



INAOE

Optimización de la Terapia Fotodinámica
Antimicrobiana para el hongo *Sporothrix schenckii*
con diversos fotosensibilizadores

Por:

Vania Déborah Vázquez Palacios

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

Agosto 2023 Tonantzintla, Puebla

Bajo la supervisión de:

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco

©INAOE 2023

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



ÍNDICE

CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN	5
1.1 Antecedentes	5
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación	7
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general:	8
1.4.2 Objetivos específicos:	8
CAPÍTULO II	9
MARCO TEÓRICO	9
2.1 Esporotricosis	9
2.1.1 Historia y morfología	9
2.1.2 Epidemiología	11
2.1.3 Patogenia	12
2.1.4 Manifestaciones clínicas	13
2.1.5 Tratamiento	15
2.2 TFDA	16
2.2.1 Fs	17
2.2.1.1 AM	18
2.2.1.2 Cur	18
2.2.2 Mecanismos de acción TFDA	18
2.3 Estado del arte	19
CAPÍTULO III	21
METODOLOGÍA	21
3.1 Material biológico	21
3.2 Medios de cultivo	21
3.3 Fs	22
3.3.1 AM	22
3.3.2 Cur	22
3.4 Fluconazol	23
3.5 Optimización de la TFDA	23
3.5.1 Pruebas de evaluación de la concentración intracelular del Fs	23
3.5.2 Determinación de dosis para la TFDA	23
3.5.3 Condiciones experimentales	24
3.5.3.1 Condiciones experimentales con fluconazol	24
3.5.4 Metodología de la TFDA	25
3.5.5 Análisis Estadístico	26
CAPÍTULO IV	27
RESULTADOS	27
4.1 Concentración intracelular de AM y Cur	27
4.1.1 Concentración intracelular AM	27

4.1.1 Concentración intracelular de Cur	30
4.2 Eficiencia de la TFDA	32
4.2.1 Resultados de concentración celular evaluados por D.O. para AM-TFDA	32
4.2.2 Resultados de viabilidad evaluados por D.O. para Cur-TFDA	35
4.2.3 Tratamientos combinados TFDA y fluconazol	38
4.2.3.1 Viabilidad de <i>S. schenckii</i> tras la aplicación de AM-TFDA con y sin fluconazol	38
4.2.3.2 Viabilidad de <i>S. schenckii</i> tras la aplicación de Cur-TFDA con y sin fluconazol	40
CAPÍTULO V	44
DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO VI	49
CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	49
6.1 Conclusiones	49
6.2 Trabajo futuro	50
Referencias	50

Resumen

La esporotricosis es una enfermedad subaguda o crónica que afecta a la piel y ganglios linfáticos. Esta enfermedad es causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. La terapia antifúngica para tratar esporotricosis es a través de la administración de medicamentos, sin embargo, esto puede llegar a ser muy extenso, y hay reportes de resistencia. Es por ello que se propone el estudio de técnicas alternativas para disminuir los tiempos de tratamiento e incrementar la eficiencia de eliminación, posiblemente entre las más importantes se encuentre la terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA). Este trabajo de investigación tiene como objetivo principal evaluar y optimizar los procesos de TFDA para la eliminación de *S. schenckii in vitro*, empleando azul de metileno (AM) y curcumina (Cur) como fotosensibilizadores (Fs). Los resultados obtenidos al momento muestran una inhibición del 70% al 36% empleando 20 μM de AM y 60 J/cm^2 de luz roja a 630 nm y 50% al 60% empleando 20 μM de Cur y 20 J/cm^2 de luz azul a 460 nm.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, azul de metileno, curcumina, terapia fotodinámica antimicrobiana.

Abstract

Sporotrichosis is a subacute or chronic disease that affects the skin and lymph nodes. This disease is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. Antifungal therapy to treat sporotrichosis is through the administration of medications, however, this can become very extensive, and there are reports of resistance. That is why the study of alternative techniques to reduce treatment times and increase elimination efficiency is proposed, possibly among the most important is antimicrobial photodynamic therapy (APDT). The main objective of this research work is to evaluate and optimize PDT processes for the elimination of *S. schenckii in vitro*, using methylene blue (MB) and curcumin (Cur) as photosensitizers (Ps). The results obtained at the moment show an inhibition of 70% to 36% using 20 μM of AM and 60 J/cm^2 of red light at 630 nm and 50% at 60% using 20 μM of Cur and 20 J/cm^2 of blue light at 460 nm.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, methylene blue, curcumin, antimicrobial photodynamic therapy.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, a mi mamá Loyda y mi hermana Eréndira, quienes son mi mayor motor para seguir adelante, por su gran amor y apoyo incondicional que me brindan en todo momento, gracias por impulsarme siempre a ser mejor persona.

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

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

A Edgar, Andrés, Alejandra, Iván, Denise, Laura, Jesús, Rebeca, 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 todas esas personas maravillosas que he conocido a lo largo de estos años, mencionarlos uno por uno sería complicado, sin embargo, sepan que estoy agradecida por siempre estar ahí para darme palabras de aliento y apoyo.

Al grupo de biofotónica, por sus comentarios y sugerencias.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La esporotricosis es una enfermedad subaguda o crónica que afecta a la piel y ganglios linfáticos. Se presenta en forma de nódulos y gomas, el agente infeccioso es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* (Bonifaz, 2012), esta enfermedad afecta principalmente al rostro y extremidades provocando lesiones fijas verrugosas o linfangíticas (Arenas, 2014). Fue descrita por primera vez en 1809 por Linck (Samanta, 2015). En 1896 Benjamin Schenck, estudiante de medicina en el Hospital John Hopkins, en Baltimore, Estados Unidos, aisló el hongo de un paciente que presentaba una lesión cutánea en el brazo. El aislamiento fue confirmado por Erwin Smith, un micólogo que describió el hongo como *Sporotrichum* (Samanta, 2015). En 1962 Carmichael y otros investigadores demostraron las diferencias del género *Sporothrix* y finalmente se aceptó la nomenclatura *S. schenckii* (Samanta, 2015).

En 1913 se publican los primeros casos de esporotricosis en México por Gayón y Aguirre-Pequeño, siendo esta la enfermedad subcutánea por micosis más frecuente en nuestro país (Zurabian, 2019).

Por su parte, la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA) es un procedimiento poco invasivo, de costo relativamente bajo, que puede aplicarse a nivel local y los efectos secundarios no son severos. Se basa en la activación de un fotosensibilizador (Fs) con luz y la activación de procesos de muerte celular (Roblero-Bartolón & Ramón-Gallegos, 2015).

En la antigüedad se usaba luz para el tratamiento de enfermedades, hay evidencia de griegos, egipcios e hindúes empleando este método, pero el efecto tóxico de la asociación de la luz y colorantes se reporta por primera vez a principios del siglo XIX con Dane, Niels Finsen y Oscar Raab, este último observó que unos protozoarios llamados paramecios dejaban de moverse cuando se encontraban expuestos a la eosina en una habitación muy iluminada (Moreno Arias, et al. 2007). Estos son los primeros reportes en los que se puede observar una respuesta

biológica al combinar luz con ciertas sustancias, a esto posteriormente se le conocería como terapia fotodinámica.

Los estudios de TFDA en hongos han sido objeto de creciente interés debido a su potencial como enfoque terapéutico efectivo y poco invasivo. Fuchs (2007) evaluó la TFDA en *Cryptococcus neoformans*, demostrando susceptibilidad al tratamiento mediante el uso de un conjugado policatiónico de polietilenoimina y el Fs clorina. Prates (2011) usó azul de metileno (AM) contra *C. albicans*. Lyon (2011) también utilizó AM para tratar la cromoblastomycosis, la cual es una enfermedad subdérmica provocada por hongos. Friedberg (2001) observó actividad antifúngica en el hongo *Aspergillus fumigatus*. Los casos mencionados representan el motivo por el cual este trabajo propone evaluar el efecto de la TFDA en la inhibición in vitro del crecimiento del hongo *S. schenckii*, causante de la esporotricosis.

1.2 Planteamiento del problema

A pesar de que la esporotricosis tiene prevalencia en todo el mundo, existen desafíos significativos en el manejo clínico de la enfermedad en nuestro país.

Uno de los principales problemas asociados a esta enfermedad, radica en la efectividad de los tratamientos actuales, la aparición de resistencia antifúngica (Li, 2019) y la falta de opciones terapéuticas seguras y efectivas para pacientes con esporotricosis severa o inmunocomprometidos, además, de que la mayoría de las veces, esta enfermedad se presenta en persona de bajos recursos para quienes es complicado poder seguir un tratamiento médico por los largos periodos de tiempo y la implicación económica que esto significa.

Por lo tanto, es crucial abordar estos desafíos y plantear investigaciones que permitan desarrollar terapias más eficaces y seguras. Este estudio contribuirá a mejorar la calidad de vida de los pacientes, haciendo que el tiempo de tratamiento se reduzca, y así promover la salud pública en general.

A pesar de la promesa que representa la TFDA en el manejo de diversas infecciones, hay escasez de estudios que se enfoquen en su optimización para combatir a *S. schenckii*, en particular, el uso de la Cur como fotosensibilizador ha sido poco explorado a pesar de su potencial demostrado en otros contextos, por lo tanto, es fundamental realizar investigaciones centradas en el desarrollo y

optimización de la TFDA para *S. schenckii*, utilizando diversos fotosensibilizadores, incluyendo la Cur.

1.3 Justificación

La terapia antifúngica para tratar esporotricosis consiste en la administración de medicamentos como yoduro de potasio, itraconazol, anfotericina B, entre otros (Bressan Waller S., et al., 2020). Sin embargo, se ha presentado farmacorresistencia a estas sustancias, además de que el uso prolongado de ellas provoca complicaciones, especialmente en pacientes con lesión hepática asintomática o trastornos hepáticos existentes, niños y mujeres embarazadas (Li, Zhu, An, Chen, & Zhang, 2019).

Debido a la farmacorresistencia que han presentado algunas cepas de *S. schenckii* a los tratamientos actuales y el reporte de secuelas (como daño en hígado y riñones), existe la necesidad de probar con nuevas terapias que nos aseguren una inhibición óptima del crecimiento microbiano.

Ante esta necesidad surge la propuesta de usar la TFDA como terapia alternativa viable, ya que esta suele ser económica y se han reportado resultados favorables en el tratamiento de varias enfermedades como el virus de papiloma humano, enfermedades parasitarias como la malaria y la enfermedad de chagas, en bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y por supuesto, en hongos, entre ellos *C. albicans*, con resultados favorables en cuanto a la inhibición del crecimiento microbiano (Saorín Falcón, 2016).

El potencial de la TFDA como tratamiento alternativo es evidente, debido a esto, en este trabajo se propone evaluar y optimizar los procesos de la terapia, estudiando diferentes fotosensibilizadores, diferentes dosis de luz, tiempos de exposición, etc.; el uso combinado de terapia antimicrobiana convencional controlada y la terapia fotodinámica antimicrobiana puede ser un tratamiento que dé solución a los riesgos que se presentan en México, sin causar secuelas graves en los pacientes.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general:

Evaluar y optimizar los procesos de TFDA para la eliminación de *S. schenckii* in vitro.

1.4.2 Objetivos específicos:

Evaluar el efecto del AM y Cur como fotosensibilizadores en la TFDA contra cepas de *S. schenckii*, provenientes de pacientes humanos, mascotas y naturaleza.

Optimizar el proceso de TFDA contra *S. schenckii* utilizando 20 μM de AM y 60 J/cm^2 de luz roja y 20 μM de Cur y 20 J/cm^2 de luz azul.

Determinar el efecto del fluconazol y los tratamientos combinados fluconazol-TFDA en las diferentes cepas de *S. schenckii*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Esporotricosis

La esporotricosis es una enfermedad causada por el hongo dimórfico *S. schenckii* atacando a la capa subcutánea de la piel. Esta es una micosis ocupacional, los pacientes suelen ser agricultores, campesinos, jardineros, amas de casa, niños en edad escolar, cultivadores y vendedores de flores, cazadores, mineros, pescadores, empacadores de vidrio y loza, entre otros (Bonifaz, 2012). El hongo habita en el suelo y plantas como musgo, espinas de rosas (Munguía Pérez, et. al., 2007) y puede afectar a cualquier persona, independientemente de su edad o sexo (Sizar, 2023; Gaviria-Giraldo, et al, 2017).

El hongo presenta diferentes morfologías, niveles de virulencia y distribución. En México se encuentra, además, la especie *S. mexicana*. (Zurabian & Hernández, 2019).

2.1.1 Historia y morfología

Hace más de un siglo la enfermedad fue identificada por primera vez (Figura 1) por un estudiante de medicina, con el paso del tiempo se hicieron reportes de la enfermedad en diversos países; el dimorfismo del hongo fue descrito en 1961 por Howard (Samanta, 2015). Decir que un hongo es dimórfico significa que presenta dos formas diferentes dependiendo si se encuentra en fase de estado silvestre o parasitario (Zurabian & Hernández Hernández, 2019).

