



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE DERMATOFITOS CAUSANTES
DE INFECCIONES CRÓNICAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ISABEL CECILIA NERI BADILLO

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA

MANZANO GAYOSSO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Las instituciones participantes fueron el Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado y el Hospital de especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este trabajo estuvo incluido en el proyecto IN215615 apoyado por PAPIIT bajo la dirección de la M. en C. María de los Angeles Patricia Manzano Gayosso.

Se agradece a PAPIIT IN215615 por la beca otorgada durante el año 2015

Índice

1.- Antecedentes	1
1.1.- Dermatofitos.....	1
1.1.1.-Historia.....	1
1.1.2.-Géneros y especies.....	3
1.1.2.1.-Clasificación.....	3
1.1.2.2.-Sistemas de identificación.....	4
1.1.2.3.-Morfología.....	6
1.1.3.-Ecología.....	11
1.1.4.-Evolución biológica.....	14
1.1.5.-Factores de virulencia.....	16
1.1.5.1.-Biopelículas formadas por hongos filamentosos.....	20
1.1.5.1.1.-Modelo de biopelícula.....	21
1.1.5.1.2.-Formación de biopelículas por dermatofitos.....	23
1.2.- Dermatofitosis crónicas.....	24
1.2.1.-Manifestaciones clínicas.....	26
1.2.2.-Epidemiología.....	28
1.3.-Antifúngicos.....	29
1.3.1.-Historia.....	29
1.3.2.-Características de las moléculas y mecanismos de acción.....	31
1.3.2.1.- Terbinafina.....	31
1.3.2.2.- Amorolfina.....	32
1.3.2.3.- Ciclopiroxolamina.....	33
1.3.3.-Resistencia a antifúngicos.....	34
2.- Planteamiento del problema	36
3.- Objetivo general	37
4.- Objetivos particulares	37
5.- Material y Método	38
5.1.- Aislados.....	38
5.1.1.- Cultivo y purificación de aislados.....	38
5.1.2.- Identificación de especies de dermatofitos y variedades de <i>T. rubrum</i> ...	39
5.1.2.1.- Fundamento de los medios y pruebas fisiológicas.....	39
5.2.- Prueba de sensibilidad antifúngica.....	41

5.2.1.- Solución madre de los antifúngicos.....	41
5.2.2.- Caldo RPMI 1640.....	41
5.2.3.- Preparación de diluciones de antifúngicos	42
5.2.4.- Preparación de microplacas con antifúngicos.....	42
5.2.5.- Preparación de los inóculos.....	45
5.2.6.- Unidades formadoras de colonias (UFC).....	45
5.2.7.- Lectura de las placas de sensibilidad.....	45
5.2.7.1.- Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	46
5.2.7.2.- Concentración mínima fungicida (CMF).....	46
5.3.- Formación de biopelículas.....	46
5.3.1.- Preparación del inóculo.....	46
5.3.2.- Fase de preadhesión.....	47
5.3.3.- Evaluación morfológica de la formación de biopelículas.....	47
5.3.4.- Cuantificación de la masa de biopelículas con cristal violeta.....	48
5.3.5.- Cuantificación de la matriz extracelular de biopelículas con safranina	48
5.4.- Análisis estadístico.....	48
6.- Resultados.....	50
6.1.- Variables epidemiológicas de los pacientes.....	50
6.2.- Aislados.....	52
6.2.1.- Identificación.....	52
6.2.2.- Prueba de sensibilidad antifúngica.....	56
6.2.3.- Formación de biopelículas.....	62
7.- Discusión.....	70
8.- Conclusiones.....	79
9.- Abreviaciones.....	80
10.- Anexos.....	81
10.- Bibliografía.....	92

1.- Antecedentes

1.1.- Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos altamente especializados adaptados para invadir, colonizar y nutrirse del tejido queratinizado de los animales. Estos hongos son capaces de producir enfermedad debido a que poseen la habilidad enzimática que les permite digerir la queratina, proteína elaborada por los queratinocitos de la piel, para establecerse en la capa córnea de la epidermis, uñas y pelos. Las infecciones que causan son generalmente denominadas tiñas o dermatofitosis ⁶.

El término dermatofito significa “planta de la piel” y proviene de las raíces griegas “*dermatos*” piel y “*phyton*” planta. Sin embargo, debido a que los agentes causales no presentan relación alguna con las plantas sería más adecuado nombrarlos dermatomicetes, cuyo sufijo se origina del griego “*myketos*” hongo ⁴¹.

1.1.1.-Historia

Los dermatofitos indudablemente han existido desde tiempos prehistóricos y han infectado a humanos y otros animales por millones de años. La primera referencia registrada de una infección por dermatofitos es atribuida a Aulus Cornelius Celsus, enciclopedista Romano, quien en su obra “*De Re Medicina*” escrita 30 a.C., describió una infección supurativa en la piel cabelluda a la cual denominó Querión, del griego “*Kerion*” que significa “panal”. Posteriormente en honor a Celsus a esta entidad se le designó Querión de Celso ^{6, 95}.

En la edad media las dermatofitosis fueron descritas como *tinea*, nombre genérico que se le daba a varias especies de “polillas” que destruían la madera y/o telas, debido a la similitud entre las marcas circulares dejadas en las prendas de lana con las lesiones cutáneas producidas por los dermatofitos. En el siglo XVI Anglo Saxon acuñó el término “ringworm” (“anillo gusano”), de donde procede el nombre para denominar a las infecciones causadas por dermatofitos. Por otro lado, hace alusión a las placas circulares de piel inflamada y zonas de pelada ^{6, 13, 47}.

En el siglo XIX fue demostrada la etiología fúngica de estas infecciones de la piel. En 1835 Robert Remak, en las costras de lesiones fávicas, observó estructuras microscópicas que semejaban varillas y capullos ^{6, 99}. En 1839 Johannes L. Schönlein describió la naturaleza fúngica de dichas estructuras. En 1840 Remak aisló el agente etiológico del favus en rodajas de manzana y en 1845 lo nombró *Achorion schoenleinii* (*Achorion*: del griego *ajorôs*, costra de la cabeza). Entre 1841 y 1844, David Gruby describió al agente causal del favus, tanto clínica como microscópicamente, estableciendo la naturaleza contagiosa de la enfermedad a través de la demostración del cumplimiento de los postulados de Koch ^{68, 95}. Este investigador, también observó la invasión ectotrix del pelo, nombrando al agente etiológico *Microsporum* (refiriéndose a las pequeñas esporas alrededor del pelo) y describió la invasión del pelo endotrix por *Trichophyton tonsurans* ^{95, 99}. El género *Trichophyton* fue descrito por Per Hendrick Malmsten en 1845 ⁷.

En 1910 Raymond Sabouraud publicó su obra “*Les Teignes*”, en la que incluyó estudios de taxonomía, morfología, métodos para el cultivo de dermatofitos y tratamiento para las dermatofitosis. Él clasificó a los dermatofitos en cuatro géneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, con base en los aspectos clínicos de la enfermedad y en las observaciones microscópicas de la morfología de los macroconidios ⁹⁹. Sin embargo, en 1934 Chester Emmons eliminó el género *Achorion* basado principalmente en la morfología de los microconidios y propuso la distribución de dermatofitos en tres géneros ^{4, 68}.

La existencia de la fase teleomorfa en los dermatofitos fue reconocida por Nannizzi en 1927, quien describió la formación de cleistotecios en *Microsporum gypseum* y lo denominó *Gymnoascus gypseus*. Más tarde Griffin confirmó la existencia de esta fase en el género *Microsporum* y la re-nombró *Nannizzia* ^{4, 68}. Con la técnica del anzuelo de queratina ideada por Raymond Vanbreuseghem, con crines estériles para el cultivo, se descubrieron rápidamente los teleomorfos de varios dermatofitos y hongos queratinofílicos relacionados ⁹⁹. Dos nuevos géneros fueron creados para incluir la fase teleomorfa de los dermatofitos, *Nannizzia* y *Arthroderma*, para *Microsporum* y *Trichophyton*, respectivamente. En 1986 Weitzman *et al.* ⁹⁸

definieron y seleccionaron únicamente al género *Arthroderma*, debido a que fue el primero en ser descrito y las diferencias morfológicas entre *Nannizzia* y *Arthroderma* no eran suficientes para justificar la existencia de dos géneros separados.

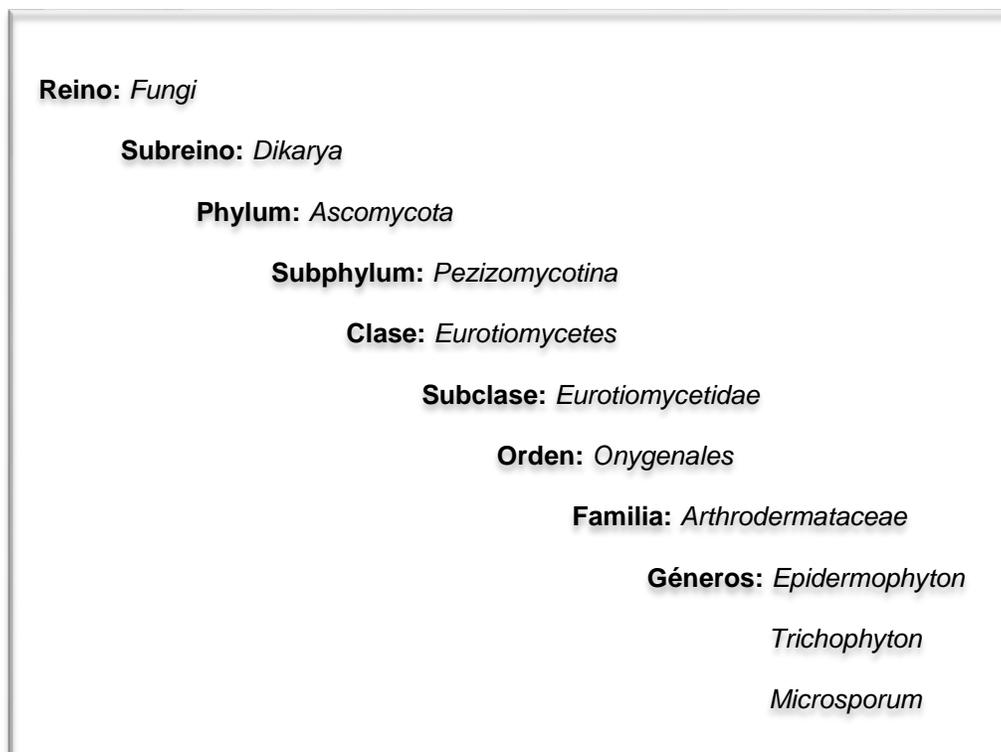
Los estudios fisiológicos y nutricionales de los dermatofitos iniciados en la Universidad de Columbia por Benham R. y Silva M. entre 1952-1953 ^{9, 85} y en el Centro de Control de Enfermedades, en Georgia, por Ajello L, Georg LK y Camp LB en 1957 ^{5, 30} simplificaron la identificación de los dermatofitos y la reducción del número de especies y variedades.

1.1.2.-Géneros y especies

1.1.2.1.-Clasificación

La clasificación actual de los hongos propuesta por Hibbett *et al.* (2007) ⁴⁶ plantea un reino, un subreino, siete phylum, diez subphylum, 35 clases, 12 subclases y 129 ordenes, de los cuales los dermatofitos se agrupan en los taxones mostrados en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Clasificación actual de los dermatofitos de acuerdo con Hibbett *et al.* (2007) ⁴⁶



Las principales características fenotípicas que los incluyen dentro de dichos taxones son: i) estadios dicarióticos (*Dikarya*) con septos simples caracterizados por la presencia de cuerpos de Wöronin (*Ascomycota*)^{46, 97}; ii) ascas prototunicadas, de globosas a piriformes, con pared delgada, que liberan las ascosporas pasivamente después de la desintegración de la pared del asca; iii) ascomas sin una capa de himenio distintiva y con ascas dispersas dentro de la cavidad ascomal; iv) ascosporas unicelulares, usualmente esféricas u ovoides; v) gimnotecios (ascoma), regularmente complejos, con apéndices variables característicos de cada especie; vi) estados anamorfos hifomicetos casi exclusivamente tálicos, que involucran la producción de artroconidios simples, intercalares o terminales, así como formas más elaboradas (*Onygenales*)^{29, 87}.

La familia *Arthrodermataceae* tiene únicamente dos géneros: *Ctenomyces* y *Arthroderma*. Las especies de *Arthroderma* producen microconidios unicelulares formados por células terminales o intercalares a la hifa, aunque son mejor conocidas por la producción de macroconidios por sus sinanamorfos *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Estos macroconidios son multicelulares, en forma de huso o cilindro, con septos transversales. Las especies incluidas en esta familia tienen la capacidad de utilizar y romper la queratina (queratinofílicas y queratinolíticas) por lo que se desarrollan en la piel, pelo y uñas de animales. Estos hongos son heterotáticos, aunque, el estado teleomorfo no ha sido encontrado para muchos de sus anamorfos⁹⁷. Se han descrito aproximadamente 40 especies de dermatofitos, de las cuales 22 corresponden al género *Trichophyton*, 16 a *Microsporum* y 2 a *Epidermophyton*³⁷.

1.1.2.2.-Sistemas de identificación

En las últimas décadas, la metodología para la identificación de dermatofitos ha cambiado. Originalmente se basó en sus características morfológicas; aunque la variabilidad intra- e inter-específica, combinada con la pérdida de las estructuras de conidiación (pleomorfismo), dificulta su clasificación. Sin embargo, el uso de pruebas fisiológicas ha ayudado a delimitar la identificación entre especies. El entrecruzamiento en los dermatofitos es otro hecho que podría ayudar a resolver

los límites en la identificación entre especies biológicamente diferentes, pero morfológicamente similares ⁵³.

En el cuadro 2 se muestra el sistema convencional de identificación de especies con base en diferentes pruebas fisiológicas y la morfología presentada en diversos medios de cultivo. Kane y Fisher *et al.* (1997) ⁵³ desarrollaron un sistema para la identificación de dermatofitos cuyo fundamento se basó en el reconocimiento temprano y fácil de algunas especies. Los medios y pruebas fisiológicas que propusieron son de utilidad en el aislamiento, purificación, conservación, esporulación, reducción del “pleomorfismo” e identificación de especies con base en el patrón de hidrólisis de proteínas, presencia de enzimas, osmotolerancia y producción de pigmento.

Cuadro 2.- Medios y pruebas fisiológicas utilizados en los sistemas de identificación convencional (1950-1960) y de Kane & Fisher (1997) para las especies de dermatofitos.

Sistema convencional	Sistema de Kane y Fisher
Agar dextrosa Sabouraud (ADS) con cloranfenicol, gentamicina y cicloheximida (CGC).	ADS con 3% NaCl
ADS con cloranfenicol y gentamicina.	ADS con 5% NaCl
Agar lactrimel ó agar papa dextrosa	Agar ácido casimino- albúmina-eritrol
Agar urea de Christensen	Agar cereal Pablum®
Agar vitaminas	Agar de Leonian modificado
Crecimiento en arroz	Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol (AG-BCP)
Dermatophyte test medium	Agar BCP – extracto de levadura- leche
Perforación de pelo <i>in vitro</i>	Agar infusión cerebro corazón
	Agar Littman Oxgall®
	Caldo Sabouraud con cicloheximida, cloranfenicol y gentamicina más HCl
	Caldo urea de Christensen

Kaminski G, micóloga australiana, de 1960 a 1985 estableció el Laboratorio de Referencia en Micología de Australia; diseñó parámetros para la identificación de dermatofitos con base en el uso de diferentes medios y pruebas fisiológicas. Sin embargo, una de sus contribuciones más relevantes fue la identificación de las

variedades de *T. rubrum*. El esquema de Kaminski ⁵⁰ propone diferentes pruebas para identificar nueve variedades de *T. rubrum* (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Esquema de Kaminski. Medios y pruebas utilizadas en la identificación de variedades de *Trichophyton rubrum* (1960-1985).

Esquema de Kaminski
Agar dextrosa Sabouraud
Agar Littman Oxgall®
Agar lactrimel
ADS con 5% de NaCl
Agar peptona al 1%
Hidrólisis de la urea
Agar libre de vitaminas (Agar <i>Trichophyton</i>)
Prueba de perforación de pelo <i>in vitro</i>

1.1.2.2.-Morfología

Para la finalidad de este trabajo solo se abordarán los aspectos sobresalientes de los dermatofitos más comunes causantes de infecciones crónicas en el humano, cuyas características morfológicas en agar dextrosa Sabouraud (ADS) se mencionan a continuación.

Epidermophyton floccosum (Harz) Langeron & Miloch, 1930

Morfología macroscópica. Colonias de crecimiento moderadamente rápido, aterciopeladas, con elevación central, superficie radiada, coloración amarillo-verdoso, marrón-oliva o amarillo-marrón. Además, producen un pigmento amarillo limón difundido al medio. Estas colonias degeneran con los subcultivos en 3 a 4 semanas, modificando su aspecto de aterciopelado a algodonoso ⁵⁸.

Morfología microscópica. Generalmente presenta abundantes macroconidios (20-40 µm x 7-12 µm) de paredes lisas, con dos a cinco septos, en forma de “mazo” o “raqueta”, agrupados en racimos semejjando una “penca de plátano”. Las colonias

conservadas en medios sólidos, por tiempo prolongado, presentan clamidoconidios, redondeados y de pared gruesa. No se observan microconidios ^{57, 58}.

Trichophyton violaceum Sabour. ex E. Bodin, 1902

Morfología macroscópica. Cultivos de crecimiento lento (aproximadamente 0.5 cm a los 7 días de incubación), en algunas ocasiones su crecimiento demora hasta 3 semanas. La superficie es elevada en forma cónica o plegada, glabra o cérea y de color rojo-púrpura, amarillo o rojo-amarillento. Al reverso de la colonia presenta diversidad en el matiz del pigmento, el cual puede ser amarillo oscuro, rojo-marrón, morado o violeta intenso. Este dermatofito modifica rápidamente su aspecto, dando lugar a zonas de micelio aéreo de color violeta pálido a blanco, que después cubre toda la colonia original. Las colonias de los cultivos con más de 30 días son de aspecto veloso, de superficie plana y blanca ^{57, 58}.

Morfología microscópica: Las hifas presentan ramificaciones dicotómicas, irregulares y ausencia de conidios. En el interior de las hifas se encuentran gránulos citoplasmáticos. Medios enriquecidos con tiamina, son de utilidad para la formación de algunos microconidios en forma de “clava” y macroconidios irregulares de extremo apical romo, de 2 a 8 septos; así mismo se pueden apreciar cadenas de clamidoconidios ^{57, 58}. Este dermatofito tiene la capacidad de hidrolizar la urea y en la prueba de perforación del pelo *in vitro* no forma cuerpos perforantes.

Trichophyton tonsurans Malmsten, 1848

Morfología macroscópica. Las colonias presentan variación en el aspecto, color y forma. El aspecto puede ser aterciopelado o veloso; el color va de blanco a “canela”, amarillento o marrón-rojizo. Su forma es acuminada, umbilicada o plegada. Al reverso o difusible al medio se aprecia un pigmento amarillento-marrón o marrón-rojizo (Figura 1) ⁵⁸.

Morfología microscópica. Los microconidios, generalmente son abundantes, de tamaño variable entre 2 y 5 μm , en forma de “mazo”, “lágrima” o irregulares y de pared gruesa; estos conidios emergen de hifas ramificadas o terminales y se disponen en ángulo recto con respecto a éstas (Figura 1) ⁵⁷. Una de las

características principales de los conidios es la tendencia que tienen de alargarse y redondearse en su polo distal, aumentando su tamaño, dando lugar a estructuras en forma de “clava” o “balón” ^{57, 58}. Los macroconidios son menos frecuentes y están menos diferenciados que los de *T. interdigitale* y más romos que los de *T. rubrum* (Figura 1). Los arthroconidios son comunes. Las modalidades de hifas que se pueden llegar a observar son en espiral, en raqueta y clamidoconidios. Las hifas generalmente tienen diámetros variables que van de 2 a 10 μm ⁵⁷.

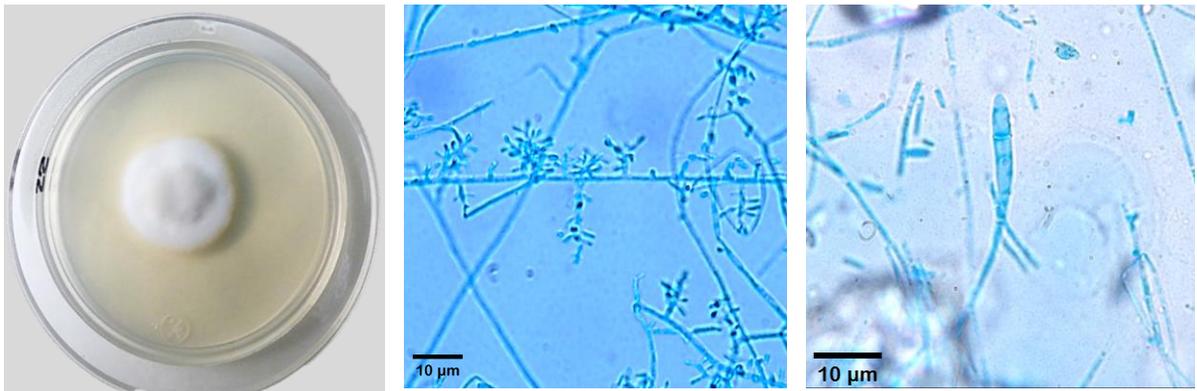


Figura 1.- Características morfológicas macro- y microscópicas de *Trichophyton tonsurans* en ADS. A) Colonia blanca algodonosa. B) Microconidios en forma de “lagrima”. C) Macroconidio alargado.

Trichophyton interdigitale Priestley, 1917

El “complejo *T. mentagrophytes*” estaba integrado por múltiples subespecies, las cuales fueron re-clasificadas taxonómicamente con base en análisis de biología molecular. Las variedades zoofílicas y antropofílicas genéticamente idénticas fueron agrupadas en la especie *Trichophyton interdigitale* y solo *Trichophyton mentagrophytes* var. *quinckeanum* conservó el nombre de *Trichophyton mentagrophytes* ⁶⁹.

Morfología macroscópica. Colonias de crecimiento en 4 a 7 días, de superficie plana, de color crema o amarillento en el centro y blanco en el margen, de aspecto pulverulento y con anillos concéntricos (Figura 2). Al reverso de la colonia se observa un color amarillo, marrón o rojo oscuro ^{57, 58}. En estado de pleomorfismo se observan colonias de aspecto densamente veloso o algodonoso, de color

blanco, presentes originalmente como micelio aéreo por zonas y posteriormente reemplazando la colonia original ⁶⁹.

Morfología microscópica. Las hifas se observan septadas, con abundantes formaciones en espiral y microconidios esféricos de 2 a 3 μm de diámetro, agrupados, que semejan racimos de uvas. Los macroconidios de 30 a 60 μm tienen forma de “lápiz”, “mazo” o “puro” (dependiendo de la cepa) y pueden llegar a tener hasta 6 septos; algunos presentan una unión estrecha (pedicelo) con la hifa vegetativa (Figura 2) ⁵⁷. Otras de las estructuras comúnmente observadas son: cuerpos nodulares, hifas en “raqueta”, clamidoconidios y estructuras semejantes a hifas peridiales ⁵⁸. En estado de pleomorfismo se presentan escasos macroconidios y microconidios ⁶⁹.

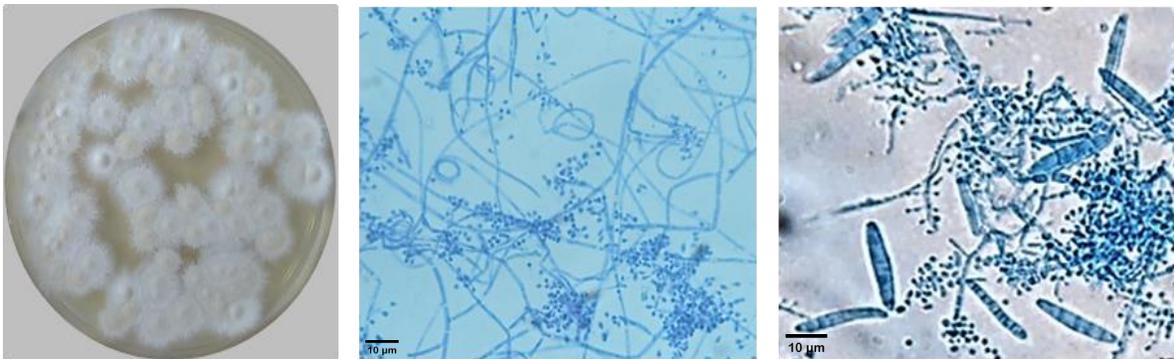


Figura 2.- Características morfológicas macro- y microscópicas de *Trichophyton interdigitale* en ADS. A) Colonias blanquecinas de aspecto pulverulento. B) Numerosos microconidios esféricos dispuestos en racimo e hifas en espiral. C) Numerosos macroconidios en forma de “puro”.

Trichophyton rubrum (Castell.) Sabour., 1910

La variabilidad en la morfología y el pleomorfismo que se produce han limitado la identificación de esta especie. Por tal motivo se introdujeron esquemas de identificación como el descrito por Kaminski ⁵⁰, el cual estudia la morfología colonial y la producción de pigmento en diversos medios y pruebas fisiológicas ⁵⁸. Los aislados de *T. rubrum* se dividen en dos grupos: A) *Trichophyton rubrum* tipo granular y B) *Trichophyton rubrum* tipo velloso (“downy”).

A). - *Trichophyton rubrum* tipo granular

Las colonias son de superficie plana o ligeramente elevada, de color blanco a crema, de aspecto similar a “gamuza”. Al reverso de la colonia se observa un color rojo-rosado. Microscópicamente la mayoría de las colonias presentan abundantes microconidios piriformes o en “clava” y un número moderado de macroconidios delgados, multiseptados, cilíndricos, de pared delgada y lisa con apéndices terminales. En los cultivos “viejos” se pueden presentar numerosos clamidoconidios con escasos microconidios ⁵⁰.

Dos variedades de *T. rubrum* tipo granular han sido descritas:

1).- *Trichophyton rubrum* var. *rhodainii*. Colonias pigmentadas de color violeta o rojo-violeta, acuminadas, de superficie plegada y glabra. Al reverso de la colonia se aprecia un color rojo-violeta intenso.

2).- *Trichophyton rubrum* var. *africana*. Colonias de aspecto pulverulento, al reverso muestran un pigmento rojo-vino, principalmente en medios que estimulan la producción de pigmento. En aislamientos primarios las colonias pueden mostrar un pigmento rojo al reverso o estar ausente.

B). - *Trichophyton rubrum* tipo velloso (“downy”)

Colonias de superficie plana a ligeramente elevada, de color blanco a crema, con aspecto de ante a vellosa y un pigmento al reverso de amarillo-marrón a rojo-“vino”. Muchos cultivos muestran de escasos a moderados microconidios piriformes o en “clava” (Figura 3). Los macroconidios generalmente están ausentes, sin embargo, proyecciones como closterosporas pueden estar presentes en algunos casos. Los cultivos de aislamiento primario pueden carecer de pigmento al reverso y presentar ausencia de microconidios. El uso de medios especiales favorece la producción de conidios, útiles para su identificación ⁵⁰.

Siete variedades de *T. rubrum* han sido reconocidas en este grupo:

1).- *Trichophyton rubrum* var. “Y”: Colonias caracterizadas por la producción de pigmento de tonalidad amarillenta y rojiza.

- 2).- *Trichophyton rubrum* var. *flava*: Colonias que solo producen pigmento amarillo.
- 3).- *Trichophyton rubrum* var. "P": Colonias caracterizadas por la producción de pigmento púrpura en agar peptona 1%
- 4).- *Trichophyton rubrum* var. *melanoide*: Colonias caracterizadas por la presencia de un pigmento melanoide difusible en todos los medios.
- 5).- *Trichophyton rubrum* var. *hiperpigmentada*: Colonias glabras con surcos radiales en la superficie, de color violeta a rojo-violeta y al reverso de la colonia un pigmento violeta a rojo violeta intenso.
- 6).- *Trichophyton rubrum* var. *incolora*: Colonias caracterizadas por la ausencia de pigmento en todos los medios de cultivo.
- 7).- *Trichophyton rubrum* var. *disgónica*: Microscópicamente restringida a hifas deformadas. En todos los medios las colonias son pequeñas, hiperpigmentadas y de escaso crecimiento.

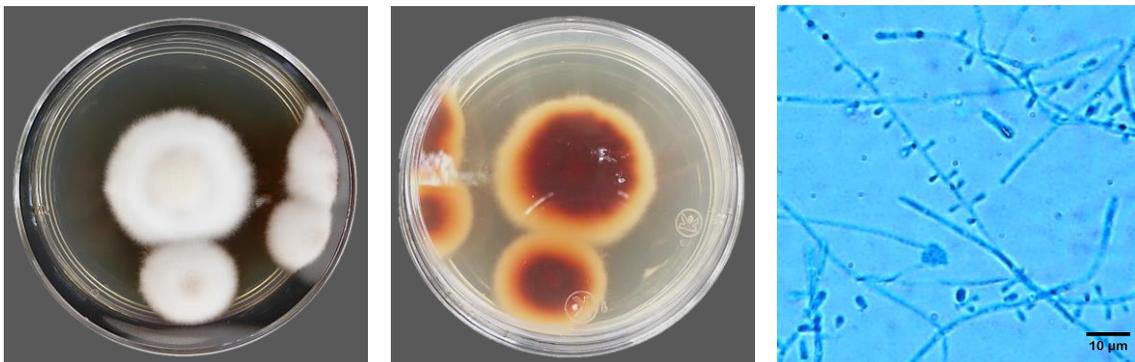


Figura 3.- Características morfológicas macro- y microscópicas de *Trichophyton rubrum* tipo "downy" en ADS. A y B) Colonias blancas algodonosas con pigmento rojo al reverso. C) Microconidios piriformes dispuestos de forma alterna sobre la hifa.

