; (B) Levaduras obtenidas del cultivo en caldo BHI.

4.2 Sensibilidad de *S. schenckii* ante Ketoconazol y Fluconazol

Los resultados de la prueba de sensibilidad antifúngica se presentan en la tabla 4. Después de las 72 horas del cultivo de las cepas aisladas de paciente (303), mascota (R-03-10-1) y de naturaleza (521) creciendo en contacto con los antifúngicos, se observó que no se formaron halos de inhibición alrededor de los discos con fármacos, también se observó crecimiento del hongo sobre el disco. Por ello y, con base a lo establecido en el documento M44-A,

mencionado anteriormente, se consideró que todas las cepas evaluadas fueron resistentes a ketoconazol y fluconazol. El grupo control de agua estéril, se empleó como indicador del crecimiento del hongo sin tratamiento. En la figura 5 se muestran algunas imágenes de cepas de *S. schenckii* en presencia de los fármacos antifúngicos mencionados, en donde se puede apreciar que no se formaron halos de inhibición.

Tabla 4

Perfil de sensibilidad de las cepas de S. schenckii ante ketoconazol y fluconazol con relación al diámetro de su halo de inhibición.

Cepas	Sensibilidad y halos de inhibición por grupos experimentales (mm)			
	Controles			
	Agua estéril	Ketoconazol (50 µg/mL)	Fluconazol (25 µg/mL)	
303	0	0	R	0
	0	0		0
	0	0		0
521	0	0	R	0
	0	0		0
	0	0		0
R-03-10-1	0	0	R	0
	0	0		0
	0	0		0

*0: Sin presencia de halo de inhibición; *R: resistente. Se muestra resultados por triplicado.

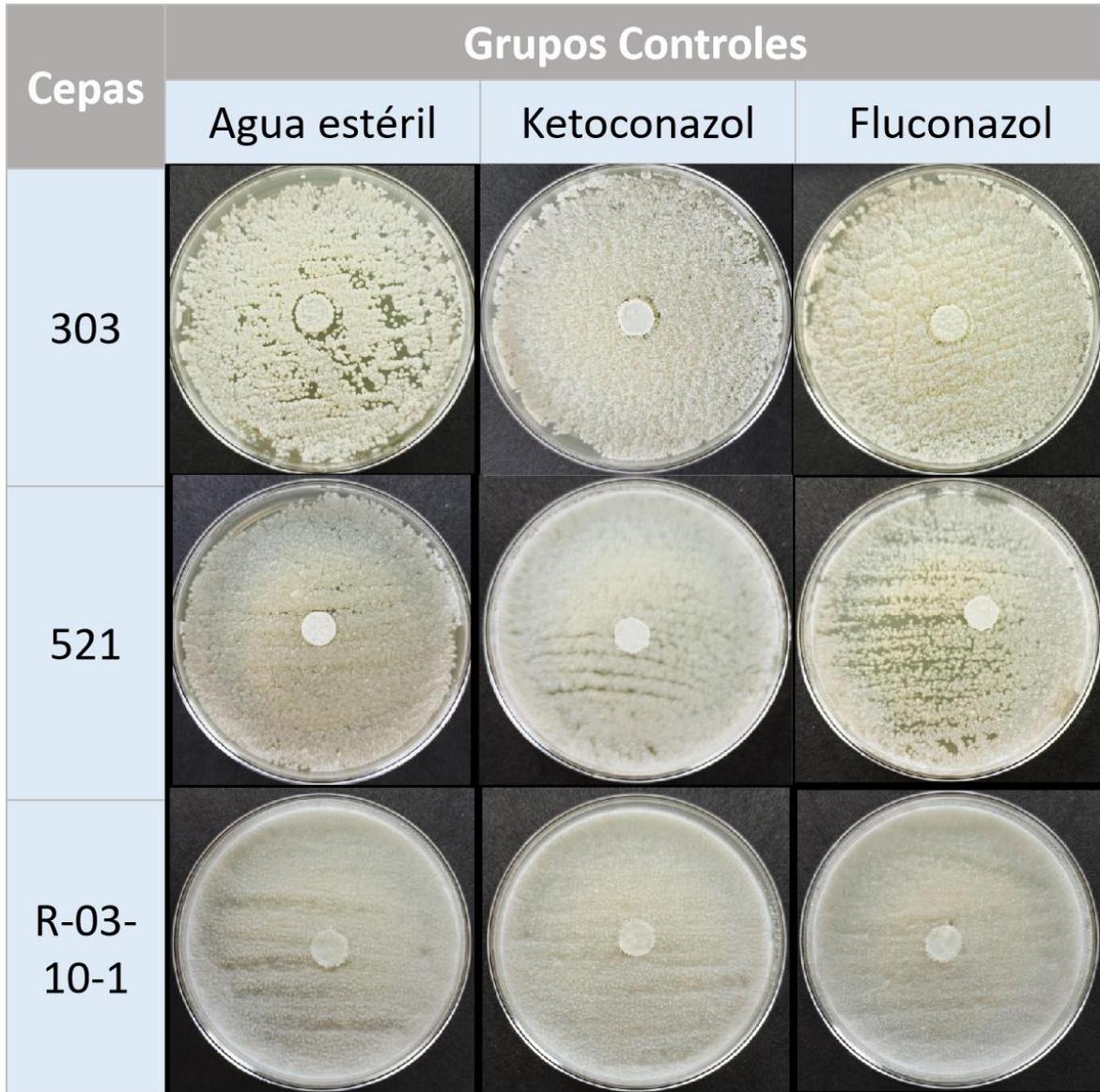


Figura 5. Resultados obtenidos del ensayo de sensibilidad antifúngica de cepas de *S. schenckii* en su fase de levadura. Las cepas no formaron halos de inhibición e inclusive crecieron sobre los discos impregnados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ketoconazol y 25 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol.

4.3 Efecto de la IFD en Cepas de *S. schenckii*

En la IFD de levaduras de cepas de *S. schenckii* evaluadas, se emplearon RB y curcumina como FS, y dispositivos LED de 520 nm y 460 nm a 10 J/cm² y 20 J/cm², respectivamente. El grupo L-F- fue indicador para los demás grupos experimentales (L-F+, L+F- y L+F+). Los ensayos de IFD se realizaron de acuerdo al proceso descrito en la sección 3.8 en metodología.

En la figura 8, se muestran las UFC de la cepa 521, después de la IFD con RB y/o curcumina. En cuanto al ensayo de IFD en la cepa de *S. schenckii* aislada de paciente (303) (figura 6), en donde se empleó RB a 5 µM con LED de 520 nm a 10 J/cm², en el grupo control L+F- se desarrollaron menos UFC (191 UFC menos) con respecto al grupo control L-F- (426 UFC), mientras que para el grupo control L-F+ fue lo contrario (587 UFC), sin embargo, al realizar la evaluación de la significancia estadística $p < 0.05$, arrojó como resultado que en los grupos control L-F+ y L+F- no existen diferencias significativas con respecto al grupo control L-F. Por otro lado, el grupo de tratamiento con IFD L+F+ fue sensible a la exposición y desarrolló menos UFC (125) que el resto de los grupos experimentales, su análisis estadístico arrojó diferencias significativas con respecto al grupo control L-F- (figura 7 (A)). Para el experimento de IFD de la misma cepa empleando 20 µM de curcumina como FS con LED de 460 nm a 20 J/cm²; no hubo efecto de inhibición en los grupos control L+F- y L-F+ con respecto al grupo control L-F-. El resultado del experimento para el grupo tratado con IFD L+F+ produjo inhibición completa del hongo (figura 7 (B)).

La IFD con curcumina mostró el mayor efecto inhibitorio en la cepa 303, comparado con la IFD con RB, ya que se inhibió completamente el crecimiento de la cepa (figura 7 (A, B)).