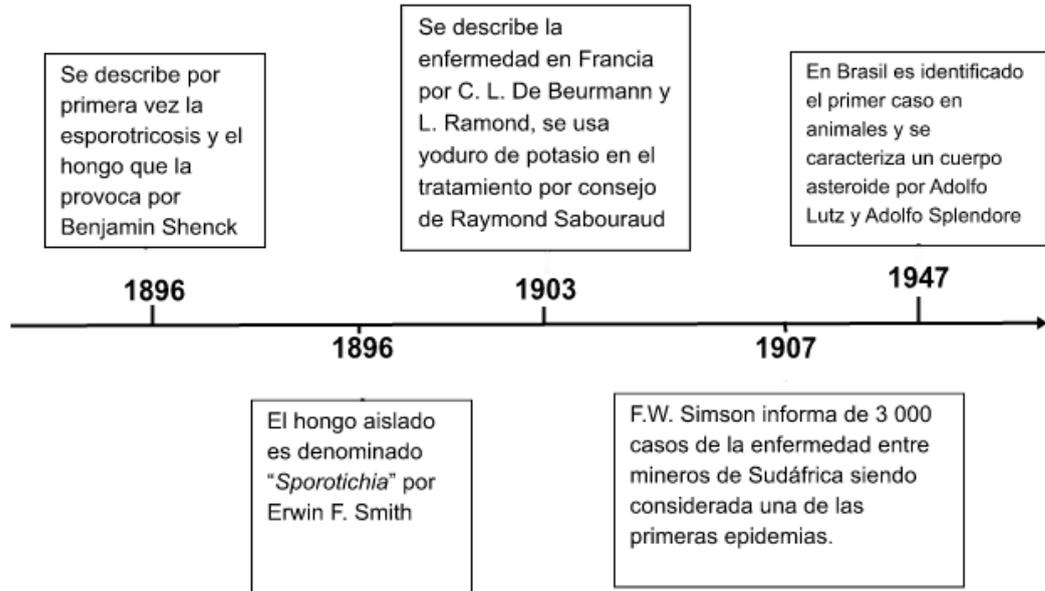


Figura 1. Primeros reportes de la esporotricosis a nivel mundial.

En México las primeras apariciones de la enfermedad fueron reportadas por Gayón y un año después fueron publicadas en la gaceta Médica de México. Se han publicado otros casos de estudio en el país como los mencionados en la Figura 2.

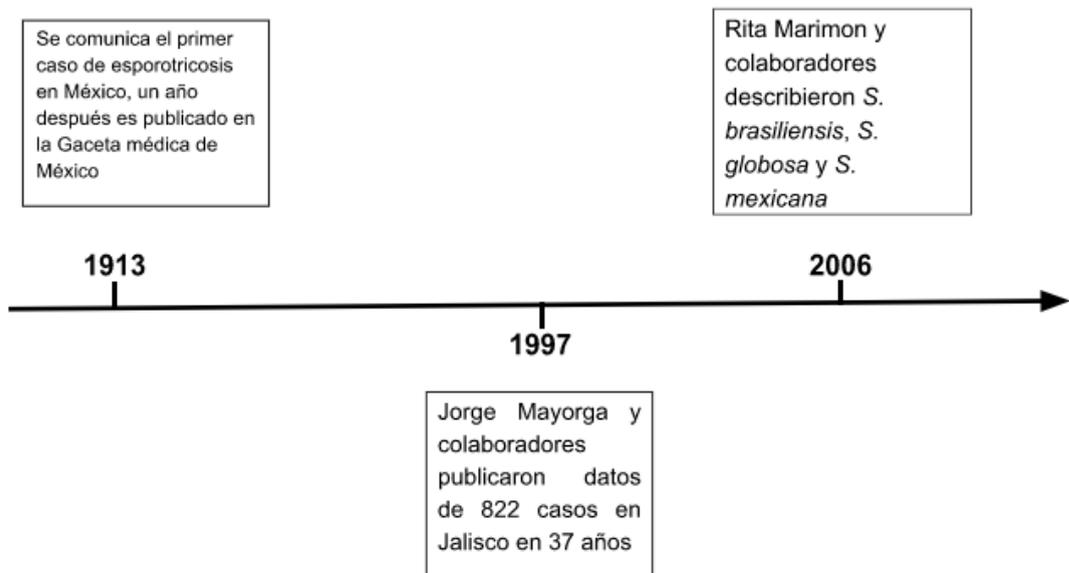


Figura 2. Reportes de la presencia de esporotricosis en México.

2.1.2 Epidemiología

La esporotricosis es una enfermedad que presenta distribución a nivel mundial, los principales países en los cuales se han reportado casos son aquellos que tienen un clima tropical y subtropical, con temperaturas que van de los 15 hasta los 25°C y una humedad alta (Gaviria-Giraldo et al., 2017).

Por lo general, se presenta como una enfermedad esporádica, y se tienen reportes de personas infectadas en todos los continentes; los países que reportan más casos de contagio son: Japón, Australia, Brasil, México, Colombia, Perú, Guatemala y Uruguay (Bonifaz, 2012).

La esporotricosis es una enfermedad ampliamente distribuida en México, teniendo registro de casos en todos los estados de la República. En la Figura 3, se presenta un mapa de los estados donde se ha reportado la presencia de esta enfermedad. Según los estudios de Bonifaz (2012), los estados de Nayarit, Jalisco, Hidalgo, Guanajuato, Tlaxcala, Ciudad de México y Puebla han sido identificados como áreas de alta prevalencia. Además, investigaciones realizadas por Arenas (2014) han ampliado esta lista incluyendo los estados de Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Estado de México y San Luis Potosí como zonas donde también se ha observado la presencia de esporotricosis.



Figura 3. Principales estados de México con la presencia de esporotricosis.

Los casos suelen presentarse principalmente en zonas de bajos recursos. Mayorga-Rodríguez, et al (2019) menciona que se realizó un estudio epidemiológico sobre la distribución de esporotricosis y *S. schenckii* en suelo y plantas en Huauchinango, Puebla. Encontraron 10 pacientes con esporotricosis, 3 de tipo fijo y 7 de tipo linfangítico.

2.1.3 Patogenia

Los brotes de infección se asocian principalmente a actividades en las cuales se está en contacto con plantas como jardinería y actividades forestales e incluso la minería (Murray, 2017). Se asocian a estas, el contacto con moho, rosales, madera podrida, astillas de árboles y otras plantas que pueden tener la presencia del hongo (Jawetz, 2011). La infección comúnmente se atribuye al pinchazo de materia orgánica como la antes mencionada la cual estaría contaminada por el hongo. También hay reportes de transmisión zoonótica, es decir, por medio de mordedura de animales contagiados con la enfermedad; se han reportado contagios principalmente de armadillos y gatos (Murray, 2017).

Los pacientes suelen mencionar un traumatismo durante actividades en las cuales tuvieron contacto con material contaminado o animales infectados y es durante esos traumatismos que conidios o fragmentos de hifas de *S. schenckii* son introducidos al cuerpo. Comúnmente las extremidades son las que presentan la lesión inicial (Jawetz, 2011).

Aunque la principal vía de ingreso de este agente patógeno es la cutánea a través de lesiones, se ha comprobado que en zonas de alta endemicidad el hongo puede entrar al organismo por la vía respiratoria y provocar casos de esporotricosis pulmonar (Bonifaz, 2012).

Una vez que el hongo ingresa en el paciente, empieza a afectar las capas profundas de la dermis, el tejido subcutáneo y el hueso (Murray, 2017). Regularmente de 10 a 15 días después del contagio en el sitio de entrada se localizan las primeras lesiones denominadas chancros esporotricósicos (Bonifaz, 2012).

Después de que aparecen las primeras lesiones, el paciente empieza a mostrar lesiones nodulares y ulceradas a lo largo de los vasos linfáticos que drenan el punto inicial del traumatismo (Murray, 2017). Uno de los cursos que puede tomar la enfermedad es una disminución de las lesiones y cura espontánea, sin embargo, el porcentaje de estos casos es muy bajo, por lo regular el hongo se irá extendiendo, dando lugar a placas verrugosas crónicas o lesiones gomosas, afectando como se dijo anteriormente, a los vasos linfáticos regionales (Bonifaz, 2012).

A menos que el paciente presente alguna condición que debilite o comprometa su sistema inmune, la diseminación a los huesos, sistema nervioso central u órganos internos como los pulmones es muy poco probable, por lo regular menos del 1% de los casos (Murray, 2017).

La mayor parte de los contagios se reportan a finales de otoño y principios de invierno, en México, esto puede deberse a varias razones: es el final de la temporada de lluvias, es cuando se alcanza la temperatura y la humedad óptimas para el crecimiento de hongos; también es cuando aumenta la exposición a las hortalizas y plantas, ya que es la temporada de cosecha y también es la temporada de mayor manipulación de flores, debido a las tradicionales celebraciones del día de muertos (Bonifaz, 2012).

2.1.4 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la esporotricosis son numerosas ya que el polimorfismo de la enfermedad produce variedad de síntomas y se han hecho diversas clasificaciones con base en la relación inmunológica (Tabla 1) que intentan explicar todos los casos de lesiones.

Tabla 1. Síntomas característicos de los diferentes tipos clínicos de la esporotricosis. (Bonifaz, 2012).

Tipo clínico	Descripción	Síntomas
Esporotricosis cutánea-linfática	Es la forma más frecuente de la enfermedad, se diagnostica del 46 al 97% de los casos.	Chancro esporotricósico, eritema, lesiones nodo-gomosas, cicatrices

		queloides.
Esporotricosis cutánea-fija	Aparece aproximadamente en 25% de los casos y no tiende a la diseminación, este tipo de lesiones son más comunes en áreas como México.	Chancro verrugoso, tuberculosis verrugosa, carcinoma espinocelular, impétigo.
Esporotricosis cutánea-superficial	Es la forma cutánea más rara, variante de la fija, se presenta casi siempre en la cara.	Dermatofitosis, micobacterias no tuberculosas, lesiones polimorfas (úlceras, pápulas, nódulos, placas).
Esporotricosis cutánea-hematógena	También llamada cutánea-diseminada, es una entidad rara aparentemente oportunista.	Tuberculosis, gomas sifilíticas, úlceras y placas verrugosas.
Esporotricosis pulmonar	Entidad rara, la mayor parte de los casos son primarios.	Neumonías, tuberculosis.

2.1.5 Tratamiento

Los tratamientos para esta enfermedad (Tabla 2) son principalmente el yoduro de potasio, el cual ha demostrado ser eficaz en la remisión de la enfermedad. De la familia de los azoles, el itraconazol es el medicamento más recetado para tratar los síntomas; a pesar de que existen varios tratamientos ninguno asegura un porcentaje de eficacia.

Uno de los medicamentos empleados en el tratamiento de la enfermedad es el fluconazol. Este antifúngico inhibe la síntesis de esteroides en la membrana de los hongos (Arenas, 2014) , por lo general, se recomienda en pacientes que no toleran el itraconazol, entre otros fármacos (Murray, 2017). Se ha utilizado para tratar la esporotricosis fija y linfocutánea con dosis de entre 150 mg una vez a la semana y 200 mg diarios (Mahajan, 2014).

Tabla 2: Medicamentos y dosis recomendadas para el tratamiento de esporotricosis

Medicamento	Dosis	Eficacia
Fluconazol	150 mg una vez a la semana 200 mg/día dependiendo el tamaño de la lesión	Tratamiento de segunda línea
Yoduro de potasio	Adultos: 3 a 6 g/día Niños: 1 a 3 g/día durante 3 meses	Solo es efectivo para las formas cutáneas
Itraconazol	200/300 g/día 4-6 meses	Fármaco de elección para la forma cutánea
Anfotericina B	Máximo 30 mg por día iniciando en 5 mg	Se recomienda su uso en lesiones extracutáneas o con forma sistémica
Terbinafina	250-500 mg/día 3-6 meses y continuar tratamiento 1 mes después de la curación clínica	Efectividad del 86%, descrita en pacientes que tienen contraindicado el itraconazol.
Hipertermia	15 a 20 minutos, tres veces al día	Aplicación de calor sobre la lesión, aproximadamente de 42-45°C, recomendado en embarazo y lactancia

2.2 TFDA

La TFDA es una técnica poco invasiva que utiliza productos químicos fotosensibles no tóxicos conocidos también como Fs, fuentes de luz y produce como resultado oxígeno molecular intracelular. Representa una alternativa a los tratamientos tradicionales para diversas enfermedades, como su uso para destruir tumores cancerosos, y para aplicaciones dermatológicas (Terra, 2018). Se han estudiado sus efectos antibacterianos y también se utiliza en el campo agrícola como insecticida y herbicida (Gallegos 2015).

El mecanismo de la TFDA implica la absorción de fotones por fotosensibilizadores excitados al estado de triplete. En este estado, el Fs transfiere energía a las biomoléculas circundantes, lo que lleva a la formación de radicales libres y aniones radicales tanto en el Fs como en el sustrato. Los electrones interactúan con las moléculas de oxígeno, lo que provoca la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que resultan tóxicas para los microorganismos patógenos (Kwiatkowski et al. 2018).

2.2.1 Fs

Las moléculas que absorben la radiación electromagnética en longitudes de onda desde el visible hasta el infrarrojo cercano (400-1100 nm) se denominan Fs y, en presencia de oxígeno molecular, catalizan diferentes tipos de reacciones en los sistemas biológicos como las especies reactivas de oxígeno y respuestas bioquímicas que provocan muerte celular.

Las características principales que debe presentar una sustancia fotosensibilizadora para ser utilizado en la TFDA son (Gallegos, 2015):

- Estabilidad química y fotoestabilidad.
- Ser hidrosoluble.
- Alta capacidad para generar oxígeno singulete.
- Coeficiente de absorción en longitudes de onda de 600-850 nm, en la región de luz roja.
- Acumulación en organelos diferentes al núcleo.
- No presentar efectos mutagénicos antes y después de ser irradiados.
- Eliminación rápida por fotodegradación, metabolización y excreción.

El daño celular causado por la TFDA involucra sitios específicos en la célula o los orgánulos donde se introduce el Fs. El daño celular ocurre debido a la acción del oxígeno singulete producido por la sustancia fotosensible después de la irradiación.

2.2.1.1 AM

El AM es un compuesto químico que pertenece a la familia de las fenotiazinas, es un compuesto básico que se disuelve en agua.