1.1.3.-Ecología

Los dermatofitos se dividen en tres grupos ecológicos con base en su preferencia o afinidad por la queratina del hospedero (Cuadro 4). Aparentemente, la especificidad por el hospedero se ha atribuido a las diferencias en la queratina de cada uno de ellos ⁵⁸.

1).- Antropofílico: (del griego *anthrōpos*, hombre y *philico*, afinidad). Grupo de dermatofitos que se encuentran primariamente asociados al tejido humano y raramente infectan otros animales ⁹⁹. Algunos autores han propuesto que estas especies evolucionaron de los hongos zoofílicos y gradualmente fueron perdiendo su afinidad por la queratina de otros animales ⁵⁸. Estos dermatofitos son responsables de aproximadamente el 70% de las dermatofitosis humanas. Otros autores reportaron que estos hongos se han adaptado a su hospedero humano causando enfermedades crónicas que progresan lentamente ¹⁰¹.

Los dermatofitos antropofílicos son comúnmente transmitidos a partir de lesiones activas de otro individuo, de manera directa o indirecta a través de fómites como peines, calcetines, zapatos, ropa de cama, toallas, etcétera ⁵⁸.

2.- Zoofílico (del griego *zoon*, animal y *philico*, afinidad). Grupo de dermatofitos que afectan a una amplia variedad de mamíferos y aves, que actúan como hospederos ⁹⁹. Estas especies son responsables de cerca del 30% de las dermatofitosis humanas y generalmente son infecciones agudas altamente inflamatorias ¹⁰¹. Estos dermatofitos sobreviven en un estado de latencia sobre células queratinizadas de origen animal ⁵⁸.

Los dermatofitos pueden ser considerados como antropofílicos o zoofílicos dependiendo de su capacidad para mantener poblaciones constantes en asociación con hospederos animales particulares y regularmente causar infección ⁹², aunque algunos dermatofitos desarrollan una relación comensal con su hospedero y pueden ser aislados de la piel aparentemente sana ⁹⁹.

3).- Geofílico (del griego *geo*, tierra y *philico*, afinidad). Grupo de dermatofitos que habitan en el suelo, asociados primariamente a materiales o sustratos que contienen queratina (pelos, plumas, escamas de piel, uñas, pezuñas y cuernos), después de que han sido desprendidos de animales vivos o en proceso de descomposición ⁹⁸. Ocasionalmente son patógenos de animales, incluyendo el humano, aunque algunas especies no son causantes de tiñas por lo que son llamados dermatofitoides (como *T. terrestre* y *T. ajelloi*) ⁹². Aparentemente su distribución se relaciona con la

disponibilidad de queratina y su supervivencia en el suelo dependerá de los siguientes factores: temperatura, luz, variación climática, altitud, pH, nutrientes, humedad y sales ⁵⁸.

Los dermatofitos geofílicos poseen características denominadas de “asociación con el suelo”, que los diferencian de los zoofílicos y antropofílicos. Éstas incluyen la autotrofia de aminoácidos y vitaminas, producción de ureasa, formación de órganos perforantes en pelos, numerosos conidios, entrecruzamiento heterotálico, osmotolerancia y la presencia de estructuras típicas (ornamentaciones conidiales, hifas en espiral y peridiales y gimnotecios de paredes rígidas) aparentemente para evitar la depredación de artrópodos ⁹⁹.

La mayoría de los dermatofitos tiene una amplia distribución, sujeta a cambios por factores climáticos, sociales, culturales, migración poblacional, viajes y terapia antifúngica. Sin embargo, algunas especies muestran una clara endemidad relacionada con sus hospederos ⁹⁹ (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Relación entre especies de dermatofitos, su hábitat natural, preferencia de hospedero y áreas geográficas endémicas. Tomado y modificado de Weitzman & Summerbell (1995) ⁹⁹

Antropofílicas	Zoofílicas	Geofílicas
<i>E. floccusum</i>	<i>M. canis</i> (gato, perro)	<i>E. stockdaleae</i>
<i>M. audouinii</i> (Africa)	<i>M. gallinae</i> (gallina)	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. ferrugineum</i> (Este de Asia y Europa)	<i>M. persicolor</i> (campañol)	<i>M. boullardii</i>
<i>T. concentricum</i> (Sureste de Asia, Melanesia, área Amazonica, Centroamérica, México)	<i>T. equinum</i> (caballo)	<i>M. cookei</i>
<i>T. interdigitale</i>	<i>T. erinacei</i> (erizo)	<i>M. gypseum</i>
<i>T. kanei</i>	<i>T. interdigitale</i> (conejos)	<i>M. praecox</i>
<i>T. megninii</i> (Portugal, Sardinia)	<i>T. mentagrophytes</i> (ratón)	<i>M. racemosum</i>
<i>T. raubitschekii</i> (Asia, África, Mediterráneo)	<i>T. simii</i> (mono, gallina)	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i> (vacas, ovejas, dromedarios)	<i>T. gloriae</i>
<i>T. schoenleinii</i>		
<i>T. soudanense</i> (África sub-Saharan)		
<i>T. tonsurans</i>		
<i>T. violaceum</i> (África, medio Este, Mediterráneo)		

1.1.4.- Evolución biológica

Diversos autores han considerado que la evolución de los dermatofitos está dirigida por su ecología, reproducción, adaptación al hospedero y patogenicidad. En particular, las reconstrucciones filogenéticas derivan de análisis de marcadores genéticos de ADN mitocondrial (ADNmt) y nuclear (ITS, LSU, *chs1*, TOP2), así como de genomas completos de ADN o ADNmt ¹⁵. Dichos análisis sugieren que las especies zoofílicas y antropofílicas surgieron independientemente de diferentes linajes de especies geofílicas no patogénicas en hábitats semejantes al de los dermatofitoides actuales. Por ejemplo, los antropofílicos anamorfos *M. audouinii* y *M. ferrugineum* surgieron del linaje de *M. canis*; *T. tonsurans* y *T. equinum* derivan del linaje de *A. vanbreuseghemii*; *T. schoenleinii* deriva del linaje de *A. benhamiae*, y más específicamente, del linaje intra-específico que dio origen a *T. mentagrophytes* (var. *quinckeanum*, el hongo del favus del ratón) (Figura 4) ⁹².

En cada uno de los linajes separados donde surgieron los dermatofitos no asociados con el suelo, muchos taxones reconocidos perdieron dos o más caracteres de “asociación con el suelo”. Lo anterior fue el resultado de una adaptación a sus hospederos animales estrictamente epigeos (humanos, ungulados, equinos), es decir, que no viven en estrecha relación con el suelo ⁹². La pérdida de los caracteres mencionados anteriormente aunado a la moderación de la actividad de ciertas enzimas (proteasas) y el alto nivel de actividad de otras (queratinasas) a temperaturas normales del cuerpo y niveles de pH de la piel, es presumiblemente responsable de la adaptación de ciertos dermatofitos a la superficie de la piel humana; referido como “antropización” ^{31, 71, 82}.

Al examinar el genoma completo del ADNmt de algunas especies de dermatofitos se ha especulado su estrecha relación y origen a partir de los hongos que causan infecciones invasivas (*Aspergillus* spp., *Candida* spp., y *Penicillium marneffe*). Lo que ha sugerido, aparentemente, que la evolución de estos hongos filamentosos fue por la adaptación al hospedero y patogenicidad. De acuerdo a estudios en la evolución de algunas especies antropofílicas se planteó que estos hongos surgieron

de la fase teleomorfa de especies zoofílicas causando infecciones humanas leves y/o crónicas ¹⁵.

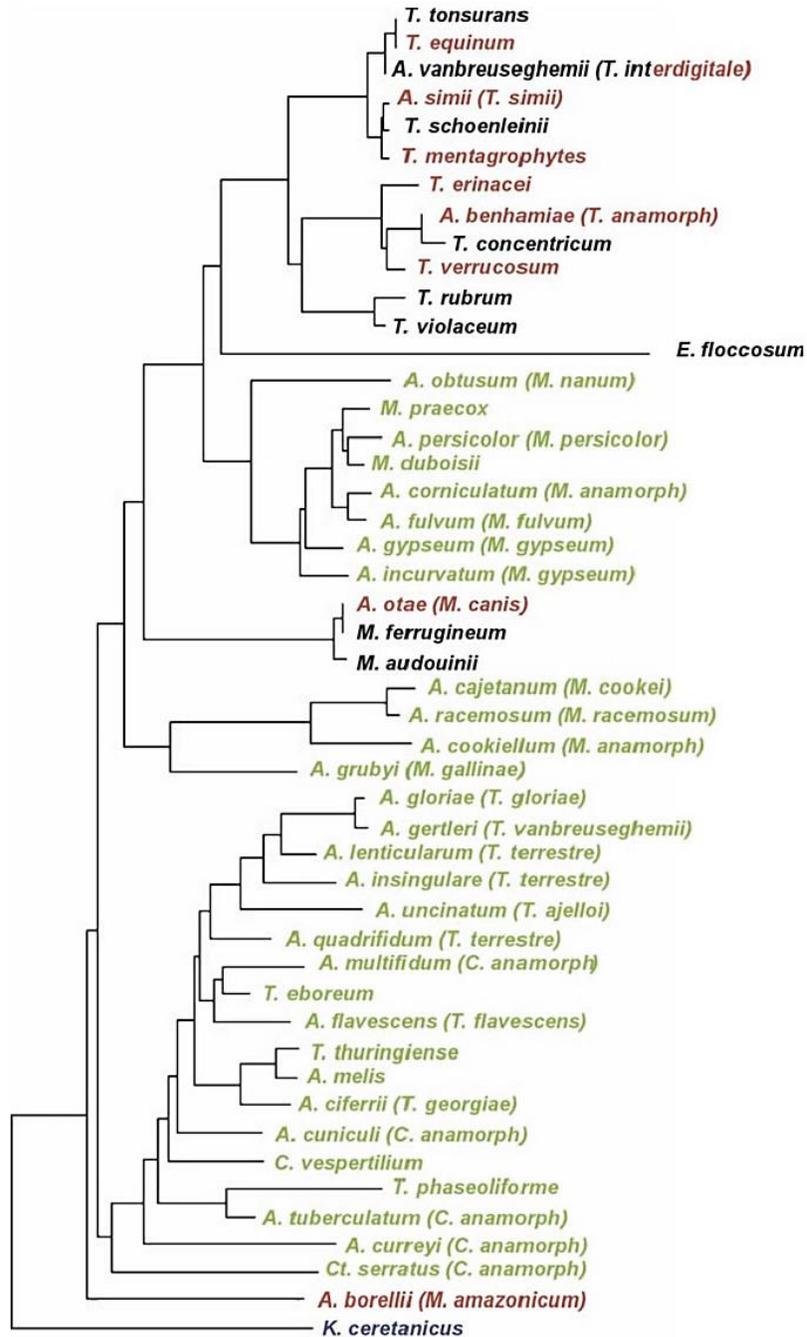


Figura 4.- Relaciones filogenéticas de los dermatofitos basada en datos de secuencia de ITS. Las especies antropofílicas se encuentran en negro, las zoofílicas en rojo y las geofílicas en verde.

Tomado de Gräser et al. (2008) ³⁴

La mayoría de dermatofitos asociados a mamíferos han evolucionado desde hace 50 millones de años y en consecuencia las diferencias entre las entidades son a menudo relativamente pequeñas y no son fácilmente discernibles, incluso a nivel de especie como en el caso de las variedades de *T. rubrum*³⁵. Los mecanismos de dispersión son dependientes de los hospederos, los cuales tienden a mantenerse dentro de áreas geográficas limitadas (continentes o subcontinentes). El flujo de genes de los hongos que los parasitan se encuentra relacionado con el tamaño de la población de hospederos, por lo que es limitado. Sin embargo, las migraciones humanas han permitido la rápida distribución sobre grandes áreas geográficas de especies antropofílicas y variantes intra-específicas³⁵.

1.1.5.-Factores de virulencia

Algunos estudios acerca de la patogenia de las dermatofitosis han demostrado que en la interacción de los dermatofitos con las células del hospedero están involucrados tres pasos principales: 1) adherencia a los tejidos del hospedero; 2) invasión y 3) respuesta inmune del hospedero¹⁸. Además de éstos, la formación de biopelículas es considerada un importante factor de virulencia involucrada en el establecimiento de infecciones crónicas^{14, 18, 20, 42}. Durante el proceso de infección los dermatofitos son capaces de secretar diversos factores de virulencia con la finalidad de penetrar a los tejidos del hospedero, nutrirse y sobrevivir (Figura 5)¹⁸.

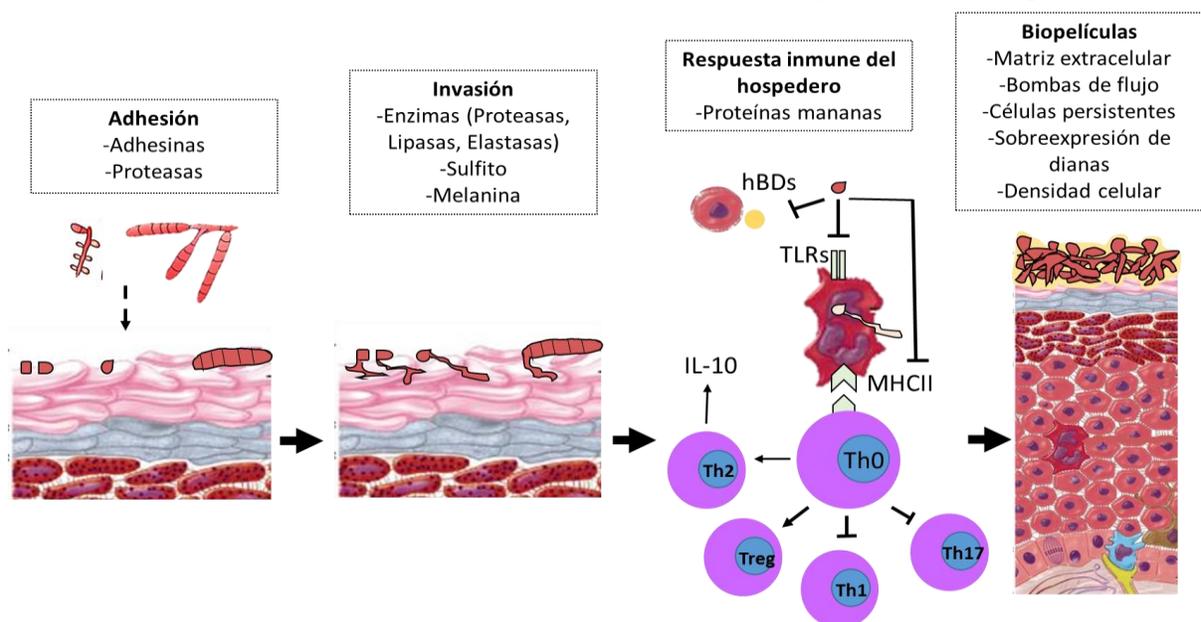


Figura 5.- Factores de virulencia de los dermatofitos involucrados en las tres fases de infección.

1).- Adherencia a los tejidos del hospedero

La adherencia es un paso fundamental para dar inicio a la colonización y al posterior desarrollo de una infección. La adherencia en los dermatofitos, como en muchos hongos patógenos, esta mediada por un gran número de enzimas denominadas adhesinas las cuales están unidas a la pared celular fúngica ^{65, 77}. Éstas juegan un papel importante en el reconocimiento de carbohidratos específicos de las células epiteliales. La subtilisina 3 (proteasa secretada por ciertos dermatofitos) es otra enzima que se ha sugerido que está involucrada en el proceso de adherencia ¹⁸.

2.- Invasión

La invasión se refiere a la germinación y penetración de los dermatofitos a la capa córnea de la epidermis. Los dermatofitos son considerados como hongos queratinofílicos especializados, es decir, tienen la capacidad de degradar y utilizar la queratina presente en las células del hospedero, como única fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y sulfuro. Esta capacidad representa un atributo fundamental de virulencia en estos hongos ^{99, 18}. Durante la penetración, los dermatofitos secretan una amplia variedad de enzimas como proteasas, lipasas y fosfolipasas, las cuales también juegan un papel fundamental en el desarrollo y sobrevivencia en ese microambiente. Las enzimas liberadas por los dermatofitos actúan como antígenos e inducen varios grados de inflamación ^{18, 65}.

Las proteasas son el principal factor de virulencia, involucradas tanto en el desencadenamiento de la respuesta inmune como en la adhesión, invasión y utilización de la queratina de la capa córnea ¹⁵. Las principales endoproteasas son la serina proteasa (implicada en el catabolismo de proteínas extracelulares) y metaloproteasas (subtilisina y fungalisina, formalmente llamadas queratinasas). Entre las exoproteasas secretadas se encuentran las aminopeptidasas leucinas, aminopeptidasas no específicas y carboxipeptidasas ⁹⁶.

La queratina es una escleroproteína cuyas cadenas de péptidos se mantienen firmemente unidas debido a los puentes disulfuro (S-S) que se forman entre los residuos de cisteína abundantes en la proteína. La digestión proteolítica de la

queratina solo es posible mediante la reducción de los puentes disulfuro. El sulfito secretado por los dermatofitos mediante bombas de flujo (codificadas por el gen SSU1) actúa sobre los puentes disulfuro, reduciendo la queratina en cisteína y S-sulfocisteína, permitiendo la digestión por las proteinasas secretadas. La acción conjunta de las proteasas y los agentes reductores resulta en la formación de pequeños péptidos y aminoácidos que pueden ser más fácilmente tomados por los dermatofitos ³⁶.

Otros factores de virulencia involucrados en la patogenia de la infección son los no enzimáticos, los cuales incluyen xantomegninas, melanina (posible inmunomodulador o proporcionador de resistencia a radicales libres, fagocitosis y a los componentes antifúngicos) y termotolerancia (en estructuras de resistencia, como clamidoconidios) ^{18, 43, 51, 103}. Finalmente, en el cuadro 5 se muestran algunos trabajos realizados sobre los mecanismos de expresión de algunos genes involucrados en la virulencia; que se ha sugerido son regulados por el factor de transcripción de la familia GATA en diferentes dermatofitos ¹⁸. La regulación en la expresión de genes de virulencia es un paso crucial en la patogénesis y en la adaptación de los dermatofitos a las células del hospedero ⁷⁷.

3.- Respuesta inmune

Los dermatofitos al invadir el tejido queratinizado, liberan metabolitos que actúan como antígenos; éstos inducen una respuesta inmune innata en los tejidos del hospedero. Los componentes de las paredes celulares como la quitina, glucano y glicopéptidos representan los principales antígenos. Los antígenos derivados de los dermatofitos pueden inducir reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I) o retardada (tipo IV) en la piel. Las respuestas de hipersensibilidad inmediata están asociadas con infecciones recurrentes o crónicas que producen altos niveles de inmunoglobulinas (IgE, IgG4) y citosinas Th2 por los leucocitos mononucleares. La hipersensibilidad retardada está asociada con dermatofitosis agudas ¹².

La principal respuesta inmune es la adaptativa del tipo Th1 con la producción de citosinas pro-inflamatorias como la interleucina 2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN- γ).

Esta respuesta es inducida para controlar la infección y regularmente promueve la curación de la dermatofitosis ^{18, 65, 72}. La especialización de cada dermatofito y la severidad de la inflamación inducida en un hospedero, puede estar relacionado con la regulación diferencial de la expresión de proteínas secretadas (lipasas, fosfatasa alcalina, esterasas, etc.) aunado al grado de inmunosupresión del hospedero ^{12, 56, 65, 96}.

Las diferentes vías por las cuales los dermatofitos pueden contrarrestar o inducir daño por medio del sistema inmune incluyen la inhibición de linfocitos por mananas de la pared celular, alteración en la función de los macrófagos, activación diferencial de queratinocitos y secreción diferencial de proteasas ^{21, 65, 96}.

Cuadro 5.- Principales productos y funciones de los genes asociados a características de virulencia en los dermatofitos propuestos por Achterman *et al.* (2012) ¹, Cafarchia *et al.* (2013) ¹⁵, Chinnapun (2015) ¹⁸ y Vermout *et al.* (2008) ⁹⁶.

Gen	Producto	Función	Dermatofito
SUB1 SUB2 SUB3	Familia subtilisina de serinas proteasas.	Adhesión/Invasión.	<i>M. canis</i>
MEP2 MEP3	Metaloproteasas.	Infección.	<i>M. canis</i>
SUB3 SUB4 LAP1 LAP2	Proteasas.	Digestión de proteínas.	<i>T. rubrum</i>
Tri m 4	Proteasa.	Incrementa transcripción durante crecimiento en queratina	<i>T. interdigitale</i>
DppIV DppV	Exoproteasa dipeptidil peptidasa.	Función especializada en la relación hongo-hospedero.	<i>M. canis</i>
TruMDR2	Proteína transportadora ABC.	Transporte de proteínas durante la infección.	<i>T. rubrum</i>
paCC	Factor de transcripción dependiente de pH.	Actividad queratinolítica y crecimiento.	<i>T. rubrum</i>

1.1.5.1-Biopelículas formadas por hongos filamentosos

En las últimas décadas el conocimiento de cómo los microorganismos crecen y sobreviven en ambientes naturales o en los tejidos del hospedero ha cambiado. En la actualidad se sabe que los microorganismos en la naturaleza raramente sobreviven como células solitarias; más bien crecen en agrupaciones denominadas biopelículas. La formación de la biopelícula es probable que sea un carácter seleccionado positivamente que comenzó a ser fijado tempranamente en la evolución microbiana, como una característica importante para la supervivencia en superficies de ambientes diversos o cambiantes ^{42, 77}.

“Una biopelícula puede ser descrita como una comunidad sésil, derivada de microbios, caracterizada por células irreversiblemente adheridas a un sustrato o interfase o entre sí, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido y que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción de genes” ²⁴. En los hongos filamentosos, el término “biopelícula” no ha sido usado para describir el crecimiento asociado a una superficie, dado que a menudo penetran el sustrato donde crecen. Se ha sugerido que por esto sean excluidos de la palabra, dado que “película” no representa adecuadamente el crecimiento invasivo. Es por eso que comúnmente son llamados como “masa fúngica”, “masa multicelular” o “tapete micelial” ⁴².

Las infecciones asociadas con la formación de biopelículas son reconocidas como un problema clínico que aumenta significativamente, siendo la causa principal de infecciones humanas persistentes. Una amplia variedad de hongos levaduriformes y filamentosos patógenos han demostrado la capacidad de colonizar superficies y formar biopelículas ^{77, 86}.

En la literatura existen muy pocos reportes sobre las biopelículas formadas por hongos filamentosos. Sin embargo, la adaptación de los hongos para el crecimiento en superficies, evidenciada por su modo de nutrición por absorción, la secreción de enzimas extracelulares para digerir moléculas complejas y un crecimiento apical de la hifa, hace a este tipo de organismos excelentes candidatos para la formación de

biopelículas ⁴². La formación de estas estructuras se ha demostrado en: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera* y *Rhizomucor pusillus* ^{77, 86}.

Las biopelículas formadas por hongos filamentosos cumplen con los siguientes criterios propuesto: A) características estructurales como el crecimiento agregado complejo (paquetes o capas de hifas, a diferencia de las hifas débilmente asociadas o monocapas); B) crecimiento de células asociadas a una superficie; C) células embebidas en una matriz polimérica extracelular secretada y auto-producida y D) cambios fenotípicos por la expresión alterada de genes debido al aumento en la tolerancia a los componentes antimicrobianos, cambios en la producción y/o secreción de enzimas o metabolitos y cambios fisiológicos ^{42, 88}.

1.1.5.1.1.-Modelo de biopelícula

En los hongos levaduriformes han sido descritos modelos bien definidos con criterios fenotípicos establecidos, principalmente en *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. y *Cryptococcus neoformans*. Las biopelículas formadas por estos hongos son comparables con las formadas por bacterias; a diferencia de las que forman los hongos filamentosos por el crecimiento invasivo de las hifas y/o estructuras que se extienden más allá de la interfase aire-líquido o por las estructuras especializadas necesarias para la penetración al hospedero, esporulación y adquisición de nutrientes en la interfase del hospedero ⁴².

Harding *et al.*, en 2009 ⁴², propusieron un modelo para la formación de biopelículas por hongos filamentosos, basado en descripciones de biopelículas formadas por *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum*. Este modelo plantea seis fases para la formación de biopelículas: i) adsorción del propágulo; ii) adhesión activa a una superficie; iii) formación de microcolonias I; iv) formación de microcolonias II; v) desarrollo reproductivo o maduración y vi) dispersión o fase planctónica (Figura 6).

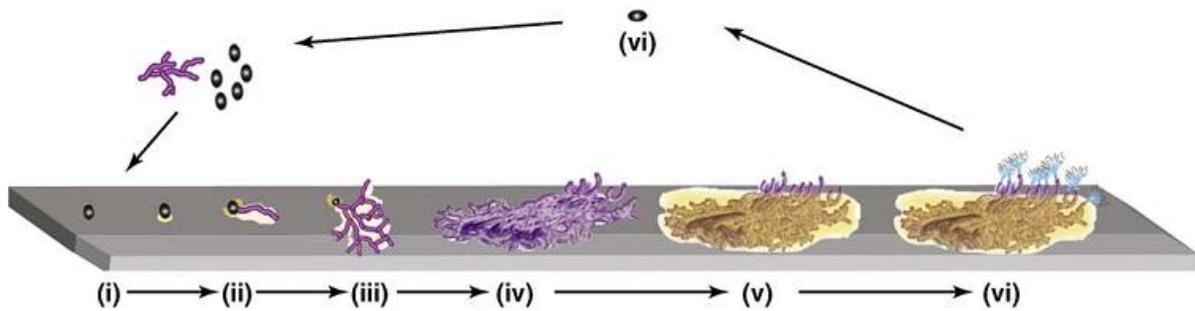


Figura 6.- Modelo propuesto por Harding *et al.* 2009 ⁴² para la formación de biopelículas por hongos filamentosos i) adsorción del propágulo, ii) adhesión activa a una superficie, iii) formación de microcolonias I, iv) formación de microcolonias II, v) desarrollo reproductivo o maduración y vi) dispersión o fase planctónica.

i) Adsorción de los propágulos: Asociación o adhesión inicial reversible de los conidios, fragmentos de hifas o esporangiosporas, a una superficie (interacciones fisicoquímicas de microorganismos con la superficie) ⁴².

ii) Adhesión activa a una superficie: Adhesión de propágulos fúngicos a una superficie a través de la secreción de sustancias adhesivas, por germinación de los conidios. Las proteínas de la pared celular juegan un papel importante en esta fase, ya que además de ser importantes en la adherencia (adhesinas) pueden tener un papel sensorial que promueve dicha respuesta ^{27, 42}.

iii) Formación de microcolonias I: El estado inicial del crecimiento y colonización de los hongos sobre la superficie involucra elongación apical y ramificación de la hifa. Las hifas se ramifican a través de la superficie en monocapa, y/o comienzan a ser invasivos. Este estado involucra la producción de una matriz extracelular polimérica que permite el crecimiento colonial adherido al sustrato. La comunicación a nivel poblacional se lleva a cabo mediante señales extracelulares, difusibles en la matriz extracelular polimérica, que coordinan cambios en la expresión de genes, morfología y desarrollo ^{77, 42}.

iv) Formación de microcolonias II o maduración inicial: Involucra la formación de redes de hifas compactas o adhesión hifa-hifa y micelio. Esto incluye estratificación, formación de paquetes de hifas mantenidos juntos por una matriz exopolimérica y la formación de canales de agua vía repulsión hidrofóbica entre las hifas o los paquetes de hifas ⁴².

v) Desarrollo reproductivo o maduración: Caracterizada por la formación de estructuras reproductivas, células esporógenas, esclerocios y otras estructuras de supervivencia. El crecimiento aéreo es una característica clave en la fructificación y dispersión fúngica ⁴².

Los cambios estructurales y fenotípicos asociados con el desarrollo de biopelículas maduras, ayudan a las células microbianas en numerosos aspectos de su ciclo de vida. Estos beneficios incluyen adhesión a las superficies, colonización de los tejidos del hospedero, expresión o incremento de las características de virulencia, protección del estrés, captura eficiente de nutrientes, mejoramiento de la comunicación de célula a célula, dispersión para la supervivencia durante las condiciones desfavorables ⁴².

vi) Dispersión o fase planctónica: Involucra la dispersión o liberación de conidios o de fragmentos de la biopelícula. Las células desprendidas pueden actuar como nuevos propágulos para reiniciar el ciclo ⁴².