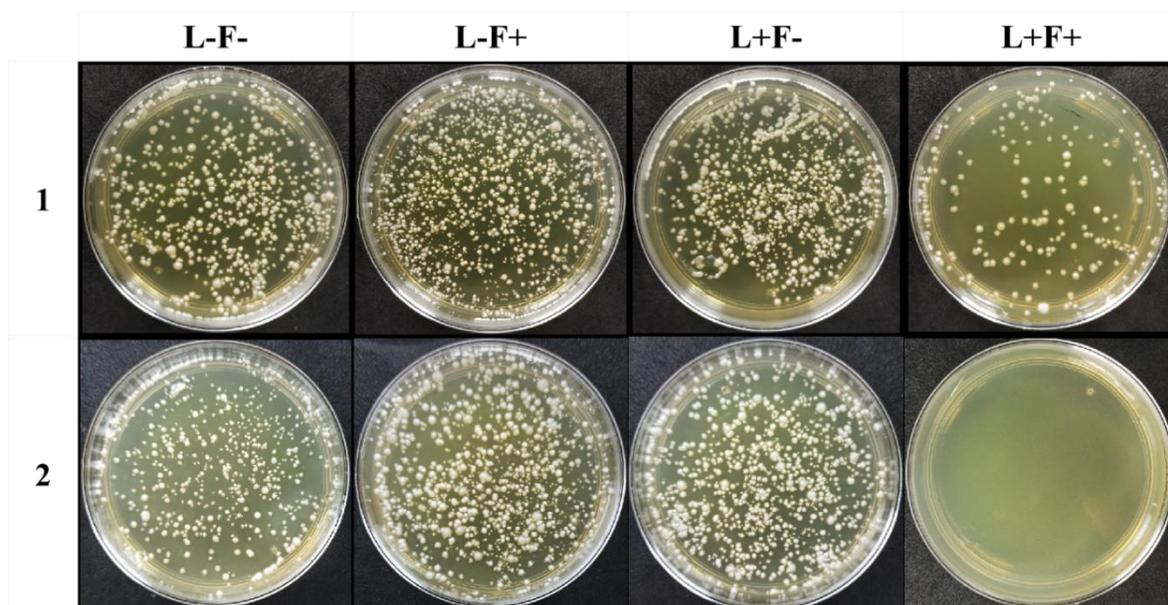


Figura 6. Pruebas de IFD con la cepa 303 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados. 1: IFD con 5 μM de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm^2 ; 2: IFD con 20 μM curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm^2 .

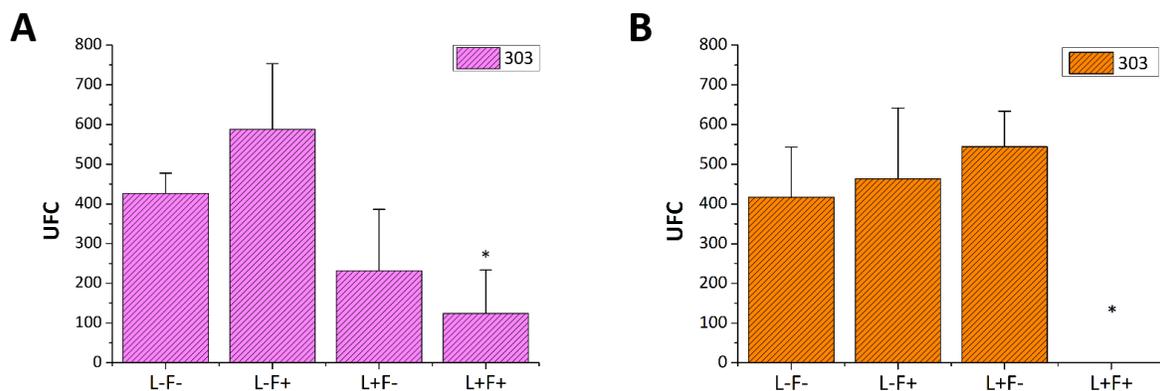


Figura 7. UFC de controles y tratamientos con la cepa 303 después de la IFD. (A) IFD con 5 μM de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm^2 ; (B) IFD con 20 μM curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm^2 . *significancia estadística de $p < 0.05$ con respecto al grupo L-F-.

En la figura 8, se muestran las UFC de la cepa 521, después de la IFD con RB y/o curcumina. Con respecto al resultado obtenido de los ensayos de la IFD con la cepa 521 de *S. schenckii* empleando RB a 5 μM con luz LED de 520 nm a 10 J/cm^2 ; en los grupos control L-F+ y

L+F- no se observaron variaciones significativas en el número de UFC (517, 479) en comparación al grupo control L-F- (443 UFC). En el grupo de tratamiento con IFD L+F+ se obtuvo efecto inhibitorio de *S. schenckii*, lo cual alcanzó una reducción significativa de UFC (343 UFC menos) con respecto al grupo no sometido a tratamiento L-F- (figura 9 (A)). En el experimento de IFD empleando 20 μM de curcumina con LED de 460 nm a 20 J/cm^2 en la cepa 521; en el grupo control L-F+, se obtuvo menor número de UFC (286) con respecto al grupo control L-F- (426), sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo. En el grupo control L+F- no se observó efecto alguno (449 UFC) con respecto al grupo control L-F-, caso contrario para el grupo de IFD L+F+, en dicho grupo, se inhibió completamente el crecimiento del microorganismo (figura 9 (B)).

La IFD con curcumina en la cepa 521, al igual que en la cepa 303, mostró el mayor efecto inhibitorio del hongo.

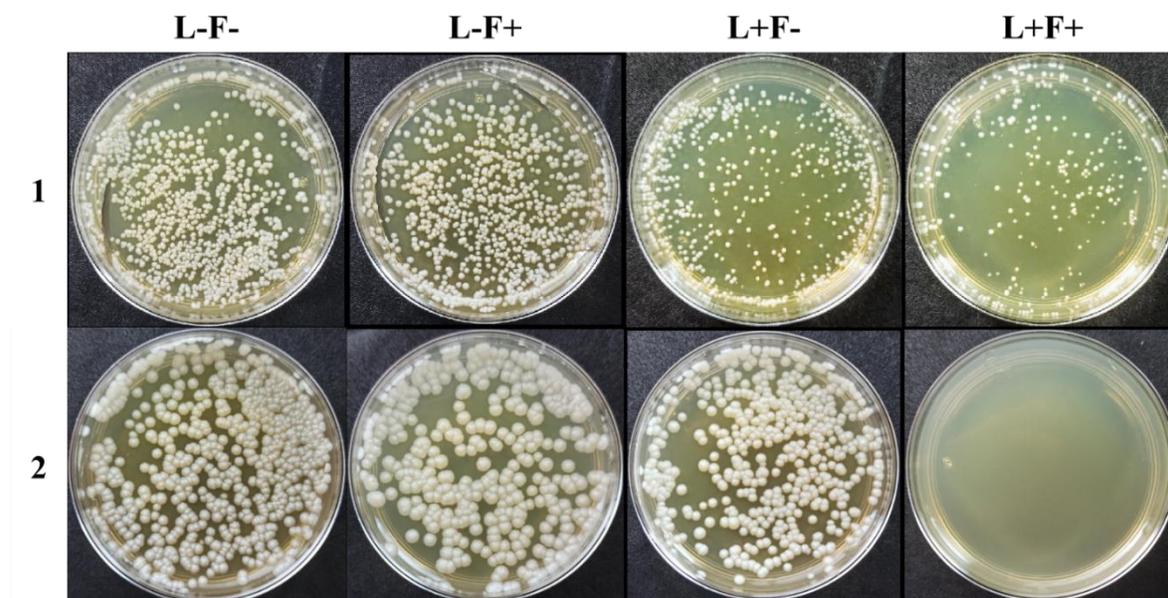


Figura 8. Pruebas de IFD con la cepa 521 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados. 1: IFD con 5 μM de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm^2 ; 2: IFD con 20 μM curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm^2 .

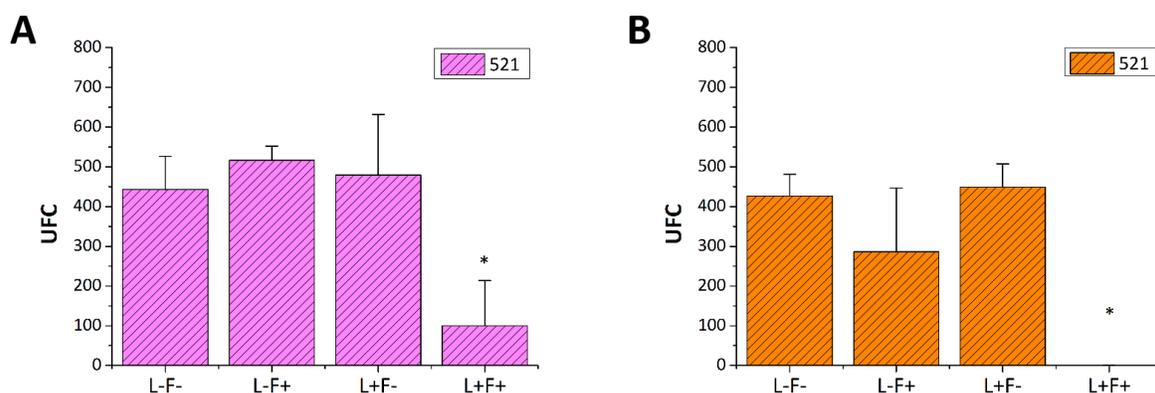


Figura 9. UFC de controles y tratamientos con la cepa 521 después de la IFD. (A) IFD con 5 μ M de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm²; (B) IFD con 20 μ M curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm². *significancia estadística de $p < 0.05$ con respecto al grupo L-F-.