AM es capaz de absorber la luz en el rango de 600-700 nm. Esa energía absorbida puede ser transferida eficientemente a otras moléculas cercanas, lo que resulta en la generación de ERO y citotoxicidad cuando se aplica luz, lo que lo convierte en un Fs. Los derivados del AM se han desarrollado para mejorar su eficacia y localización celular (Wainwright, 2013).

El AM se ha utilizado ampliamente para teñir organismos y para tratar la metahemoglobinemia, y recientemente se ha considerado como un Fs para la TFDA, debido a que ha demostrado capacidad para tratar una amplia gama de afecciones producidas por microorganismos patógenos, con baja toxicidad y pocos efectos secundarios.

2.2.1.2 Cur

La Cur es un compuesto polifenólico que se encuentra en la cúrcuma, una especia ampliamente utilizada en la medicina tradicional. Además de su uso en la cocina, la Cur ha demostrado ser un agente prometedor en el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer. Recientemente ha sido objeto de investigación como fotosensibilizador en la TFDA (Chen, 2019).

2.2.2 Mecanismos de acción TFDA

Se necesita de los siguientes elementos para que la TFDA se pueda llevar a cabo:

1. Fs
2. Luz
3. Oxígeno

La interacción energética de estos tres elementos básicos de la fototerapia se detalla en el diagrama de Jablonsky (Figura 4), por lo que comenzamos observando el dispositivo fotosensible en su estado electrónico basal, que es una unidad de excitación de corta duración. Los fotorreceptores excitados pueden volver a su estado base emitiendo energía absorbida en forma de fluorescencia o por transducción interna (Gallegos 2015).

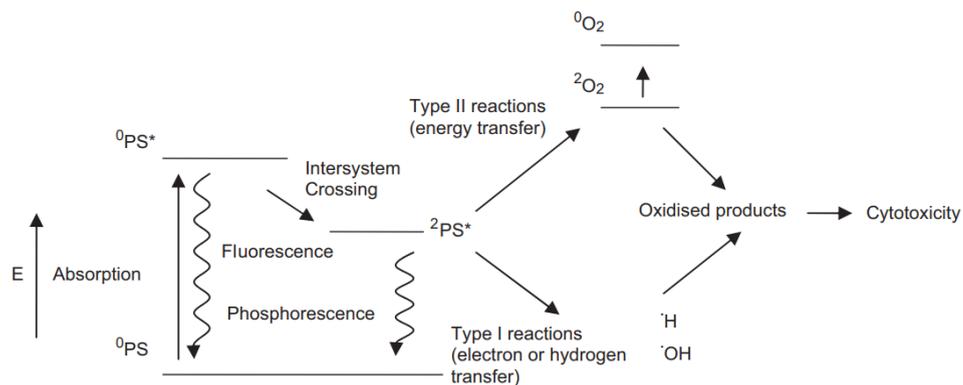


Figura 4. Diagrama de Jablonsky. Obtenida de Donnelly 2007.

El mecanismo de acción de la TFD consiste en la absorción de la energía fotónica de la luz visible de la longitud de onda apropiada a través de su interacción con las moléculas de Fs en los tejidos, provocando excitación y un cambio en el nivel de energía (Liang et al., 2016).

Los Fs pueden pasar al primer estado excitado triplete a través de un proceso conocido como cruzamiento intersistema, a eso se le conoce como spin forbidden o transición prohibida, y existen Fs que obtienen un alto rendimiento en el estado triplete (T^*), el estado T^* tiene una vida lo suficientemente larga como para participar en reacciones químicas. El material fotosensible en su estado triplete también puede volver al estado fundamental produciendo fosforescencia mediante la emisión de un fotón (Gallegos, 2015).

Posterior a todo el proceso de activación de los Fs empieza el proceso de degradado conocido como fotoblanqueamiento.

2.3 Estado del arte

En los estudios de TFDA, se ha investigado el uso de diversos Fs, principalmente se ha utilizado el AM, como se evidencia en los experimentos in vitro realizados por Mario Nunes (2014) utilizando *S. schenckii* filamentoso. Por su parte, Guirado (2017) empleó el mismo fotosensibilizador para la variante sensu stricto. En el estudio de Gilaberte et al. (2014), se utilizaron varios tipos de AM, incluyendo azul de metileno nuevo y 1,9 dimetileno azul contra levaduras de *S. schenckii*. Otros Fs utilizados son el ácido 5-aminolevulínico (ALA), utilizado por Cheng (2020) contra *S. schenckii* globosa, y el ácido metilaminolevulínico (MAL), reportado por Gilaberte

(2014); Sin embargo, no se obtuvieron reducciones significativas de las lesiones con este último.

En un caso de estudio se reporta la utilidad de las pruebas de fotosensibilidad in vitro para elegir el fotosensibilizador más eficaz para cada paciente, de la misma manera como los antibiogramas seleccionan el antibiótico más eficaz para cada aislado bacteriano (Gilaberte, y otros, 2014).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En esta sección se mencionan los procedimientos realizados para el cultivo del hongo *S. schenckii* de manera *in vitro*, la técnica utilizada para determinar la presencia de Fs dentro de los microorganismos y los pasos para conseguir la concentración celular óptima para realizar la TFDA; también se menciona el procedimiento realizado para la aplicación de TFDA con diferentes Fs. Todos los procedimientos aquí mencionados se llevaron a cabo en el laboratorio de Terapia Fotodinámica del Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE).

3.1 Material biológico

Para los experimentos realizados en el laboratorio se trabajó con las siguientes cepas de *S. schenckii*: 179 (paciente), R-03-8 (mascota) y 528 (naturaleza), obtenidas del Laboratorio de Micología Médica del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP-BUAP).

El hongo se cultivó en agar Sabouraud durante 10 días y posteriormente se resembró en 7 mL de caldo de infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) a una temperatura de 37°C en agitación por 3 días.

3.2 Medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo acorde a las indicaciones del fabricante, se agregaron antibióticos al medio especificado. Todo lo anterior siguiendo el protocolo interno del laboratorio.

Caldo BHI + cloranfenicol

- Se suspendieron 37 g de polvo BHI (MCD LAB Edo. de México; Sigma-Aldrich, St. Louis) en 1 litro de agua destilada.
- Se agitó constantemente hasta que los polvos estuvieran disueltos.
- Se vertió en tubos falcón de 15 mL y se tapó.
- Se esterilizó a 118°C por 15 minutos y se dejó enfriar.
- Se agregó cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis)(50 mg/L).

Agar Sabouraud

- Se suspendieron 36 g de polvo agar Sabouraud (MCD LAB Edo. de México) en 1 litro de agua destilada y se mezcló.
- Se esterilizó a 118°C por 15 minutos.
- Se agregó cloranfenicol (50 mg/L) cuando el medio estaba tibio.
- Se vertió en placas petri de 60 mm.

3.3 Fs

Los Fs usados en los experimentos se prepararon siguiendo el protocolo interno del laboratorio.

3.3.1 AM

Para conocer la cantidad de AM necesario para un stock de 200 µM, se siguió la siguiente fórmula:

$$m = CMV = (200 \mu\text{mol/l}) \times (383,9 \text{ g/mol}) \times (0,1\text{l}) = 7478\mu\text{g} = 7,47\text{mg}$$

donde m es la masa en gramos (g), M es la masa molar (g/mol), y V es el volumen en litros (l), dando como resultado la concentración C en las unidades mol/l.

Procedimiento:

- Se pesaron 7.47 mg de AM y se aforaron a 100 ml de PBS.
- Se filtró con una jeringa en un frasco estéril y se protegió el frasco con papel aluminio para evitar la interacción del colorante con la luz.
- Se obtuvo un stock de 200 µM a partir del cual se tomó una muestra de 2 ml, la cual fue diluida en 8 ml de PBS para obtener una solución de 40 µM. Esta solución se utilizó en una proporción de 1:1 en los experimentos, logrando así una concentración final de 20 µM.

3.3.2 Cur

Se desea obtener una concentración de 800 μM en 6 ml de DMSO puro. La Cur utilizada tiene una masa molar de 368.38 g/mol, entonces se obtiene de la siguiente manera:

$$V = CM \quad V = (800 \mu\text{mol/l}) \times (368.38 \text{ g/mol}) \times (0,006 \text{ l}) = 1,768.22 \mu\text{g} = 1.768 \text{ mg}$$

donde m es la masa en gramos (g), M es la masa molar (g/mol), y V es el volumen en litros (l), dando como resultado la concentración C en las unidades mol/l.

Procedimiento:

- Se pesaron 1.78 mg de Cur.
- Se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) puro.
- El DMSO puro es un solvente altamente citotóxico que no requiere filtrado.
- Las diluciones se realizan a no mayor al 5% final de DMSO en agua estéril.
- Las diluciones se realizaron sin exceder el 5% final de DMSO en agua estéril.

3.4 Fluconazol

Se preparó una solución del antimicótico, la cual fue adicionada al agar Sabouraud.

Procedimiento:

- Se pesaron 9 mg de fluconazol (Afungil, Laboratorios Senosiain).
- Se disolvió en 10 ml de agua estéril.
- Se filtró con una jeringa en un frasco estéril.
- Se agregó 2 ml de la solución preparada a 70 ml de agar Sabouraud cuando el medio estaba tibio.

3.5 Optimización de la TFDA

3.5.1 Pruebas de evaluación de la concentración intracelular del Fs

Para identificar la cantidad de Fs absorbido por los hongos, se realizó una incubación con Fs en tubos eppendorf colocando medio BHI usando los Fs AM a 20

μM y Cur a $20 \mu\text{M}$ a una relación 1:1 y se puso a incubar en oscuridad durante 30 min y 1h.

Después de la incubación los hongos se lavaron 2 veces centrifugando con PBS a 9000 rpm durante 6 min. Se agregó agua inyectable para romper las células y se hizo lectura de densidad óptica (iMark™ Microplate Absorbance Reader) para determinar la concentración intracelular de los Fs.

3.5.2 Determinación de dosis para la TFDA

Una vez establecido el tiempo óptimo de incubación, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad celular evaluadas mediante la D.O., con el propósito de determinar si las dosis de $20 \mu\text{M}/60 \text{ J}/\text{cm}^2$ de AM y $20 \mu\text{M}/20 \text{ J}/\text{cm}^2$ de Cur resultan adecuadas para la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Después de irradiar las placas, se midió la D.O. a las 24 horas para determinar el grado de inhibición del crecimiento en los hongos.

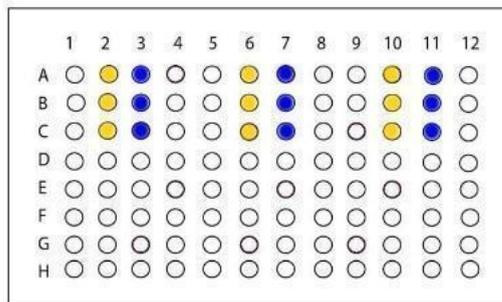
3.5.3 Condiciones experimentales

Para llevar a cabo los experimentos de viabilidad empleando D.O., se establecieron tres grupos de control y un grupo para la TFDA:

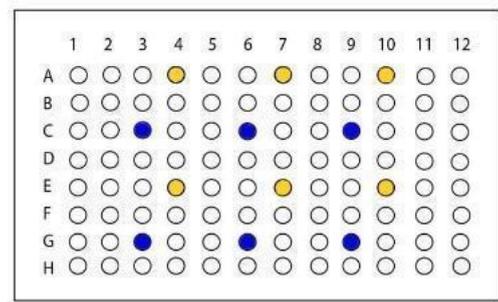
- **Control** (L-, Fs-): Este grupo no fue irradiado con luz (L) ni tuvo Fs.
- **Control de toxicidad (C. Tox.)** (L-, Fs+): Este grupo tuvo Fs, pero no fue irradiado con luz.
- **Control de luz (C. luz.)**(L+, Fs-): Este grupo recibió irradiación de luz, pero no tenía Fs.
- **Tratamiento (TFDA)**(L+, Fs+): Este fue el grupo que recibió el tratamiento de TFDA, teniendo Fs y luz.

Cada grupo control fue colocado en microplacas de 96 pozos siguiendo la distribución descrita en la figura 5, el arreglo de placa A) se mantuvo en total oscuridad, en el arreglo B), la imagen muestra la distribución del C. Luz y TFDA, la cual fue acorde al dispositivo de luz LED utilizado.

A)



B)



TFDA (resaltado en azul) control L+F-. La distribución en los pozos se debe a los dispositivos usados en laboratorio.

3.5.3.1 Condiciones experimentales con fluconazol

La viabilidad celular de TFDA con y sin fluconazol, fué evaluada mediante unidades formadoras de colonias (UFC), a los grupos control anteriores se agregaron dos más, los cuales incluyen el antimicótico fluconazol:

- **TFDA+ Fluconazol (TFDA+F)** (L+, Fs+, Fluc+): este grupo no será irradiado con luz ni tendrá fotosensibilizador.
- **Fluconazol (Fluc)** (L-, Fs-, Fluc+): este grupo si posee fotosensibilizador, pero tampoco está irradiado con luz

Esto se hizo con el propósito de evaluar la eficacia de la terapia combinada de TFDA y fluconazol, así como el comportamiento de los microorganismos frente al uso exclusivo del antimicótico.

3.5.4 Metodología de la TFDA

Con base en diversas pruebas realizadas en laboratorio se ha establecido el siguiente proceso de TFDA (figura 6): los hongos se dejaron crecer en medio agar SDA por 10 días a 30°C, posteriormente se recolectaron esporas colocando 1 ml de PBS a la placa con el hongo, y se hizo un raspado suave con un asa, esto para que los microorganismos queden suspendidos en el líquido, posteriormente esta suspensión fue agregada a 6 ml de BHI líquido, esto se dejó en una incubadora de agitación por 3 días a 37°C.