1.1.5.1.2.-Formación de biopelículas por dermatofitos

Burkhart *et al.* (2002) ¹⁴ describieron las biopelículas en las infecciones por dermatofitos, haciendo alusión a los dermatofitomas. Esta entidad se manifiesta clínicamente como masas blancas, densas, circunscritas o bien una banda blanca a amarillenta que se extiende del borde distal al proximal, dentro o debajo de la lámina ungueal. Es considerada una forma de onicomycosis refractaria al tratamiento antifúngico de administración bucal. Histológicamente se presenta como masas hiperqueratósicas circunscritas, además de abundantes elementos fúngicos, hifas, artroconidios y en ocasiones clamidoconidios, de apariencia anormal, compactados formando masas fúngicas (posiblemente debido a la presencia de una matriz extracelular) ^{10, 14, 64}. Los dermatofitomas se encuentran adheridos a la lámina ungueal, rodeados por la porción que crece activamente ¹⁴.

Los estudios *in vitro* sobre biopelículas utilizando como modelo los dermatofitos son pocos. Recientemente Costa-Orlandi *et al.* (2014) ²⁰ demostraron la capacidad de

T. rubrum y *T. interdigitale* para formar biopelículas maduras en 72 h, a través de diferentes técnicas de microscopía, ensayos colorimétricos y metabólicos.

Por otro lado, en el estudio de Kaufman *et al.* (2007)⁵³ sobre el proceso de infección de los microconidios de *T. interdigitale* en fragmentos de piel, demostraron la posible formación de una biopelícula, por las características de asociación observadas entre los elementos fúngicos y los tejidos del hospedero durante las fases de adhesión e invasión. En la fase de adhesión a la capa córnea se observó una red de fibrillas cortas que conectaban los elementos fúngicos con la superficie de los tejidos de la piel y fibrillas largas que conectaban los microconidios adyacentes (con una posible comunicación intercelular). Durante la invasión mostraron el crecimiento de una red de hifas ramificadas elongadas que invadían la capa córnea en direcciones no específicas; además de fibrillas delgadas y cortas que conectaban la superficie de los elementos fúngicos con las células del hospedero.

1.2.- Dermatofitosis crónicas

Aunque no existe una definición establecida para el término “dermatofitosis crónica” ésta se describe en términos simples como aquellos pacientes que presentan una infección por dermatofitos caracterizada por lesiones cutáneas poco inflamatorias, una duración superior a 1 mes, con o sin recurrencia a pesar de ser tratados con terapia antifúngica y una reacción de hipersensibilidad retardada negativa a la tricofitina^{11, 23, 37}. En estos casos la cronicidad puede deberse a factores del hospedero, del agente causal, ambientales o farmacológicos²³. Estas infecciones afectan al 20% de los pacientes que se presentan con dermatofitosis, de las cuales el 90% son causadas por *T. rubrum*¹².

Los factores que explican la susceptibilidad del individuo para desarrollar dermatofitosis crónica son microambientes húmedos, cálidos y maceración de la piel, lo que permite el crecimiento favorable, la persistencia fúngica y por ende la enfermedad^{21, 23}. La respuesta inmune en estos individuos podría estar alterada impidiendo la activación de linfocitos T, necesarios en la recuperación de una dermatofitosis, o a través de una fagocitosis deficiente de los elementos fúngicos.

Es fundamental la respuesta del hospedero para reconocer al dermatofito como un invasor extraño y eliminarlo. En la interacción hongo-hospedero durante las infecciones por dermatofitos debe mantenerse un equilibrio entre la patogenicidad del hongo y las defensas del hospedero ¹².

Trichophyton rubrum y *T. tonsurans* están ampliamente adaptados al humano y se ha demostrado la capacidad que presentan para evadir o modular la respuesta inmune, lo que conduce a la permanencia prolongada en el tejido del hospedero, causando dermatofitosis crónicas ¹⁰⁴. Las mananas de la pared celular de *T. rubrum* están involucradas en el fenómeno de inmunosupresión a través de las siguientes vías inmunológicas: 1) reducen la expresión de receptores cruciales en activar la respuesta inmune (TLRs y hBDs) y 2) reducen la proliferación de linfocitos T y su actividad citotóxica. De tal manera que estimulan el desencadenamiento de diversos eventos: disminución en la respuesta inmune citotóxica a través de la evasión de receptores manosa del hospedero; evasión de la fagocitosis por macrófagos debido a la activación de exoantígenos y la capacidad de diferenciarse en hifas dentro de ellos y destruirlos; disminución en la modulación de las MHC clase II y estimulación de la expresión de IL10 (citocina anti-inflamatoria) (Figura 5) ^{11, 12, 16, 22}. Otro evento que cambia es la inhibición en el recambio de las células de la capa córnea, ya sea directamente o por la alteración en la función de los linfocitos, asegurando así su persistencia en el hospedero ⁹⁶.

Las dermatofitosis crónicas son un problema que ha aumentado su frecuencia en la consulta dermatológica debido a su estrecha relación con diversos factores de inmunosupresión, como diabetes mellitus descompensada, infección por virus de inmunodeficiencia (VIH/SIDA), neoplasias, el uso de antiinflamatorios esteroides sistémicos o tópicos y fármacos inmunosupresores (ciclosporina, azatioprina) ⁸⁰. Por otro lado, otras enfermedades dermatológicas que aumentan la susceptibilidad de los individuos para desarrollar infecciones crónicas por dermatofitosis son la dermatitis atópica e ictiosis, por el defecto de barrera y la cantidad excesiva de células queratinizadas, respectivamente ^{21, 71}.

1.2.1.-Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con infecciones crónicas por dermatofitos pueden ser leves o moderadas, con una amplia variedad de expresiones clínicas. Esta variación es el resultado de la respuesta inmune del hospedero a una determinada especie de dermatofito ^{12, 37, 96}.

Tradicionalmente las infecciones causadas por dermatofitos han sido nombradas de acuerdo a la localización anatómica involucrada (cuadro 6). Las manifestaciones clínicas que se presentan en la piel glabra varían ampliamente dependiendo de la relación hongo-hospedero, sin embargo, generalmente se caracterizan por lesiones anulares de bordes elevados, con una triada de manifestaciones: eritema, descamación y prurito ⁵⁷.

Cuadro 6. - Tipos de dermatofitosis crónicas, cuadro clínico y principales agentes causales.

Tipo de dermatofitosis	Cuadro clínico	Agente causal	Referencia
Granuloma de Majocchi	Localización intra/subcutánea caracterizada por placas eritemato-escamosas que exhiben pápulas y pústulas foliculares.	<i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i>	Nenoff <i>et al.</i> (2014) ⁷²
Síndrome de <i>T. interdigitale</i>	Localizada a los pies caracterizada por vesículas (>2mm) en el arco plantar, a los lados de los pies y talón. Onicomiosis superficial blanca.	<i>T. interdigitale</i>	Zaias <i>et al.</i> (2003) ¹⁰⁵
Síndrome de <i>T. rubrum</i>	Afecta al menos cuatro sitios corporales como pies (plantas), manos (palmas), uñas y algún otro sitio con la exclusión del área inguinal.	<i>T. rubrum</i>	Nenoff <i>et al.</i> (2014) ⁷²
De la ingle	Afecta la región inguino-crural, caracterizada por placas eritemato-escamosas, con margen elevado y prurito.	<i>E. floccosum</i> <i>T. rubrum</i>	Bonifaz (2012) ¹³ , Nenoff <i>et al.</i> (2014) ⁷² , Weitzman <i>et al.</i> (1995) ⁹⁹

Continúa abajo

Tipo de dermatofitosis	Cuadro clínico	Agente causal	Referencia
De la mano	Afecta la palma, dorso y regiones interdigitales de la mano, caracterizada por descamación leve a profusa.	<i>T. rubrum</i>	Cafarchia <i>et al.</i> (2013) ¹⁵ , Nenoff <i>et al.</i> (2014) ⁷² , Weitzman <i>et al.</i> (1995) ⁹⁹
De las uñas	Se puede presentar de cuatro formas: blanca superficial, subungueal distal lateral, subungueal proximal o distrófica total. Caracterizada por paquioniquia, onicolísis y cambio de coloración. Dermofitomas caracterizados por bandas blancas a amarillentas o masas blancas circunscritas.	<i>E. floccosum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i>	Burkhart <i>et al.</i> (2002) ¹⁴ , Manzano – Gayosso <i>et al.</i> (2008) ⁶⁰ , Zaias <i>et al.</i> (2003) ¹⁰⁵
De los pies	Afecta pliegues interdigitales con lesiones descamativas, maceración y supurativas, en la cara plantar del pie se caracteriza por hiperquetatosis (mocasín).	<i>E. floccosum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. rubrum</i>	Nenoff <i>et al.</i> (2014) ⁷² , Weitzman <i>et al.</i> (1995) ⁹⁹
Del cuerpo	Afecta tronco, hombros, extremidades y ocasionalmente la cara. Las manifestaciones son similares a la inguinal.	<i>M. audouinii</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i>	López-Martínez <i>et al.</i> (2012) ⁵⁷ , Manzano – Gayosso <i>et al.</i> (2008) ⁶⁰ , Weitzman <i>et al.</i> (1995) ⁹⁹
Incognito o atípica	Las lesiones se caracterizan por poca o nula inflamación y descamación. Pueden presentar infecciones inflamatorias profundas (dermis) o mimetizar otras condiciones dermatológicas (lupus eritematoso, dermatitis por contacto, psoriasis, eczema, rosácea).	<i>M. canis</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i>	Jacobs <i>et al.</i> (2001) ⁴⁸ , Manzano – Gayosso <i>et al.</i> (2008) ⁶⁰

1.2.2.-Epidemiología

Las dermatofitosis son las micosis más frecuentes y constituyen aproximadamente del 20 a 25% de los diagnósticos de la consulta dermatológica ⁵⁷. *Trichophyton rubrum* es el dermatofito que presenta la mayor frecuencia en la población urbana, principalmente como causante de dermatofitosis crónicas. Mundialmente se ha observado un incremento en el aislamiento de esta especie en diferentes formas clínicas: de las uñas del 64.4% a 79.3%, del cuerpo e ingle del 32 a 47%, de la mano del 64.4 a 80% y de los pies del 56.8 a 82.9% ⁷⁸.

Durante los pasados 100 años, el espectro de dermatofitos ha cambiado marcadamente en todo el mundo con diferencias que dependen del área geográfica y otros factores tales como la inmigración. La alta frecuencia de dermatofitosis en ciertas regiones se atribuye a: 1) factores ambientales como alta temperatura (30 – 35°C) y humedad relativa (75 – 100%), las cuales son condiciones favorables para la dispersión y desarrollo fúngico; 2) factores sociodemográficos como estatus socioeconómico bajo, promiscuidad, contacto con animales de compañía y deficientes condiciones de higiene ^{74, 44}.

En México las dermatofitosis constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica ^{8, 58}. Las especies más comunes causantes de estas infecciones son cinco: *T. rubrum* (71.2%), *T. tonsurans* (6.9%), *T. interdigitale* (5.5%), *M. canis* (4.5%) y *E. floccosum* (1.3%). Las formas clínicas más frecuentes de dermatofitosis son de las uñas (59.9%), seguida por la de los pies (24.5%) ⁵⁵.

La dermatofitosis de las uñas es la forma que afecta principalmente a individuos de más de 60 años. La tendencia que se ha observado en este grupo de pacientes se debe a la dificultad en el tratamiento aunado a la elevada tasa de fracaso terapéutico que han presentado, la cual oscila entre el 20-50%. En general la tasa en el cumplimiento del tratamiento ha sido baja (49%), debido al prolongado tiempo de administración de éste y al lento crecimiento de las uñas ¹⁷. La prevalencia de este tipo de infecciones puede variar entre el 2.5 – 16% siendo más alta entre ciertos

grupos de riesgo, como los pacientes diabéticos (33%) y con insuficiencia venosa periférica o alteraciones de la queratinización (psoriasis e ictiosis) ^{44, 59, 71}. El aumento en la frecuencia de infecciones en las uñas en relación con otras formas clínicas de dermatofitosis se debe al incremento en el contacto con las fuentes de infección (piscinas, actividades deportivas, calzado cerrado) y al aumento en la incidencia de diabetes mellitus y enfermedades vasculares ⁷⁴. Por ello son importantes las medidas de tratamiento a las fuentes de infección potencialmente re-infectivas, para evitar el alto riesgo de falla en el tratamiento establecido al paciente ³⁴.

Para lograr un tratamiento más exitoso en las dermatofitosis crónicas deben tomarse en cuenta varios aspectos: 1) las medidas generales para restablecer las condiciones óptimas del área anatómica afectada, 2) el fármaco antifúngico utilizado que sea de amplio espectro para la erradicación del agente causal y 3) restauración de la inmunidad (reactivación de la actividad fagocítica de macrófagos) en el individuo afectado ^{12, 80}.

1.3.-Antifungicos

1.3.1.-Historia

En el siglo XX se hizo el descubrimiento e introducción de los compuestos antifúngicos disponibles hoy en día (Figura 7), con la demostración de la actividad antifúngica de ciertas moléculas. El descubrimiento de éstas inició en 1939 con la griseofulvina, seguida del grupo de los azoles (benzimidazol en 1944, miconazol y clotrimazol en 1969, econazol 1970), los polienos (1949), la cicloheximida también conocida como actidiona y natamicina A (1946), anfotericina B (1950), flucitocina (1973) y amorolfina (1981) ^{40, 72, 76, 83, 93}.

A partir de los 70's se dieron avances en la investigación de nuevos antifúngicos más seguros y de amplio espectro. El lento progreso observado comparado con el desarrollo de los antibacterianos fue por las características de las células fúngicas; que son eucariotas similares a las células de los mamíferos. Por lo tanto, los

fármacos que inhiben la biosíntesis de proteínas, ARN o ADN en hongos presentan gran potencial de toxicidad en las células del hospedero ^{40, 83}.

Para los años de 1980's, cuatro grupos de fármacos antifúngicos fueron identificados: polienos, azoles, morfolinas y alilaminas. Sin embargo, el único fármaco introducido para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas fue ketoconazol (1981). Los avances realizados en los 1990's llevaron a la síntesis de terbinafina (alilamina), para el tratamiento de las dermatofitosis y una nueva formulación lipídica de anfotericina B con mejores perfiles de seguridad. La primera generación de triazoles (fluconazol e itraconazol) estuvo disponible entre 1990 y 1992. La síntesis de equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) y la segunda generación de triazoles (voriconazol, posaconazol e isavuconazol) se llevó a cabo en los años 2000's ^{72, 83}.

El incremento de infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos y la falla terapéutica se han asociado a resistencia clínica o microbiológica. Este fenómeno ha permitido seguir con líneas de investigación enfocadas en la síntesis de antifúngicos nuevos, seguros y más efectivos ^{17, 40}.

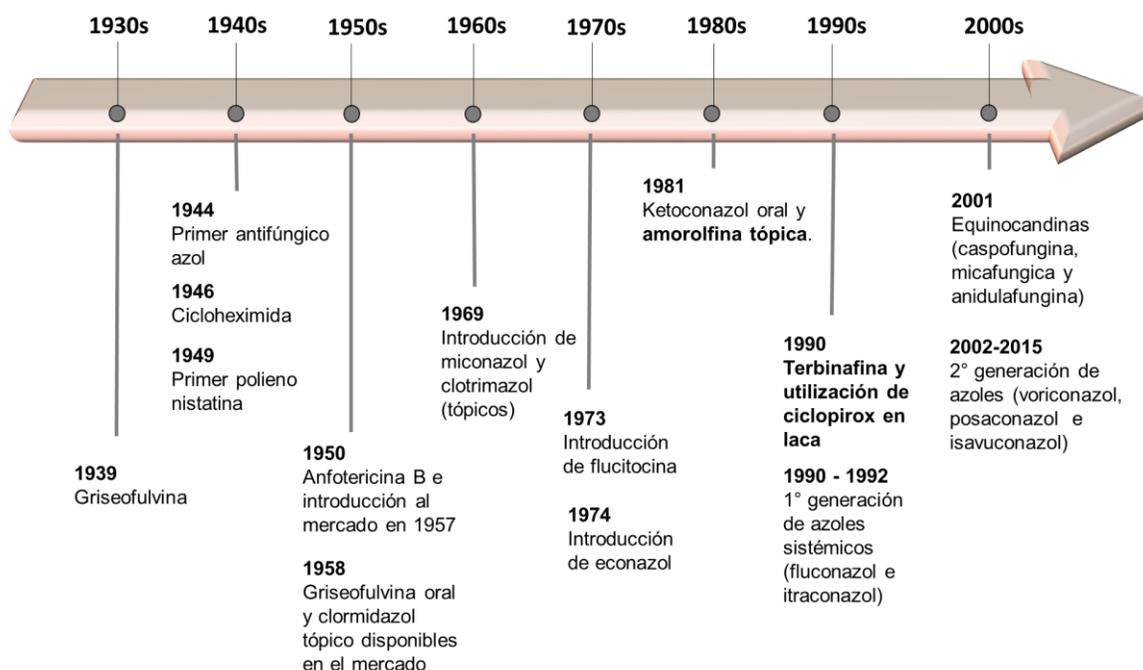


Figura 7.- Eventos clave en el desarrollo de antifúngicos.

1.3.2.- Características de las moléculas y mecanismos de acción

En esta sección se describirán principalmente las características de los antifúngicos relacionados con este estudio. La indicación terapéutica de los antifúngicos de formulaciones tópicas es limitada en las infecciones por dermatofitos y que no afectan grandes áreas. Mientras que los tratamientos sistémicos o combinados son de gran utilidad en el caso de las infecciones diseminadas, extensas, profundas, recidivantes o en los casos severos de afección ungueal ^{17, 99}.

El mecanismo de acción de los azoles (ketoconazol, clotrimazol y miconazol) se basa en la inhibición de la síntesis de ergosterol, principal componente de la membrana plasmática fúngica, a través de la inhibición del citocromo P450, dependiente de la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa (Figura 11). En la última década se ha observado una tendencia al uso de otros antifúngicos (itraconazol, voriconazol, amorolfina, terbinafina y ciclopiroxolamina), debido al amplio número de efectos secundarios, interacciones medicamentosas, baja absorción, recurrencia y altas tasas (20 - 50%) de fracasos terapéuticos observados con los fármacos imidazoles ^{17, 66, 76, 83}.

1.3.2.1.-Terbinafina

La terbinafina (Figura 8) es un miembro de las alilaminas cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ergosterol, al bloquear a la enzima escualeno epoxidasa; enzima independiente del citocromo P450 (Figura 11). El resultado es una deficiencia de ergosterol y una acumulación intracelular de escualeno; lo que se traduce en su acción fungicida y fungistática ^{37, 76}. En el tratamiento de infecciones por dermatofitos, la terbinafina presenta una mayor eficacia frente a *Trichophyton* spp. que frente a *Microsporum* spp. ⁷⁶. Además, exhibe actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram negativas y Gram positivas potencialmente patógenas. La actividad antibacteriana de la terbinafina puede ser una ventaja particular en el tratamiento del intertrigo interdigital de los pies, donde se presenta una asociación compleja de bacterias - hongos ³⁷.

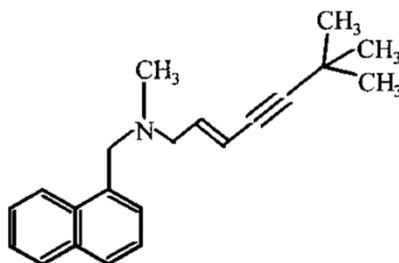


Figura 8.- Estructura química de la terbinafina

La terbinafina es el único miembro de su clase efectiva tanto por vía sistémica como tópica. La presentación en crema al 1% es útil en el tratamiento de las dermatofitosis del cuerpo e intertrigo interdigital del pie (después de terapia tópica de 1 a 2 semanas), en las infecciones crónicas de los pies se aumentan las semanas de tratamiento (de 2 a 6 semanas) ³⁷. La terapia tópica está asociada con altas tasas de curación (44 - 79.3%) y cortos períodos de tratamiento (6 -16 semanas) en comparación con la terapia con azoles ^{17, 74}.

Algunos estudios demostraron la resistencia en algunos dermatofitos frente a terbinafina. Ésta se atribuye a una modificación en la enzima diana, incremento en el flujo del fármaco, adaptación al estrés y sobre-expresión de salicilato mono-oxigenasa ^{64, 73}.

1.3.2.2.-Amorolfina

La amorolfina (Figura 9) es un derivado morfolínico cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del ergosterol con actividad fungicida y fungistática. En presencia de amorolfina, el ignosterol, un esteroide que contiene un doble enlace Δ_{14} , es formado en lugar del ergosterol. Además, en altas concentraciones de este fármaco se ha visto una gran acumulación de escualeno. Por lo tanto, la amorolfina al parecer interfiere con las enzimas Δ_{14} - reductasa y Δ_{7-8} – isomerasa en la ruta de biosíntesis del ergosterol (Figura 11) ³⁷. Su espectro de acción incluye a dermatofitos, levaduras (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Malassezia* spp.), hongos dimórficos (*Coccidioides*, *Histoplasma*, *Sporothrix*), algunos hongos filamentosos (*Scopulariopsis* spp.), hongos dematiáceos (*Alternaria* y *Cladosporium*) y bacterias del orden Actinomycetales ^{76, 93}.

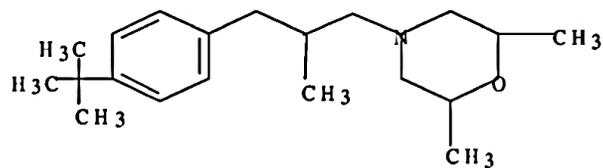


Figura 9.- Estructura química de la amorolfina

La amorolfina se encuentra en presentaciones tópicas de crema (0.25 y 0.5%), spray (0.5 y 2%) y laca al 5% ⁷⁵. Su presentación en laca al 5% es efectiva en las dermatofitosis de las uñas con tasas de curación del 60 – 76%, en un periodo de 3 a 6 meses ¹⁷.

1.3.2.3.- Ciclopiroxolamina

La ciclopiroxolamina (Figura 10) es un derivado de las hidroxipiridonas que ejerce su actividad antifúngica al quelar cationes trivalentes, incluyendo Fe^{3+} y Al^{3+} , lo cual resulta en la inhibición de enzimas dependientes de metales, particularmente citocromos, catalasas y peroxidasas, conduciendo a un transporte reducido de iones a través de las membranas citoplasmáticas de los hongos y a un consumo reducido de nutrientes ⁹³. Además, al bloquear el transporte transmembranal de precursores radioactivos, previene la incorporación de éstos a proteínas, ARN y ADN, interfiriendo así con su síntesis (Figura 11) ³⁹. En las células del hospedero, la ciclopiroxolamina inhibe la cascada del ácido araquidónico, lo cual resulta en su actividad anti-inflamatoria. Es activo frente a dermatofitos (aunque menos activo que la terbinafina), levaduras (*Candida* spp., *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*), mohos (*Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium solani*) y secundariamente frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas ^{39, 76, 89, 93}. Su actividad antibacteriana es particularmente benéfica en el tratamiento de infecciones asociadas.

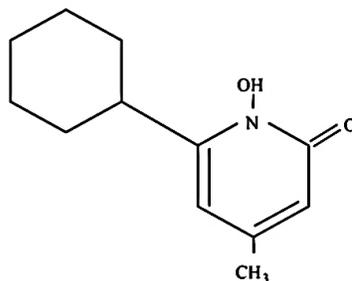


Figura 10.- Estructura química de la ciclopiroxolamina

La ciclopiroxolamina tiene varias formulaciones tópicas, disponibles para administración tanto en piel como en uñas; crema (0.77-1%), laca (8%), spray (1%), suspensión (0.77%), champú (1%) y gel (0.77%) ^{39, 89, 93}. Los rangos de curación micológica en las dermatofitosis de las uñas es entre el 29-36%, alcanzados con la formulación en laca al 8% en periodos de tratamiento de 48 semanas ¹⁷. En el caso del uso de crema (1%) en la piel glabra se han observado tasas de curación que varían del 35 al 90% en periodos de 2 semanas a 3 meses ⁸⁹. La carencia de efecto de bombas de resistencia al fármaco puede permitir el uso de ciclopiroxolamina por tiempo prolongado sin reducción significativa de su eficacia antifúngica y antibacteriana ³⁹.

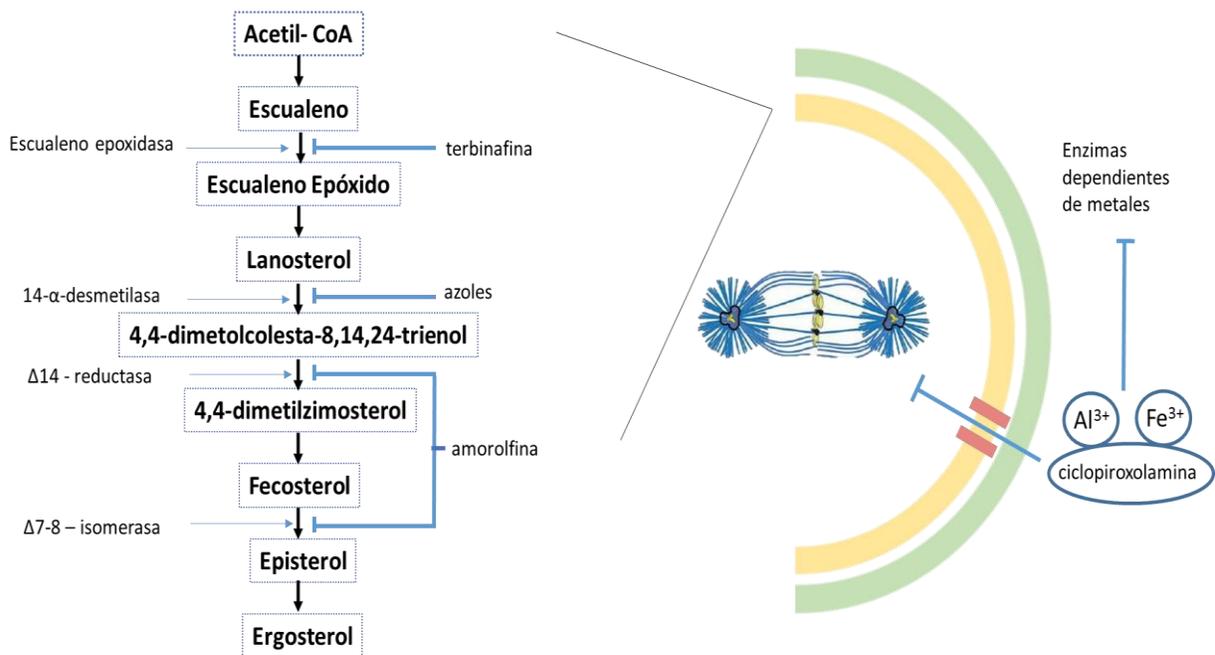


Figura 11.- Mecanismos de acción de los antifúngicos

1.3.3.-Resistencia a antifúngicos

En la última década la resistencia antifúngica emergió debido al uso prolongado de agentes antifúngicos en micosis cutáneas. La resistencia antifúngica puede ser clínica, microbiológica o una composición de las dos. La resistencia clínica se define como la persistencia o progresión de una infección debido a una falla en la

erradicación del microorganismo, a pesar de una adecuada administración del antifúngico. Las fallas pueden ser atribuidas a un diagnóstico incorrecto, interacción con otros fármacos y una dosis o duración sub-óptima de la terapia. Una respuesta clínica exitosa a la terapia antifúngica depende no solamente de la susceptibilidad del organismo patógeno, sino también del sistema inmune del hospedero, la penetración y distribución del fármaco, la cooperación del paciente, y la ausencia de un foco de infección persistente ²³.

La resistencia microbiológica primaria o intrínseca es encontrada naturalmente entre ciertos hongos sin una exposición previa al fármaco. Mientras que la resistencia secundaria se desarrolla entre aislados expuestos previamente al antifúngico y generalmente depende de la alteración en la expresión de genes (Erg11, TruMDR1, TruMDR2) ^{23, 64, 73}.

Los mecanismos bioquímicos de los hongos que contribuyen al fenotipo de resistencia a los fármacos son: 1) decremento o disminución de la introducción del fármaco a la célula fúngica (cambios en permeasas de membrana); 2) alteraciones estructurales en el sitio diana; 3) incremento en el flujo del fármaco (por sobre-expresión de transportadores de bombas de flujo TruMDR1 y TruMDR2) o 4) una combinación de éstos en niveles de dianas intracelulares ^{23, 40}. Desde un punto de vista molecular, estos cambios bioquímicos pueden resultar de una amplificación, transferencia o delección de genes, mutaciones puntuales, pérdida de elementos regulatorios en funciones cis o trans y activación transcripcional ²³.

Otro mecanismo de resistencia ha sido atribuido a la producción de biopelículas, las cuales confieren resistencia, tanto a las defensas del hospedero como a los fármacos antifúngicos ^{23, 25}. La resistencia de las biopelículas fúngicas incluye mecanismos de la matriz extracelular, actividad de bombas de flujo, células persistentes que fungen como reservorio y a partir de las cuales se puede desarrollar nuevamente la infección, densidad celular, sobre-expresión de dianas de antifúngicos, respuestas de estrés y la fisiología general de la célula ⁷⁷.