El crecimiento de las UFC de la cepa R-03-10-1 después de la IFD con RB y/o curcumina se puede observar en la figura 10. Los ensayos de IFD con la cepa R-03-10-1 de *S. schenckii* utilizando 5 μ M de RB como FS y el dispositivo LED de 520 nm a 10 J/cm², el número de UFC de *S. schenckii* para los grupos control L-F+ y L+F- fue de 327 y 294, respectivamente, por lo que se vio ligeramente disminuido en comparación al conteo de UFC del grupo control L-F- (435 UFC). Sin embargo, el resultado del análisis estadístico no arrojó diferencias significativas con una $p < 0.05$ con respecto al grupo control L-F-, es decir, la luz o el FS por sí solos no causaron efecto inhibitorio representativo. En el grupo control L+F+ se produjo acción inhibitoria obteniendo 166 UFC y se obtuvo diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento L-F- (figura 11 (A)). Ahora bien, en el experimento de IFD en la cepa R-03-10-1 con curcumina y luz LED de 460 nm a 20 J/cm²; entre los grupos control L-F+ y L+F- no se mostró diferencia significativa de UFC (329 y 388) con respecto al grupo control L-F- (425 UFC), mientras que en el grupo control L+F+, el efecto de la IFD fue evidente debido a la completa inhibición de *S. schenckii* (figura 11 (B)). Comparando los dos FS empleados en la IFD, el efecto de la IFD sobre la cepa R-03-10-1 fue mayor con 20 μ M de curcumina en combinación a la irradiación de la luz LED de 460 nm a 20 J/cm² en comparación a la IFD con 5 μ M de RB y luz LED de 520 nm a 10 J/cm².

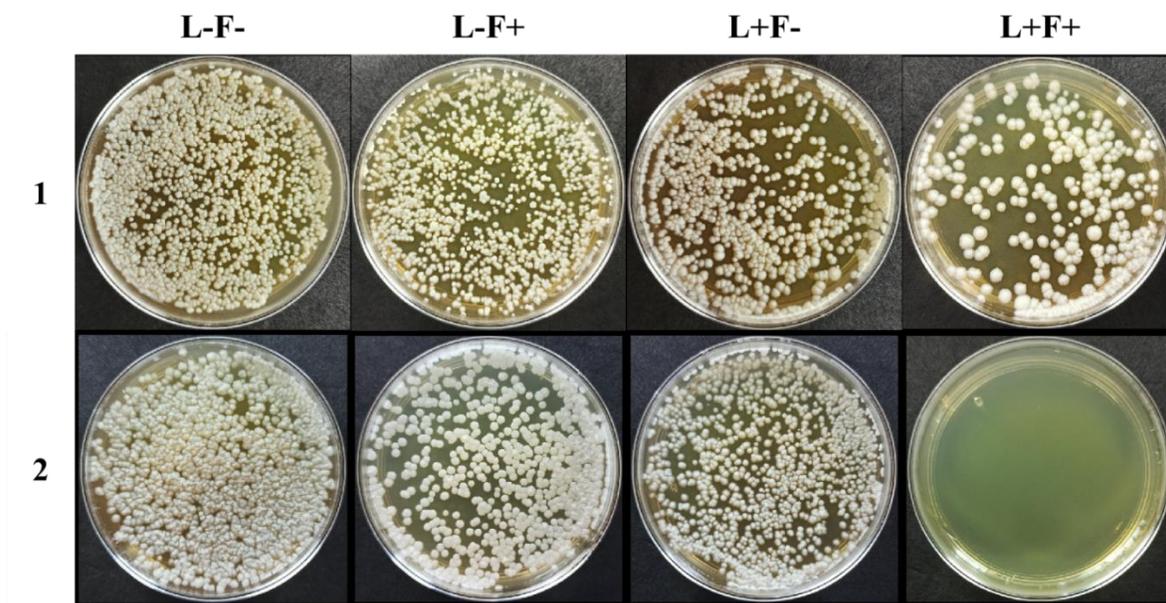


Figura 10. Pruebas de IFD con la cepa R-03-10-1 después de 7 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados. 1: IFD con 5 μM de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm^2 . 2: IFD con 20 μM curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm^2 .

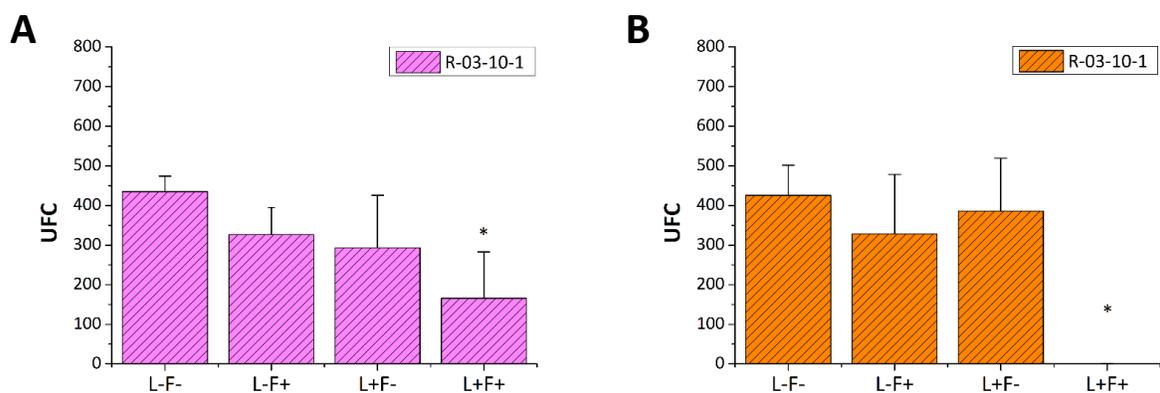


Figura 11. UFC de controles y tratamientos con la cepa R-03-10-1 después de la IFD. (A) IFD con 5 μM de RB y LED de 520 nm a 10 J/cm^2 ; (B) IFD con 20 μM curcumina y LED de 460 nm a 20 J/cm^2 . *significancia estadística de $p < 0.05$ con respecto al grupo L-F-.

La IFD en *S. schenckii* empleando RB redujo un 70% su crecimiento, mientras que el efecto de IFD con curcumina las inhibió completamente.

Capítulo 5

Discusiones

En nuestro estudio se tuvo como objetivo principal el inhibir a *S. schenckii* con la IFD empleando dos FS de diferentes familias químicas, las cuales mostraron ser efectivos en la inhibición del hongo. Cabe mencionar que, hasta donde nosotros sabemos, es la primera vez que se emplea RB o curcumina como FS en la IFD en *S. schenckii*. El efecto de la IFD se le atribuye principalmente a la generación de ROS, ya que es capaz de alterar la membrana del hongo, pero también depende de la concentración del FS, el tiempo de incubación de la muestra con el FS, el tiempo de irradiación, densidad de energía aplicada, entre otros. Por otra parte, la resistencia de *S. schenckii* ante ketoconazol y fluconazol puede estar vinculado a la diversidad genética y la sobreexpresión de genes del hongo.

Discusión

Las pruebas de sensibilidad antifúngica realizadas en las cepas de *S. schenckii* mostraron una clara resistencia al fluconazol o al ketoconazol, sin importar el origen del aislamiento. El resultado del efecto de fluconazol obtenido en nuestro estudio es similar a lo que autores reportan (Trilles et al., 2005; Oliveira et al., 2011; Ottonelli Stopiglia et al., 2013; Córdoba et al., 2018; Rojas et al., 2018), puesto que señalan su pobre efectividad antifúngica. En cuanto al efecto de ketoconazol obtenido, es contrario a los reportes existentes, ya que se ha evidenciado de tener buena actividad en la inhibición de levaduras de *S. schenckii* en estudios *in-vitro* (Trilles et al., 2005; Alvarado-Ramírez & Torres-Rodríguez, 2007; Marimon et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Ottonelli Stopiglia et al., 2013; Han et al., 2017; Córdoba et al., 2018). Un estudio reciente reporta que la resistencia de *S. schenckii* ante antifúngicos es debido a su capacidad de producción de melanina que le confiere protección antifúngica; a su diversidad genética, es decir, su variación en el número y tamaño de cromosomas (políformismo) que le da la capacidad de adaptación; la mutación del citocromo P450 monooxigenasa (Waller et al., 2020). Ambos antifúngicos utilizados en este estudio pertenecen a la familia de los azoles de segunda generación los cuales tienen la función de inhibir el citocromo P450 monooxigenasa, en especial al P540 CYP51 vinculada en la

biosíntesis de ergosterol que regula el fluido en la membrana y estructura celular de los hongos, sin embargo, una mutación en la entrada del canal de sitio de acción incrementa su resistencia ante los antifúngicos. También la sobreexpresión de genes relacionados en la biosíntesis de ergosterol afectan la actividad antifúngica de los fármacos (Matowane et al., 2018; Rodrigues, 2018; Shafiei et al., 2020). Puede ser por ello que los tratamientos de la esporotricosis requieren de varios meses para eliminar al hongo y no siempre se alcanza, y por lo mismo, la IFD resulta ser una alternativa de tratamiento, ya que su blanco de acción no está determinado por solo una ruta metabólica como en el caso de los antifúngicos, además, la IFD puede tener efectos satisfactorios en menor tiempo y provocar menos efectos secundarios.