Para la TFDA se tomaron 100 µL de medio con hongos y se añadió 100 µL del Fs a una concentración de 20 µM esto para mantener una relación 1:1 dejando el tiempo necesario para que sea absorbido; después las muestras se colocaron en

microplacas de 96 pozos y se irradiaron con 20 J/cm² de luz azul a 460 nm para la Cur y 60 J/cm² de luz roja a 650 nm para los experimentos con AM utilizando un dispositivo de focos LED, todos los experimentos fueron realizados en condiciones experimentales dos veces por triplicado y utilizando los grupos control mencionados anteriormente. La eficiencia de la TFDA se evaluó por conteo de UFC.

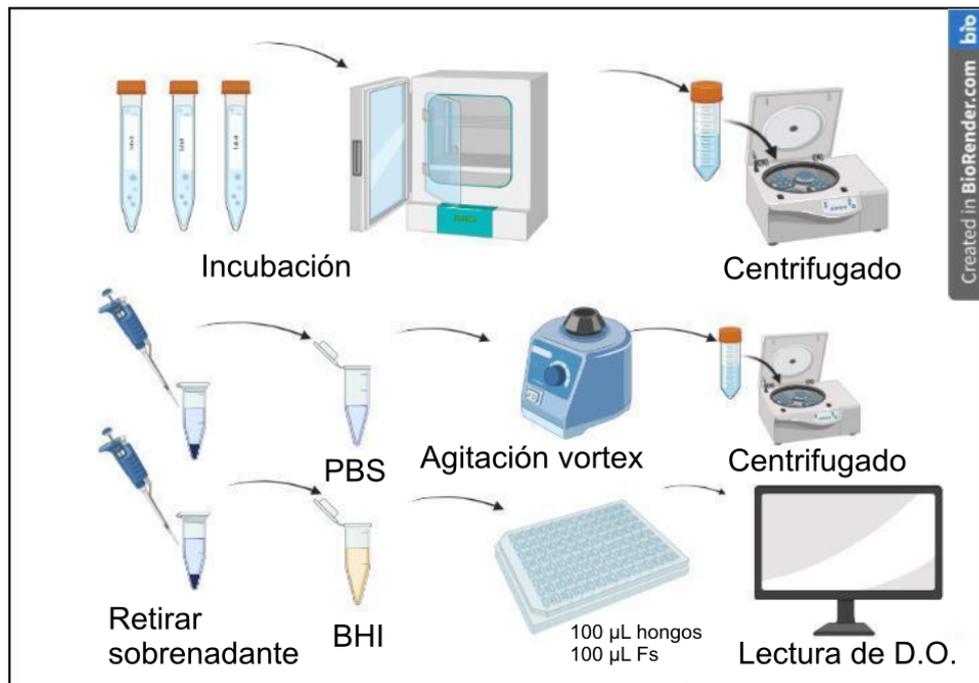


Figura 6. Proceso de la TFDA

3.5.5 Análisis Estadístico

Todas las pruebas se realizaron en condiciones de esterilidad dos veces por triplicado y el análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía y la comparación de medias de Tukey $p < 0.05$ con el Software OriginPro.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos al realizar las pruebas de concentración intracelular las cuales nos ayudaron a determinar la presencia del Fs dentro de las células, y los experimentos de TFDA evaluados con D.O. la que nos permite identificar el nivel de biomasa en los experimentos y UFC la cual es una de las técnicas más utilizada para la determinación de supervivencia celular posterior a la TFDA.

4.1 Concentración intracelular de AM y Cur

La presencia intracelular de los Fs se confirmó al realizar el proceso de lisado de las células de *S. schenckii* en todos los casos estudiados.

Las siguientes gráficas presentan la comparación entre un control el cual no tuvo una interacción con Fs y las incubaciones a los 30 min y 1 h con Fs.

4.1.1 Concentración intracelular AM

En estas pruebas se la incubación se realizó con 20 μM de AM, en la tabla 3 se muestra la relación de los valores de $p < 0.05$ correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 3: Valores p de las cepas estudiadas.

Cepa	P -value
179	4.04×10^{-5}
R-03-8	2.11×10^{-2}
528	8.33×10^{-3}

La cepa 179 (figura 7) notó una acumulación del 41% de AM con respecto al control el cual no tiene interacción con el Fs, en la incubación de 30 min se mantuvo un porcentaje similar del 40%, ambos tiempos mostraron diferencia significativa con respecto al control en cuanto a la presencia de Fs.

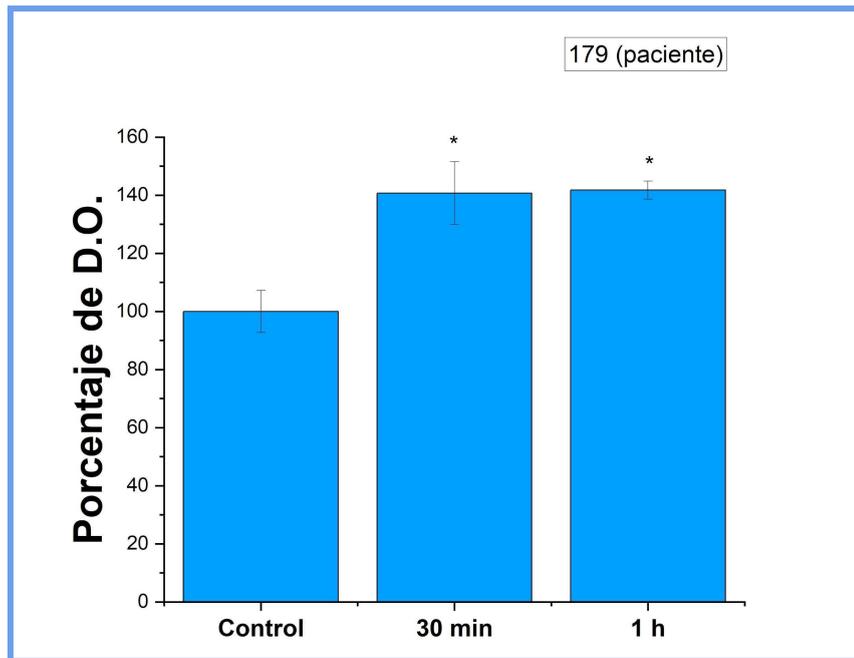


Figura 7 Concentración intracelular en la cepa 179 con 20 μ M de AM, *diferencia significativa con respecto al control.

La cepa R-03-8 (figura 8) es la que presentó la menor acumulación de Fs de las 3 cepas evaluadas, a los 30 min tuvo un acumulación de 5% y 1 h después fue del 11% con respecto al control sin interacción con el FS, en este caso aunque se pudo observar una pequeña acumulación intracelular del Fs, no se mostró una diferencia significativa con respecto al control.

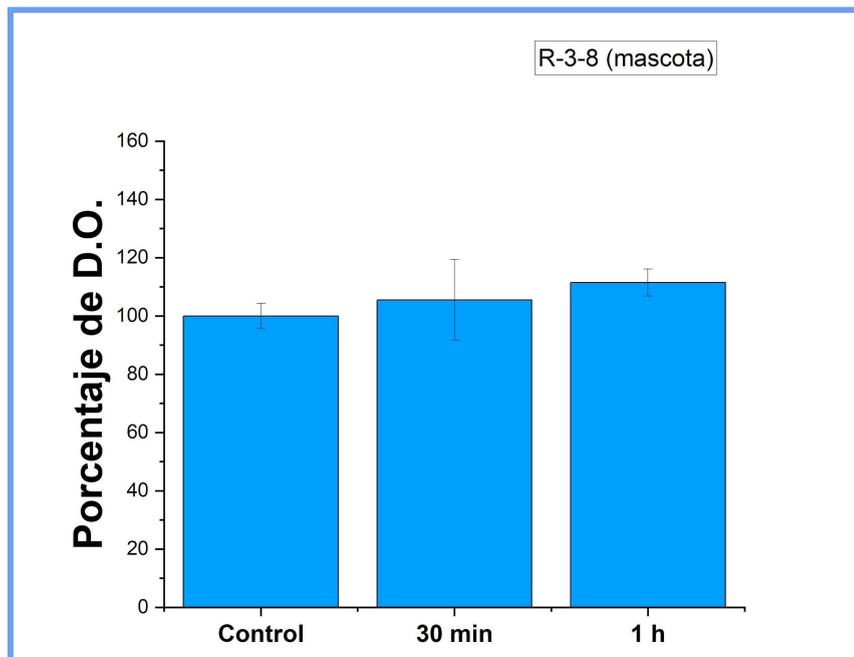


Figura 8 Concentración intracelular en la cepa R-03-8 con 20 μ M de AM.

La cepa 528 (figura 9) presentó una acumulación de Fs del 21% en la incubación de 30 min y se mantuvo un porcentaje similar en 1 h siendo este del 24%, ambos tiempos mostraron diferencia significativa con respecto al control en cuanto a la presencia de Fs.

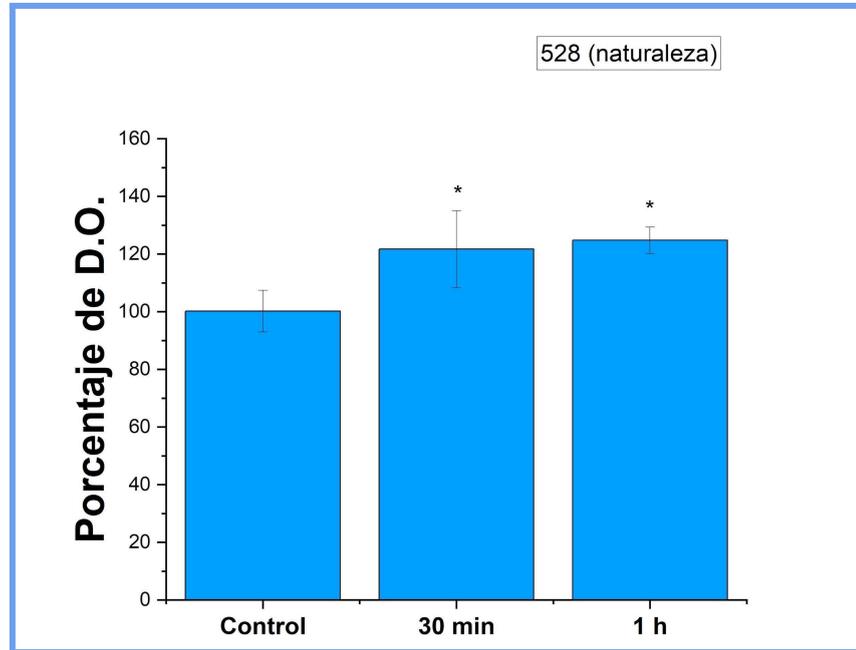


Figura 9 Concentración intracelular en la cepa 528 con 20 μM de AM, *diferencia significativa con respecto al control.

4.1.1 Concentración intracelular de Cur

Para estas pruebas se hicieron incubaciones con 20 μM de Cur, en la tabla 4 se muestra la relación de los valores de $p < 0.05$ correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 4: Valores p de las cepas estudiadas.

Cepa	P-value
179	3.91×10^{-2}
R-03-8	4.40×10^{-5}
528	1.53×10^{-2}

La cepa 179 (figura 10) presentó una acumulación del 26% de Cur con respecto al control el cual no tiene interacción con el Fs a 1 h, en la incubación de

30 min el porcentaje de Fs fue del 12%, ambos tiempos mostraron diferencia significativa con respecto al control en cuanto a la presencia de Fs.

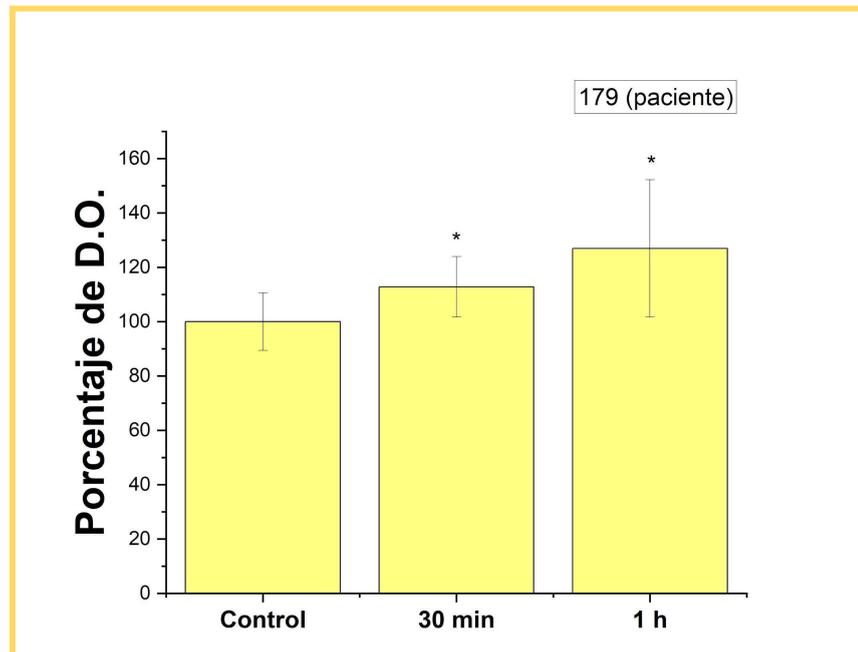


Figura 10 Concentración intracelular en la cepa 179 con 20 μ M de Cur, *diferencia significativa con respecto al control.

En la cepa R-03-8 (figura 11), podemos observar que a los 30 min tuvo un incremento de 26% y 1 h después fue 35% con respecto al control el cual no tiene interacción con el Fs, encontrando así una diferencia significativa en cuanto a la presencia de Fs en comparación al control.