2.- Planteamiento del problema

Las dermatofitosis son un problema de salud pública que afecta al 20 - 25% de la población mundial. En los últimos años se ha dado un aumento en el número de casos de dermatofitosis que pasan a un estado crónico, de las cuales *T. rubrum* representa el principal agente causal. En general, las formas clínicas crónicas están asociadas a pacientes inmunocomprometidos, o que presentan lesiones extensas persistentes y con resistencia (clínica o microbiológica) a los tratamientos antifúngicos. La cronicidad y la resistencia son eventos posiblemente relacionados con la formación de biopelículas. Estos hallazgos han llevado a fallas en los tratamientos establecidos, con exposición prolongada al antifúngico y altos costos. Ante la evidencia de las bajas tasas de curación y el aumento en los efectos adversos presentados por los fármacos de uso clínico común (griseofulvina e imidazoles) se han desarrollado antifúngicos con diferentes mecanismos de acción, que tengan menor toxicidad y mejor actividad contra el hongo. A pesar de los avances tecnológicos aún no se ha establecido cual es el mecanismo que explica la interacción hongo-hospedero en las infecciones crónicas. Por lo anterior es pertinente determinar la identidad de las especies de dermatofitos causantes de estas infecciones. La diversidad fenotípica de *T. rubrum* podría estar relacionada con el patrón de sensibilidad a los antifúngicos o cronicidad de las infecciones. Por lo que es necesario establecer el perfil de sensibilidad presentado por los agentes causales de dermatofitosis crónica a distintos fármacos de reciente introducción. De la misma forma es importante evaluar la capacidad de estos hongos como formadores de biopelículas y relacionarlo con el perfil de sensibilidad con la finalidad de tener estrategias profilácticas y terapéuticas para este tipo de infecciones.

3.- Objetivo general

Caracterizar las especies de dermatofitos y variedades de *Trichophyton rubrum* causantes de infecciones crónicas en el humano, su capacidad de formar biopelículas y su patrón de sensibilidad a tres antifúngicos.

4.- Objetivos particulares

Identificar los aislados de dermatofitos y variedades de *Trichophyton rubrum* obtenidas de pacientes con dermatofitosis crónica por sus características fenotípicas y pruebas fisiológicas.

Valorar el perfil de sensibilidad antifúngica de cada uno de los dermatofitos aislados frente a terbinafina, amorolfina y ciclopiroxolamina.

Demostrar la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* por los aislados de dermatofitos a través de la observación morfológica y cuantificación de la biomasa y de la matriz extracelular.

5.- Material y método

5.1.- Aislados

Dieciocho aislados clínicos de dermatofitos causantes de infección crónica fueron incluidos en el estudio, así como una cepa control de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533. Los diferentes aislados fueron obtenidos de los pacientes atendidos en los hospitales Darío Fernández, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE); Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Laboratorio de Micología Médica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Anexo 1).

Los parámetros que se consideraron para incluir a los aislados obtenidos de pacientes con dermatofitosis crónica fueron aquellos que presentaran dos o más de los siguientes criterios: infección mayor de un mes de evolución, diseminada a dos o más regiones corporales, falla en la respuesta al tratamiento antifúngico establecido y reactivación de la infección. De cada paciente se realizó una hoja de registro con los siguientes datos: edad, género, tiempo de evolución de la enfermedad, localización topográfica de la lesión, manifestaciones clínicas, tratamiento antifúngico previo, enfermedades y tratamientos asociados (Anexo 2)

5.1.1- Cultivo y purificación de aislados

De cada paciente se tomó muestra de escamas de piel o uñas, que fueron procesadas en el laboratorio de Micología Médica por medio de un estudio micológico, el cual incluyó: 1) examen directo con hidróxido de potasio (KOH) al 20%; algunas escamas se colocaron sobre un portaobjetos, se añadió 1 gota de KOH a 20%, se colocó un cubreobjetos y se visualizó bajo el microscopio óptico para la búsqueda de hifas y/o artroconidios. 2) Cultivo en agar dextrosa Sabouraud (ADS) y en ADS adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (ADS-A); cada muestra fue sembrada por picadura en los medios de cultivo, las placas fueron incubadas a 28°C durante 7 a 14 días. De cada aislado se realizaron cultivos monospóricos; las colonias fúngicas fueron cosechadas con ayuda de un asa micológica estéril y se colocaron en tubos de 5 mL que contenían solución salina al

0.95%, se agitaron en el vórtex para separar los conidios de las hifas. Posteriormente se colocaron 2 µL de la suspensión en placas de ADS-A y se sembraron por estría cerrada en cuatro direcciones con un asa bacteriológica estéril. Las placas fueron incubadas a 28°C, con revisión diaria, hasta la observación de colonias fúngicas de aproximadamente 2 - 3 mm de crecimiento. Una colonia filamentosa aislada fue seleccionada y transferida con una aguja de disección a una placa con ADS-A. Se incubó a 28°C durante 7 a 14 días hasta su crecimiento. Lo anterior con la finalidad de asegurar la purificación de cada uno de los aislados.

5.1.2.- Identificación de dermatofitos y variedades de *T. rubrum*

Para la identificación del género y especie de los dermatofitos se valoraron las características morfológicas macro y microscópicas que presentaban los aislados en diferentes medios de cultivo que estimulan la producción de conidios y pigmento: agar peptona al 1% (AP), agar avena sales (AAS), agar tierra pelos (A-TP), agar ácido casimino (AAC), agar Gorodkova (AG), agar extracto de carne dextrosa (AEC-D), agar harina de maíz dextrosa (AHM-D) y agar lactrimel (AL). Para las pruebas fisiológicas se utilizaron agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol (AG - BCP), agar urea de Christensen (AUC) y la prueba de perforación de pelo *in vitro* (Anexo 4).

Para la identificación de variedades de *T. rubrum* se siguieron los lineamientos establecidos en el esquema de Kaminski, el cual se basa en el uso de diversos medios y pruebas fisiológicas⁵⁰.

5.1.2.1.- Fundamento de los medios y pruebas fisiológicas

Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol

Este medio de cultivo es utilizado para: 1) la delineación de especies de acuerdo a las diferencias en la disociación de proteínas (el rompimiento de la caseína libera iones amonio que alcalinizan el medio, evidenciado a través del cambio de coloración de azul a púrpura); 2) la detección de contaminación bacteriana que pueda suprimir el crecimiento de los dermatofitos; 3) la producción de pigmento por las colonias de algunas variedades de *T. rubrum*; 4) la producción de macroconidios

por *M. canis* y especies de *Trichophyton* y 5) la delimitación de especies por la tasa de crecimiento, debido a la supresión en el crecimiento de especies del complejo *T. rubrum* por la presencia de glucosa ^{52, 90, 91}.

Agar urea de Christensen

Algunos dermatofitos tienen la capacidad de hidrolizar la urea a través de la actividad de ureasa. El rompimiento de la urea libera iones amoniacos, los cuales modifican el pH del medio, evidenciado por el viraje de color amarillento (pH ácido) a rosa fucsia (pH alcalino). Esta prueba es comúnmente utilizada para diferenciar *T. rubrum* (ureasa negativa) de *T. interdigitale* (ureasa positiva) entre los 4 a 7 días de incubación a 28°C ⁷⁵.

Prueba de perforación del pelo *in vitro*

Algunos dermatofitos son capaces de penetrar e invadir la vaina del pelo por producir órganos perforantes especializados, mientras que otras especies se adhieren al pelo por simple erosión de la cutícula. Esta prueba permite diferenciar los aislados de *T. rubrum* tipo “downy” típica (sin órganos perforantes) de los aislados atípicos (pleomórficos) de *T. interdigitale* que producen órganos perforantes entre 7 y 14 días. Además, estimula la conidiación ⁷⁵.

ADS adicionado con 3-5% de cloruro de sodio (ADS-NaCl)

La adición del 3 al 5% de NaCl al ADS permite la identificación de dermatofitos de acuerdo a su tolerancia al compuesto. El ADS-NaCl 3% también es útil para la identificación de aislados atípicos de *E. floccosum*; este medio se recomienda para la conservación, ya que retarda la degeneración de esta especie. Otra ventaja de la adición de NaCl es la estimulación de producción de macroconidios en tres dermatofitos: *M. audouinii*, *T. interdigitale* y *M. persicolor* ⁵².

Agar Littman Oxgall (ALO)

Este medio reduce el diámetro de las colonias fúngicas e inhibe el crecimiento de bacterias contaminantes, facilitando el desarrollo de los hongos de lento

crecimiento. El esquema de Kaminski, es útil para diferenciar las variedades de *T. rubrum* tipo granuloso y “downy”⁵⁰.

Agar avena-sales, agar lactrimel, agar peptona al 1%, agar ácido casimino, agar extracto de carne dextrosa, agar harina de maíz dextrosa y agar Gorodkowa.

Estos siete medios de cultivo favorecen la conidiación en los aislados atípicos y estimulan la producción de pigmento. Algunos son útiles en la identificación de variedades de *T. rubrum* de acuerdo al esquema de Kaminski^{50, 52}.

5.2.- Prueba de sensibilidad antifúngica

Para las pruebas de sensibilidad *in vitro* de los diferentes dermatofitos aislados frente a terbinafina (TRB), amorolfina (AMR) y ciclopiroxolamina (CPX), se siguieron los lineamientos del documento M38-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, siglas en inglés)¹⁹. Todos los procedimientos se llevaron a cabo por duplicado.

5.2.1.- Solución madre de los antifúngicos

La solución madre de cada uno de los antifúngicos se preparó disolviendo la cantidad correspondiente de cada uno de ellos, en el solvente adecuado para llegar a una concentración final de 16 µg/mL. En el caso de TRB y AMR el solvente utilizado fue dimetil-sulfoxido (DMSO), mientras que la CPX fue disuelta en agua mili-Q. Cada solución fue esterilizada con unidades filtro de 0.22µm y conservadas a -20°C hasta su utilización.

5.2.2.- Caldo RPMI 1640

El medio utilizado para las pruebas de sensibilidad antifúngica por microdilución en caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 con L- glutamina sin bicarbonato de sodio y el amortiguador ácido 3-(N-morfolino-propanosulfónico) (MOPS) a un pH de 7 (anexo 3). Este medio ha sido recomendado para las pruebas de sensibilidad, ya que no tiene un efecto antagónico con los agentes antifúngicos¹⁹.

5.2.3.- Preparación de diluciones de antifúngicos

Las diluciones seriadas fueron preparadas de acuerdo al procedimiento establecido en el documento M38-A2 del CLSI. Los rangos de concentración de los tres antifúngicos fue de 16 a 0.03 µg/mL, posteriormente se hizo una dilución 1:50 en medio RPMI para el llenado de las placas de 96 pozos y se distribuyeron en las columnas (1- 10) de la placa de manera decreciente. La secuencia del procedimiento se muestra en la figura 12 para AMR y TRB y en la figura 13 para CPX.

5.2.4.- Preparación de microplacas con antifúngicos

Se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos con fondo cóncavo distribuidos en 12 columnas y 8 filas. El llenado de las placas se realizó de izquierda a derecha. Para ello se depositaron 100 µL de cada una de las diluciones de antifúngicos preparadas previamente de la columna 1 a la 10, disminuyendo su concentración sucesivamente. De tal forma que la columna 1 tuviera la mayor concentración y la columna 10 la menor. Los pozos de la columna 11 fueron el control de crecimiento (CC) y los de la columna 12 el control de esterilidad (CE), en ellos se depositaron 100 µL de medio RPMI 1640 sin antifúngico. Las microplacas se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

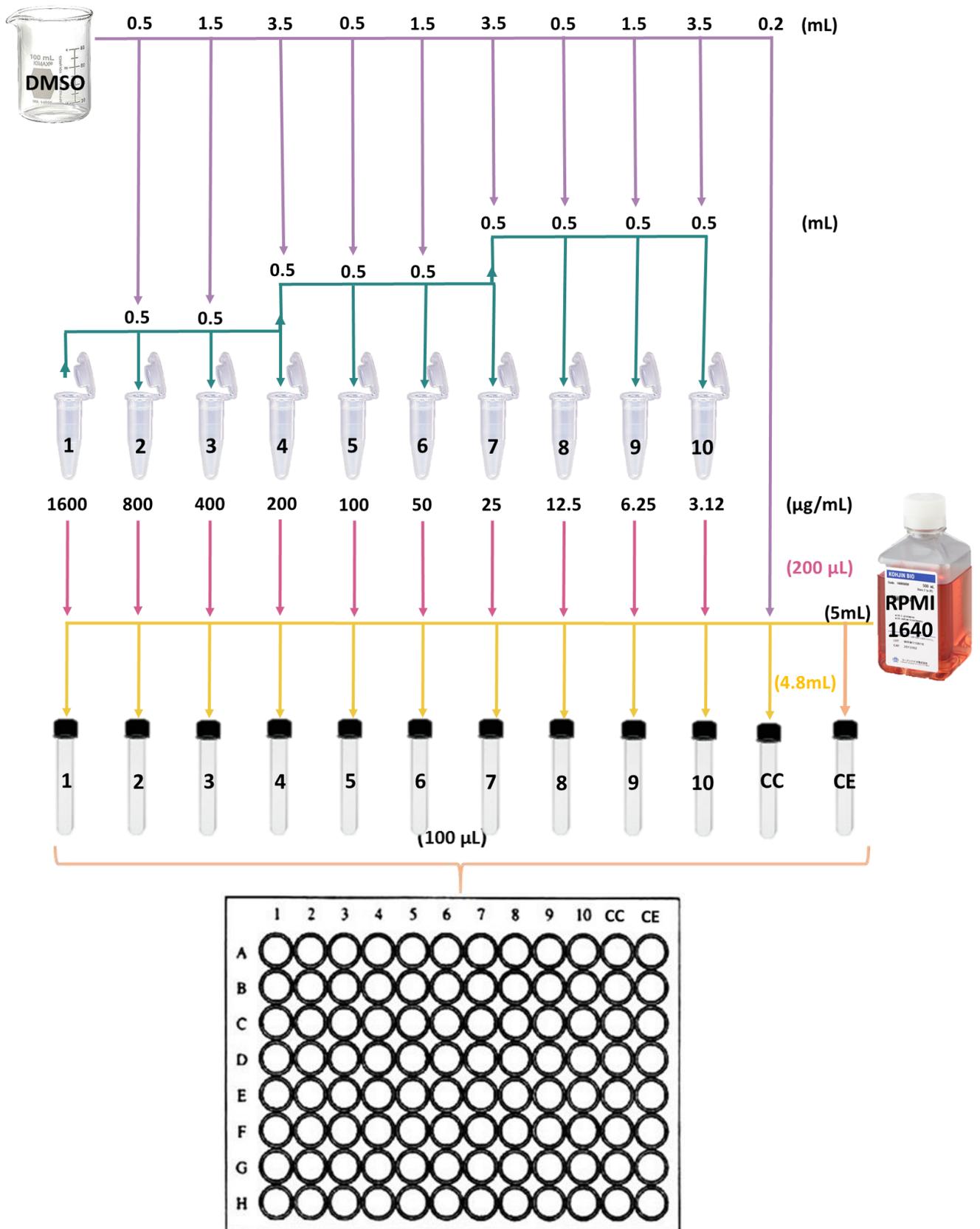


Figura 12.- Antifúngicos insolubles en agua (amorolfina y terbinafina). Diluciones correspondientes, concentraciones y disposición en la microplaca. Control de calidad (CC) y control de esterilidad (CE).

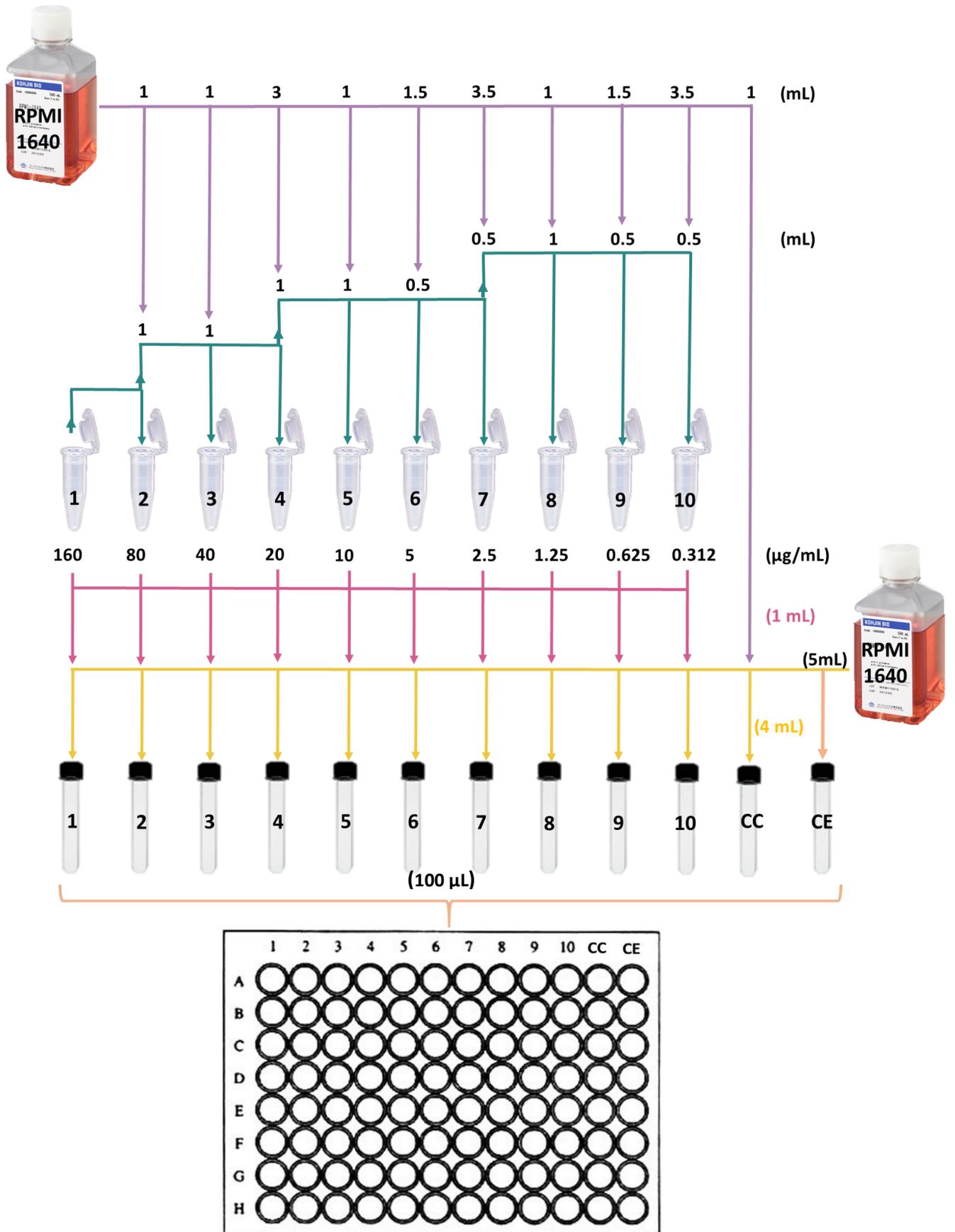


Figura 13.- Antifúngicos solubles en agua (ciclopiroxolamina). Diluciones correspondientes, concentraciones y disposición en la microplaca. Control de calidad (CC) y control de esterilidad (CE).

5.2.5.- Preparación de los inóculos

La suspensión inóculo de cada aislado se obtuvo a partir del crecimiento colonial de 10 a 14 días en tubos con AL. La preparación del inóculo se realizó agregando 2 mL de solución NaCl al 0.95% a los tubos y removiendo suavemente la superficie de la colonia con ayuda del asa bacteriológica. Un mL de la suspensión de conidios fue cosechado con una pipeta Pasteur estéril y colocada en tubos estériles de 1.5 mL. Los tubos se dejaron reposar 10 min para la precipitación de las partículas más pesadas. Posteriormente se contaron los conidios con una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. El volumen del inóculo fue aforado a 5 mL y posteriormente diluido en RPMI 1640 para obtener una concentración final de 1×10^3 UFC/mL. Se agitó por 15 seg con el vórtex para homogeneizar la suspensión. Finalmente 100 μ L de cada una de las suspensiones del aislado problema se distribuyeron de la fila "C a la H". *Candida parapsilosis* ATCC 29019 y *C. krusei* ATCC 6258 fueron utilizadas como control de calidad del método. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48h y posteriormente 5 días a 28°C.

5.2.6.- Unidades formadoras de colonias (UFC)

Para verificar la concentración de la suspensión inóculo se tomaron 2 μ L de la suspensión 1×10^6 UFC/mL y se sembraron por estría cerrada en cuatro direcciones sobre las placas de ADS. Las placas se incubaron a 28°C de 7 a 10 días después de los cuales se contaron las UFC.

5.2.7.- Lectura de las placas de sensibilidad

La lectura de las placas de sensibilidad se realizó de manera visual con un espejo invertido a las 24 y 48 h para el caso de las cepas de control de calidad del método y 7 días para el caso de los dermatofitos. En cada lectura se verificó la ausencia de crecimiento fúngico en los pozos de la columna 12 (CE) y el crecimiento en la columna 11 (CC). A los siete días se realizó lectura de la microplaca con el espectrofotómetro (Dynex MRX II) a una densidad óptica (DO) de 405 nm.

5.2.7.1.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI fue determinada como la mínima concentración del fármaco a la que se produjo una inhibición del 90% del crecimiento fúngico. Actualmente no existen puntos de corte definidos para los fármacos AMR, TRB y CPX, pero con base en diversos estudios *in vitro* en aislados clínicos, se consideró la CMI ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, sensible; 2 $\mu\text{g/mL}$, intermedia y ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, resistente ⁵⁷.

5.2.7.2.-Concentración mínima fungicida (CMF)

Para estimar la CMF de cada aislado frente a los diferentes fármacos se tomaron 2 μL del contenido de los pozos de cada aislado correspondientes a la inhibición del fármaco. Las muestras se sembraron por estría cerrada, en placas de ADS previamente marcadas, en sentido de las manecillas del reloj. El primer cuadrante correspondió al último pozo en el que se observó crecimiento y los tres siguientes del proceso de inhibición. Las placas se incubaron de 7 a 10 días a 28°C. Posteriormente se contaron el número de UFC correspondientes a cada cuadrante. La CMF se determinó como la mínima concentración del fármaco a la que se produjo un efecto fungicida, establecido como el último cuadrante de la placa en el que se registró el crecimiento de 3 o menos colonias y se comparó con la dilución correspondiente.

5.3.- Formación de Biopelículas

Para evaluar la formación de biopelículas en los dermatofitos se siguieron los procedimientos descritos por Mowat *et al.* (2007) ⁶⁷ y Costa- Orlandi *et al.* (2014) ²⁰. Para evaluar la formación de biopelículas se realizaron: A) observación de las características morfológicas y B) evaluación de la masa de la biopelícula y la matriz extracelular. Todos los procedimientos se llevaron a cabo por duplicado.

5.3.1.- Preparación del inóculo

La reactivación de los aislados se realizó a partir de resiembras consecutivas cada 7 días en ADS, ATP y AL, sucesivamente ⁶¹, con el fin de promover la esporulación y facilitar la obtención de conidios necesarios para lograr la concentración deseada

del inóculo. Para la preparación del inóculo se partió de cultivos de 7 a 10 días de crecimiento (dependiendo de la especie) en tubos con AL incubados a 28°C. A cada tubo del aislado problema se le agregaron 5 mL de tampón de fosfatos salinos (PBS) 0.01M (pH 7.2), con ayuda del asa micológica se removió suavemente para facilitar la separación de conidios. La suspensión fue cosechada con pipetas Pasteur de 1 mL y colocada en tubos estériles de 5 mL. Los conidios fueron contados con cámara de Neubauer y la suspensión fue ajustada con medio RPMI a una concentración final de 1×10^6 UFC/mL.

5.3.2.- Fase de preadhesión

El ensayo de formación de biopelículas se realizó en placas de 6 pozos, de los cuales 5 fueron utilizados para la evaluación de diferentes aislados y el sexto pozo como control blanco. En cada ensayo se utilizaron tres placas, una por cada prueba: 1) morfología de la biopelícula; 2) masa de la biopelícula y 3) matriz extracelular. La placa para evaluar morfología se preparó previamente con cubreobjetos estériles de 22 mm. Para la fase de preadhesión se agregaron 2 mL del inóculo a un pozo de cada placa y se incubó 3 h sin agitación a 37°C. El sobrenadante fue removido de cada pozo y las células fueron lavadas suavemente tres veces con 1000 μ L de PBS 0.01M (pH 7.2), con el fin de remover las células no adheridas. Finalmente, a cada pozo se le agregó 3000 μ L de caldo RPMI 1640 - 2% de glucosa a cada pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C por 72 h en agitación de 100 rpm.

5.3.3.- Evaluación morfológica de la formación de biopelículas

Los cubreobjetos de cada pozo de la placa de morfología fueron lavados por triplicado con 1000 μ L de PBS 0.01M (pH 7.2), con la finalidad de remover las células no adheridas. Después de dejar secar a temperatura ambiente, 400 μ L de cristal violeta (CV) (0.4%) fueron agregados a cada cubreobjetos, durante 45 min. El exceso de colorante fue removido mediante tres lavados con 1000 μ L de agua destilada. Para la observación de las biopelículas formadas, los cubreobjetos fueron colocados en portaobjetos y visualizados en un microscopio invertido (Olympus IX70).

5.3.4.- Cuantificación de la masa de biopelículas con cristal violeta

Los pozos de cada placa fueron lavados por triplicado con 1 mL de PBS 0.01M (pH 7.2), con la finalidad de remover las células planctónicas. Después de dejar secar a temperatura ambiente, 400 μ L de solución de CV al 0.4% fueron adicionados a cada pozo por 5 min. Los pozos fueron lavados de 3 a 4 veces con agua destilada estéril para remover el exceso de colorante. Las biopelículas fueron desteñidas por la adición a cada pozo de 1000 μ L de solución de etanol al 95% durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente la solución de etanol fue suavemente homogeneizada hasta solubilizar completamente el colorante. La DO de la solución resultante fue leída en un espectrofotómetro (Jenway Genova) a una longitud de onda de 570 nm. Los valores de absorbancia fueron proporcionales a la cantidad de biomasa de la biopelícula, la cual incluye hifas y material polimérico extracelular (a mayores cantidades de material biológico, mayores niveles de absorbancia) ⁷⁰. Los aislados fueron considerados como buenos o malos formadores de biopelículas de acuerdo al valor de la media (\bar{x}) (por arriba de la \bar{x} : buenos formadores; por debajo de la \bar{x} : malos formadores).

5.3.5.- Cuantificación de la matriz extracelular de biopelículas con safranina

Después de las 72 h de incubación los pozos de cada placa fueron lavados por triplicado con 1 mL de PBS 0.01M (pH 7.2), con el fin de remover las células en suspensión. Después de dejar secar a temperatura ambiente, 400 μ L de solución de safranina (SFR) al (0.1%) fue adicionado a cada pozo por 5 min. Después de dicho tiempo cada pozo fue lavado suavemente con 1000 μ L de agua destilada hasta que el sobrenadante saliera claro (aproximadamente 6 lavados). La densidad óptica de la solución resultante fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

5.4.- Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando ANOVA de una y dos vías, comparaciones múltiples con la prueba de Tukey y coeficiente de correlación de Pearson con el software GraphPad Prism 6. Los valores de $p < 0.05$ (ANOVA) fueron considerados como estadísticamente significativos y los valores de 1 o cercanos a 1 (Pearson) fueron considerados como correlación positiva.

6.- Resultados

6.1.- Variables epidemiológicas de los pacientes

De los 17 pacientes con dermatofitosis crónica incluidos en este estudio, uno fue excluido por pérdida del aislado fúngico. De los 16 pacientes, el 43.75% correspondieron al género femenino y 56.25% al masculino. La edad promedio fue de 42.18 años con un rango de 19 a 84 años (Figura 14). El tiempo de evolución de las lesiones varió de 1 a 168 meses, con un promedio de 55.8 meses (Figura 15). En la figura 16 se muestran algunos ejemplos de la localización anatómica de las lesiones en los pacientes con dermatofitosis crónica. La principal topografía afectada fue las uñas de los pies (31.25%), seguida de las formas diseminadas a dos o más áreas anatómicas (25%). Otras localizaciones fueron pies (18.75%), mama (6.25%), muslo (6.25%), glúteo (6.25%) e ingle (6.25%). Once de los 16 pacientes (68.75%) recibieron tratamiento previo con antifúngicos; de éstos el 18.18% tratamiento combinado (ketoconazol con miconazol y ketoconazol con itraconazol), mientras que el 81.82% recibió tratamiento único. De este último el 33.33% de los pacientes recibió tratamiento con miconazol, el 22.22% con terbinafina y el 11.11% cada uno con ketoconazol, itraconazol, voriconazol y antifúngico tópico no especificado. Las enfermedades asociadas a los pacientes con dermatofitosis crónica fueron principalmente diabetes mellitus tipo 2 (60%), seguido por dermatitis atópica (10%), celulitis (10%), traumatismos en la uña (10%) e infecciones bacterianas (10%) (Anexo 1).

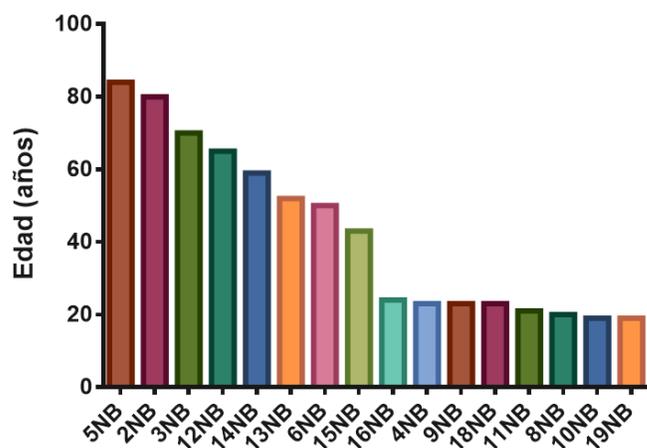


Figura 14. - Edades de los pacientes con dermatofitosis crónica incluidos en el estudio.