En nuestro trabajo demostramos que la IFD es efectiva disminuyendo el crecimiento de cepas de *S. schenckii* de diferente origen empleando 5 μM de RB activada con LED de 520 nm y densidad de energía de 10 J/cm^2 . También que la IFD con 20 μM de curcumina como FS con LED de 460 nm a 20 J/cm^2 , inhibe completamente el crecimiento del hongo. Cabe destacar que hasta ahora solo hay reportes de IFD en especies de *S. schenckii* utilizando AM a diferentes concentraciones, fuentes de luz láser o de LED, con la cual se han obtenido resultados positivos en la reducción del desarrollo del hongo tanto en ensayos *in-vitro* como *in-vivo* (tabla 5).

Actualmente no hay reportes de IFD con RB y/o curcumina en especies de *S. schenckii*, no obstante, hay evidencias de la eficacia de la IFD en bacterias gram-positivas, gram-negativas, hongos y hasta en tratamientos de cánceres utilizando RB y curcumina como FS.

Silva et al. (2018), reportaron un efecto notorio exponiendo bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus hirae* y *Escherichia coli*) a IFD irradiándolo con fuente de luz LED verde (530 nm) junto con colorantes xanténicos (RB y eritrosina) a diferentes concentraciones y densidad de energía, tanto la luz como el FS por sí solos no causan daño a las bacterias mientras que la combinación de ambos es efectiva en la reducción

de ellas, Silva menciona que la IFD altera las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular y por consiguiente causan daño. En nuestro estudio, los datos obtenidos indican que no hay efecto significativo ante la exposición de las cepas a RB o a la irradiación por sí solas, es decir no causaron efecto citotóxico (daño celular).

Tabla 5

IFD en especies de S. schenckii empleando diferentes FS.

Microorganismo	Fuente de luz (nm)	FS	Dosis J/cm ²	Estudio	Resultado	Referencia
<i>S. schenckii</i>	GaAlAs 660	0.1 mg/mL AM	26.31	<i>In-vitro</i>	Reducción del 100% de UFC/mL	(Monteiro de Paula Guirado et al., 2017)
<i>S. schenckii</i> <i>S. brasiliensis</i> <i>S. globosa</i> <i>S. mexicana</i> <i>S. albicans</i>	Diodo láser InGaAIP 685	0.5, 1.0, 2.0 µg/ml AM	28	<i>In-vitro</i>	Todas las especies fueron sensibles a la IFD	(Nunes et al., 2014)
<i>S. schenckii</i>	LED 635	5µM AM 1 % AM	37	<i>In-vitro e in-vivo</i>	Respuesta efectiva en ambos estudios	(Gilaberte et al., 2014)
<i>S. globosa</i>	LED 640	0.1 mL de 10 mmol/L AM	40	<i>In-vitro</i>	Inhibición efectiva	(Li et al., 2019)
<i>S. globosa</i>	LED 633	1.19 M ALA	162	<i>In-vitro</i>	Inhibición del 97% de micelio e inhibición completa en levaduras	(Chen et al., 2020)

Otro estudio realiza la comparación de IFD en células planctónicas y biopelículas del hongo *Cándida albicans* con RB y eosina empleando fuente de luz LED (532 nm) a una densidad de energías de 42.63 J/cm² y con ambos FS tuvieron reducción significativa sobre las células planctónicas a partir de 6.25 µM mientras que a concentraciones de 12.5, 25 y 50 µM de RB inhibieron al 100% y con eosina fue a 25 µM, sin embargo, a una concentración de 100 µM aumentó la viabilidad celular la cual le atribuyen al cambio del espectro del FS por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Freire et al., 2014). Nosotros reportamos una

reducción significativa a una concentración menor de RB (5 μM) y menor densidad de energía (10 J/cm^2), no obstante, sería necesario realizar más pruebas de IFD empleando diferentes concentraciones del FS para obtener inhibición completa del hongo.

El tiempo de incubación y de irradiación de las muestras son importantes para la obtención del efecto de la IFD. En nuestro estudio las muestras se incubaron con RB por 30 minutos, basándonos en la literatura y se irradiaron por 3:25 minutos en la IFD para obtener una densidad de energía de 10 J/cm^2 . Sabbahi et al. (2018), reporta IFD en *Staphylococcus aureus* con RB e indica una reducción bacteriana significativa con un tiempo de incubación de 10 minutos y al aumentar el tiempo a 30 minutos causó mayor efecto de citotoxicidad con inhibición del 45.1% del microorganismo, es decir, a mayor tiempo de incubación, mayor es el efecto de citotoxicidad del FS sobre la bacteria. La irradiación de las muestras con un tiempo de 10 minutos a 10 J/cm^2 con 20 μM de RB se redujo un 79.4 %, mientras que la irradiación de 30 minutos con dosis de 90 J/cm^2 a la misma concentración de RB, aumentó el porcentaje de inhibición a 91.1 %. Sabbahi et al. (2018), menciona que el efecto del FS por sí solo puede ser o no tóxico, eso depende de la concentración del FS, el microorganismo en estudio y el tiempo de incubación, por otra parte, en el estudio detectaron que los principales responsables del efecto de la IFD es la producción de radicales libres de hidroxilo, no dejando atrás la producción de $^1\text{O}_2$. Wozniak et al. (2019), reporta que la IFD con RB (5, 10 μM) y luz LED verde (515 nm) a 90 J/cm^2 en la bacteria *Acinetobacter baumannii* es efectiva en la reducción bacteriana, a la vez realizaron pruebas para la detección de ROS empleando 3'(p-aminofenil) fluoresceína, un indicador de radicales de hidroxilo y en combinación con 0.1% de DMSO para la detección de $^1\text{O}_2$, el resultado fue que ambos se generan en la IFD.

El espectro de absorción de activación del FS es muy importante para poder producir ROS, tanto Freire et al. (2014) como Silva et al. (2018), reportan que el espectro de absorción de RB se encuentra entre 480-580 nm y el pico de absorción cada uno lo reporta con una ligera

variación siendo a 550 y 557 nm respectivamente, nosotros empleamos una fuente de luz LED con longitud de onda cercano a lo reportado (520 nm) que en consecuencia pudo ser efectivo en la activación de las moléculas de RB para la producción de ROS y este puede ser el principal responsable de la inhibición de *S. schenckii*.

El efecto de la IFD con curcumina fue evidente en *S. schenckii*, puesto que no hubo crecimiento de levaduras con ninguna de las tres cepas estudiadas. La curcumina es extraído de la *Curcuma longa* y producido principalmente en la India, se conoce por sus efectos farmacológicos en el tratamiento de tumores (piel, pulmones, estómago, colon y pecho), actividad inflamatoria, antioxidante, bactericida, antifúngica, analgésico y hasta para la prevención y tratamiento del parkinson a la cual sus propiedades farmacológicas se le atribuye a su rápida excitación (nanosegundos), transferencia de átomos de hidrógeno y cambios conformacionales (Dias et al., 2020). Dovigo et al. (2011), menciona que la IFD en *C. albicans* fue efectiva a tres concentraciones de curcumina (4, 5 y 20 μM) a 37.5 J/cm², así mismo, la inactivación con 20 μM del FS a 5.28 J/cm² con un tiempo de irradiación de 4 minutos obtuvieron inhibición completa del hongo. Nosotros obtuvimos el mismo resultado con la IFD en *S. schenckii* utilizando la misma concentración de curcumina (20 μM), sin embargo, empleamos mayor densidad de energía (20 J/cm²), será necesario a futuro realizar evaluaciones a diferentes dosis de luz para encontrar la mínima dosis inhibitoria en *S. schenckii*.