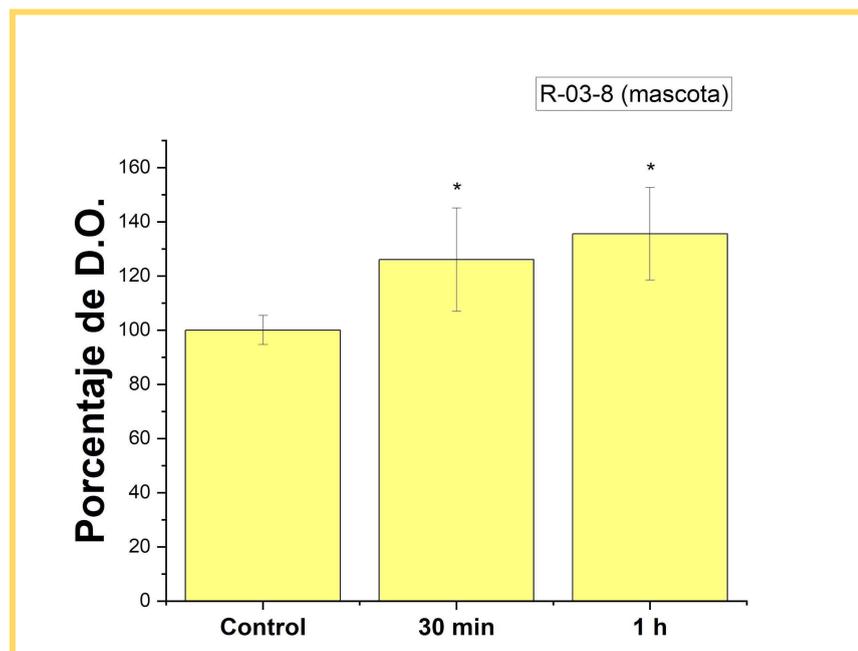


Figura 11 Concentración intracelular en la cepa R-03-8 con 20 μ M de Cur, *diferencia significativa con respecto al control.

La cepa 528 (figura 12) presentó menor acumulación en la incubación de 30 min siendo de 4% y el porcentaje aumenta a 1 h siendo este del 27%, la incubación de 1 h presenta diferencia significativa con respecto al control el cual no tiene interacción con el Fs y a los 30 min en cuanto a la presencia de Fs.

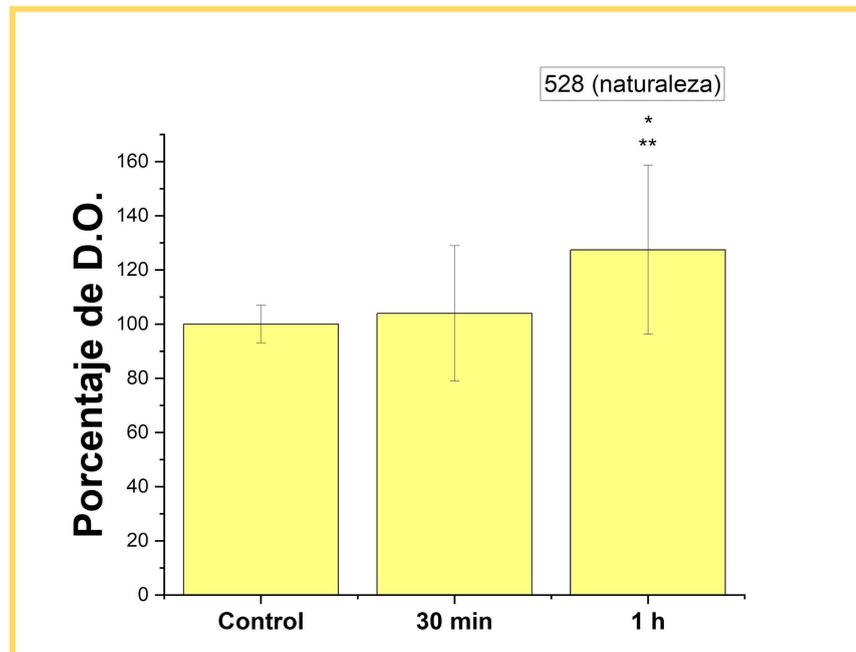


Figura 12 Concentración intracelular en la cepa 528 con 20 μ M de Cur, *diferencia significativa con respecto al control, **diferencia significativa respecto a los 30 min.

Los resultados obtenidos nos permiten seleccionar 1 h de incubación, tanto de AM como de Cur como el mejor tiempo para garantizar una internalización del Fs en las 3 especies de *Sporothrix* evaluadas.

4.2 Eficiencia de la TFDA

A partir de los resultados anteriores, se determinó que el tiempo óptimo de incubación es de 1 h. Posteriormente, se hicieron pruebas de D.O. para determinar cuál es la concentración y la dosis de luz adecuada para la inhibición del crecimiento del microorganismo.

4.2.1 Resultados de concentración celular evaluados por D.O. para AM-TFDA

La TFDA aplicada a estos casos fue de 20 μM de AM, y se aplicó una dosis de luz de 60 J/cm^2 , a pesar de que en algunos casos como en la cepa 179 que presentó un inhibición de 3% y 528 que tuvo una inhibición de 24% los cuales no representaron una diferencia significativa, la prueba de D.O. no permitió observar una disminución en la concentración celular que presenta una diferencia significativa lo que nos indica que el método no es del todo concluyente, dado que algunos casos no mostraron los efectos esperados.

En la tabla 5 se muestra la relación de los valores de $p < 0.05$ correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 5: Valores p de las cepas estudiadas.

<i>Cepa</i>	<i>P-value</i>
179	3.82×10^{-3}
R-03-8	1.34×10^{-4}
528	1.90×10^{-3}

Los resultados de la TFDA en la cepa 179 (figura 16) muestran una disminución en la inhibición del 3% la cual no representa una diferencia significativa con respecto al control.

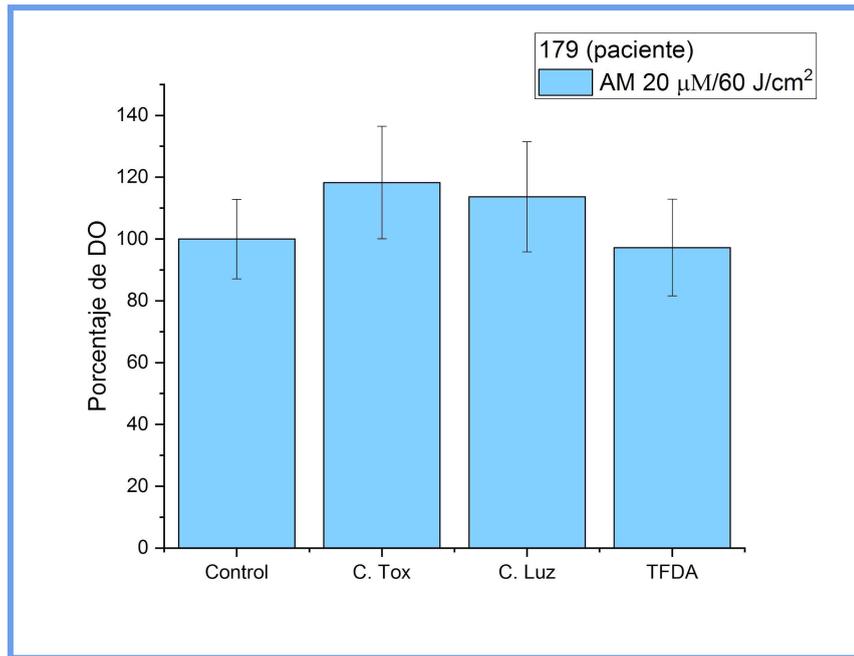


Figura 16 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 179, después de 24 h de aplicada la TFDA con AM a 20 μM , y una dosis de luz de 60 J/cm^2 evaluada por D.O.

Los resultados de la TFDA en la cepa R-03-8 (figura 17) nos muestran una disminución en la viabilidad de las células del 38% en la dosis evaluada, mostrando una diferencia significativa con respecto al grupo control.

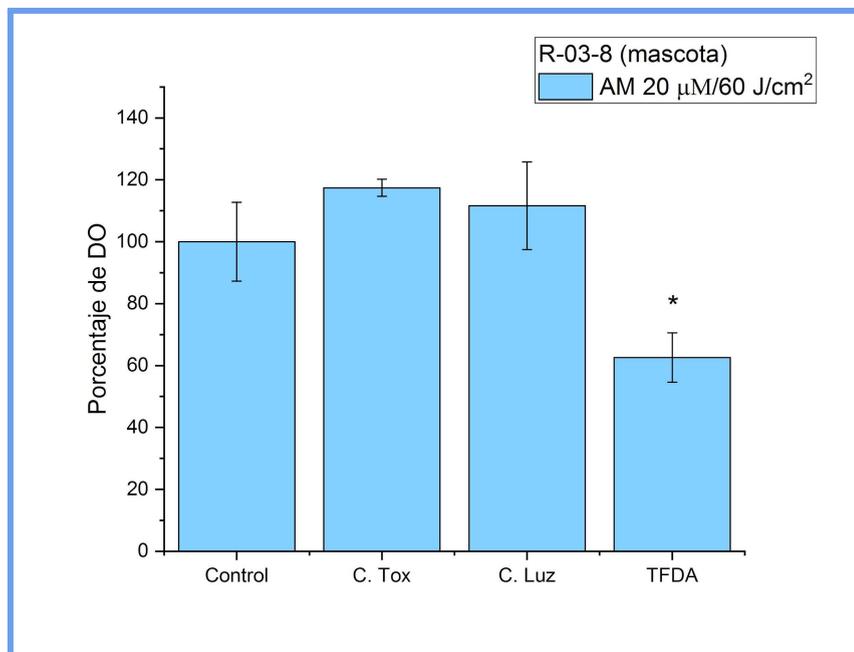


Figura 17 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa R-03-8, después de 24 h de aplicada la TFDA con AM a 20 μM , y una dosis de luz de 60 J/cm^2 evaluada por D.O.

Los resultados de la TFDA en la cepa 528 (figura 18) nos muestran una disminución en la viabilidad de las células del 24% en la dosis evaluada, a pesar de presentarse una disminución con respecto al control esta no representa una diferencia significativa.

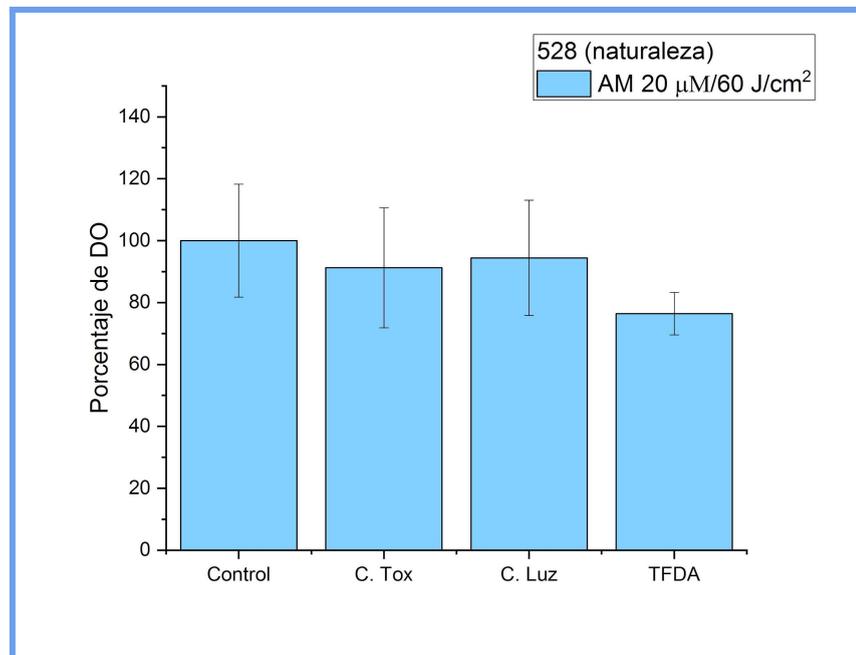


Figura 18 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 528, después de 24 h de aplicada la TFDA con AM a 20 μ M, y una dosis de luz de 60 J/cm^2 evaluada por D.O.

De las tres cepas evaluadas con D.O. únicamente la cepa R-03-8 mostró una diferencia significativa respecto al control cuando fue tratada con TFDA (figura 17), sin embargo, los resultados no son concluyentes y debido a esto se tomó la decisión de monitorear el comportamiento de los microorganismos por UFC.

4.2.2 Resultados de viabilidad evaluados por D.O. para Cur-TFDA

La TFDA aplicada a estos casos fue de 20 μ M de AM, y se aplicó una dosis de luz de 20 J/cm^2 . En la tabla 6 se muestra la relación de los valores de $p < 0.05$ correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 6: Valores p de las cepas estudiadas.

Cepa	P -value
179	3.82×10^{-3}

R-03-8	1.34×10^{-4}
528	3.65×10^{-3}

Los resultados de la TFDA en la cepa 179 (figura 13) mostraron una disminución en la viabilidad de las células del 11% utilizando 20 μM de Cur /20 J/cm^2 , la cual no presenta diferencia significativa con respecto al control.