NB: corresponde a la clave del aislado.

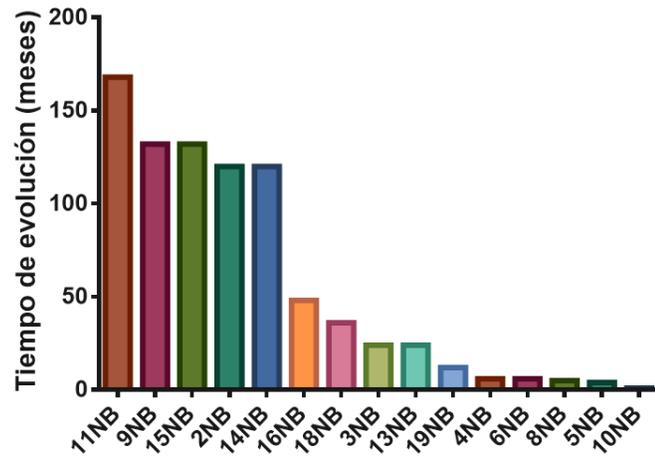


Figura 15.- Tiempo de evolución de la dermatofitosis crónica en los pacientes incluidos en el estudio.



Figura 16.- Localización anatómica de las lesiones presentadas por los pacientes con dermatofitosis crónica: A) pies (12NB); B) cara externa del muslo (13NB); C y D) diseminado a ingle, muslo y pies (3NB(A) y 3NB(B)); E) abdomen (4NB) y F) uñas (9NB).

6.2.- Aislados

6.2.1.- Especies identificadas

De los diecisiete aislados obtenidos se identificaron diversas especies del género *Trichophyton*. De éstas, diez fueron *Trichophyton rubrum* (58.82%), cuatro *T. tonsurans* (23.53%) y tres *T. interdigitale* (17.65%) (Figura 17). De las variedades de *T. rubrum*, nueve de los aislados se incluyeron en el tipo “downy”, de los cuales ocho fueron variedad “Y” y uno variedad “flava” (Anexo 3). Las características morfológicas macro, microscópicas y tres pruebas fisiológicas (AUC, AG-BCP y prueba de perforación de pelo *in vitro*) de las especies identificadas y variedades de *T. rubrum* se observan en las figuras 18 y 19, respectivamente. Las características morfológicas de uno de los aislados de *T. rubrum* (13NB) no coincidió con ninguna de las variedades propuestas en el esquema de Kaminski. El aspecto de las colonias fue aterciopelado, con pigmento rosa-salmón al anverso en ADS, el tiempo de crecimiento de 7 a 10 días, mínimo desarrollo en ADS con NaCl al 5%, ausencia de pigmento en agar peptona al 1%. La prueba de urea fue parcialmente positiva a los 14 días. Microscópicamente presentó numerosos conidios, variación en el tamaño y forma de los microconidios, los extremos de las hifas semejantes a macroconidios y abundantes cadenas de clamidoconidios en AT (Figura 20).

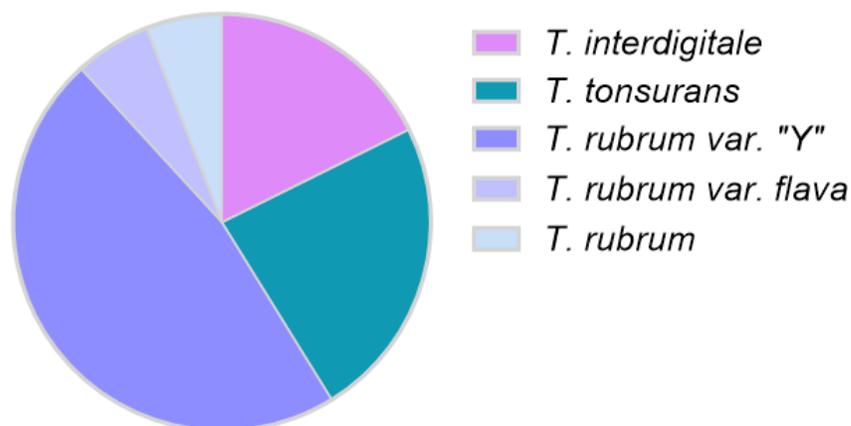


Figura 17.- Porcentaje de las diferentes especies identificadas de dermatofitos y variedades de *T. rubrum*.

Trichophyton tonsurans *Trichophyton interdigitale*

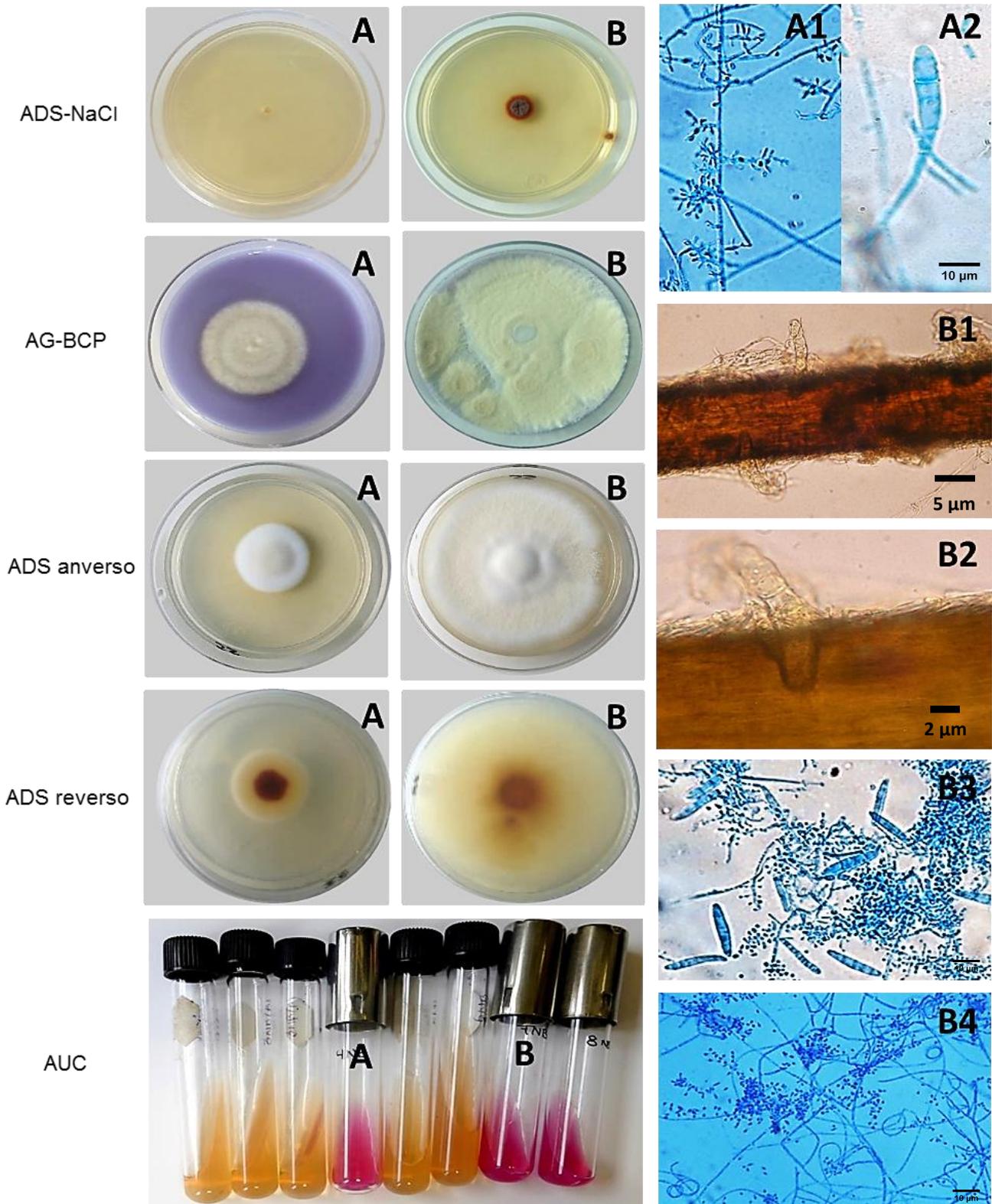


Figura 18.- Características morfológicas de A) *Trichophyton tonsurans* y B) *Trichophyton interdigitale* en los diferentes medios y pruebas fisiológicas utilizados para su identificación. Imágenes microscópicas: A1) Microconidios piriformes dispuestos en cruz en AL. A2) Macroconidio alargado en AL. B1 y B2) Cuerpos perforantes en prueba de perforación de pelo *in vitro*. B3) Macroconidios en ADS. B4) Hifas en espiral y racimos de microconidios esféricos en ADS.

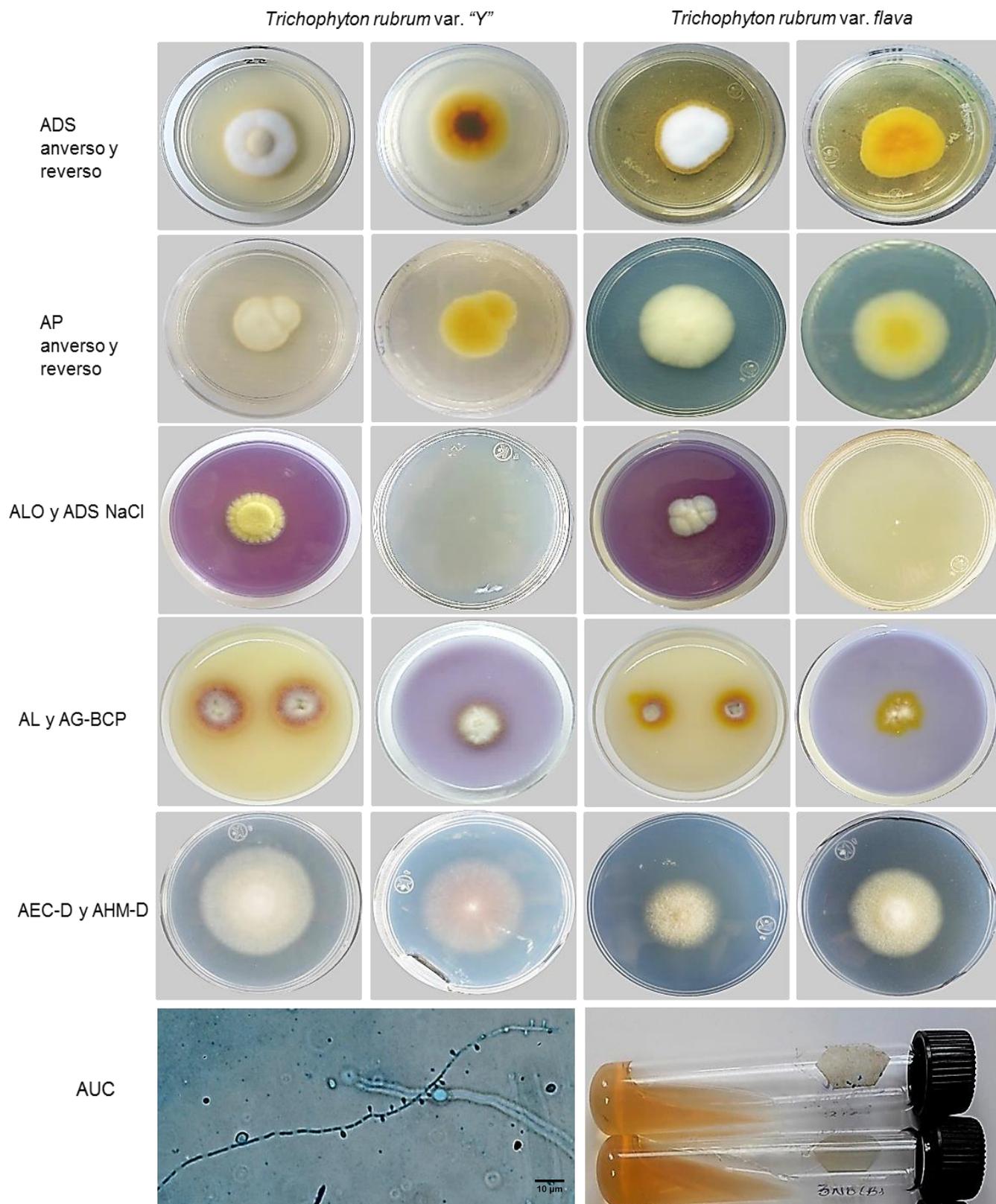


Figura 19.- Características morfológicas macro y microscópicas de A) *Trichophyton rubrum* var. "Y" y B) *Trichophyton rubrum* var. *flava* en los diferentes medios y pruebas fisiológicas utilizados para su identificación. Imagen microscópica muestra escasos microconidios piriformes, alternados a lo largo de la hifa, de *T. rubrum* tipo "Downy" en ADS.

Trichophyton rubrum (13NB)

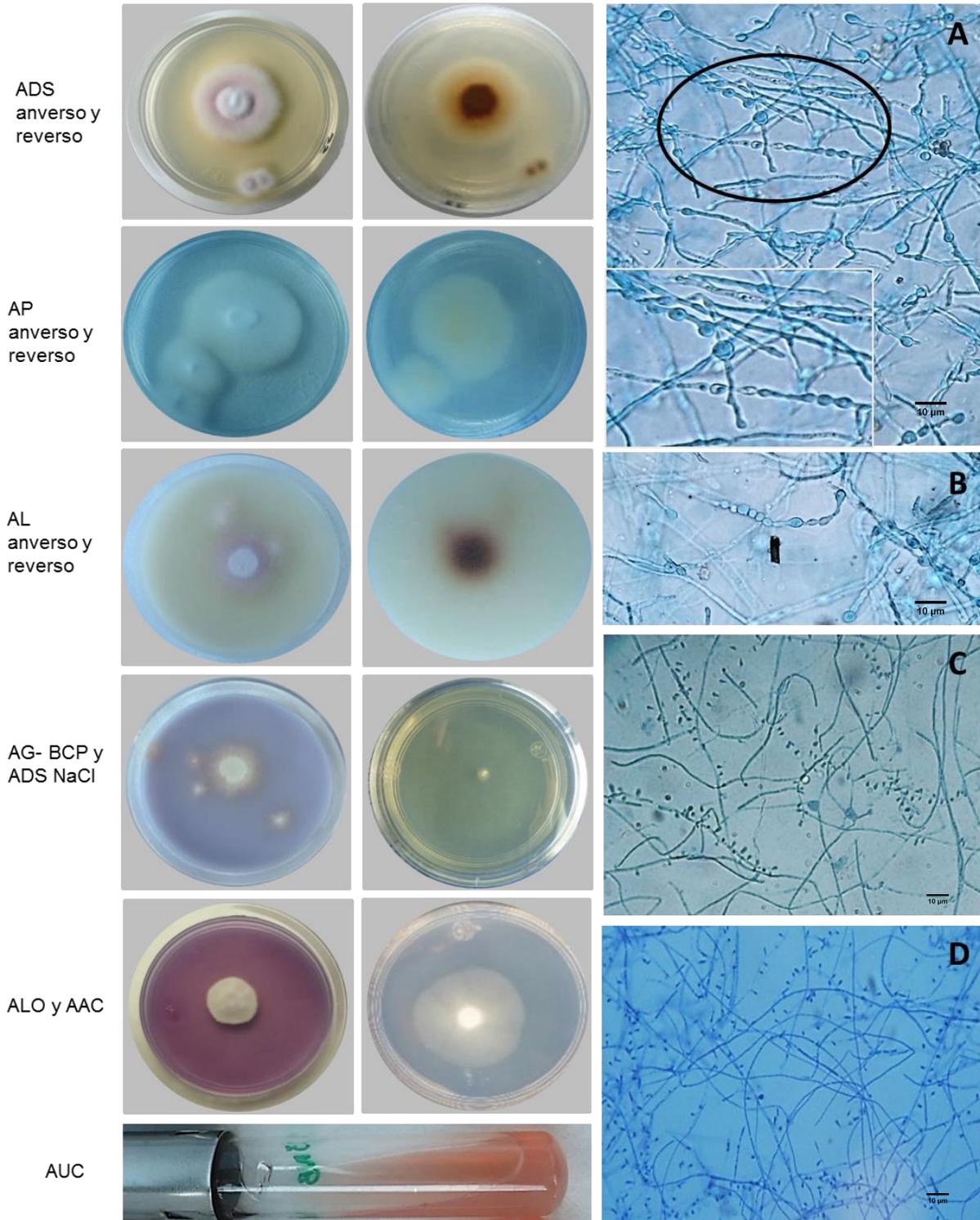


Figura 20.- Características morfológicas del aislado 13NB de *Trichophyton rubrum* en los diferentes medios y pruebas fisiológicas utilizados para su identificación. A y B) Abundantes cadenas de clamidoconidios (área bajo el círculo) en ATP. C y D) Abundantes microconidios piriformes en ADS.

6.2.2.- Prueba de sensibilidad antifúngica

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El patrón de sensibilidad antifúngica observado en los diferentes aislados frente a los tres fármacos valorados (AMR, CPX, TRB) se muestra en la figura 21. De acuerdo al resultado del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, no hubo diferencia significativa en la sensibilidad de cada uno de ellos (AMR $p= 0.0983$; CPX $p= 0.7986$ y TRB $p= 0.13659$), ni entre especies (AMR $p= 0.2954$; CPX $p= 0.7291$ y TRB $p= 0.3092$) frente a cada uno de los fármacos evaluados (Figura 21 y 22). Al analizar los resultados en los aislados correspondientes a las variedades de *Trichophyton rubrum* se observó que la variedad *flava* fue más sensible frente a AMR ($0.030 \mu\text{g/mL}$) y TRB ($0.045 \mu\text{g/mL}$) en comparación con la variedad "Y" (AMR = $0.065 \mu\text{g/mL}$; TRB = $0.134 \mu\text{g/mL}$). La actividad de cada antifúngico frente a todos los aislados en estudio varió en CMI de $0.030 \mu\text{g/mL}$ a $0.125 \mu\text{g/mL}$ en AMR; $0.188 \mu\text{g/mL}$ a $0.500 \mu\text{g/mL}$ en CPX y $0.030 \mu\text{g/mL}$ a $0.375 \mu\text{g/mL}$ en TRB. La actividad de estos fármacos presentó diferencias significativas ($p < 0.0001$) en el ANOVA de dos vías; amorolfina mostró la mejor actividad, seguida de terbinafina y finalmente ciclopiroxolamina con valores promedio de CMI de $0.069 \mu\text{g/mL}$, $0.162 \mu\text{g/mL}$ y $0.229 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 23). En la figura 24 se observa un ejemplo de las microplacas utilizadas para evaluar la CMI de los tres antifúngicos. En la fila D (3NB(A)) de la placa de AMR y TRB se observó la menor CMI ($0.03 \mu\text{g/mL}$).

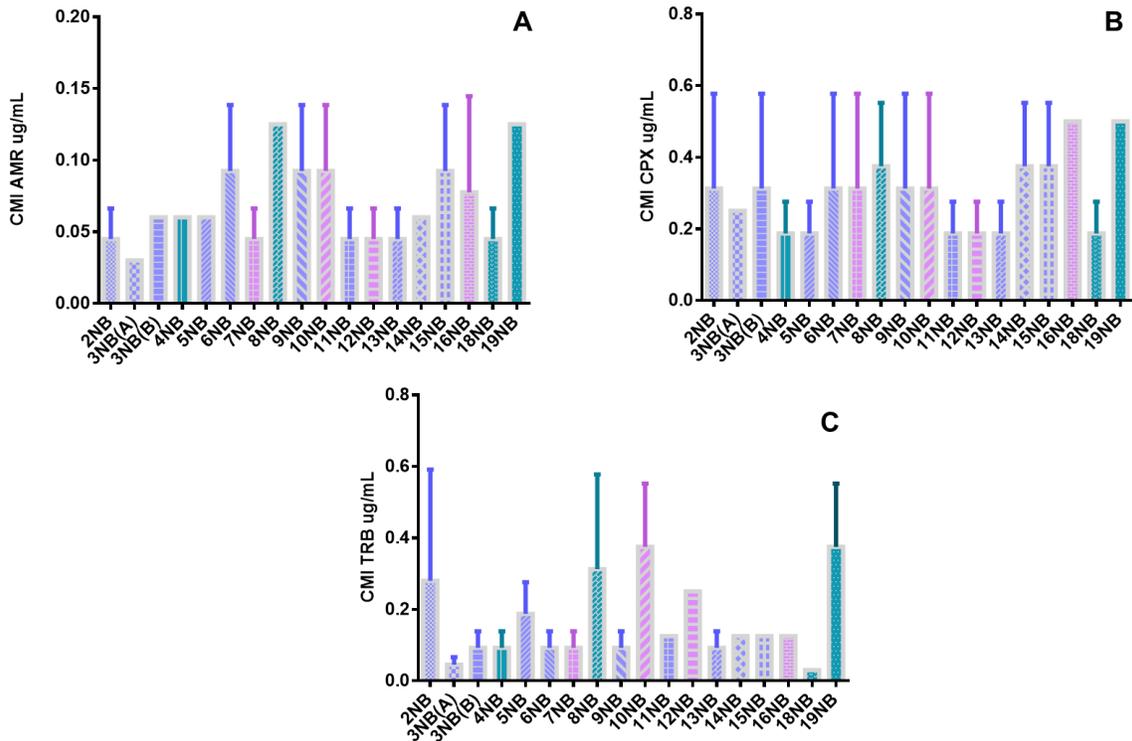


Figura 21.- Valores de CMI de A) AMR; B) CPX y C) TRB correspondientes a cada aislado de dermatofito. Las barras moradas corresponden a aislados de *T. rubrum*, las verdes a *T. tonsurans* y las rosas a *T. interdigitale*.

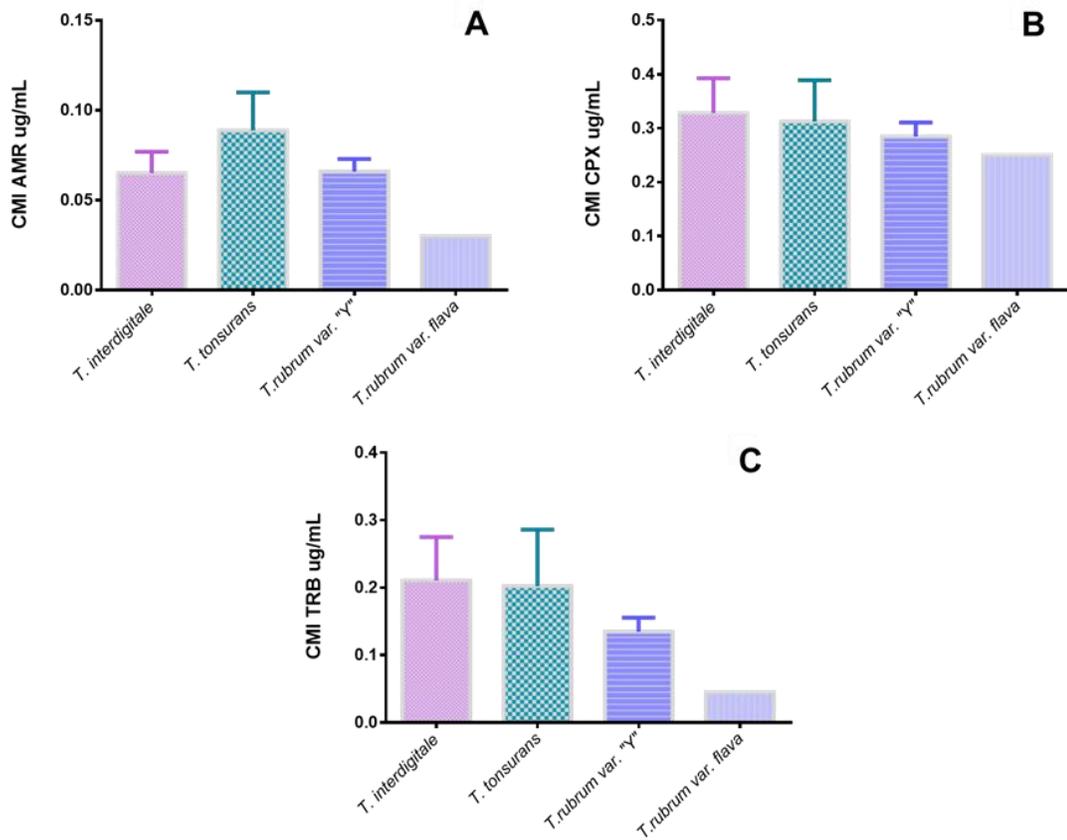


Figura 22.- Valores de CMI de A) AMR; B) CPX y C) TRB frente a las diferentes especies identificadas y variedades de *T. rubrum*.

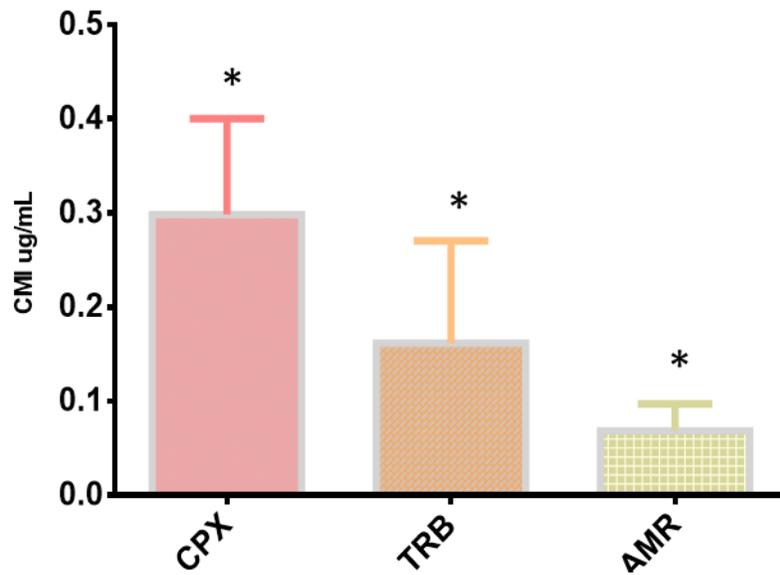


Figura 23.-Valores promedio de CMI de CPX, TRB y AMR frente a los aislados de dermatofitos. El asterisco indica los antifúngicos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en su actividad frente a todos los aislados en la prueba de ANOVA de dos vías.

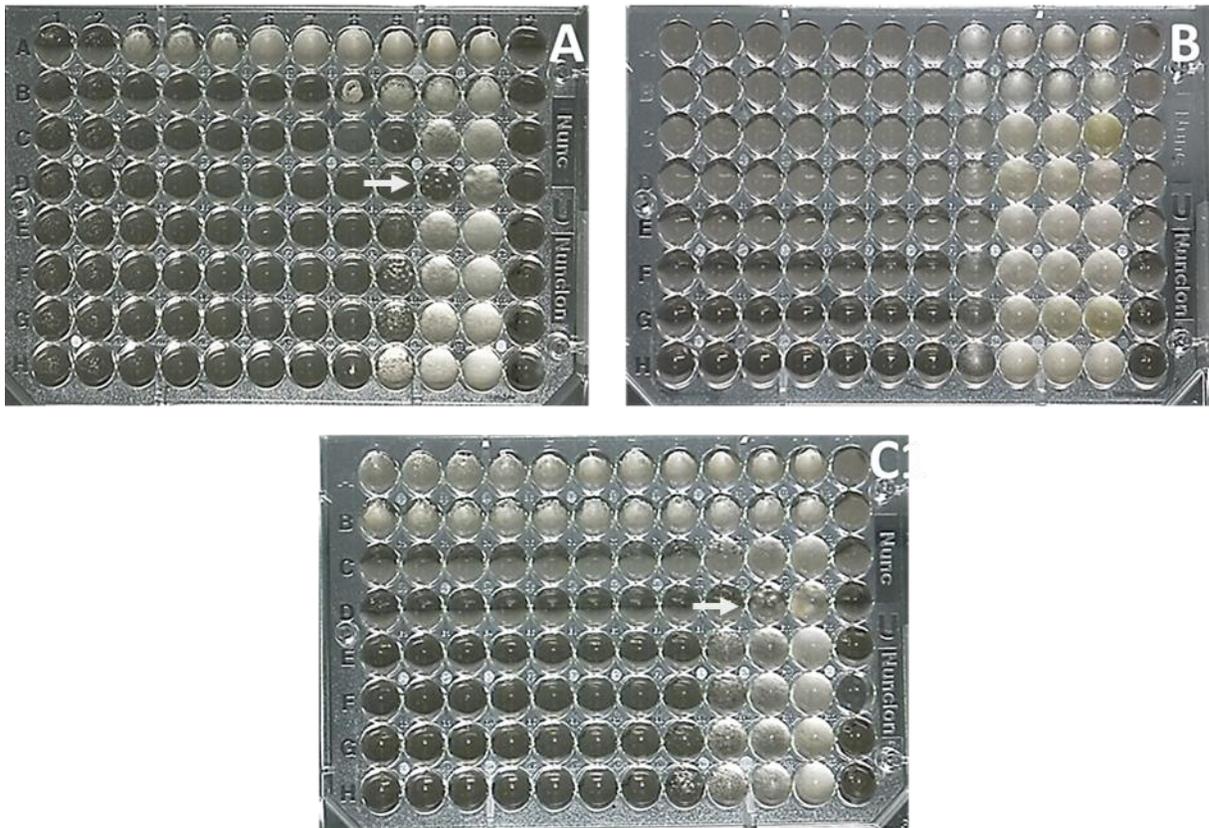


Figura 24.-Microplacas utilizadas para la determinación de CMI de A) AMR; B) CPX y C) TRB. Las flechas en las microplacas A y C indican el aislado 3NB(A) cuyo valor de CMI fue $0.03 \mu\text{g}/\text{MI}$.