Se conoce que a mayor tiempo de irradiación del FS hay un decaimiento en la absorción de luz llevando a cabo el fotoblanqueamiento del agente FS de tal forma que reduce su efectividad en la IFD (Dovigo et al., 2011). Costa Araújo et al. (2017), indica que la IFD con curcumina (5 g/L) a un tiempo de irradiación de 2-3 minutos con fuente de luz LED (450 nm) con densidad de energía de 5.7 J/cm² es efectiva en la inhibición de bacterias cariogénicas. Otro punto importante mencionado anteriormente es del tiempo de incubación

de las muestras con el FS, ya que si se aumenta el tiempo de incubación de las muestras habrá mayor penetración del FS a la membrana celular (Dovigo et al., 2011).

Además, se ha reportado que la IFD a baja concentración de curcumina (2.5 μM) a 37.5 J/cm² es capaz de producir daño genotóxico en *C. albicans* afectando la topoisomerasa I y II e impidiendo la recuperación del ADN. Las topoisomerasas son las encargadas en la regulación, replicación, transcripción y recombinación del ADN, por lo tanto, la afección de las topoisomerasas generan daño al ADN, la cual pueda ser uno de los mecanismos de actividad antifúngica de la IFD con curcumina (Carmello et al., 2015).

Recientemente, se reportó que la IFD con el empleo del ALA como FS causa daño al ADN en *S. globosa*, pero no se menciona que provoque cambios mutagénicos (Chen et al., 2020), ahora bien, se desconoce si la IFD con RB o curcumina pueda causar daño genotóxico en la especie *S. schenckii*.

Otro factor importante a considerar en la eficiencia de la IFD, es el tipo de medio en el que se prepara la curcumina, ya que influye en la eficiencia de la producción de ROS. La curcumina irradiada en medios próticos es potente en la generación de ¹O₂ y radicales libres, sin embargo, se ha probado que también en medios apróticos la generación de ROS es efectiva (Dahll et al., 1994). Por ello empleamos DMSO como solvente, uno de los más utilizado para la curcumina, la cual tiene propiedades apróticas, en nuestro ensayo se utilizó al 10 % dado que a dicha concentración no afecta la viabilidad celular (Dovigo et al., 2011).

Hay reportes de que la exposición de las muestras con curcumina o luz por sí solas no tienen acción antifúngica (Dovigo et al., 2011; Santezi et al., 2018). Esto lo comprobamos con nuestros resultados, ya que no se obtuvo efecto de inhibición del hongo incubado solo con el FS o solo con la irradiación.

Los microorganismos patógenos al estar expuestos a la presencia de ROS pueden desencadenar una serie de respuestas para protegerse. Ortega et al. (2015), señala que el factor de transcripción (AP1) y el glicerol del alta osmolaridad (HOG1) podrían ser las vías de regulación del hongo expuesto al estrés oxidativo inducido por radicales como el H_2O_2 y O_2^- en las especies *S. schenckii* y *S. brasiliensis*, además estos expresan enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y tiorredoxina peroxidasa, sin embargo, se desconocen los genes encargados de regular las vías de respuesta ante el estrés oxidativo. Ruiz-Baca et al. (2019), identificó proteínas expresadas por *S. schenckii* en respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , entre ellas las proteínas de choque de calor 70 kDa, chaperonas GroEL, factor de elongación 1- β , proteínas hipotéticas y peroxirredoxina mitocondrial.

La producción de radicales libres y $^1\text{O}_2$ en la fotosensibilización inactiva enzimas, proteínas e induce la peroxidación de lípidos (degradación oxidativa de lípidos) causando el daño de las membranas y organelos celulares. Otro punto es que el $^1\text{O}_2$ no es específico en la oxidación de agentes, por lo que no hay una vía de defensa específica del hongo ante su ataque, además inhibe procesos enzimáticos como el de las catalasas y superóxido dismutasa (Donnelly et al., 2008). En nuestro estudio la inhibición de *S. schenckii* fue evidente y puede estar relacionada con el daño de la membrana celular e inactivación de alguna de las vías de señalización implicadas en la defensa del hongo ante el estrés oxidativo inducido por las ROS generadas durante la IFD. Poco se sabe del mecanismo en *S. schenckii*, por ello se requiere más estudios que confirmen los efectos de la IFD en este hongo.

Randazzo et al. (2016), explica que la concentración del microorganismo es importante en la efectividad de la IFD, ya que en menor concentración celular habrá mayor daño oxidativo. Con las concentraciones celulares empleadas en nuestro estudio (2.5×10^5 y 3×10^5 cel/mL), en ambos tratamientos de IFD se obtuvo inhibición.

S. schenckii s. s. presenta un mayor polimorfismo cromosomal la cual le sigue *S. globosa* y *S. brasiliensis* (Rangel-Gamboa et al., 2016), las cuales no están relacionadas con las características clínicas o las de fuentes de aislamiento (Sasaki et al., 2014). A pesar de ello, en nuestro estudio no se obtuvo variación en susceptibilidad en las tres cepas del hongo ante la IFD.

Capítulo 6

Conclusiones y Trabajo a Futuro

En nuestra investigación se optimizó el proceso de obtención de levaduras y de la concentración celular de *S. schenckii* con el fin de realizar pruebas de susceptibilidad antifúngica y de IFD con RB y curcumina como FS. A continuación, se exponen las conclusiones que derivan del trabajo de investigación realizado y los posibles trabajos a futuro para dar continuación a este proyecto.

6.1 Conclusiones

S. schenckii desarrolló un mayor número de levaduras (aproximadamente un 40% más) en medios ricos en nutrientes como el BHI a 37°C en comparación con el medio YPD. El uso de cloranfenicol, además de no afectar la viabilidad celular, fue efectivo en la prevención de contaminación con bacterias.

Con respecto a la sensibilidad antifúngica en las cepas de *S. schenckii* de diferentes orígenes (paciente, naturaleza y mascota) resultaron ser resistentes a fluconazol (25 µg/mL) y a ketoconazol (50 µg/mL).

La IFD empleando 5 µM de RB a 10 J/cm² redujo un 70% el crecimiento de *S. schenckii* y la IFD con 20 µM curcumina a 20 J/cm² fue efectiva en la inhibición completa del crecimiento del hongo. Además, ambos FS y fuentes de luz LED por sí solos no causaron efecto citotóxico sobre *S. schenckii*.

Las tres cepas no variaron en cuanto a su susceptibilidad antifúngica ni a la respuesta a la IFD presentada.

6.2 Trabajo a Futuro

Dado que no existen reportes relacionados con el tema de investigación de esta tesis, por los resultados obtenidos y por el alcance de nuestro trabajo, quedan abiertas muchos temas por

indagar y continuar con trabajos a futuro para otros investigadores. A continuación, se sugieren algunos posibles trabajos:

- Realizar pruebas antifúngicas en *S. schenckii* en su fase micelial con antimicóticos a diferentes concentraciones.
- Analizar el efecto de la IFD en *S. schenckii* en su forma micelial.
- Analizar el efecto de la IFD en biopelículas de la especie de *S. schenckii*.
- Realizar una comparación del efecto de la IFD empleando diferentes FS a varias concentraciones y/o dosis de radiación, y observar la respuesta de *S. schenckii* en sus dos formas (micelio-levadura).
- Evaluar el efecto de la combinación de la IFD con fármacos antifúngicos sobre *S. schenckii*.
- Estudiar el efecto de la IFD en ensayos *in-vivo* para infecciones con *S. schenckii*.
- Analizar la efectividad de la IFD con otras cepas del complejo *S. schenckii*.
- Identificar posibles cambios morfológicos ocasionados por la IFD en *S. schenckii*.