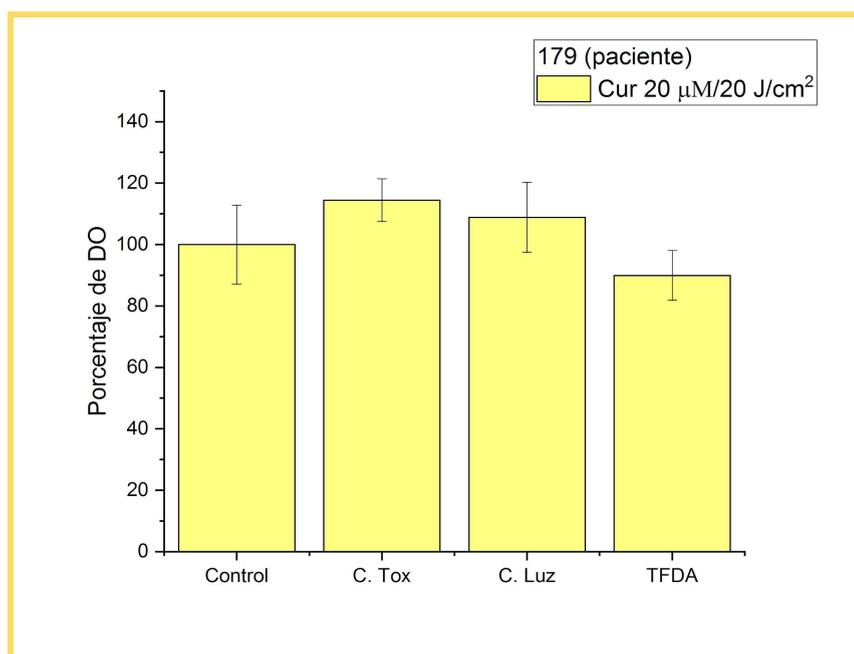


Figura 13 Evaluación de D.O. de viabilidad de *S. schenckii* cepa 179, después de 24 h de aplicada la TFDA con Cur a 20 μM , y una dosis de luz de 20 J/cm^2 .

Los resultados de la TFDA en la cepa R-03-8 (figura 14) mostraron una disminución en la viabilidad de las células del 5% utilizando 20 $\mu\text{M}/20 \text{ J}/\text{cm}^2$ de Cur, en esta cepa tampoco podemos observar diferencia significativa en TFDA con respecto al control.

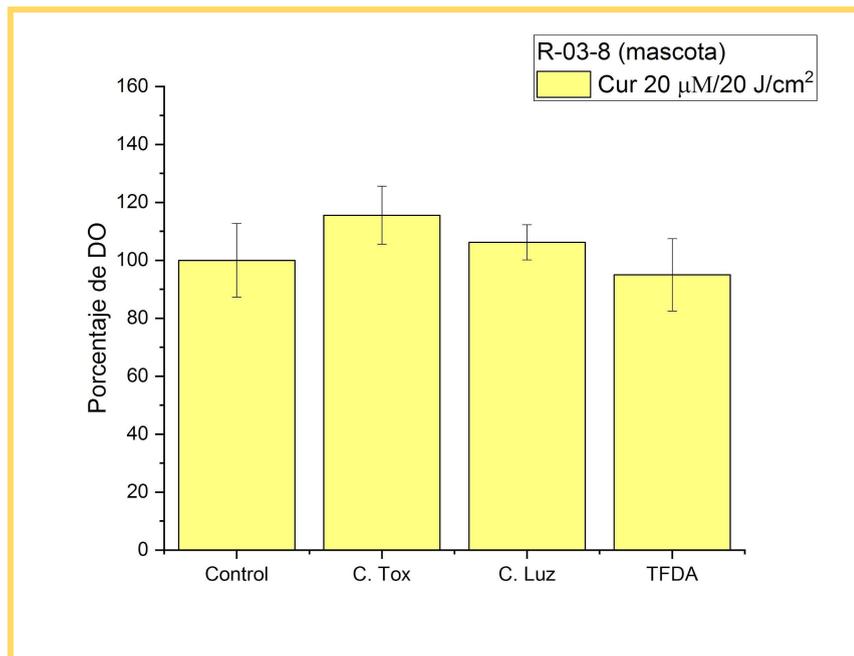


Figura 14 Evaluación de D.O. de viabilidad de *S. schenckii* cepa R-03-8, después de 24 h de aplicada la TFDA con Cur a 20 μM , y una dosis de luz de 20 J/cm^2 .

Los resultados de la TFDA en la cepa 528 (figura 15) se puede observar una disminución en la viabilidad de las células del 13% utilizando Cur 20 $\mu\text{M}/20 \text{ J}/\text{cm}^2$, al igual que en las gráficas anteriores no se presenta diferencia significativa en la columna de TFDA con respecto al control.

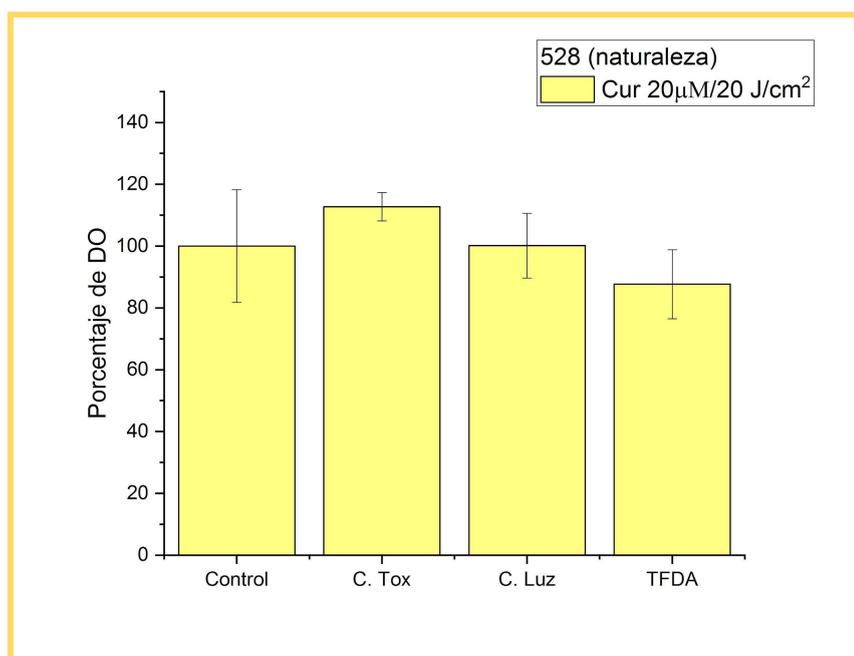


Figura 15 Evaluación de D.O. de viabilidad de *S. schenckii* cepa R-03-8, después de 24 h de aplicada la TFDA con Cur a 20 μM , y una dosis de luz de 20 J/cm^2 .

4.2.3 Tratamientos combinados TFDA y fluconazol

De los experimentos realizados con TFDA con y sin fluconazol, se observó la eficiencia de la TFDA con AM y con Cur, las cuales ocasionaron una disminución importante de UFC en todas las cepas evaluadas. Además, se observó la resistencia de todas las cepas al tratamiento con fluconazol y en la terapia combinada TFDA+F se observó un ligero incremento en la inhibición de UFC en varios casos, aun cuando no representó una diferencia significativa con respecto a la TFDA sola.

4.2.3.1 Viabilidad de *S. schenckii* tras la aplicación de AM-TFDA con y sin fluconazol

La TFDA aplicada a estos casos fue de 20 μ M de AM, y se aplicó una dosis de luz de 60 J/cm², en la tabla 7 se muestra la relación de los valores de $p < 0.05$ correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 7: Valores p de las cepas estudiadas.

<i>Cepa</i>	<i>P-value</i>
179	9.98×10^{-10}
R-03-8	2.37×10^{-4}
528	7.34×10^{-9}

Los resultados obtenidos para la cepa 179 (figura 19) mostraron una inhibición en el crecimiento in vitro de 53% en la TFDA y el 65% en la terapia combinada de TFDA con fluconazol, mostrando una ligera mejoría en la inhibición en este caso la cual no representa una diferencia significativa respecto a TFDA.

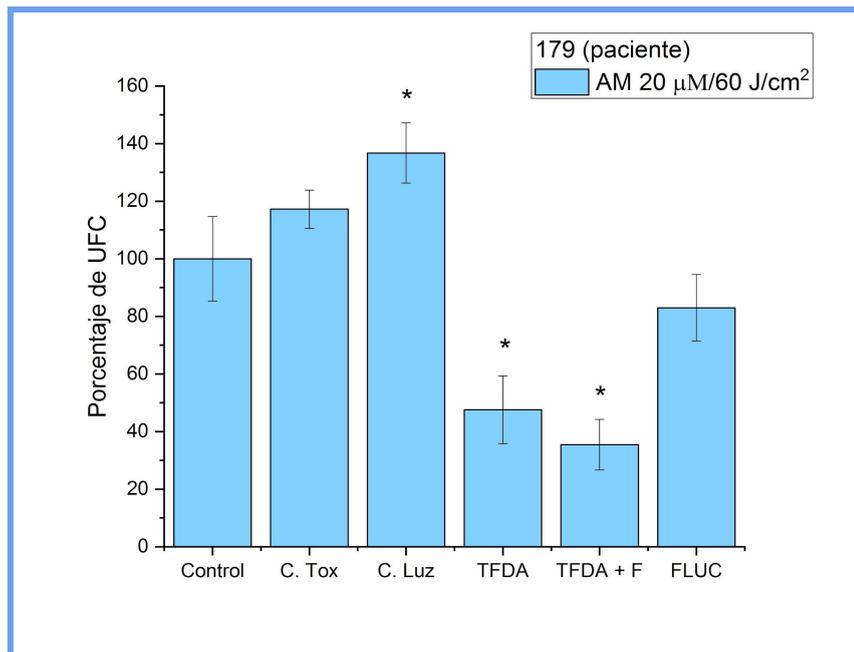


Figura 19 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 179, aplicando AM-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

Los resultados obtenidos para la cepa R-03-8 (figura 20) muestran una inhibición en el conteo de UFC del 42% en la TFDA y el 36% en la terapia combinada de TFDA con Fluconazol, en este caso la TFDA mostró una inhibición ligeramente menor que TFDA+F, sin embargo, al igual que con la cepa 179 no hay diferencia significativa entre estos dos grupos.

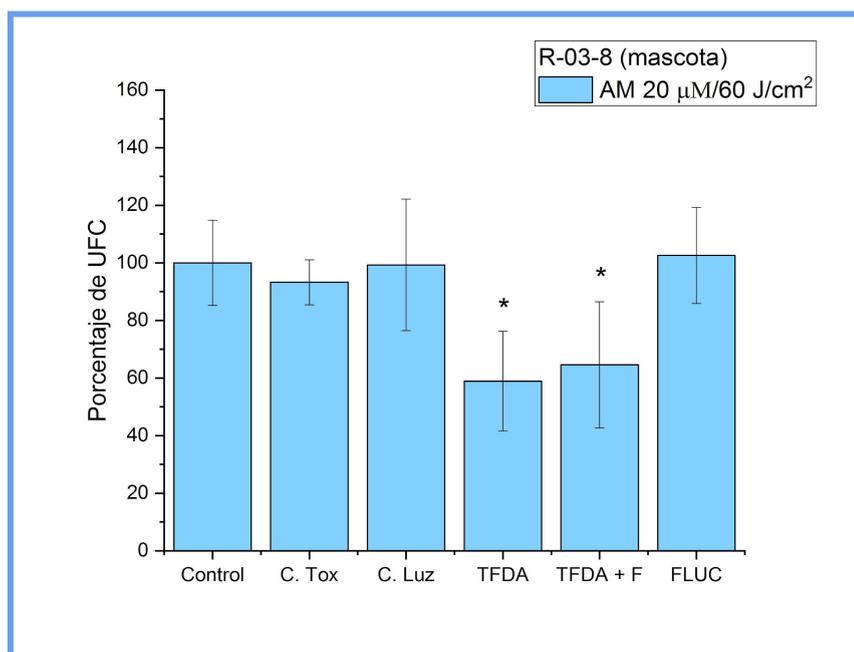


Figura 20 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa R-03-8, aplicando AM-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

Los resultados obtenidos para la cepa 528 (figura 21) muestran una inhibición en el en el conteo de UFC de 69% en la TFDA y el 73% en la terapia combinada de TFDA con Fluconazol, de la misma manera que con las otras dos cepas, no hubo diferencia significativa respecto a TFDA, en esta cepa el C. Luz también presentó una disminución de 40% la cual es significativa respecto al control.

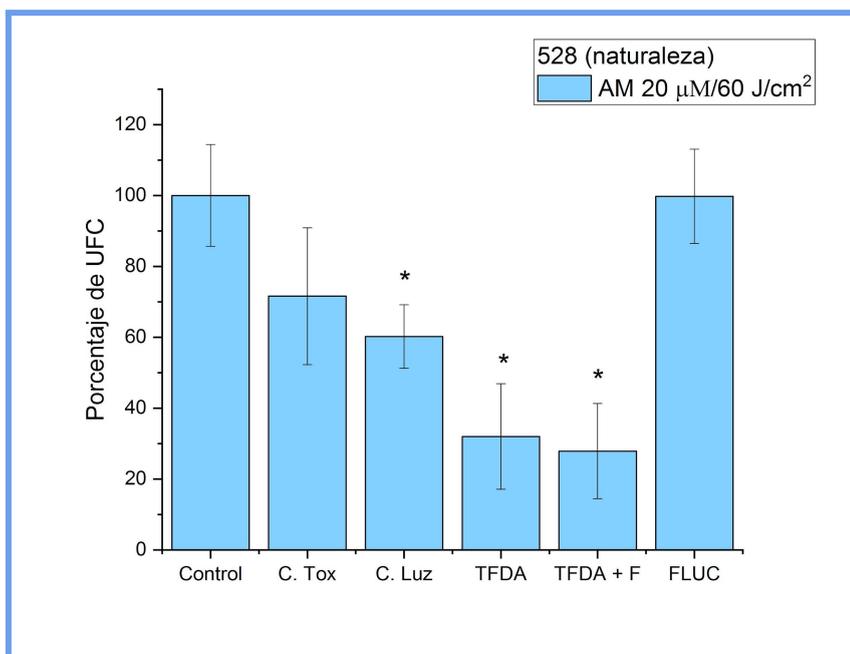


Figura 21 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 528, aplicando AM-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

4.2.3.2 Viabilidad de *S. schenckii* tras la aplicación de Cur-TFDA con y sin fluconazol

La TFDA aplicada a estos casos fue de 20 μM de Cur, y se aplicó una dosis de luz de 20 J/cm², en la tabla 8 se muestra la relación de los valores de p <0.05 correspondientes a cada cepa para realizar una comparación de medias de Tukey.