Concentración mínima fungicida (CMF)

En la figura 25 se muestran los valores de CMF de cada antifúngico frente a cada aislado de dermatofito. De acuerdo al ANOVA de una vía solamente hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las especies *Trichophyton tonsurans* y *T. rubrum* frente a amorolfina (Figura 26). En cuanto a las variedades de *T. rubrum* se observó diferencia en los valores de CMF frente a los tres fármacos estudiados; la variedad *flava* mostró valores menores (AMR 0.045 $\mu\text{g/mL}$; CPX 2 $\mu\text{g/mL}$ y TRB 0.095 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con la variedad "Y" (AMR 0.101 $\mu\text{g/mL}$; CPX 5.33 $\mu\text{g/mL}$ y TRB 0.266 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 26). La actividad fungicida de cada antifúngico frente a todos los aislados en estudio varió en la CMF de 0.045 $\mu\text{g/mL}$ a 0.750 $\mu\text{g/mL}$ en AMR; 2.00 $\mu\text{g/mL}$ a 16.00 $\mu\text{g/mL}$ en CPX y 0.045 $\mu\text{g/mL}$ a 0.750 $\mu\text{g/mL}$ en TRB. La actividad antifúngica de estos fármacos presentó diferencias significativas ($p < 0.0001$) en el ANOVA de dos vías; al igual que con la CMI amorolfina mostró la mejor actividad, seguida de terbinafina y finalmente ciclopiroxolamina con valores promedio de CMF de 0.187 $\mu\text{g/mL}$, 0.294 $\mu\text{g/mL}$ y 7.222 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 27). Sin embargo, la actividad fungicida con ciclopiroxolamina fue mala, demostrada por los valores superiores a 1 $\mu\text{g/mL}$, con una diferencia hasta de 6 a 7 diluciones con respecto a la CMI. En la figura 28 se observan algunos ejemplos de las UFC crecidas en placas con ADS en las que se determinó la CMF por la actividad de cada antifúngico sobre los dermatofitos.

Correlación de concentración mínima inhibitoria con concentración mínima fungicida

En el análisis de coeficiente de correlación de Pearson, para los valores promedio de CMI y CMF frente a todos los aislados estudiados, fue positivo en el caso de terbinafina ($r = 0.7076$) y amorolfina ($r = 0.6895$). En la figura 29 se observa que a mayores valores de CMI aumentan los valores de CMF, excepto en el caso de la ciclopiroxolamina cuyo valor de r fue de 0.4356.

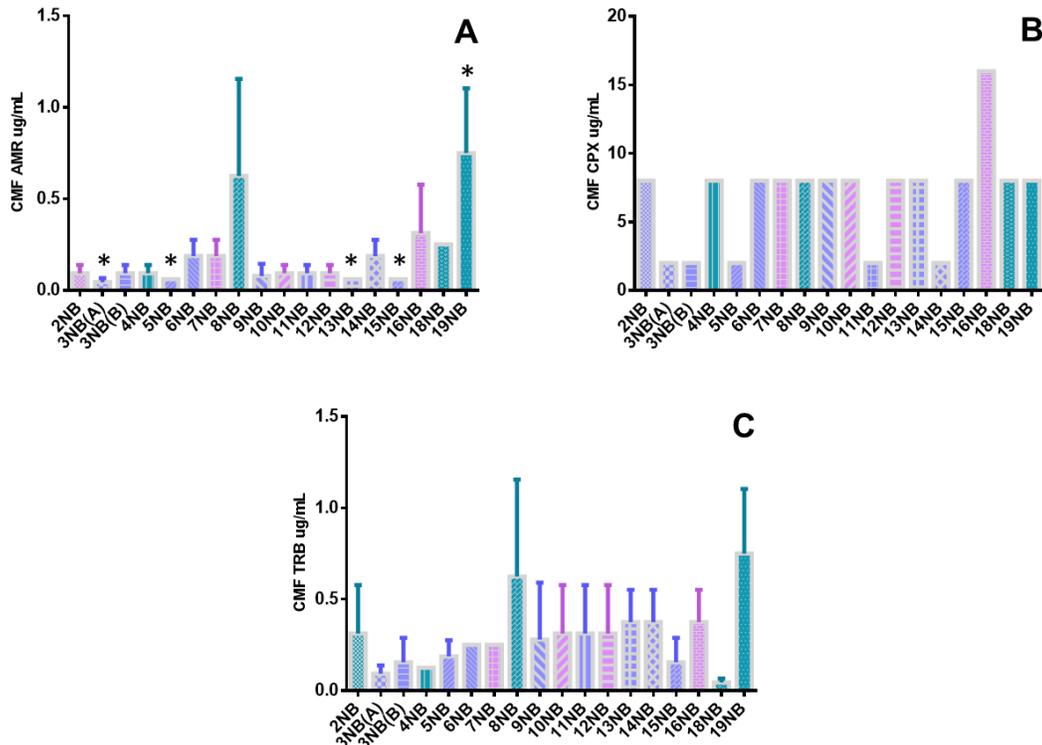


Figura 25.- Valores de CMF de A) AMR; B) CPX y C) TRB correspondientes a cada aislado de dermatofito. Las barras moradas corresponden a aislados de *T. rubrum*, las verdes a *T. tonsurans* y las rosas a *T. interdigitale*. Los asteriscos en la imagen A indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la CMF de los aislados frente a amorolfina de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

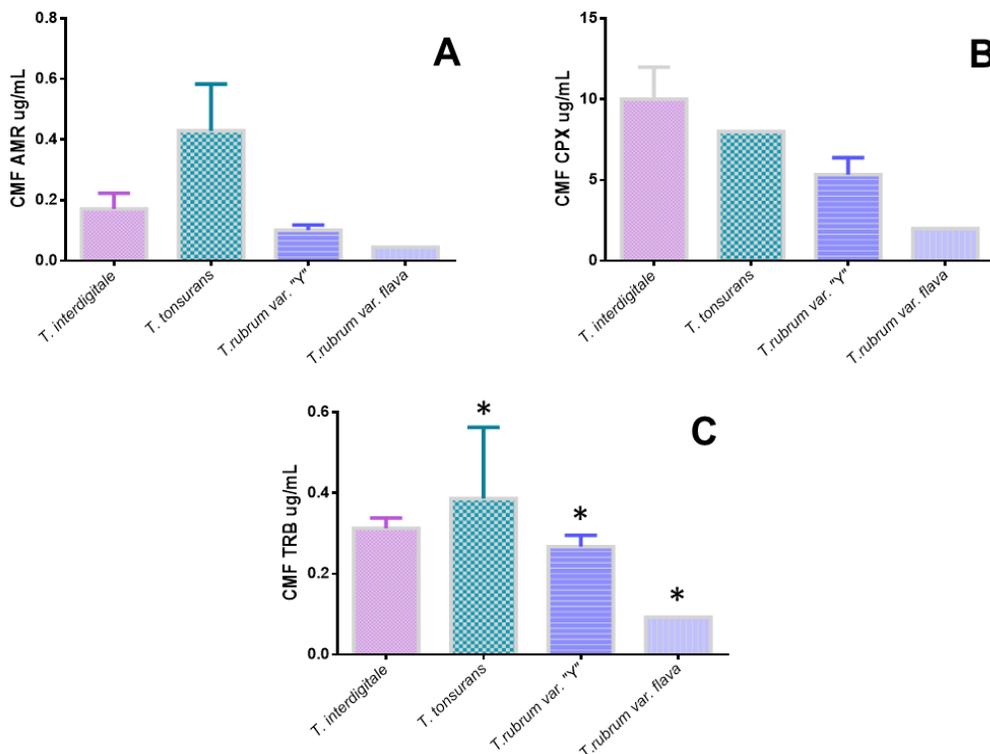


Figura 26.-Valores de CMF de A) AMR B) CPX y C) TRB correspondientes a cada especie identificada y variedad de *T. rubrum*. Los asteriscos en la imagen C indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la CMF de las especies frente a terbinafina de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

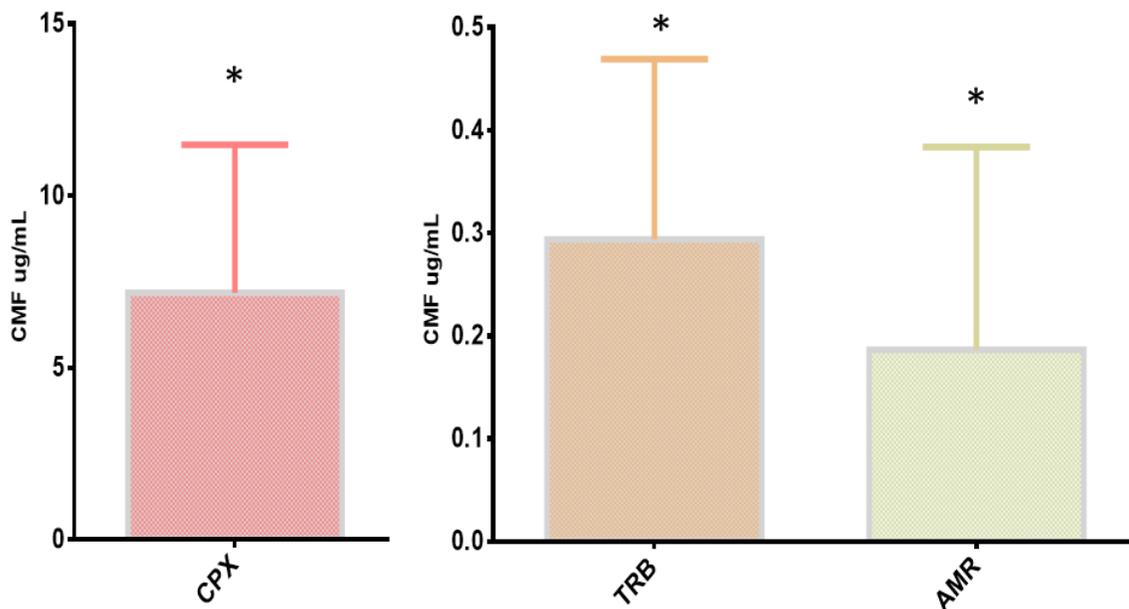


Figura 27.-Valores promedio de CMF de CPX, TRB y AMR frente a los aislados de dermatofitos. El asterisco indica los antifúngicos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en su actividad fúngica frente a todos los aislados en la prueba de ANOVA de dos vías.

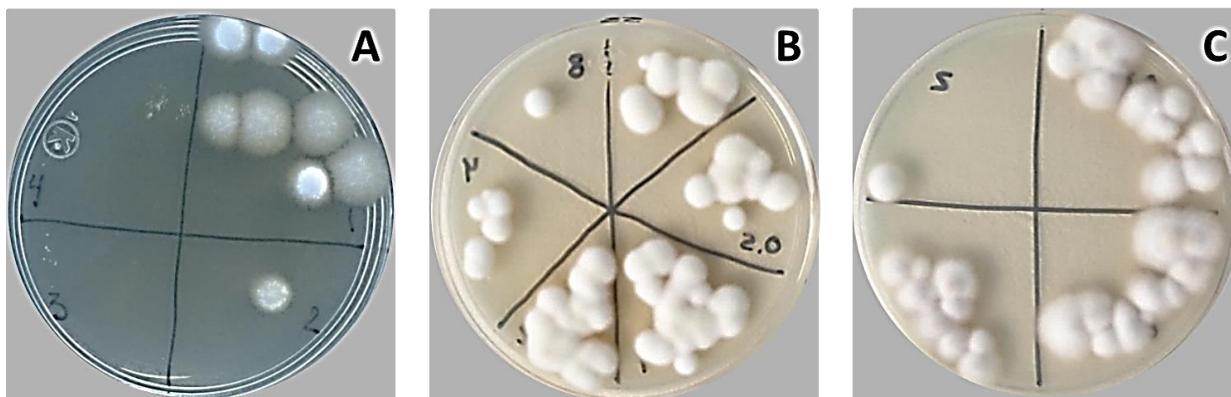


Figura 28.- Placas con ADS utilizadas para la determinación de CMF de A) AMR; B) CPX y C) TRB. Las UFC disminuyeron en sentido a las manecillas del reloj.

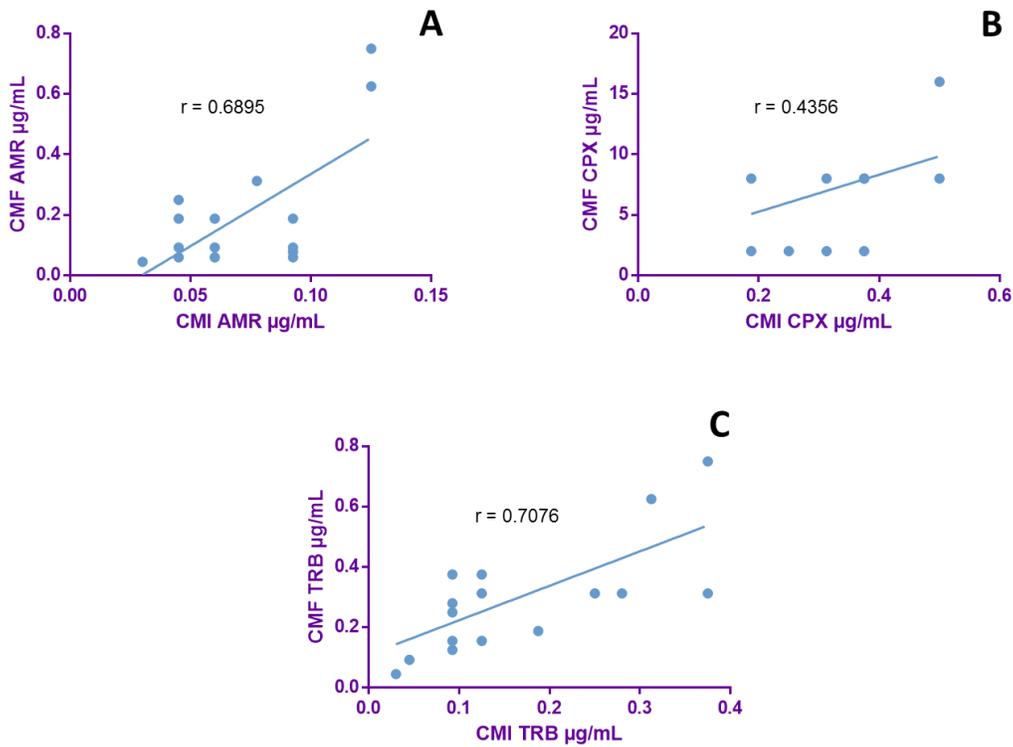


Figura 27.- Correlación de valores de CMI y CMF de A) AMR; B) CPX; C) TRB

6.2.3.- Formación de biopelículas

Morfología

Todos los aislados mostraron la capacidad de formar biopelículas, evidenciado por las observaciones morfológicas obtenidas con el microscopio invertido. La morfología de las distintas especies identificadas mostró diferencias con respecto a la presencia de estructuras de reproducción, densidad del micelio y morfología de las hifas. Los aislados de *T. interdigitale* se caracterizaron por la presencia de macroconidios, abundantes microconidios germinando, clamidoconidios e hifas gruesas con baja retención del colorante (Figura 28). Los de *Trichophyton tonsurans* presentaron abundantes microconidios germinando, que daban lugar a hifas gruesas, en algunos aislados se observó la presencia de microconidios en disposición alterna (Figura 29). La característica sobresaliente de los aislados de *T. rubrum* fue la presencia de abundantes hifas delgadas, rizadas y ramificadas, emergiendo de microconidios, las cuales se anastomosaban con hifas adyacentes hasta formar densas masas de micelio (Figura 30). Un aislado de *T. rubrum* (13NB) presentó características distintas al resto; numerosos microconidios dispuestos de

forma alternada a lo largo de las hifas, extremos de las hifas semejantes a macroconidios, cadenas de clamidoconidios y baja retención del colorante por las hifas (Figura 31).

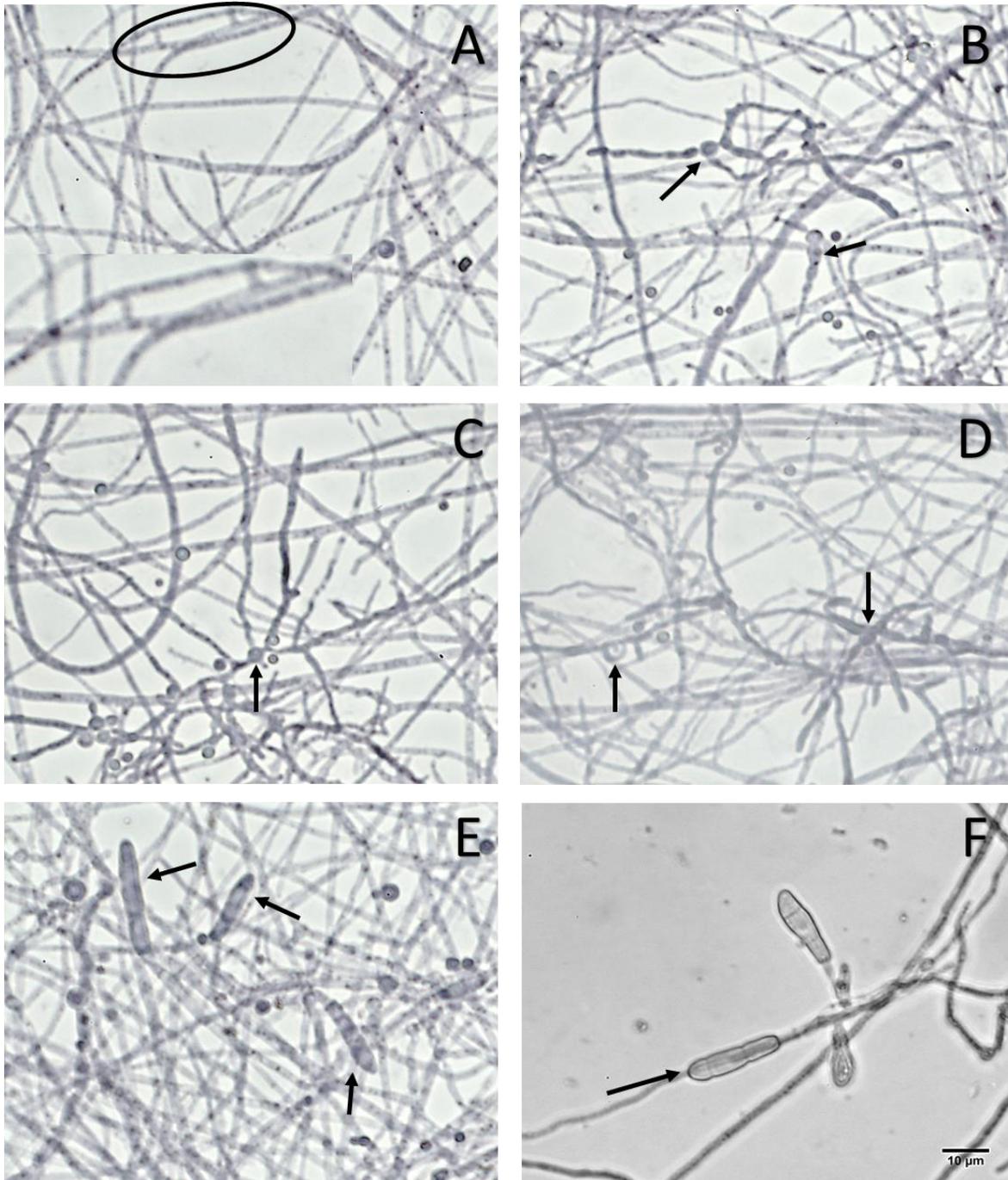


Figura 28. Características microscópicas de las biopelículas formadas por los aislados de *Trichophyton interdigitale*. A) Hifas gruesas, anastomosadas, con baja retención del colorante. B, C y D) Microconidios germinando. B) Cadenas de clamidoconidios. D) Hifas en espiral. E y F) Macroconidios. Las áreas bajo el círculo indican las zonas de anastomosis. Las flechas en cada imagen señalan las estructuras descritas.

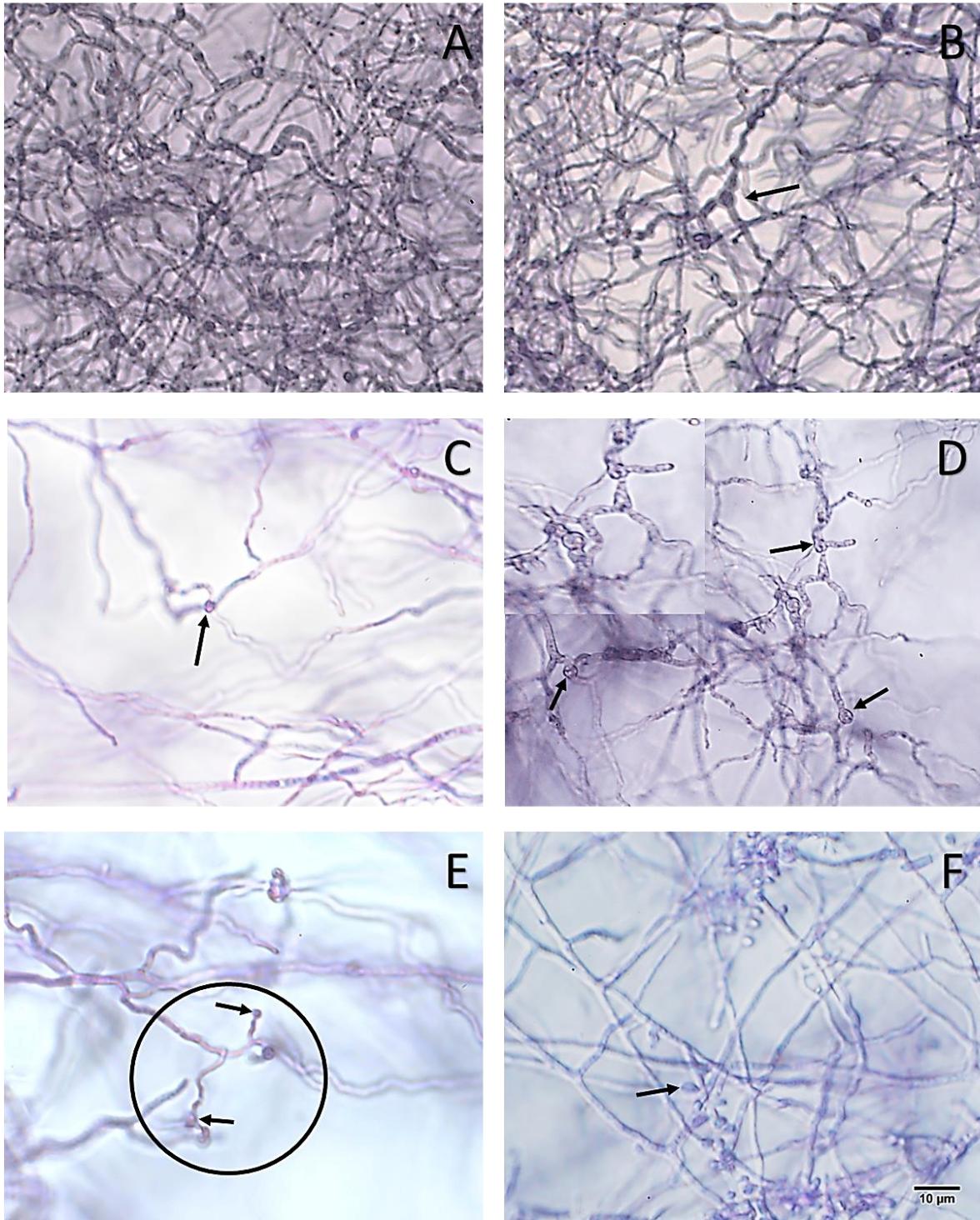


Figura 29. Características microscópicas de las biopelículas formadas por los aislados de *Trichophyton tonsurans*. A) Redes de hifas. B, C y D) Microconidios germinando. E) Anastomosis de hifas emergentes de microconidios adyacentes y F) Microconidios en disposición alternada a lo largo de la hifa. Las áreas bajo el círculo indican las zonas de anastomosis. Las flechas en cada imagen señalan las estructuras descritas

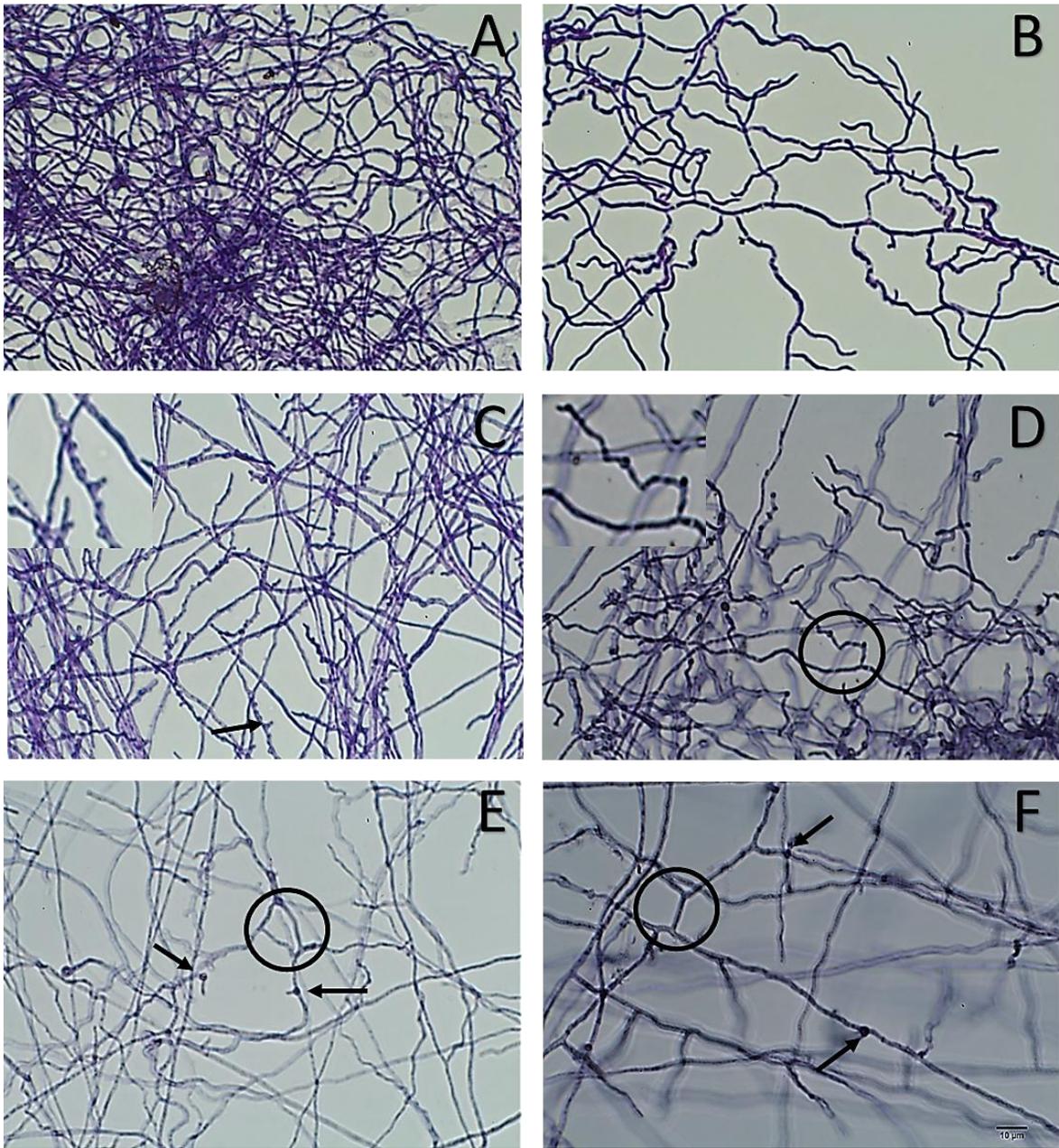


Figura 30. Características microscópicas de las biopelículas formadas por los aislados de *Trichophyton rubrum*. A y B) Redes de hifas rizadas y delgadas con alta retención del colorante. C) Microconidios. D, E y F) Anastomosis de hifas emergentes de microconidios adyacentes. Las áreas bajo el círculo indican las zonas de anastomosis. Las flechas en cada imagen señalan las estructuras descritas.