Capítulo 7

Referencias

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Pan American Health Org.
- Ackermann, C., Vomero, A., Fernández, N., & Pérez, C. (s/f). Esporotricosis linfocutánea. A propósito de un caso pediátrico. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 6.
- Al-Tawfiq, J. A., & Wools, K. K. (1998). Disseminated Sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* Fungemia as the Initial Presentation of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 26(6), 1403–1406. <https://doi.org/10.1086/516356>
- Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M. M. E., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2016). Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. *PLOS ONE*, 13.
- Alvarado-Ramírez, E., & Torres-Rodríguez, J. M. (2007). In Vitro Susceptibility of *Sporothrix schenckii* to Six Antifungal Agents Determined Using Three Different Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2420–2423. <https://doi.org/10.1128/AAC.01176-06>
- Araújo, N. C., Fontana, C. R., Bagnato, V. S., & Gerbi, M. E. M. (2014). Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers in Medical Science*, 29(2), 629–635. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1369-3>
- Araújo, Natália Costa, de Menezes, R. F., Carneiro, V. S. M., dos Santos-Neto, A. P., Fontana, C. R., Bagnato, V. S., Harvey, C. M., & Gerbi, M. E. M. (2017). Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(5), 259–263. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4156>
- Arias, G. A. M., Luna, A. E., Delgadillo, A. A., & Camps-Fresneda, A. (2007). Terapia fotodinámica. *Medicina cutánea ibero-latino-americana*, 35(6), 255-268
- Armenteros, J. A. (2019). Esporotricosis linfangítica. *Revista Cubana de Medicina*, 5(3).
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Marine, M., Genis, J., Cano, J., & Guarro, J. (2009). Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 651–655. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x>

- Austin, E., & Jagdeo, J. (2018). An in vitro approach to photodynamic therapy. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (138)
- Barros, M. B. de L., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. (2011). Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 633–654. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>
- Bonifaz, A., & Tirado-Sánchez, A. (2017). *Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease*. 13.
- Brancaleon, L., & Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers in Medical Science*, 17(3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s101030200027>
- Bravo, T. (2012). Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 59(3), 147–171.
- Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., & Sala, R. (2005). *A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin*. 6.
- Carmello, J. C., Pavarina, A. C., Oliveira, R., & Johansson, B. (2015). Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 15(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov018>
- Carmichael, J. W. (1962). Chrysosporium and some other aleuriotrophic hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 40(8), 1137–1173.
- Carrasco-Zuber, J. E., Navarrete-Dechent, C., Bonifaz, A., Fich, F., Vial-Letelier, V., & Berroeta-Mauriziano, D. (2016). Afectación cutánea en las micosis profundas: Una revisión de la literatura. Parte 1: micosis subcutáneas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(10), 806–815. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.05.017>
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C., Mochizuki, T., & Li, S. (2014). Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, 00(0), 12.
- Chen, R., Song, Y., Zhen, Y., Yao, L., Shi, Y., Cui, Y., & Li, S. (2020). 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy has effective antifungal activity against *Sporothrix globosa* in vitro. *Mycoses*, 63(12), 1311–1320. <https://doi.org/10.1111/myc.13171>
- Christen, H. R. (1975). *Química general*. Reverte.

- Comini, L., & Montoya, S. N. (2016). Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica. *Bitácora Digital*, 3(7), Article 7. <https://revistas.psi.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/16316>.
- Córdoba, S., Isla, G., Szusz, W., Vivot, W., Hevia, A., Davel, G., & Canteros, C. E. (2018). Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. *Mycoses*, 61(7), 441–448. <https://doi.org/10.1111/myc.12760>
- Corell, J. J. V. (2006). *Micosis cutáneas*. Ed. Médica Panamericana.
- Cromer, A. H. (1986). *Física en la ciencia y en la industria*. Reverte.
- Dahll, T. A., Bilski, P., Reszka, K. J., & Chignell, C. F. (1994). PHOTOCYTOTOXICITY OF CURCUMIN. *Photochemistry and Photobiology*, 59(3), 290–294. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05036.x>
- de Beer, Z. W., Harrington, T. C., Vismer, H. F., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2003). Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*: *Sporothrix schenckii* Complex. *Mycologia*, 95(3), 434. <https://doi.org/10.2307/3761885>
- de Freitas, L. F., & Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. En *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy* (pp. 1–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42864-4.00001-4>
- de Meyer, E. M., de Beer, Z. W., Summerbell, R. C., Moharram, A. M., de Hoog, G. S., Vismer, H. F., & Wingfield, M. J. (s/f). *Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting Sporothrix species in the Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii complex*. 15.
- de Oliveira-Esteves, I. C. M. R., Almeida Rosa da Silva, G., Eyer-Silva, W. D. A., Basílio-de-Oliveira, R. P., de Araujo, L. F., Martins, C. J., ... & Raphael de Almeida Ferry, F. (2017). Rapidly Progressive Disseminated Sporotrichosis as the First Presentation of HIV Infection in a Patient with a Very Low CD4 Cell Count. *Case reports in infectious diseases*, 2017.
- Dearborn, F. M. (1999). *Enfermedades De La Piel*. B. Jain Publishers.
- del Moral, M. B., Arenas, R., & Esmenjaud, J. R. (2007). Esporotricosis en Veracruz. Estudio de cinco casos. *Dermatología Revista Mexicana*, 51(1), 9-13.
- Dias, L. D., Blanco, K. C., Mfouo-Tynga, I. S., Inada, N. M., & Bagnato, V. S. (2020). Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*

- C: *Photochemistry Reviews*, 45, 100384.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384>
- Dimmer, J. A. (2018). Fotosensibilizadores fotodinámicos naturales y potenciales aplicaciones terapéuticas.
- Donnelly, R. F., McCarron, P. A., & Tunney, M. M. (2008). Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research*, 163(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>
- Dovigo, Livia N., Pavarina, A. C., Ribeiro, A. P. D., Brunetti, I. L., Costa, C. A. de S., Jacomassi, D. P., Bagnato, V. S., & Kurachi, C. (2011). Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. *Photochemistry and Photobiology*, 87(4), 895–903. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x>
- Dovigo, Livia Nordi, Carmello, J. C., de Souza Costa, C. A., Vergani, C. E., Brunetti, I. L., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2013). Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Medical Mycology*, 51(3), 243–251. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.714081>
- Estrada-Castañón, R., Chávez-López, G., Estrada-Chávez, G., & Bonifaz, A. (2018). Report of 73 cases of cutaneous sporotrichosis in Mexico. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 93(6), 907–909. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187726>
- Estrada-Castañón, R., Estrada-Chávez, G., & Chávez-López, M. de G. (2019). Diagnosis and Management of Fungal Neglected Tropical Diseases In Community Settings—Mycetoma and Sporotrichosis. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 81. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020081>
- Eva Ramón (2015). Terapia fotodinámica: teoría y práctica. IPN.
- Farooqui, S. M., & Youness, H. (s/f). The Infection Returns: A Case of Pulmonary Sporotrichosis Relapse after Chemotherapy. *Case Reports in Medicine*, 5.
- Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2013). Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*, 4(3), 241–249. <https://doi.org/10.4161/viru.23112>
- Ferreira, G. A., Watanabe, A. L. C., Trevizoli, N. C., Jorge, F. M. F., Cajá, G. O. N., Diaz, L. G. G., ... & Araújo, M. C. C. L. (2019, June). Disseminated Sporotrichosis in a

- liver transplant patient: A case report. In *Transplantation proceedings* (Vol. 51, No. 5, pp. 1621-1624). Elsevier.
- Flores, C., Ferrada, L., & De La Parra, M. (2019). Estudio micológico y experimental de un caso de esporotricosis. *Boletín Micológico*, 1(1). <https://doi.org/10.22370/bolmicol.1982.1.1.1438>
- Freire, F., Costa, A. C. B. P., Pereira, C. A., Beltrame Junior, M., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2014). Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*, 29(3), 949–955. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1435-x>
- García, J. R., & Rovira, J. M. V. (1999). *Fundamentos de óptica ondulatoria*. Universidad de Oviedo.
- Gilaberte, Y., Aspiroz, C., Alejandre, M. C., Andres-Ciriano, E., Fortuño, B., Charlez, L., Revillo, M. J., Hamblin, M. R., & Rezusta, A. (2014). Cutaneous Sporotrichosis Treated with Photodynamic Therapy: An *in Vitro* and *in Vivo* Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 32(1), 54–57. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3590>
- Gold, J. A. W., Derado, G., Mody, R. K., & Benedict, K. (2016). Sporotrichosis-Associated Hospitalizations, United States, 2000–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 22(10), 1817–1820. <https://doi.org/10.3201/eid2210.160671>
- González, M. E. (2020). *Análisis de la morfología post inactivación fotodinámica en cepas de Candida albicans* (tesis de licenciatura). Universidad Politécnica de Puebla, Puebla, México.
- Govender, N. P., Maphanga, T. G., Zulu, T. G., Patel, J., Walaza, S., Jacobs, C., Ebonwu, J. I., Ntuli, S., Naicker, S. D., & Thomas, J. (2015). An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004096. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004096>
- Guirado, G. M. de P., Feitosa, L. dos S., Kozusny-Andreani, D. I., & Navarro, R. S. (2018). Analysis of laser therapy effects in *Sporothrix schenckii* inactivation *in vivo*. *Research on Biomedical Engineering*, 34(2), 93–101. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.06917>
- Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>