Tabla 8: Valores p de las cepas estudiadas.

Cepa	P-value
179	8.65×10^{-8}
R-03-8	3.10×10^{-9}
528	4.47×10^{-8}

Los resultados obtenidos para la cepa 179 (figura 22) muestran una inhibición en el conteo de UFC de 71% en la TFDA y el 66% en la terapia combinada de TFDA con Fluconazol, mostrando una ligera mejoría en la inhibición en este caso la cual no representó una diferencia significativa respecto a TFDA.

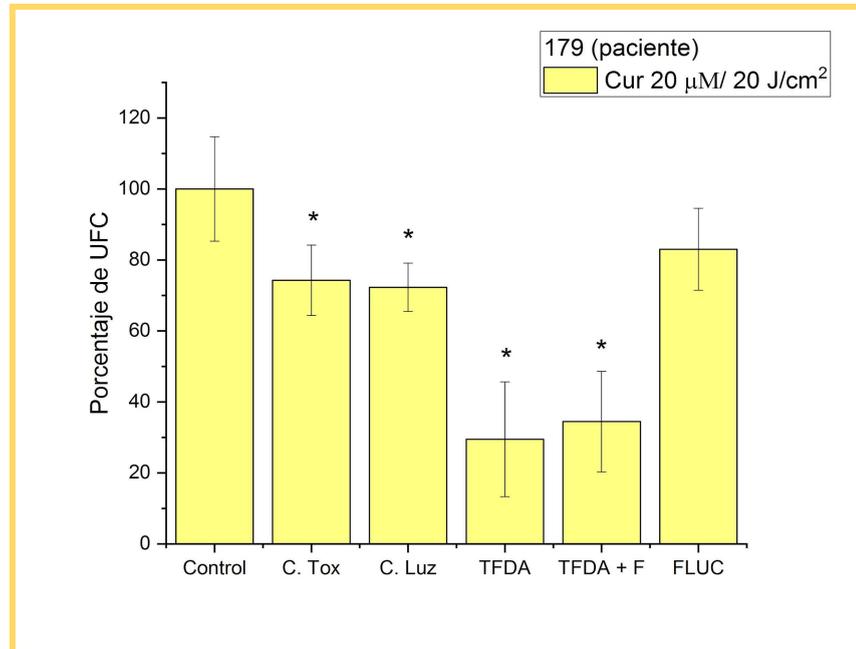


Figura 22 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 179, aplicando Cur-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

Los resultados obtenidos para la cepa R-03-8 (figura 23) muestran una inhibición en el conteo de UFC de 55% en la TFDA y el 57% en la terapia combinada de TFDA con Fluconazol, también se muestra una ligera mejoría en la inhibición de este último grupo control, la cual de igual manera que con la cepa 179 no representa una diferencia significativa respecto a TFDA.

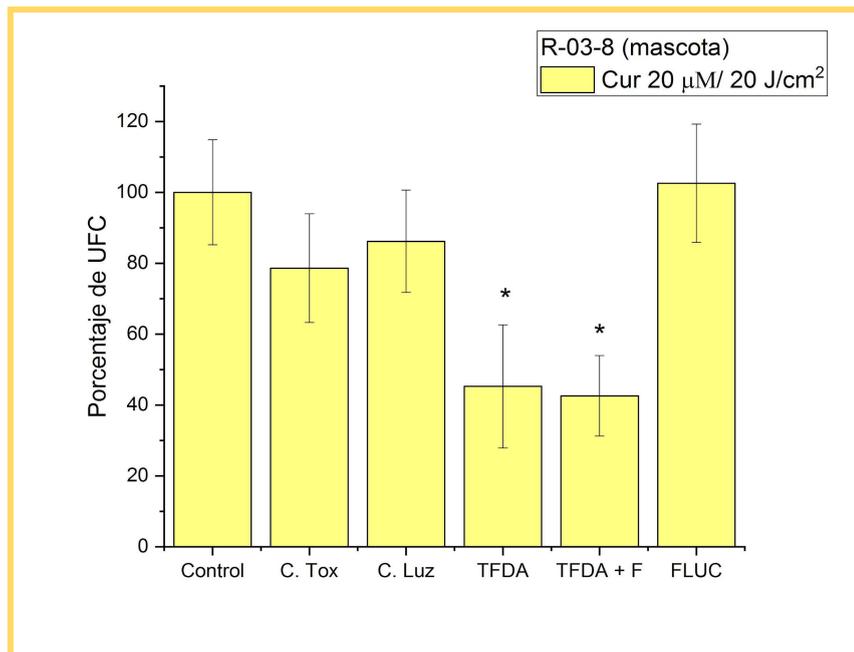


Figura 23 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa R-03-8, aplicando Cur-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

Los resultados obtenidos para la cepa 528 (figura 20) muestran una inhibición en el conteo de UFC de 60% en la TFDA y el 63% en la terapia combinada de TFDA con Fluconazol, en este caso los dos tratamientos tienen una eficacia similar la cual no representó una diferencia significativa entre los grupos TFDA y TFDA+F.

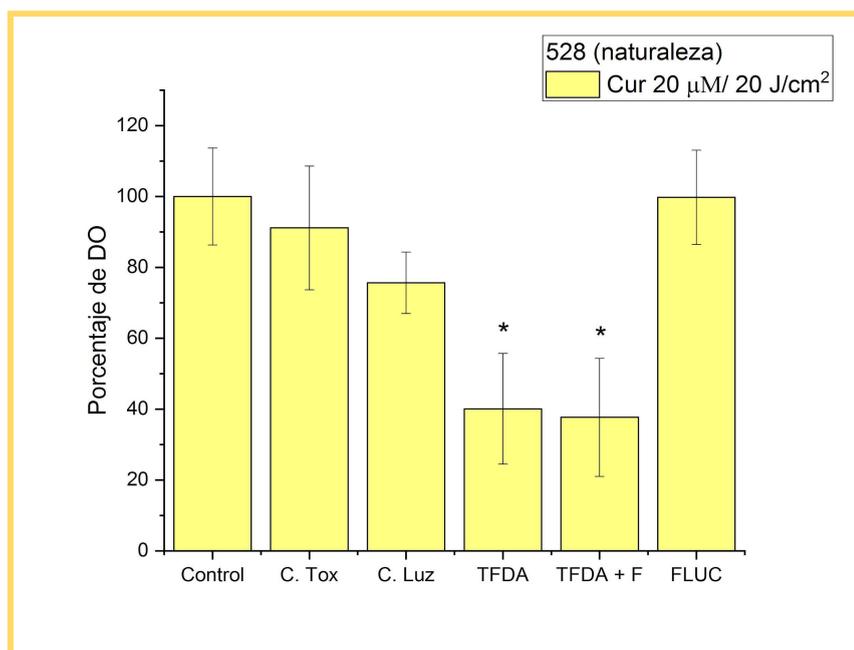


Figura 24 Comparación de viabilidad de *S. schenckii* cepa 528, aplicando Cur-TFDA con y sin fluconazol evaluada por UFC.

Los resultados demuestran que la eficacia de la TFDA para inhibir el crecimiento de *S. schenckii* tiene 60% de inhibición del crecimiento de los microorganismos en promedio. Estos resultados sugieren que la terapia de Cur y luz azul se muestra prometedora como una posible estrategia en el tratamiento de infecciones provocadas por el hongo *S. schenckii*.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En esta sección de discusiones, se exploran y analizan los resultados obtenidos en el presente estudio en el cual buscamos evaluar las dosis de AM y Cur necesarias para tener una TFDA con una inhibición eficiente del hongo *S. schenckii*.

Después de obtener los resultados mostrados previamente se observó una disminución de 50 al 70 % en la AM-TFDA y Cur-TFDA, estos son resultados positivos con respecto a la terapia y estos resultados también nos indican que ambas opciones son altamente viables para continuar con los estudios de investigación destinados a eliminar este hongo *in vitro*.

Li (2019) trabajó con AM y obtuvo un efecto fungicida teniendo una disminución de 60% aproximadamente en el crecimiento microbiano, Nunes (2014) hizo pruebas con AM en *S. schenckii sensu stricto*, *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* teniendo una disminución entre el 50 y 80% de los microorganismos después de la TFDA, Garcia-Malinis (2018) utilizó AM en lesiones de pacientes y menciona que se obtuvo una disminución total de las lesiones; Monteiro de Paula (2017) reporta una inhibición completa del hongo usando la combinación de la irradiación láser y AM, Teniendo en consideración los resultados reportados por estos autores podemos notar que la inhibición lograda con nuestro experimentos, entre 50 y 70% de disminución en las UFC, se encuentran dentro de los valores reportados de inhibición y para ello se utilizó la mitad de la dosis de luz reportada por Chen (2020).

Tabla 9. Estudios reportados contra *S. schenckii* usando TFDA.

Autor	Año	Cepas usadas	Terapia Fotodinámica		
			Fotosensibilizador	Potencia J/cm ²	Fuente de luz (nm)
Monteiro de Paula, et al.	2017	<i>S. schenckii</i>	AM 0.1 mg/mL	Láser de arseniuro de galio y aluminio 26.31 J/cm ²	660 nm
Li, et al.	2019	<i>Sporothrix globosa</i>	AM 1.0 µg/mL	LED 40 J/cm ²	640 ± 10 nm
Chen, et al.	2020	<i>S. globosa</i>	ácido 5-aminolevulínico (ALA) 0.3, 0.6 o 1.19 M	LED 162 J/cm ²	633 ± 10 nm
Nunes Mario, et al.	2014	<i>S. schenckii sensu stricto</i> , <i>S. albicans</i> , <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. mexicana</i>	AM 0.5, 1.0 2.0 µg/mL	LED 28 J/cm ²	685 nm
Gilaberte, et al.	2014	<i>S. schenckii</i>	Aminolevulinato de metilo (MAL), AM, nuevo azul de metileno (NAM), 1,9-dimetilmetileno (DMMB)	LED 37 J/cm ²	635nm
Garcia-Malini	2018	<i>S. complex</i>	AM (1%)	Luz de sol	

Hay pocos estudios previos para la TFDA contra *S. schenckii* específicamente (Tabla 9), sin embargo, aunque se ha observado la disminución del microorganismo con AM como Fs es fundamental continuar con su estudio para ampliar nuestro conocimiento sobre el tema en cuestión y así obtener una comprensión más completa y detallada del espectro de dosis que nos dan resultados positivos y el comportamiento del hongo después de recibir la TFDA.

Actualmente no hay reportes de TFDA con Cur en especies de *S. schenckii*, no obstante, hay evidencias de la eficacia en el uso de Cur como Fs en la TFDA para infecciones con hongos, Dovigo (2011) ha realizado trabajos con *C. albicans* en estado planctónico consiguiendo erradicación de células planctónicas y reducción del 68 y 87%, dependiendo del tiempo de preincubación. Baltazar en el 2015 también trabajó el hongo *T. rubrum* teniendo Inhibición completa. Nuestro trabajo con *S. schenckii* tuvo una inhibición mayor al 50% en todas las cepas estudiadas, se muestra una inhibición del crecimiento del hongo del 55 al 71%, siendo estos valores semejantes a los estudios de Cur en otros hongos, lo que nos dice que este Fs es eficaz en el tratamiento *in vitro* de *S. schenckii* presentado niveles de inhibición positivos.

Las evaluaciones de sensibilidad antifúngica llevadas a cabo en cepas de *S. schenckii* evidenciaron una resistencia notable al fluconazol a pesar de que es un medicamento antimicótico ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones fúngicas. A pesar de su amplio uso en tratamientos antifúngicos, la disminución en la viabilidad celular fue menor al 10% en las tres cepas estudiadas (figura 25 y 26).

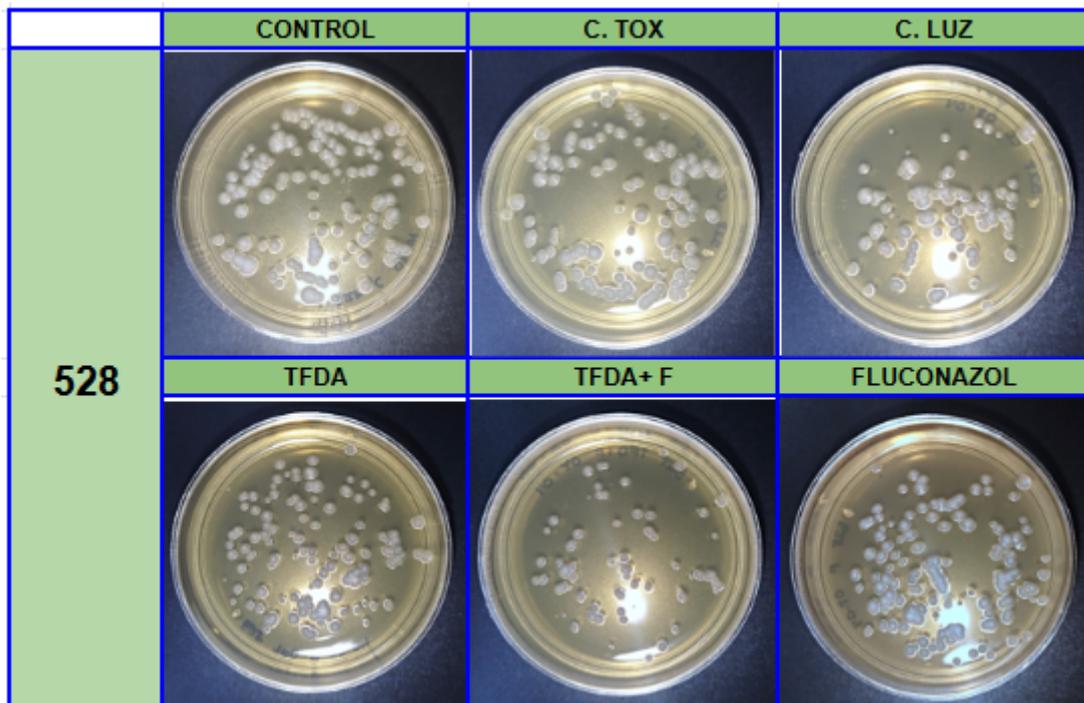


Figura 25 Pruebas de TFDA con la cepa R-03-8 después de 3 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados.