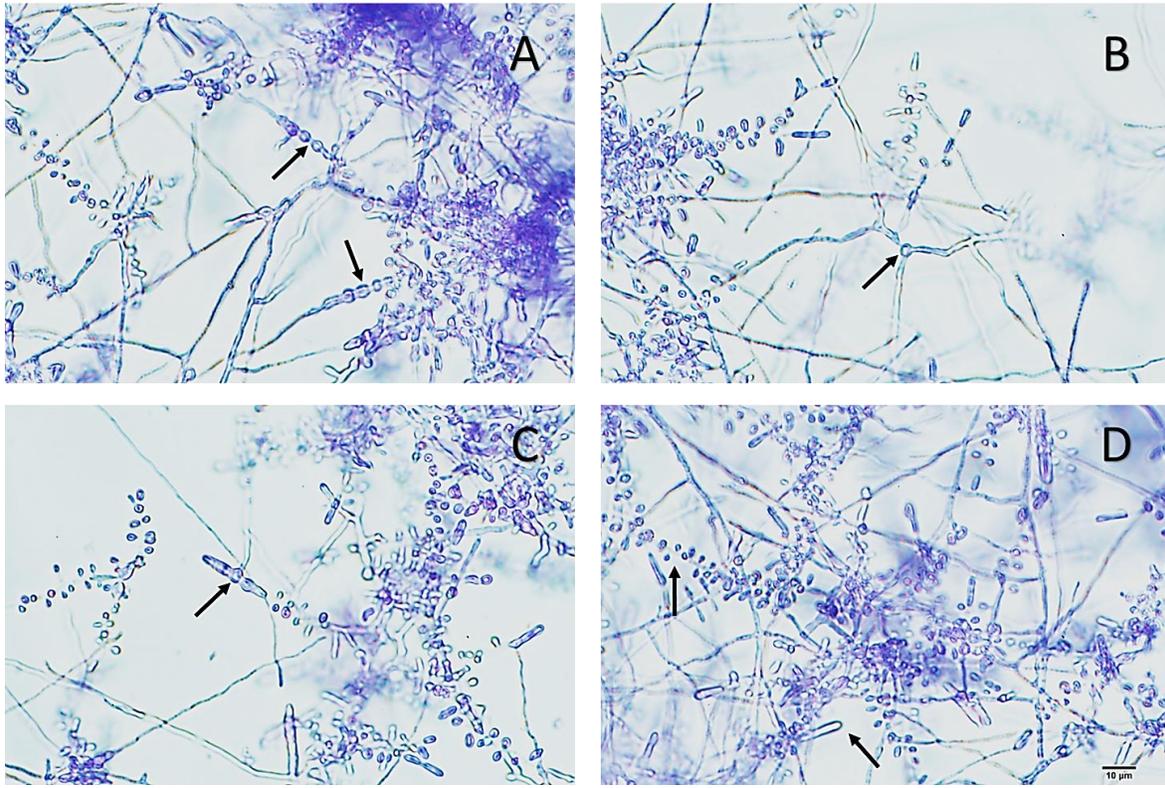


Figura 31. Características microscópicas de la biopelícula formada por el aislado 13NB (*Trichophyton rubrum*). A) Cadenas de clamidoconidios. B) Microconidio germinando. C) Macroconidio y D) Múltiples microconidios en disposición alternada en la hifa y macroconidios jóvenes. Las flechas en cada imagen señalan las estructuras descritas.

Cuantificación con cristal violeta

Los valores de absorbancia (DO 570 nm) obtenidos de los diferentes aislados variaron de 1.2 a 17.8, siendo la \bar{x} 8.4. Con base en el valor de la \bar{x} la mayoría de los aislados fueron considerados como bajos formadores de biopelícula, de los cuales el 8NB, identificado como *Trichophyton tonsurans*, presentó el valor más bajo (1.2). Tres de los aislados de *T. rubrum* (2NB, 5NB y 6NB) mostraron la mejor capacidad de formar biopelículas (Figura 32). Los tres aislados considerados como altos formadores de biopelícula provenían de pacientes de edad avanzada con dermatofitosis crónica de localización en los pies y presentaban DM 2 como enfermedad asociada (Figura 33). De acuerdo al resultado del análisis de varianza (ANOVA) de una vía hubo diferencia significativa ($p < 0.0001$) en la capacidad de

formar biopelículas por los diferentes aislados. Esta capacidad no mostró diferencias significativas ($p = 0.3608$) con respecto a las diversas especies valoradas. En la figura 34 se observa el promedio de los aislados de *T. rubrum*, que fue la especie (principalmente la variedad “Y”) con mayor capacidad de formar biopelículas (valores superiores a la \bar{x}).

Cuantificación con safranina

Los valores de absorbancia (DO 492 nm) obtenidos de los diferentes aislados variaron de 0.062 a 0.377, manteniéndose siempre por debajo de 1 (Figura 32). Los aislados 16NB (*T. interdigitale*) y 13NB (*T. rubrum*) fueron los que produjeron la menor y mayor cantidad de matriz extracelular, respectivamente. De acuerdo al resultado de ANOVA de una vía no hubo diferencia significativa ($p = 0.0507$) en la capacidad de producir matriz extracelular en los diferentes aislados. Sin embargo, en las especies *T. interdigitale* y *T. rubrum* se observó diferencia significativa ($p < 0.05$), de las cuales la segunda, principalmente la variedad “Y”, produjo una mayor cantidad de matriz extracelular (Figura 34).

Correlación de masa y matriz extracelular de biopelículas formadas por dermatofitos

El resultado del análisis de coeficiente de correlación de Pearson mostró que no hubo correlación ($r = 4522$) entre la masa y matriz extracelular en las biopelículas formadas por los diferentes aislados de dermatofitos (Figura 35).

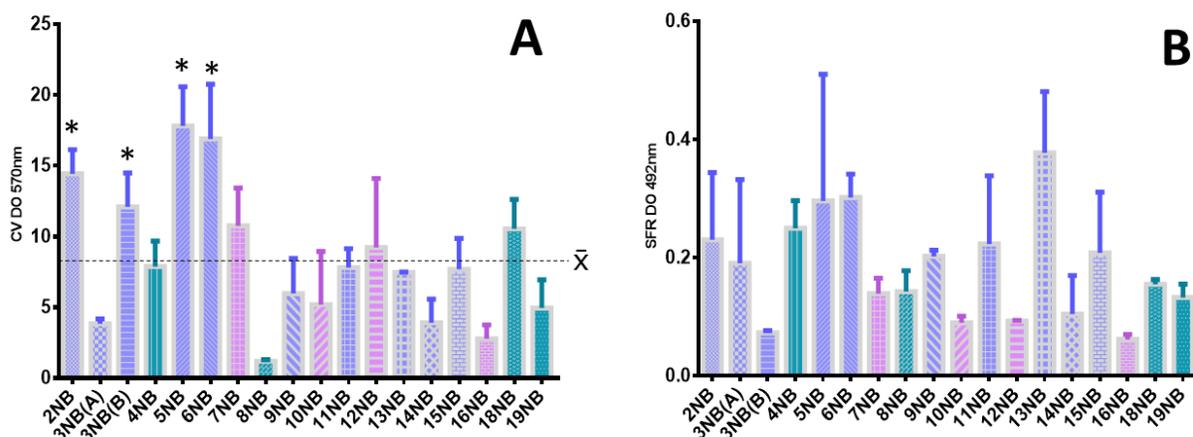


Figura 32.- Cuantificación de la masa y matriz extracelular de biopelículas formadas por aislados de dermatofitos con A) CV y B) SFR. Los asteriscos indican los aislados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la producción de masa de la biopelícula con cristal violeta de acuerdo al ANOVA de una vía

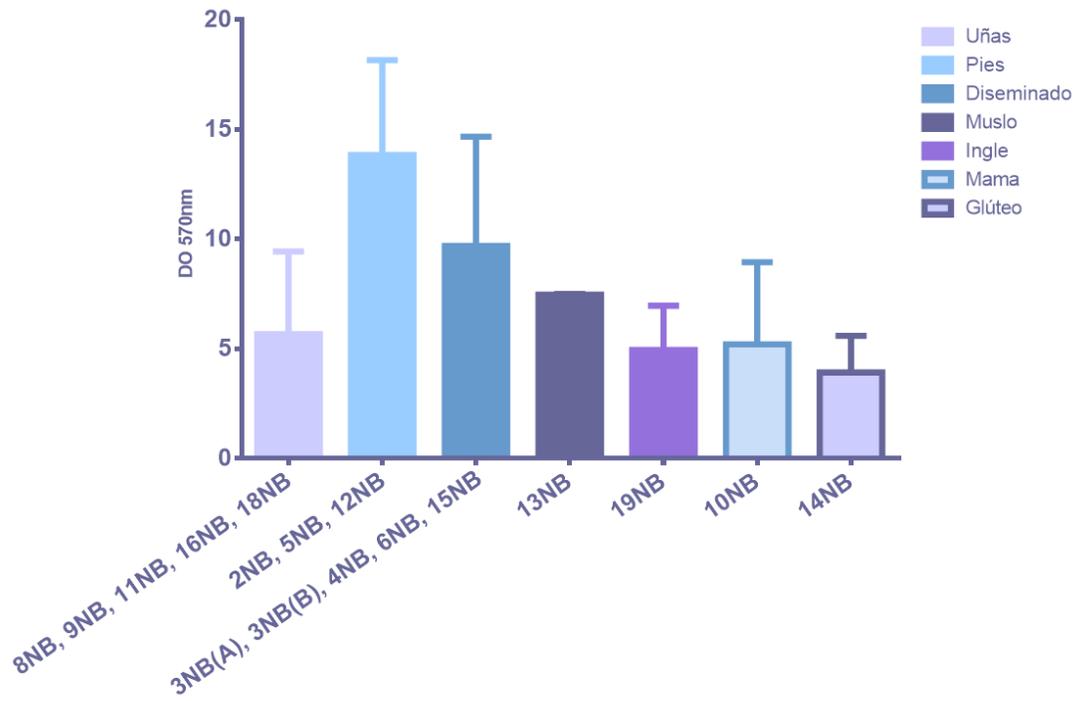


Figura 33.- Cuantificación de la masa de biopelículas formadas por los aislados correspondientes a diferentes topografías de lesiones.

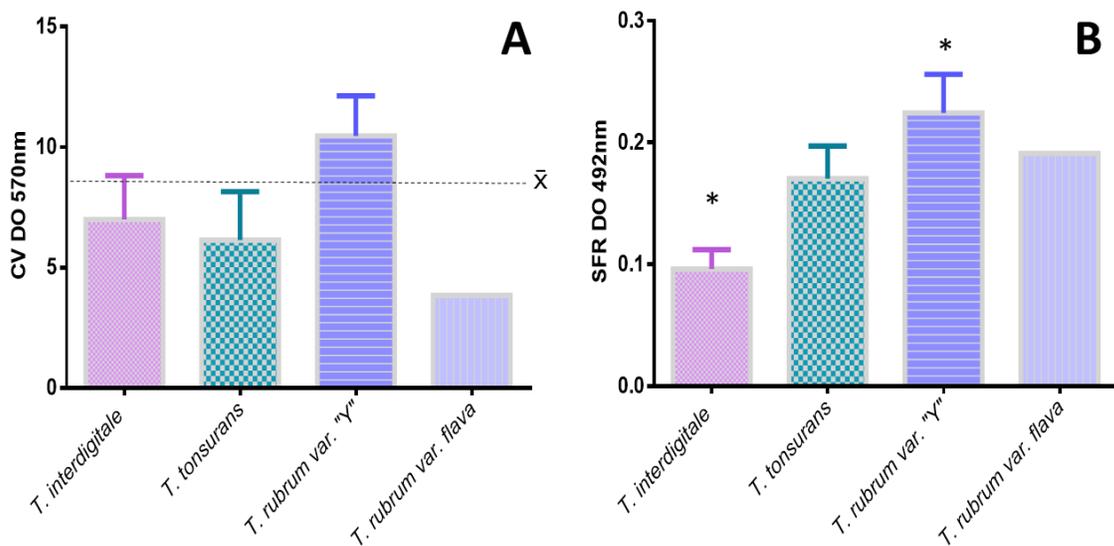


Figura 34.- Cuantificación de la masa y matriz extracelular de biopelículas formadas por especies de dermatofitos y variedades de *T. rubrum* con A) CV y B) SFR, respectivamente. Los asteriscos indican las especies que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de matriz extracelular de acuerdo con el ANOVA de una vía.

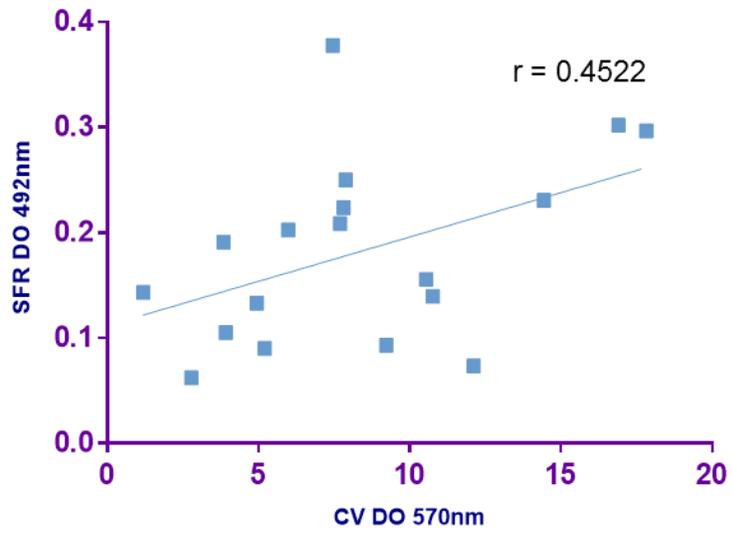


Figura 35.- Correlación de valores de DO de CV y SFR para evaluar la masa y matriz extracelular de los aislados de dermatofitos.

7.- Discusión

Los dermatofitos son causantes de las infecciones cutáneas (dermatofitosis) más comunes a nivel mundial. En general, las dermatofitosis afectan del 20 al 25% de la población, en edades de 0 a 90 años; aproximadamente el 20% de los individuos afectados desarrollan dermatofitosis crónicas ^{12, 22, 74, 79}.

Las dermatofitosis crónicas representan un problema de salud pública debido a que son fuentes potenciales de infección, a partir de las cuales se pueden infectar otras áreas anatómicas y otros individuos mediante auto-inoculación o transferencia horizontal, respectivamente. La persistencia de estas infecciones durante tiempo prolongado puede conducir al desarrollo de dermatofitosis diseminadas, las cuales representan el 25% de las dermatofitosis crónicas. Lo anterior, pone de manifiesto la importancia del manejo adecuado de estas infecciones y de la temprana identificación de los agentes causales, ya que podrían estar relacionados con su capacidad para permanecer por largo tiempo en el tejido del hospedero.

En la última década se ha observado un aumento en la frecuencia de las dermatofitosis crónicas entre el 5 a 10% de nuevos casos por año ²⁶. En el presente estudio los pacientes con infección crónica fueron principalmente individuos del género masculino, en un amplio rango de edad, entre 19 y 84 años (\bar{x} 42.18). El 60% de los pacientes presentaron DM2 como enfermedad asociada. Los rangos de edad observados posiblemente se deben a la población adulta que es atendida en los hospitales participantes y al nivel de atención de alta especialidad. Los resultados obtenidos en el predominio de género y edad de los pacientes, las enfermedades asociadas y la localización anatómica de las dermatofitosis fueron similares a las descripciones de otros autores ^{8, 22, 26, 45, 50, 62, 74, 78, 79, 100}.

La mayoría de los pacientes presentaron una larga evolución de la enfermedad, en promedio fue de 55.8 meses. Este hecho estuvo relacionado principalmente con la localización en las uñas (31.25%) y asociado a pacientes con DM2, los cuales presentan alteraciones en la microcirculación, lo que favorece los cambios en la estructura de la lámina ungueal y por ende el establecimiento del hongo. El

prolongado tiempo de evolución de las dermatofitosis de las uñas puede deberse a la baja respuesta inmune del hospedero en esa zona, traumatismos repetidos en las uñas que fue observado en uno de los pacientes; y la dificultad en el tratamiento, evidenciada por la falla terapéutica presentada en cinco de los casos frente a itraconazol, ketoconazol, miconazol y terbinafina.

En este estudio las infecciones diseminadas ocuparon el segundo lugar en frecuencia. Las topografías afectadas fueron pies, uñas, extremidades y tronco. Lo anterior ya había sido reportado por Welsh O, *et al.* (2006) ¹⁰⁰ quienes encontraron la asociación de infección en los pies con uñas y cuerpo.

Otro hallazgo diferente a los trabajos previos ^{8, 62} fueron las infecciones de los pies, las cuales predominaron en el género femenino. Sin embargo, en este tipo de infecciones la preferencia por el género del hospedero es indistinta. En las dermatofitosis de las uñas se observó que la edad de los individuos afectados es menor (20 - 25 años) con respecto a los datos reportados anteriormente (30 – 60 años) ⁸. Esta diferencia puede deberse al aumento del uso de calzado cerrado, actividades deportivas y asistencia a lugares acuáticos de recreación por los individuos en edad productiva. Aunado a la falla terapéutica a diversos antifúngicos que se observó en el 68.75% de los pacientes. Las formas clínicas observadas en este estudio coincidieron con reportes previos de dermatofitosis en la población en general ^{8, 26, 55, 62, 78, 79, 100}.

El bajo número de muestras procesadas fue debido a los parámetros considerados para incluir los aislados de pacientes con dermatofitosis crónicas. La identificación de algunos de los hongos causantes de dermatofitosis ha sido un problema para los micólogos clínicos. Las características fenotípicas observadas en los aislamientos primarios no siempre son suficientes para llegar a la identificación de la especie causal. Por ello, en este trabajo se utilizaron diversos medios de cultivo y pruebas fisiológicas que facilitaron la identificación de los dermatofitos. Los medios que resultaron de utilidad fueron agar lactrimel (AL), agar tierra pelos (ATP) y agar dextrosa Sabouraud adicionado con cloruro de sodio al 5% (ADS-NaCl); y pruebas fisiológicas como agar glucosa leche púrpura de bromocresol (AG-BCP), agar urea

de Christensen (AU) y la prueba de perforación de pelo *in vitro*. Sin embargo, los medios utilizados para estimular la producción de pigmento en los aislados de *T. rubrum* no fueron de utilidad, como lo describen diversos autores ^{52, 84}. Otra limitación evidente fue el aspecto y color de las colonias observadas en los medios anteriormente mencionados con respecto a ADS y AL, además de carecer de pigmento al reverso. En el presente estudio, en el aislado 13NB se presentaron limitaciones para su identificación fenotípica, ya que en ninguno de los medios y pruebas fisiológicas utilizados coincidieron sus características con las descripciones y por tanto no se incluyó en ninguna especie. La identificación de este aislado se llevó a cabo a través de análisis molecular de la región ITS del ADNr y comparación con las secuencias disponibles en GenBank las cuales mostraron una identidad del 99.99% con la especie *T. rubrum*. Sin embargo, dadas sus características no se incluyó en ninguna de las variedades descritas en el esquema de Kamisnki ⁵⁰. La amplia variabilidad que se llega a observar en los aislados de *T. rubrum* en ocasiones imposibilita la incorporación de éstos en un solo esquema de identificación ⁴⁵. Por lo que llega a ser oportuno el uso de técnicas moleculares para su identificación ⁸¹.

El esquema de resiembra utilizado para la reversión del pleomorfismo, de acuerdo a Manzano-Gayosso *et al.* (2015) ⁶¹, facilitó la identificación del aislado 12NB. En el aislamiento primario en ADS presentaba colonias blancas algodonosas, con pigmento amarillo al reverso, moderado número de microconidios y macroconidios ausentes. Después de las resiembras se modificaron sus características a colonias planas, pulverulentas, de color beige, con abundantes macroconidios, microconidios en racimos e hifas en espiral.

En este estudio de los cinco principales agentes causales de dermatofitosis en México, únicamente se aislaron tres especies del género *Trichophyton* (*T. rubrum*, *T. interdigitale* y *T. tonsurans*); de las variedades de *T. rubrum* solo se identificaron dos ("Y" y *flava*). La frecuencia de los aislamientos coincidió con diversos reportes ^{7, 8, 26, 28, 33, 45, 55, 62, 100}. La identificación de las especies de *Trichophyton* estuvo relacionada con la localización anatómica de la infección; hallazgo similar a

descripciones previas por otros autores ^{62, 100}. También fue evidente que las especies aisladas tienen afinidad antropofílica; estudios previos han reportado que estas especies presentan mayor capacidad de adaptación en el hospedero humano ^{31, 56}.

Por otro lado, la identificación de dos variedades de *T. rubrum* en el aislado 3NB, el cual fue obtenido de dos áreas corporales de un mismo paciente. Diversas condiciones podrían explicar este hecho, como enfermedades asociadas (paraneoplasias, infección en vías urinarias, hipertrofia prostática, IgM elevada), edad avanzada, falla terapéutica y uso de corticosteroides son factores que contribuyeron al desarrollo de dermatofitosis crónica diseminada. Es importante tomar en cuenta que los casos diseminados generalmente resultan de la extensión de una infección existente a través de auto-inoculación a otra área corporal. Por lo tanto, la presencia de dos variedades de *T. rubrum* en el mismo paciente podría deberse a las diferencias en el microambiente, en las distintas áreas corporales de las que fueron aisladas y no a la colonización independiente de la variedad de especie. Dichas diferencias en el microambiente podrían generar la expresión de diversos tipos de pigmento (característica primordial en la identificación de variedades de *T. rubrum*) a través de la inducción o represión de genes. Esto explicaría la variedad fenotípica a pesar de la identidad genotípica como lo demuestran algunos estudios ^{33, 35}.

La variabilidad morfológica y fisiológica presentada por los agentes causales de dermatofitosis crónica podría estar relacionada con su patrón de sensibilidad antifúngica. A pesar de que todos los aislados fueron sensibles a los tres antifúngicos evaluados (CMI < 1 µg/mL) se observaron ligeras diferencias en sus valores de concentración mínima inhibitoria (CMI).

Trichophyton rubrum fue la especie más sensible a los tres fármacos, similar a los reportes de otros autores ^{2, 54}. En cambio *Trichophyton tonsurans* mostró valores de CMI más altos frente a amorolfina (AMR), coincidiendo con el estudio de Adimi *et al.* (2013) ²; mientras que *Trichophyton interdigitale* presentó valores de CMI más altos frente a terbinafina (TRB) y ciclopiroxolamina (CPX), contrario a lo reportado

por Adimi *et al.* (2013) ² quien demostró la mayor sensibilidad de *T. interdigitale* en comparación con *T. tonsurans* frente a CPX. Con respecto a los valores de CMI obtenidos de *T. rubrum* y *T. interdigitale* frente a AMR se encontraron coincidencias con Wiederhold *et al.* (2014) ¹⁰² y diferencias con Adimi *et al.* (2013) ² quienes obtuvieron valores más altos (0.316 µg/mL y 0.389 µg/mL, respectivamente). Valores menores de CMI fueron reportados por Wiederhold *et al.* (2014) ¹⁰² y Gupta *et al.* (2003) ³⁹ para *T. interdigitale* frente a CPX (0.03 - 0.2095 µg/mL) y *T. tonsurans* frente a los tres fármacos (TRB 0.003 - 0.03 µg/mL; AMR 0.03 µg/mL y CPX 0.06 - 0.125 µg/mL). Mientras que Adimi *et al.* (2013) ² y Jue *et al.* (1985) ⁴⁹ obtuvieron valores altos de CMI con CPX (0.9 – 3.9 µg/mL) en las tres especies identificadas. Al comparar los valores de CMI obtenidos con TRB en las tres especies de *Trichophyton* con respecto al reporte de Afshari *et al.* (2016) ³ las cifras estuvieron por debajo. En el presente trabajo AMR presentó la mejor actividad frente a las tres especies de *Trichophyton*, a diferencia de lo reportado por otros autores ^{2, 38, 94, 102} quienes demostraron la mejor actividad con TRB.

Las dos variedades de *T. rubrum* mostraron diferencias en su sensibilidad (de dos a cuatro diluciones) a AMR y TRB. La variedad *flava* fue la que presentó los valores más bajos de CMI con respecto a la variedad “Y”. Esta diferencia puede ser el resultado de la diversidad del pigmento; dado que *T. rubrum var. “Y”* produce dos tipos (rojos y amarillos) mientras que *T. rubrum var. flava* únicamente uno (amarillo). Youngchim *et al.* (2011) ¹⁰³ han propuesto que los pigmentos juegan un papel importante en la virulencia, por lo que podrían estar relacionados con el desarrollo de resistencia a los antifúngicos.

No existen reportes en la literatura sobre los valores de concentración mínima fungicida (CMF) de los aislados de dermatofitos frente a los fármacos evaluados. En este trabajo todos los aislados fueron sensibles a AMR y TRB (CMF < 1 µg/mL). Sin embargo, en el caso de CPX se observaron valores de CMF que variaron de 2 a 16 µg/mL. Estos resultados ponen de manifiesto la baja capacidad fungicida de éste fármaco frente a los aislados evaluados. El mecanismo de acción de CPX podría estar relacionado con el resultado obtenido, ya que CPX es quelante de

caciones trivalentes, por lo que reduce la actividad de metaloproteasas implicadas en la infección y metabolismo celular. En presencia del fármaco (CMI) las células fúngicas disminuyen su crecimiento y reproducción (actividad fungistática). Sin embargo, una vez que el fármaco es retirado (CMF) las células retoman su actividad, por lo que pueden crecer y multiplicarse en concentraciones a las que antes les era imposible. Con respecto a los valores de CMF únicamente hubo diferencia significativa entre *T. rubrum* y *T. tonsuran* frente a TRB. Esta diferencia radicó en que cuatro aislados de *T. rubrum* (3NB(A), 5NB, 13NB, 15NB) presentaron diferencias significativas en sus valores de CMF con respecto a un aislado de *T. tonsurans* (19NB). El valor superior de CMF del aislado 19NB se debió probablemente al tratamiento combinado que había recibido el paciente del que provenía y que podría estar generando algún tipo de resistencia a los antifúngicos.

En este estudio AMR presentó mejor actividad (fungistática y fungicida) que TRB frente a las especies de *Trichophyton* causantes de infección crónica. Esto puede deberse al mecanismo de acción de estos antifúngicos. Amorolfina actúa sobre dos enzimas de la vía de síntesis del ergosterol (Δ 7-8 isomerasa y Δ 14 reductasa), mientras que TRB únicamente sobre escualeno epoxidasa. Por lo tanto, la acción fungistática y/o fungicida de AMR sería más eficaz. Algunos estudios ^{64, 72} han demostrado el desarrollo de resistencia a TRB en dermatofitos por la modificación en la enzima diana. Lo anterior estaría relacionado con el estudio más reciente llevado a cabo por Afshari *et al.* (2016) ³ quienes reportaron valores de CMI hasta de 16 μ g/mL por algunos dermatofitos (*T. interdigitale* y *T. rubrum*) frente a este antifúngico. Debido a que la probabilidad de que ocurra una alteración simultánea en dos enzimas es baja, AMR representaría la mejor opción terapéutica para este tipo de infecciones. El mismo argumento sería válido para el caso de los azoles, considerando que se han reportado modificaciones en la enzima diana y fallas terapéuticas para este grupo de antifúngicos.

Algunos investigadores han planteado la posibilidad de que los microorganismos utilicen algunas estrategias como la formación de biopelículas, con la finalidad de explicar las fallas terapéuticas y la persistencia en el tejido del hospedero ²⁴. En la

literatura se ha descrito formación de biopelículas en hongos filamentosos y son pocos los que reportan la presencia de estructuras de conidiación³². La producción de estructuras de conidiación en las biopelículas formadas *in vitro* por hongos filamentosos podría estar relacionado con el método utilizado y el tipo de aislado evaluado (primario o de conservación). La introducción de una fase de preadhesión permite la remoción de estructuras no adherentes previo al desarrollo de la biopelícula. La eliminación de las células planctónicas resulta en la formación de biopelículas a partir de las células adheridas, las cuales inician la germinación de forma sincrónica. El desarrollo de estas estructuras fúngicas resulta en la formación de biopelículas maduras (fases IV y V); que en el caso de especies de rápido crecimiento puede culminar con la producción de estructuras de conidiación (fase VI). Estudios previos^{67, 86} cuyo método utilizado permitió la formación de biopelículas a partir de células tanto planctónicas como adherentes; resultó en la constante germinación de conidios, por lo que las biopelículas observadas únicamente presentaban redes de hifas conformando densas masas de micelio (fases III y IV). Costa-Orlandi *et al.* (2014)²⁰ incluyeron la fase de preadhesión en la formación de biopelículas por dermatofitos; sin embargo, probablemente la ausencia de estructuras de reproducción se debió al uso de cepas en estado de conservación. Las modificaciones presentadas por este tipo de aislados con respecto a los aislamientos primarios pudieron haber influido en la producción de tales estructuras. Gonzáles-Ramírez *et al.* (2016)³², en *Aspergillus fumigatus*, demostraron el desarrollo asincrónico de la biopelícula, producción de conidios, formación de micelio a partir de ellos y la modificación de las hifas.

Burkhart *et al.* (2002)¹⁴ describieron la formación de biopelículas como un mecanismo microbiológico para explicar las infecciones crónicas y persistentes por dermatofitos de localización en las uñas. De acuerdo con este hecho, las dermatofitosis crónicas de los pacientes incluidos en este estudio causados por las especies del género *Trichophyton* se les podrían atribuir a su capacidad para formar biopelículas. Esta capacidad fue evidenciada por los análisis cualitativos y cuantitativos de las biopelículas formadas *in vitro* por los aislados de *Trichophyton* spp. La morfología observada en los diversos aislados mostró diferencias en la

densidad del micelio, morfología de las hifas y las estructuras de conidiación. La presencia de hifas maduras (evidenciada por el grosor y baja retención del colorante) y estructuras de reproducción (clamidodoconidos y macroconidios) en los aislados de *T. interdigitale* podría deberse a la formación de biopelículas en fase V o VI, de acuerdo al modelo propuesto por Harding *et al.* (2009) ⁴². La capacidad de estos aislados de formar biopelículas maduras en un tiempo de 72 h podría estar relacionado con la velocidad de crecimiento (rápido) que caracteriza a la especie. A diferencia de los aislados de *T. rubrum*, cuyas biopelículas producidas se encontraron en la fase IV, relacionado probablemente con su tasa de crecimiento (lento). Las biopelículas de *T. rubrum* en estas fases fue evidenciado por la presencia de hifas jóvenes (alta retención del colorante), ramificadas, que emergían de microconidios y se anastomosaban con hifas adyacentes, formando redes de hifas en estratos. La presencia de hifas rizadas en esta especie se debió probablemente a su alta capacidad de formar biopelículas; dado que esta modificación permitiría un aumento en la superficie de adhesión y absorción, así como una mejor comunicación celular.