- Hamblin, M. R., & Huang, Y. (2013). *Handbook of Photomedicine*. Taylor & Francis.
- Han, H. S., Kano, R., Chen, C., & Noli, C. (2017). Comparison of two *in vitro* antifungal sensitivity tests and monitoring during therapy of *Sporothrix schenckii sensu stricto* in Malaysian cats. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 156-e32. <https://doi.org/10.1111/vde.12417>
- Hektoen, L., & Perkins, C. F. (1900). Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *The Journal of experimental medicine*, 5(1), 77.
- Howard, D. H. (1961). Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. *Journal of bacteriology*, 81(3), 464.
- Jacobson, E. S. (2000). Pathogenic Roles for Fungal Melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 708–717. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.708>
- Juzeniene, A., & Moan, J. (2007). The history of PDT in Norway: Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 4(1), 3-11.
- Kauffman, C. A., Bustamante, B., Chapman, S. W., & Pappas, P. G. (s/f). *Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America*. 11.
- Kim, M. M., & Darafsheh, A. (2020). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 96(2), 280–294. <https://doi.org/10.1111/php.13219>
- Konan, Y. N., Gurny, R., & Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(2), 89-106.
- La luz: Ondas electromagnéticas, espectro electromagnético y fotones (artículo)*. (2020). Khan Academy. Recuperado el 3 de junio de 2020, de <https://es.khanacademy.org/science/ap-chemistry/electronic-structure-of-atoms-ap/bohr-model-hydrogen-ap/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>
- Laguna, V. P. (2019). *Terapia fotodinámica antimicrobiana frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas* (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).

- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 143–158. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00526-1)
- Li, J., Zhu, M., An, L., Chen, F., & Zhang, X. (2019). Fungicidal efficacy of photodynamic therapy using methylene blue against *Sporothrix globosa* in vivo and in vivo. *European Journal of Dermatology*, 29(2), 160–166. <https://doi.org/10.1684/ejd.2019.3527>
- Liang, Y., Lu, L.-M., Chen, Y., & Lin, Y.-K. (2016). Photodynamic therapy as an antifungal treatment. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 23–27. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3336>
- Lima, O.C., Figueiredo, C. C., Pereira, B. A. S., Coelho, M. G. P., Morandi, V., & Lopes-Bezerra, L. M. (1999). Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(5), 651–657. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000500020>
- Lima, Osana C., Figueiredo, C. C., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Morandi, V., & Lopes Bezerra, L. M. (2001). Involvement of Fungal Cell Wall Components in Adhesion of *Sporothrix schenckii* to Human Fibronectin. *Infection and Immunity*, 69(11), 6874–6880. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6874-6880.2001>
- Lopes-Bezerra, L. M., Mora-Montes, H. M., Zhang, Y., Nino-Vega, G., Rodrigues, A. M., de Camargo, Z. P., & de Hoog, S. (2018). Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Medical Mycology*, 56(suppl_1), S126–S143. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx103>
- Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 78(2), 293–308. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000200009>
- Lopes-Bezerra, L. M., Walker, L. A., Niño-Vega, G., Mora-Montes, H. M., Neves, G. W. P., Villalobos-Duno, H., Barreto, L., Garcia, K., Franco, B., Martínez-Álvarez, J. A., Munro, C. A., & Gow, N. A. R. (2018). Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminar structures and sloughing of extensive and intact layers. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), e0006169. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006169>
- López-Romero, E., Reyes-Montes, M. del R., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., Flores-Carreón, A., & Toriello, C. (2011).

- Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*, 6(1), 85–102. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.157>
- M Lisart, F. F., & Molina, J. P. (2004). Principios de la fototerapia y su aplicación en el paciente oncológico. *Farmacia Hospitalaria*, 2004(28/3), 205.
- Mang, T. S. (2004). Lasers and light sources for PDT: Past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00012-2)
- Marimon, R., Gene, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M., & Guarro, J. (2006). Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3251–3256. <https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06>
- Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008). In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 732-734
- Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008). In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 732-734.
- Masoule, S. F., Pourhajibagher, M., Khoobi, M., & Safari, J. (2018). *Photodynamic Inactivation of Endopathogenic Microbiota Using Curcumin- mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy*. 29(3), 5.
- Matowane, R. G., Wieteska, L., Bamal, H. D., Kgosiemang, I. K. R., Van Wyk, M., Manume, N. A., Abdalla, S. M. H., Mashele, S. S., Gront, D., & Syed, K. (2018). In silico analysis of cytochrome P450 monooxygenases in chronic granulomatous infectious fungus *Sporothrix schenckii*: Special focus on CYP51. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1866(1), 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.10.003>
- Mayorga-Rodríguez, J., Mayorga-Garibaldi, J. L., Muñoz-Estrada, V. F., & Ramírez, R. M. D. L. (2019). Esporotricosis: serie de 1,134 casos en una zona endémica de México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 47(1), 24-28.
- Méndez-Tovar, L. J., Garibay-Partida, A. J., & Vázquez-Hernández, A. (2020). Esporotricosis linfangítica en un paciente con insuficiencia hepática. *Dermatología Revista Mexicana*, 63(5), 490-494.

- Mora-Montes, H. M., & Lopes-Bezerra, L. M. (Eds.). (2017). *Current Progress in Medical Mycology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64113-3>
- Morales, L. P., López, M. I., Cherta, O. Q., & Rodríguez, I. R. (2014). *Aislamiento microbiológico de Sporothrix Schenckii en un paciente inmunodeprimido. Presentación de un caso* *Microbiological Isolation of Sporothrix Schenckii in an Immunocompromised Patient. A Case Report*. 8.
- Mordon, S., Martínez-Carpio, P. A., Vélez, M., Alves, R., & Trelles, M. A. (2012). Terapia fotodinámica (PDT) en piel y estética: procedimiento, materiales y método en base a nuestra experiencia. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 38(3), 287-295.
- Moussa, T. A. A., Kadasa, N. M. S., Al Zahrani, H. S., Ahmed, S. A., Feng, P., Gerrits van den Ende, A. H. G., Zhang, Y., Kano, R., Li, F., Li, S., Song, Y., Dong, B., Rossato, L., Dolatabadi, S., & Hoog, S. de. (2017). Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), 560–569. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000451>
- Naqvi SH, Becherer P, Gudipati S. (1993). Ketoconazole treatment of a family with zoonotic sporotrichosis. *Scand J Infect Dis*. 1993;25(4):543-5. doi: 10.3109/00365549309008541.
- NCCLS. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*. NCCLS document M44-A [ISBN 1-56238-532-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
- Nosanchuk, J. D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 12.
- Nunes Mario, D. A., Denardi, L. B., Brayer Pereira, D. I., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2014). In vitro photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. *Medical Mycology*, 52(7), 770–773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu041>
- Oliveira, D. C., Lopes, P. G. M., Spader, T. B., Mahl, C. D., Tronco-Alves, G. R., Lara, V. M., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2011). Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3047–3049. <https://doi.org/10.1128/JCM.00255-11>
- Orofino-Costa, R., Macedo, P. M. de, Rodrigues, A. M., & Bernardes-Engemann, A. R. (2017). Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and

- clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(5), 606–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.2017279>
- Ortega, I., Soares Felipe, M. S., Vasconcelos, A. T. R., Lopes Bezerra, L. M., & Da Silva Dantas, A. (2015). Peroxide sensing and signaling in the *Sporothrix schenckii* complex: An in-silico analysis to uncover putative mechanisms regulating the Hog1 and AP-1 like signaling pathways. *Medical Mycology*, 53(1), 51–59. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu069>
- Ottonelli Stopiglia, C. D., Magagnin, C. M., Castrillón, M. R., Mendes, S. D. C., Heidrich, D., Valente, P., & Scroferneker, M. L. (2013). Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology*, 1–9. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.818726>
- Pérez, R. M., Lozano, Y. R., Roldán, E. C., Escobar, M. D. C. V., & Taxis, A. E. (2007). Epidemiología de la esporotricosis en el municipio de Huauchinango, Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 27(2), 38–43.
- Picco, D. de C. R., Cavalcante, L. L. R., Trevisan, R. L. B., Souza-Gabriel, A. E., Borsatto, M. C., & Corona, S. A. M. (2019). Effect of curcumin-mediated photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: A systematic review of in vitro studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.010>
- Prasad, P. N. (2004). *Introduction to Biophotonics*. John Wiley & Sons.
- Quishida, C. C. C., De Oliveira Mima, E. G., Jorge, J. H., Vergani, C. E., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2016). Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers in Medical Science*, 31(5), 997–1009. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1942-7>
- Randazzo, W., Aznar, R., & Sánchez, G. (2016). Curcumin-Mediated Photodynamic Inactivation of Norovirus Surrogates. *Food and Environmental Virology*, 8(4), 244–250. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9255-3>
- Rangel-Gamboa, L., Martínez-Hernandez, F., Maravilla, P., Arenas-Guzmán, R., & Flisser, A. (2016). Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. *Medical Mycology*, 54(3), 248–255. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv096>
- Rasamoelina, T., Maubon, D., Raharolahy, O., Razanakoto, H., Rakotozandrindrainy, N., Rakotomalala, F. A., Bailly, S., Sendrasoa, F., Ranaivo, I., Andrianarison, M., Rakotonirina, B., Andriantsimahavandy, A., Rabenja, F. R., Andrianarivelo, M. R.,