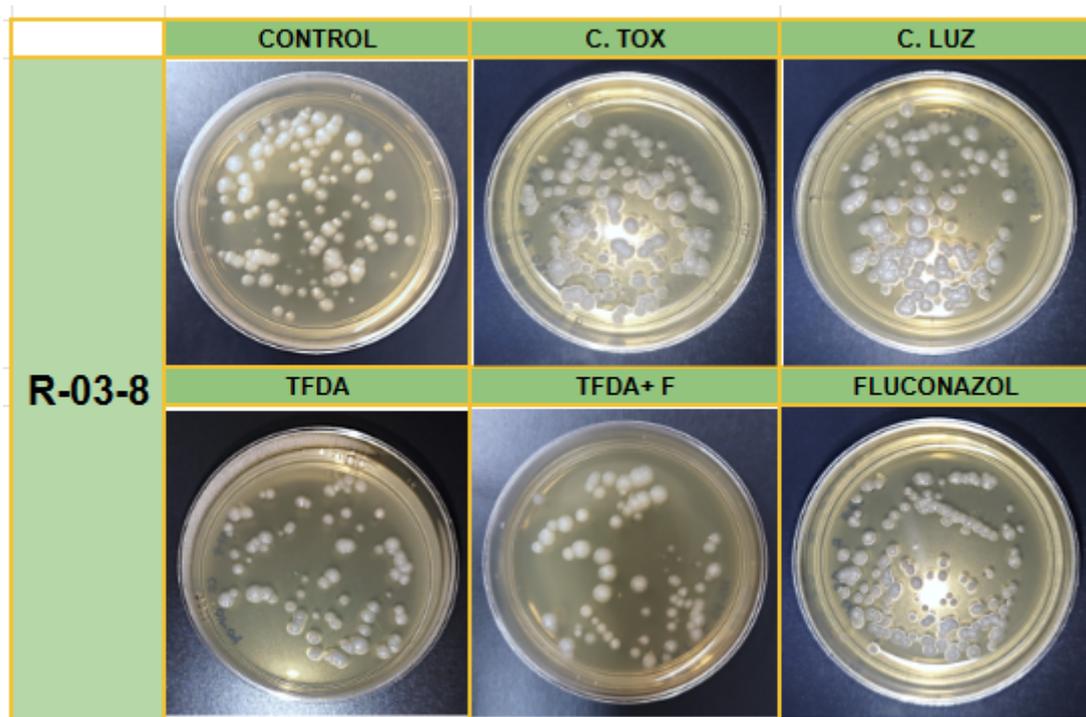


Figura 26 Pruebas de TFDA con la cepa R-03-8 después de 3 días de incubación de acuerdo a los grupos experimentales evaluados.

Este hallazgo concuerda con lo reportado previamente por Cowen (2008), quien abordó la problemática de la resistencia presentada por los hongos frente a ciertos antifúngicos como es el caso de los azoles. La terapia combinada de TFDA con fluconazol no mostró diferencia significativa en comparación con la TFDA sola, lo cual nos podría indicar que la inhibición del crecimiento de las colonias fue principalmente por la TFDA y no necesariamente por la acción combinada.

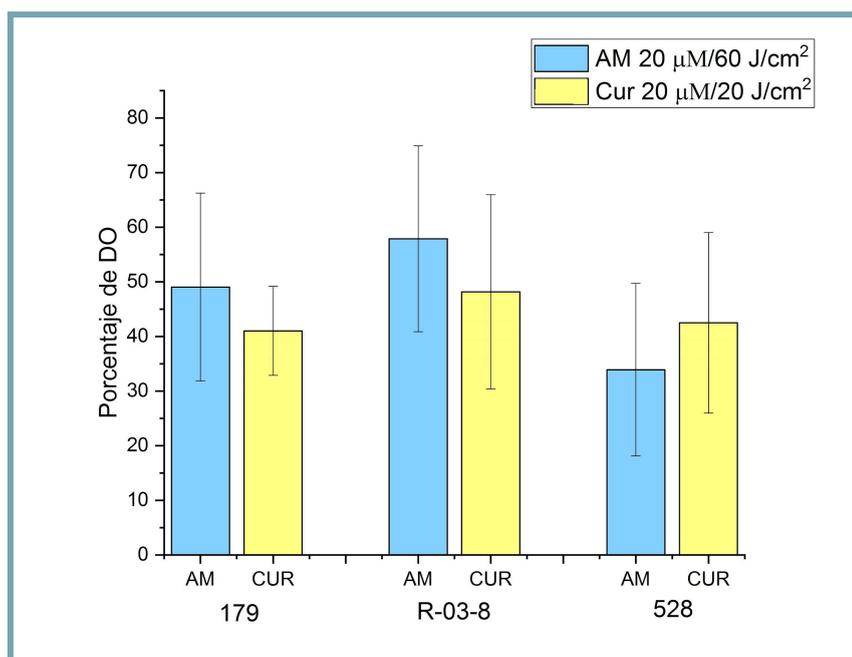


Figura 27 Comparación de la viabilidad celular en las tres cepas trabajadas después de AM-TFDA (20 μM/60 J/cm²) y Cur-TFDA(20 μM/20 J/cm²).

Al realizar la comparación de la inhibición causada por AM-TFDA y Cur-TFDA (figura 27), se observó que no existe una diferencia significativa entre los efectos de los tratamientos, tanto AM como Cur, por lo que ambos Fs pueden ser opciones viables y efectivas en la aplicación de la TFDA para el tratamiento de *S. schenckii*. Aun cuando es evidente que diferentes cepas pueden responder de diferente manera a cada terapia, se puede notar que la cepa 528 es más sensible a la TFDA con AM y las cepas 179 y R-03-8 resultaron un poco más sensibles a la TFDA con Cur.

Se requiere de más investigación para profundizar en los mecanismos involucrados y optimizar los parámetros de tratamiento, pero estos resultados son alentadores en cuanto al potencial terapéutico que ofrece el tratamiento combinado de TFDA y medicamentos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

En nuestra investigación se optimizó el proceso de TFDA en contra de *S. schenckii* y se utilizó AM y Cur como Fs para realizar pruebas de susceptibilidad antifúngica. A continuación, presentamos las conclusiones extraídas del trabajo de investigación realizado y posibles trabajos futuros para dar continuidad a este proyecto.

6.1 Conclusiones

La TFDA con Cur o AM resultó eficiente para eliminar a las cepas de *S. schenckii* evaluadas. Empleando 20 μM de Cur a 20 J/cm^2 redujo entre un 42 y 69% el crecimiento de las cepas y utilizando 20 μM de AM a 60 J/cm^2 se obtuvo una inhibición de 55 a 70%.

La terapia combinada TFDA + Fluc, mostró una inhibición entre 30 y 70% en el crecimiento microbiano de las cepas evaluadas, en algunos casos esto representó una inhibición ligeramente mayor al tratamiento de TFDA solo. Sin embargo, no representa una diferencia significativa, lo que nos podría indicar que la inhibición es producida únicamente por la TFDA y no por acción del antimicótico.

Las cepas R-03-8 y 528 mostraron alta resistencia al fluconazol y a pesar de que en la cepa 179 se encontró una disminución de 17% en la viabilidad celular esta no fue significativa en comparación con el crecimiento fúngico presentado en el grupo control.

6.2 Trabajo futuro

Dado que hay pocos trabajos relacionados con el enfoque de investigación presentado en esta tesis, los resultados adquiridos y la extensión abarcada por nuestro estudio nos presentan múltiples oportunidades en las cuales se pueden desarrollar investigaciones futuras. A continuación, se plantean algunas sugerencias:

- Investigar la efectividad de la TFDA en pruebas realizadas en modelos murinos in vivo para el tratamiento de infecciones causadas por *S. schenckii*.
- Evaluar la resistencia de *S. schenckii* a otros medicamentos y el efecto combinado de la TFDA y antifúngicos.
- Analizar el efecto de la TFDA en las biopelículas formadas por *S. schenckii*.
- Reconocer potenciales cambios en la morfología inducidas por la TFDA en *S. schenckii*.

Referencias

- Arenas, R. (2014). *Micología médica ilustrada*. México D.F.: McGRAW-HILL.
- Baltazar LM, Krausz AE, Souza ACO, Adler BL, Landriscina A, Musaev T, et al. (2015) *Trichophyton rubrum* is Inhibited by Free and Nanoparticle Encapsulated Curcumin by Induction of Nitrosative Stress after Photodynamic Activation. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120179>
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. México, D.F.: McGRAW-HILL.
- Bressan Waller, S., Dalla Lana, D. F., Maciel Quatrin, P., Alves Ferreira, M. R., Meneghello Fuentefria, A., & Mezzari, A. (2020). Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 73-80.
- Chen, J., Gao, F., Wang, Y., Xia, D., Shi, Y., & Gong, Q. (2019). Curcumin Enhances the Effect of Photodynamic Therapy on Breast Cancer Cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 173-179. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.018.
- Dovigo, L. N., Pavarina, A. C., Ribeiro, A. P., Brunetti, I. L., Costa, C. A., Jacomassi, D. P., et al. (2011). Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol.* 87, 895–903. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x
- Fuchs, B. B., Tegos, G. P., Hamblin, M. R., & Mylonakis, E. (2007). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Inactivation Is Associated with Cell Wall Integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2929–2936. doi:10.1128/aac.00121-07
- Gilaberte, Y., Aspiroz, C., Alejandre, M., Andres-Ciriano, E., Fortuño, B., Charlez, L., Rezusta, A. (2014). Cutaneous Sporotrichosis Treated with Photodynamic Therapy: An in Vitro and in Vivo Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 54-57.
- Hernández Delesma, L. d. (2021). Análisis del efecto de la Inactivación Fotodinámica con diferentes fotosensibilizadores en la inhibición de *Sporothrix schenckii* spp. Tonantzintla, Puebla: INAOE.
- Javier Ruíz Ávila, N. R. (2009). Terapia fotodinámica en dermatología. *Dermatología Rev Mex*, 178-186.

- Jawetz, M. &. (2016). Microbiología médica. México, D. F: McGraw-Hill Education.
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., ... & Kotulska, M. (2018). Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.047>
- Mahajan, V. K. (2014). Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatology Research and Practice*, 2014, 1–13. doi:10.1155/2014/272376
- Mayorga Rodríguez, J., Mayorga Garibaldi, J. L., Muñoz Estrada, V. F., & De León Ramírez, R. M. (2019). Esporotricosis: serie de 1,134 casos en una zona endémica de México. *Medicina cutánea ibero-latino-americana*, 47(1), 24-28.
- Monteiro de Paula Guirado, G., Scarparo Navarro, R., Dennis Rossoni, R., Campos Junqueira, J., & dos Santos Feitosa, L. (2017). In vitro reduction of pathogenic sporothrix schenckii fungus by photodynamic therapy. *O Mundo da Saúde*, 139-144.
- Moreno Arias, G. A., Eng Luna, A., Alvarado Delgadillo, A., & Camps-Fresneda, A. (2007). Terapia fotodinámica. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 255-268. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2007/mc076b.pdf>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). Microbiología médica. Elsevier Health Sciences.
- Nunes Mario, D. A., Denardi, L., Brayer Pereira, D. I., Santurio, J., & Alves, S. (2014). In vitro photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. *Medical Mycology*, 770-773.
- Roblero-Bartolón, G. V., & Ramón-Gallegos, E. (2015). Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gaceta médica de México*, 85-98.
- Samanta, I. (2015). *Veterinary Mycology*. India: Springer India.
- Saorín Falcón, P. (2016). Uso de la Terapia Fotodinámica y el quitosan para la inactivación de *Candida albicans* en un modelo de Experimentación animal. Obtenido de Biblioteca universitaria, Universidad de Murcia: <http://hdl.handle.net/10201/47889>

- Silva Ferreira, Ernando Leyva-Cruz, Juan Oliveira, Luana Sousa, Milton Alves, Álvaro Neto, Antônio Miltão, Where. (2014). Introdução às espectroscopias de absorção e fluorescência: Aplicações Farmacêuticas.
- Sizar O, Talati R. Sporotrichosis. [Actualizado el 2023 de febrero de 5]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532255/>
- Wainwright, M., & Crossley, K. B. (2002). Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? *Journal of Chemotherapy*, 14(5), 431–443. doi:10.1179/joc.2002.14.5.431
- Zurabian, R., & Hernández Hernández, F. (2019). Esporotricosis: la micosis subcutánea más frecuente en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 48-55.