Los aislados de *T. tonsurans* presentaron características intermedias entre las otras dos especies; escasos microconidios, hifas maduras y redes de hifas menos densas que las de *T. rubrum*. La presencia de hifas maduras y microconidios en esta especie podría estar relacionado, al igual que con *T. interdigitale*, con el desarrollo de una biopelícula madura. Sin embargo, debido a la tasa de crecimiento (moderada) de la especie, la producción de estructuras de reproducción no fue tan abundante como en *T. interdigitale*.

Las observaciones del presente trabajo son similares a las reportadas por otros autores ³², las cuales se pueden resumir en: 1) desarrollo asincrónico de las biopelículas; predominio de masas densas de micelio en el centro de la estructura y formas de conidiación en la periferia. 2) modificación morfológica; hifas rizadas en los aislados de *T. rubrum*. 3) presencia de microconidios en aislados de *T. interdigitale*.

Por otro lado, la capacidad de formar biopelículas *in vitro* por los diferentes aislados de dermatofitos también fue demostrada mediante pruebas cuantitativas. Para evaluar la cantidad de biomasa y matriz extracelular de las biopelículas con cristal violeta (CV) y safranina (SFR), respectivamente. Los valores de absorbancia obtenidos con CV fueron superiores a los reportados por otros autores en diferentes grupos de hongos filamentosos (1 – 3) ^{20, 67}. Posiblemente la variación se debió a la utilización de microplacas de 6 pozos, en lugar de 96 pozos, para los ensayos de formación de biopelícula. La diferencia en el diámetro del pozo estuvo relacionada con la superficie disponible para la formación de esta estructura. Con respecto a otros estudios de formación de biopelículas *in vitro* por *T. rubrum* y *T. interdigitale* ²⁰ los valores de absorbancia obtenidos en este trabajo con CV y SFR fueron superiores de 2 a 4 veces. A pesar de dicha diferencia se encontró el mismo patrón; los aislados de *T. rubrum* presentaron la mejor capacidad de formar biopelículas, principalmente *Trichophyton rubrum* var. “Y”. Evidenciado por la mayor cantidad de biomasa y matriz extracelular, proporcionales a los valores de absorbancia de CV y SFR, respectivamente. Los tres aislados de *T. rubrum* que fueron los mejores formadores de biopelícula, se obtuvieron de edad avanzada, con DM2 y dermatofitosis de localizada en los pies. Lo anterior, podría sugerir que las infecciones crónicas por dermatofitos se podrían explicar por una resistencia microbiológica atribuida a la formación de biopelículas y clínicamente por una inmunosupresión. También es posible que la localización anatómica esté relacionada con la capacidad de formar biopelículas por los agentes causales de dermatofitosis. Debido a que los aislados con mayor capacidad para formar estas estructuras se aislaron de lesiones en los pies y de dermatofitosis diseminada a otras áreas corporales.

La baja respuesta a los antifúngicos y el prolongado tiempo de evolución de las infecciones crónicas por dermatofitos, aunado a la demostración de la capacidad para formar biopelículas *in vitro* por los agentes causales y a los valores de sensibilidad frente a los antifúngicos estudiados (AMR, CPX y TRB) podría sugerir a los médicos la prescripción de tratamientos combinados. Con el fin de obtener una curación rápida, efectiva y dirigida a los pacientes con este tipo de infecciones.

8.- Conclusiones

- ❖ El desarrollo de una dermatofitosis crónica no depende únicamente del estado inmunológico.
- ❖ La diabetes mellitus tipo 2 fue la principal enfermedad asociada en los pacientes con dermatofitosis crónica.
- ❖ Las tres formas clínicas más comunes de las dermatofitosis crónicas fueron de las uñas, diseminadas y de los pies. La infección de las uñas fue la que presentó el mayor tiempo de evolución.
- ❖ Los medios y pruebas fisiológicas fueron de utilidad para la identificación de las especies causantes de dermatofitosis.
- ❖ *Trichophyton rubrum* var. “Y” fue el principal agente causal de dermatofitosis crónica.
- ❖ Todos los aislados de dermatofitos causantes de infección crónica fueron sensibles a amorolfina, ciclopiroxolamina y terbinafina.
- ❖ La amorolfina fue el antifúngico que mostró la mejor actividad frente a todos los aislados estudiados.
- ❖ La ciclopiroxolamina presentó actividad fungistática pero no fungicida.
- ❖ Todos los aislados de dermatofitos presentaron capacidad de formar biopelículas *in vitro*; *Trichophyton interdigitale* presentó estructuras de conidiación, mientras que *T. rubrum* mostró la mayor cantidad de biomasa y matriz extracelular a las 72 h.

9.- Abreviaciones

AAC	Agar ácido casimino
AAS	Agar avena sales
ADS	Agar dextrosa Sabouraud
ADS-A	ADS con cicloheximida y cloranfenicol
ADS-NaCl	ADS con 5% de cloruro de sodio
AEC-D	Agar extracto de carne dextrosa
AG	Agar Gorodkowa
AHM-D	Agar harina de maíz dextrosa
AL	Agar lactrimel
ALO	Agar Littman Oxgall ®
AP	Agar peptona
A-TP	Agar Tierra Pelos
AG-BCP	Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol
AUC	Agar urea de Christensen
<i>chs1</i>	Gen de la quitin sintasa 1
hBDs	Defensinas beta humanas
ITS	Espaciadores transcritos internos del ADN que codifica para el ARNr
LSU	Subunidad grande del gen del ARNr
PBS	Tampón de fosfatos salinos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TOP2	Gen de la topoisomerasa 2

10.- Anexos

Anexo 1.- Clave de cada uno de los aislados y su procedencia.

Clave del aislado	Procedencia
2NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
3NB(A)	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
3NB(B)	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
4NB	Laboratorio de Micología Médica
5NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
6NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
7NB	Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS
8NB	Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS
9NB	Laboratorio de Micología Médica
10NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
11NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
12NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
13NB	Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS
14NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
15NB	Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE
16NB	Laboratorio de Micología Médica
18NB	Laboratorio de Micología Médica
19NB	Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS

Anexo 2.- Aislados y variables demográficas y clínicas de los pacientes con dermatofitosis crónicas.

Clave del aislado	Edad (años)	Sexo	Evolución (meses)	Topografía de la lesión	Manifestaciones clínicas	Tratamientos previos	Enfermedad o factor asociado
2NB	80	F	120	Pies	Descamación gruesa de tonalidad amarillenta distribuida en islotes. Asintomática.	Ninguno	DM2, pancitopenia, obesidad GII, infección hepática.
3NB(A)	70	M	24	Ingle derecha y parte posterior del muslo.	Placa eritematosa de margen elevado con escamas blancas. Prurito leve y dolor ardoroso moderado. Reactivación de repetición.	Betametason, voriconazol	Hipertrofia prostática, infección de vías urinarias, paraneoplasia, IgM elevada.
3NB(B)				Pie			
4NB	23	M	6	Ingle (I), abdomen (A) y pies (P).	En (I) y (A) placas hiperpigmentadas, eritematosas, de margen elevado, con pápulas y escamas finas blanquecinas. (P): en pliegues interdigitales, descamación blanquecina.	Ninguno	Ninguna
5NB	84	F	4	Dorso del pie.	Placa eritematosa con descamación fina. Prurito moderado y constante.	Vitacilina, metformina y glibenclamida.	DM2
6NB	50	F	6	Pies y uñas 1° y 3°.	Descamación moderada en la cara plantar. Paquioniquia en uña 1° y 3°; en la 1° leuconiquia proximal.	Miconazol, metformina	DM2
8NB	20	M	5	5° uña del pie izquierdo.	Melanoniquia	Ketoconazol, Tx. de repetición.	DM2

Clave del aislado	Edad (años)	Sexo	Evolución (meses)	Topografía de la lesión	Manifestaciones clínicas	Tratamientos previos	Enfermedad o factor asociado
9NB	23	F	132	Todas las uñas de ambos pies.	Paquioniquia y leuconiquia. Uñas opacas, maceración en el cuarto pliegue.	Ketoconazol, miconazol Tx. de repetición.	Ninguno
10NB	19	F	1	Región mamaria izquierda.	Placa anular eritematosa, descamativa, con borde elevado.	Miconazol Tx. de repetición	Dermatitis atópica.
11NB	21	M	168	1° Y 3° uña del pie derecho.	Leuconiquia, onicosis y paquioniquia.	Tx. Tópico no especificado.	Ninguno.
12NB	65	M	Sin datos	Pies.	Descamación blanquecina en bloques. Asintomática.	Miconazol, glibenclamin, carbamazepina.	Neuropatía, DM2.
13NB	52	F	24	Cara externa del muslo derecho.	Placa eritematosa, descamación fina y algunas pápulas.	Metformina.	DM2 Hepatitis C Cirrosis
14NB	59	M	120	Área glútea.	Eritema discreto, descamación fina, pápulas eritematosas en la periferia. Asintomático	"Cold cream", valsartán	Trombocitopenia Hipertensión arterial
15NB	43	M	132	Pies y uñas.	Descamación fina y eritema discreto. Uñas amarillentas, con onicosis.	Terbinafina, metronidazol, ceftriaxona.	Celulitis pierna izquierda.
16NB	24	F	48	Uñas 1°, 4° y 5° de ambos pies.	Melanoniquia y onicomaderosis.	Urea y terbinafina.	Traumatismos repetidos por presión con zapatilla de ballet.
18NB	23	M	36	1° uña.	Paquioniquia, uña amarillenta y pulverulenta.	Itraconazol Tx. derepetición	Depresión moderada.
19NB	1	M	12	Ingle.	Pápulas eritematosas, con margen escamosa. Erupción de repetición	Itraconazol y ketoconazol. Tx de repetición	Ninguno

Tx. Tratamiento

Anexo 3.- Identificación de especies de *Trichophyton* y variedades de *T. rubrum*

Clave del aislado	Especie	Tipo	Variedad
2NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
3NB(A)	<i>T.rubrum</i>	Downy	Flava
3NB(B)	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
4NB	<i>T. tonsurans</i>	-	-
5NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
6NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
8NB	<i>T. tonsurans</i>	-	-
9NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
10NB	<i>T. interdigitale</i>	-	-
11NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
12NB	<i>T. interdigitale</i>	-	-
13NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
14NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
15NB	<i>T.rubrum</i>	Downy	“Y”
16NB	<i>T. interdigitale</i>	-	-
18NB	<i>T. tonsurans</i>	-	-
19NB	<i>T. tonsurans</i>	-	-

Anexo 4.- Preparación de medios de cultivo

Agar urea de Christensen	
<ul style="list-style-type: none"> • Solución A <p>Agua destilada 90 mL</p> <p>Agar 1.5 g</p> • Solución B <p>Agua destilada 10 mL</p> <p>Base agar urea 2.9 g</p> 	
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Calentar la solución A hasta disolver el agar, esterilizar a 121°C durante 15 min y dejar enfriar a 50°C. • Preparar la solución B y esterilizar por filtración con unidades de 0.45 µm. • Mezclar ambas soluciones y verter en tubos de ensaye. 	

Agar tierra pelos	
Agua destilada	1000 mL
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	0.9 g
Tierra (esterilizada previamente por triplicado)	20 g
Pelos	Los necesarios
Agar	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar todos los componentes (excepto los pelos) y calentar hasta disolver el agar. Esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas Petri. • Agregar con pinzas estériles la cantidad deseada de pelos. 	

Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol

- **Solución A**

Agua destilada	1000 mL
Leche descremada	80 g
Púrpura de Bromocresol 1.6% (diluido en etanol)	2 mL

- **Solución B**

Agua destilada	200 mL
Glucosa	40 g

- **Solución C**

Agua destilada	800 mL
Agar	30 g

Preparación

- Preparar por separado las soluciones A (evitando añadir el colorante para prevenir alteraciones en la molécula) y B. Ajustar pH a 6.6 y esterilizar a 115°C por 8 min.
- Calentar la solución C hasta disolver completamente el agar y esterilizar a 121°C por 15 min.
- Dejar enfriar las soluciones a 50°C y mezclarlas en el matraz de la solución C.
- Agregar el colorante, homogeneizar y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye.

Agar dextrosa Sabouraud

Agua destilada	1000 mL
Dextrosa	40 g
Peptona especial	10 g
Agar.....	15 g

Preparación

- Rehidratar el medio en un litro de agua destilada, calentar hasta disolver y esterilizar a 121°C por 15 min.
- Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye.

Agar dextrosa Sabouraud con antibióticos	
Agua destilada	1000 mL
Agar dextrosa Sabouraud	65 g
Cloranfenicol	50 mg
Cicloheximida	400 mg
Agar.....	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Rehidratar el medio en un litro de agua destilada, calentar hasta disolver y esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y agregar los antibióticos en ambiente estéril. • Verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar dextrosa Sabouraud con 5% de NaCl	
Agua destilada	1000 mL
Agar dextrosa Sabouraud	65 g
Cloruro de Sodio (NaCl).....	50 g
Agar.....	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar los componentes en agua destilada, calentar hasta diluir y esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar avena sales	
Agua destilada	1000 mL
Sulfato de Magnesio MgSO ₄	1 g
Di-potasio de fosfato K ₂ HPO ₄	1.5 g
Nitrato de Sodio NaNO ₃	1 g
Avena	10 g
Agar	18 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Calentar la avena en 200mL de agua destilada durante 20min, sin llegar a ebullición. • Disolver las sales y el agar en el agua destilada restante, calentando hasta su disolución. • Mezclar el agar-sales con la avena y llevar a ebullición. Esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar Lactrimel	
Agua destilada	1000 mL
Harina de arroz.....	14 g
Leche descremada.....	14 g
Miel.....	7 g
Agar	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar todos los componentes y calentar hasta disolver el agar. Esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar ácido casimino (agar <i>Trichophyton</i> libre de vitaminas)	
Agua destilada	1000 mL
Ácido casimino (libre de vitaminas)(Difco).....	1 g
Glucosa.....	40 g
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.1 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	1.8 g
Agar.....	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar los componentes en agua destilada, calentar hasta diluir y esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar Gorodkova	
Agua destilada	1000 mL
D-glucosa	1 g
Peptona.....	10 g
Cloruro de Sodio (NaCl).....	10 g
Agar.....	20 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar los componentes en agua destilada, calentar hasta diluir y esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50°C y verter en cajas Petri. 	

Agar harina de maíz dextrosa	
Agua destilada	1000 mL
Harina de maíz.....	50 g
Glucosa.....	5 g
Glicerol.....	30 mL
Agar.....	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Añadir la harina de maíz al agua destilada y calentar a punto de ebullición durante 20 min. • Adicionar el agar y calentar hasta diluir, posteriormente agregar la glucosa y el glicerol. • Esterilizar a 121°C por 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri o tubos de ensaye. 	

Agar extracto de carne - dextrosa	
Agua destilada	1000 mL
D - glucosa	0.5 g
Lab Lemnco	0.25 g
Agar	20 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar los componentes en agua destilada. • Ajustar a pH 7.0 • Calentar hasta diluir. • Esterilizar a 121°C por 15 min. • Dejar enfriar a 50° C y verter en cajas Petri. 	

Agar Littman Oxgall (Himedia)	
Agua destilada	1000 mL
Digerido peptídico de tejido animal.....	10g
Dextrosa.....	10g
Oxgall.....	15g
Cristal Violeta.....	0.01g
Agar.....	15 g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Suspender 55g de Agar Litman Oxgall en 1000mL de agua destilada. • Calentar hasta disolver el medio completamente. • Esterilizar a 121°C por 15 minutos y dejar enfriar a 50°C. • Enfriar a 45°C y en condiciones de esterilidad agregar estreptomycin a una concentración final de 30 µg/mL de medio. • Verter en cajas de Petri. 	

Caldo RPMI 1640	
Agua estéril químicamente pura (MQ).....	1000 mL
Polvo RPMI.....	10 g
MOPS.....	34.5g
Preparación	
<ul style="list-style-type: none"> • Disolver el MOPS en 500mL de agua MQ • Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1M y agregar el polvo RPMI1640 • Ajustar a un pH final de 7.0 ± 1, aforar a 1000 mL. • Esterilizar con unidades filtro de 0.22 µm. • Almacenar a 4°C. 	

11.- Bibliografía

1. Achterman RR, White TC. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol.* 2012: 358305. doi: 10.1155/2012/358305.
2. Adimi P, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Mirhendi H, Shidfar MR, Emmami M, Rezaei-Matehkolaei A, Gramishoar M, Kordbacheh P. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strain using microdilution method in Tehran. *Iran J Pharm Res.* 2013;12:537-545.
3. Afshari MA, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Antifungal susceptibility and virulence factors of clinically isolates dermatophytes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2016;8:36-46.
4. Ainsworth GS. Introduction to the history of medical and veterinary mycology: Cambridge; Cambridge University Press. 1986.
5. Ajello L, Georg LK. *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycophatol Mycol Appl.* 1957;8:3-17.
6. Ajello L. Natural History of the dermatophytes and related fungi. *Mycophatol Mycol Appl.* 1974;53:93-110.
7. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010;28:197- 201.
8. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:63-67.
9. Benham RW. Nutritional studies of the dermatophytes: effect on growth and morphology, with special reference to the production of macroconidia. *Trans N Y Acad Sci.* 1953;15:102-106.
10. Bennett D, Rubin AL. Dermatophytoma: a clinicopathologic entity important for dermatologist and dermatopathologist to identify. *Int J Dermatol.* 2013; 52: 1285-1287.

11. Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. J Invest Dermatol. 1991;96: 657-661.
12. Blutfeld MS, Lohre JM, Pawich DA, Vlahovic TC. The immunologic response to *Trichophyton rubrum* in lower extremity fungal infections. J Fungi. 2015;1:130-137.
13. Bonifaz A. Dermatofitosis. Micología médica básica. (4ta Ed): México; McGraw-Hill. 2012. p. 93-124.
14. Burkhart CN, Burkhart CG, Gupta AK. Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilms. J Am Acad Dermatol. 2002;47:629-631.
15. Cafarchia C, Latta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. Infect Genet Evol. 2013;20:336-351.
16. Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. Microbes Infect. 2006;8:372-379.
17. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, Santos P, Cárdenes D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. Rev Iberoam Micol. 2010;27:49-56.
18. Chinnapun D. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. Walailak J Sci & Tech. 2015;12:573-580.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. (2da Ed). 2008;28.
20. Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. Biofouling. 2014;30:719-727.
21. Dahl MV. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. J Am Acad Dermatol. 1993;28:S19-S23.

22. De Sousa M da G, Santana GB, Criado PR, Bernard G. Chronic widespread dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum*: a syndrome associated with a *Trichophyton*-specific functional defect of phagocytes. *Front Microbiol.* 2015;6:801-808.
23. Dogra S, Uprety S. The menace of chronic and recurrent dermatophytosis in India: Is the problem deeper than we perceive?. *Indian Dermatol Online J.* 2016;7:73-76.
24. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167-193.
25. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIOJ.* 2000;46(Supp1); S47-S52.
26. Drakensjö IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Med Mycol.* 2010;49:484-489.
27. Fanning S, Mitchell AP. Fungal Biofilms. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002585.doi:10.1371/journal.ppat.1002585.
28. Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50:748–752.
29. Geiser DM, Gueidan C, Miadlikowska J, Lutzoni F, Kauff F, Hofstetter V, Fraker E, Schoch CL, Tibell L, Untereiner WA, Aptroot A. Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia.* 2006;98;1053-1064.
30. Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J Bacteriol.* 1957;74:113-121.
31. Gokulshankar S, Ranjitsingh A, Venkatesan G, Ranjith MS, Vijayalakshmi GS, Prabhmanju M, Subashini S. Is moderation of protease production an adaptation of well-defined anthropization in dermatophytes?. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53:87-92.
32. Gonzáles-Ramírez AI, Ramírez–Granillo A, Medina–Canales MG, Rodríguez–Tovar AV, Martínez–Rivera MA. Analysis and description of the

- stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. BMC Microbiol. 2016;16:243–255.
33. Gouling Y, Xiaohong Y, Jingrong L, Liji J, Lijia A. A study on stability of phenotype and genotype of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia. 2006;161:205–212.
 34. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. Mycopathologia. 2008;166:239-256.
 35. Gräser Y, De Hoog S, Summerbell RC. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. Med Mycol. 2006;44:199-209.
 36. Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kurnet J, Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. J Invest Dermatol. 2013;133:1550-1555.
 37. Gupta AK, Einarson TR, Summerbell RC, Shear NH. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses: A North American perspective. Drugs. 1998;55:645-674.
 38. Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafina, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. Br J Dermatol. 2003;149:296-305.
 39. Gupta AK, Plott T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. Int J Dermatol. 2004;43:3-8.
 40. Gupte M, Kulkarni P, Ganguli BN. Antifungal antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;58:46-57.
 41. Guzmán G. Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina: México; Bianca Delfosse. 1997.
 42. Harding MW, Marques LL, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? Trends Microbiol. 2009;17:475-480.
 43. Hashimoto T, Pollack JH, Blumenthal HJ. Carotenogenesis associated with arthrospore formation of *Trichophyton mentagrophytes*. J Bacteriol. 1978;136:1120–1126.

44. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep.* 2015. doi:10.1007/s2281-015-0231-4.
45. Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, Córdova-Martínez E, Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, García de Acevedo B, Orozco-Topete R, Cerbón MA. Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolates. *Rev Mex Micol.* 2007;25:9-14.
46. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* 2007;111:509-547.
47. Homei A, Worboys M. Fungal disease in Britain and the United State. 1850-2000. United Kingdom: Pelgrave and MacMillan; 2013, pp 17.
48. Jacobs JA, Kolbach DN, Vermeulen AH, Smeets MH, Neuman HA. Tinea incognito due *Trichophyton rubrum* after local steroid therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;33:E142-E144.
49. Jue SG, Dawson GW, Brogden RN. Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. *Drugs.* 1985;29:330–341.
50. Kaminski G. Kaminski's dermatophyte identification scheme. *Mycology online.* <http://www.mycology.adelaide.edu.au>.
51. Kandemir H, Ilkit M, Çürük A. Xanthomegnin detection does not discriminate between *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* complexes. *J Microbiol Methods.* 2015;111:122–126.
52. Kane J. The biological aspects of the Kane/Fisher system for identification of dermatophytes, en: Kane J. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails.* U.S.A. Publishing Company. 1997. p. 81–129.
53. Kaufman G, Horwitz BA, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med Micol.* 2007;45:149-155.

54. Li RY, Wan Z, Wang AP, Shen YN, Lu CM, Li M, Xi LY, Liu WD, Zeng FQ. *In vitro* susceptibility testing of amorolfine in pathogenic fungi isolated from dermatomycosis patients in China. *Mycoses*. 2004;47:402-406.
55. López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med Mycol*. 2010;48:476-479.
56. López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev Latinoam Microbiol*. 1994;36:17-20.
57. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares LR. *Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 3ªed. México:Trillas, 2012.
58. Manzano-Gayosso P. Dermatofitos: ecología y morfología, en: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. *Actualidades en Micología Médica*. (6ta Ed). México D.F, Facultad de Medicina, UNAM, 2012.
59. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Palacios-Morales Y, Córdova-Martínez E, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. *Mycopathologia*. 2008;166:4-45.
60. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, García-Salazar R, Córdova-Martínez E, Palacios-Morales Y, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Dermatofitosis cutánea atípica. Reporte de cinco casos. *Dermatología CMQ*. 2008;6:114-117.
61. Manzano-Gayosso P, Zabicky-López J, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Bazán-Mora E, Córdova-Martínez E, López-Martínez R. Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos. *Rev Mex Micol*. 2015;41:47-53.
62. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. Dermatophytoses in Mexico City. *Mycoses*. 1994;37:49-52.

63. Martínez-Herrera E, Moreno-Coutiño G, Fernández-Martínez RF, Finch J, Arenas R. Dermatophytoma: description of 7 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:1014-1016.
64. Martinez-Rossi NM, Peres, NT, Rossi A. Antifungal resistance mechanism in dermatophytes. *Mycopathologia.* 2008;166:369-383.
65. Méndez-Tovar LJ. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. *Clin Dermatol.* 2010;28:185-189.
66. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, López-Martínez R. Resistencia a compuestos azólicos en aislamientos clínicos de *Trichophyton spp.* *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:320-322.
67. Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2007;56:1205-1212.
68. Negróni R. Historical aspects of dermatomycoses. *Clin Dermatol.* 2010;28:125-132.
69. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5:198-202.
70. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. Mycology- an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12:188-209.
71. Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Tietz HJ. Mycology-an update. Part 2: Dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12:749-777.
72. Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents: Spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:51-83.
73. Peres NT, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol.* 2010; 85:657-667.

74. Pires CA, Cruz NF, Lobato AM, Sousa PO, Carneiro FR, Mendes AM. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol*. 2014;89:259-264.
75. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008;166:295-306.
76. Sánchez-Carazo JL, Obón-Losada L, Pont-Sanjuan V. Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16:S26-S30.
77. Sardi J de C, Pitangui N de S, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31:22-29.
78. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008;166:335-352.
79. Sentamilselvi G, Kamalam A, Ajithadas K, Janaki C, Thambiah AS. Scenario of chronic dermatophytosis: An Indian study. *Mycopathologia*. 1998;140:129-135.
80. Serrano-Jaén L, Méndez-Tovar LJ, Almeida-Arvizu V, Manzano-Gayosso P, Córdova-Martínez E, Bazán-Mora E, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. Dermatofitosis diseminada crónica asociada a fagocitosis deficiente tratada con antimicóticos e inmunostimulación fagocitaria. *Gac Med Mex*. 2006;142:41-45.
81. Seyfarth F, Ziemer M, Gräser Y, Elsner P, Hipler UC. Widespread tinea corporis caused by *Trichophyton rubrum* with non-typical cultural characteristics—diagnosis via PCR. *Mycoses*. 2007;50:26-30.
82. Sharma A, Chandra S, Sharma M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses*. 2012;55:410-415.
83. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:40-79.
84. Silva M, Benham RW. Nutritional studies of the dermatophytes with special reference to the red-pigment-producing varieties of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Invest Dermatol*. 1954;22:285-297.

85. Silva M, Benham RW. Nutritional studies of the dermatophytes with special reference to *Trichophyton megnini* (Blanchard 1896) and *Trichophyton gallinae* (Megnin. 1881). *J Invest Dermatol.* 1952;18:453-472.
86. Singh R, Shivaprakash MR, Chakrabarti A. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology.* 2011;157:2611-2618.
87. Spatafora JW, Sung GH, Johnson D, Hesse C, O'Rourke B, Serdani M, Spotts R, *et al.* A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia.* 2006;98:1018-1028.
88. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
89. Subissi A, Monti D, Togni G, Mailland F. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs.* 2010;70: 2133-2152.
90. Summerbell RC, Kane J. Physiological and other special test for identifying dermatophytes, en: Kane J. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails.* Belmont, California: Publishing Company. 1997.
91. Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2279-2282.
92. Summerbell RC. Form and function in the evolution of dermatophytes. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17Suppl:30-43.
93. Tabara K, Szewczyk AE, Bienias W, Wojciechowska A, Pastuszka M, Oszukowska M, Kaszuba A. Amorolfine vs. ciclopirox – lacquers for the treatment of onychomycosis. *Postępy Dermatol Alergol.* 2015;32:40-45.
94. Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, Matsumura M, Goto K, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura M, Makimura K. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agent to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. *Microbiol Immunol.* 2014;58:1-8.

95. Tiles G. Teignes et teigneux. Histoire médicale et sociale. Francia: springer; 2009.
96. Vermout S, Tabart J, Baldo A, Anne M, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008;166: 267-275.
97. Webster J, Weber RWS. Introduction to fungi. (3ra Ed). EUA. Cambridge University Press. p 841, 2007.
98. Weitzman I, McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. Mycotaxon. 1986;25:505-518.
99. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995;8:240-259.
100. Welsh O, Welsh E, Ocampo-Candiani J, Gomez M, Vera-Cabrera L. Dermatophytoses in Monterrey, México. Mycoses. 2006;49:119-123.
101. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. Eukaryot Cell. 2008;7:1238-1245.
102. Wiederhold NP, Fothergill AW, McCarthy DI, Tavakkol A. Luliconazole demonstrates potent *in vitro* activity against dermatophytes recovered from patients with onychomycosis. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:3553-3555.
103. Youngchim S, Pornsuwan S, Nosanchuk JD, Dankai W, Vanittanakom N. Melanogenesis in dermatophyte species *in vitro* and during infection. Microbiology. 2011;157:2348-2356.
104. Zaias N, Rebell G. Chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. J Am Acad Dermatol. 1996;35:S17-S20.
105. Zaias N, Rebell G. Clinical and mycological status of the *Trichophyton mentagrophytes (interdigitale)* syndrome of chronic dermatophytosis of the skin and nails. Int J Dermatol. 2003;42:779-788.