- Ramarozatovo, L. S., & Cornet, M. (2019). Sporotrichosis in the Highlands of Madagascar, 2013–20171. *Emerging Infectious Diseases*, 25(10), 1893–1902. <https://doi.org/10.3201/eid2510.190700>
- Reiss, E., Shadomy, H. J., & Lyon, G. M. (2011). *Fundamental Medical Mycology*. John Wiley & Sons.
- Ribeiro, B. N. de F., Ribeiro, R. N. de F., Penna, C. R. R., & Frota, A. C. (2015). Bone involvement by *Sporothrix schenckii* in an immunocompetent child. *Pediatric Radiology*, 45(9), 1427–1430. <https://doi.org/10.1007/s00247-015-3299-7>
- Rodrigues, A. M., Cruz Choappa, R., Fernandes, G. F., de Hoog, G. S., & de Camargo, Z. P. (2016). *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biology*, 120(2), 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.006>
- Rodrigues, A. M., de Hoog, Gs., Zhang, Y., & de Camargo, Z. P. (2014). Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerging Microbes & Infections*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.33>
- Rodrigues, M. L. (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *MBio*, 9(5), e01755-18, /mbio/9/5/mBio.01755-18.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01755-18>
- Rojas, F. D., Fernández, M. S., Lucchelli, J. M., Lombardi, D., Malet, J., Vetrivano, M. E., ... & Giusiano, G. (2017). Cavitary pulmonary sporotrichosis: case report and literature review. *Mycopathologia*, 182(11), 1119–1123.
- Rojas, O., Bonifaz, A., Campos, C., Treviño-Rangel, R., González-Álvarez, R., & González, G. (2018). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility, and Geographic Origin of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. *Journal of Fungi*, 4(3), 86. <https://doi.org/10.3390/jof4030086>
- Ruiz-Baca, E., Leyva-Sánchez, H., Calderón-Barraza, B., Esquivel-Naranjo, U., López-Romero, E., López-Rodríguez, A., & Cuéllar-Cruz, M. (2019). Identification of proteins in *Sporothrix schenckii* sensu stricto in response to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Revista Iberoamericana de Micología*, 36(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.10.004>
- Ruiz, V. A., & Guillén, S. M. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana.

- Sabbahi, S., Ben Ayed, L., & Jemli, M. (2018). Staphylococcus aureus photodynamic inactivation mechanisms by rose bengal: Use of antioxidants and spectroscopic study. *Applied Water Science*, 8(2), 56. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0693-y>
- Santezi, C., Reina, B. D., & Dovigo, L. N. (2018). Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>
- Sasaki, A. A., Fernandes, G. F., Rodrigues, A. M., Lima, F. M., Marini, M. M., dos S. Feitosa, L., de Melo Teixeira, M., Felipe, M. S. S., da Silveira, J. F., & de Camargo, Z. P. (2014). Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. *PLoS ONE*, 9(1), e86819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086819>
- Saúl, A., & Bonifaz, A. (2011). Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. *Dermatol Rev Mex*, 55(4), 200-208.
- Seyedmousavi, S., de Hoog, G. S., Guillot, J., & Verweij, P. E. (Eds.). (2018). *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7>
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>
- Silva, A., Borges, A., Freitas, C., Hioka, N., Mikcha, J., & Simões, M. (2018). Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal and Erythrosine Is Effective in the Control of Food-Related Bacteria in Planktonic and Biofilm States. *Molecules*, 23(9), 2288. <https://doi.org/10.3390/molecules23092288>
- Taninratapat, N., & Srisuttiyakorn, C. (2019). Localized Cutaneous Sporotrichosis on Face in Healthy Thai Female. *Mycopathologia*, 184(4), 539–542. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00354-7>
- Taylor, K. (1913). SPOROTRICHUM SCHENCKII. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 60(15), 1142. <https://doi.org/10.1001/jama.1913.04340150024007>
- Taylor, V. M., Cedeño, D. L., & Robledo, S. M. (2011). Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Infectio*, 15(4), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70742-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70742-1)

- Tegos, G., & Mylonakis, G. T. and E. (2012). *Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies*. CABI.
- Teixeira, P. A. C., de Castro, R. A., Nascimento, R. C., Tronchin, G., Pérez Torres, A., Lazéra, M., de Almeida, S. R., Bouchara, J.-P., Loureiro y Penha, C. V., & Lopes-Bezerra, L. M. (2009). Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology*, *155*(11), 3730–3738. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029439-0>
- Tellez, M. D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Quinello, C., Bonne-Hernandez, R., & Carlos, I. Z. (2014). *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*, *160*(Pt_11), 2352–2365. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081794-0>
- Tipler, P. A., & Mosca, G. (2005). *Física para la ciencia y la tecnología. Luz. 2B*. Reverte.
- Tirado-Sánchez, A., & Bonifaz, A. (2016). Sporotrichosis in Children: An Update. *Current Fungal Infection Reports*, *10*(3), 107–116. <https://doi.org/10.1007/s12281-016-0259-0>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Torres-Hurtado, S. A., Ramirez-Ramirez, J., Larios-Morales, A. C., Ramírez-San-Juan, J. C., Ramos-García, R., Espinosa-Texis, A. P., & Spezzia-Mazzocco, T. (2019). Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *26*, 203-209.
- Trilles, L., Fernandez-Torres, B., Schubach, A. de O., Paes, R. de A., Inza, I., & Guarro, J. (s/f). *In Vitro Antifungal Susceptibilities of Sporothrix schenckii in Two Growth Phases*. 3.
- Tunccan, Ö. G., Kalkanci, A., Unal, E. A., Abdulmajed, O., Erdoğan, M., DiZbay, M., & Çaglar, K. (s/f). The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk J Med Sci*, *7*.
- Vázquez-Hernández, F., Granada-Ramírez, D. A., Arias-Cerón, J. S., Rodríguez-Fragoso, P., Mendoza-Álvarez, J. G., Ramón-Gallegos, E., Cruz-Orea, A., & Luna-Arias, J. P. (2018). Use of nanostructured materials in drug delivery. En *Nanobiomaterials* (pp. 503–549). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00020-9>

- Waller, S. B., Dalla Lana, D. F., Quatrin, P. M., Ferreira, M. R. A., Fuentefria, A. M., & Mezzari, A. (2020). Antifungal resistance on *Sporothrix* species: An overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00307-z>
- Wilson, B. C., & Patterson, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine & Biology*, 53(9), R61.
- Wong, B. J.-F., & Ilgner, J. (2016). *Biomedical Optics in Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*. Springer.
- Wozniak, A., Rapacka-Zdonczyk, A., Mutters, N. T., & Grinholc, M. (2019). Antimicrobials Are a Photodynamic Inactivation Adjuvant for the Eradication of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00229>
- Yagnik, K. J. (2017). *A rare case of disseminated Sporothrix schenckii with bone marrow involvement in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia*. 3.
- Yao, L., Song, Y., Cui, Y., Zhou, J.-F., Zhong, S.-X., Zhao, D.-Y., & Li, S.-S. (2019). Pediatric Sporotrichosis in Jilin Province of China (2010–2016): A Retrospective Study of 704 Cases. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, piz052. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz052>
- Yao, L., Song, Y., Zhou, J. F., Cui, Y., & Li, S. S. (2020). Epidemiological and clinical comparisons of paediatric and adult sporotrichosis in Jilin Province, China. *Mycoses*, 63(3), 308-313.
- Zeppone Carlos, I. (2015). *Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects*. Springer International Publishing: Springer e-books: Imprint: Springer: Springer e-books. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11912-0>
- Zurabian, R., & Hernández Hernández, F. (2019). Esporotricosis: la micosis subcutánea más frecuente en México. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 62(5), 48-55.