



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Valoración de la terapia fotodinámica con azul de metileno en
dermatomicosis ovinas

Autor/es

Elena Moros Salvador

Director/es

Juan José Ramos Antón. Prof. Titular. Dpto Patología animal.
Antonio Rezusta López. Prof. Asociado. Jefe de sección de
microbiología, H.U. Miguel Servet.

Facultad de Veterinaria

Curso 2014-2015

ÍNDICE:

RESUMEN.	2
ABSTRACT.	2
INTRODUCCIÓN.	3
DERMATOFITOSIS OVINA:	4
- Etiología.	4
- Cuadro Clínico.	4
- Diagnóstico.	7
- Tratamiento y prevención	9
TERAPIA FOTODINAMICA:	11
- Introducción.	11
- Características de la terapia fotodinámica.	12
- Mecanismos de acción.	14
- Aplicaciones terapéuticas.	16
- Azul de metileno:	19
OBJETIVOS.	21
APLICACIÓN PRÁCTICA.	22
- Material y Métodos.	22
- Resultados y discusión.	23
CONCLUSIONES.	26
CONCLUSIONS.	26
VALORACION PERSONAL.	27
BLIBLIOGRAFIA.	28
ANEXOS.	31

RESUMEN

Las dermatomicosis son infecciones del tejido queratinizado causadas por uno o varios hongos. *Trichophyton verrucosum* es el más frecuente en la oveja y generalmente provoca áreas alopécicas circulares y ligeramente costrosas. Se suele situar en zonas desprovistas de lana, como la cabeza y el cuello.

El problema de las dermatomicosis ovinas es, ante todo, la falta de productos terapéuticos permitidos, teniendo que acudir a tratamientos destinados para otras especies. Ante la falta de tratamientos específicos, están surgiendo otras terapias como el empleo del azul de metileno como agente de la terapia fotodinámica.

La terapia fotodinámica se ha estudiado en los últimos años, sobre todo por su carácter inocuo, siendo que además, en este caso, no es invasiva, es barata, de fácil aplicación y utilización.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto, del azul de metileno como el agente fotodinámico en las dermatofitosis ovinas.

Para esto, a partir de un rebaño sospechoso, al que vamos a tomar muestras para identificar el agente etiológico. Una vez confirmado, que es una dermatomicosis por *Arthroderma vanbreuseghemii*, se procede a realizar un tratamiento parcial de las lesiones con el azul de metileno. Periódicamente se comprueba la evolución de las lesiones tratadas y se compara con las lesiones que no han recibido tratamiento. De esta forma tendremos datos para controlar el efecto del azul de metileno en las dermatofitosis.

Assessment of methylene blue in ovine dermatomycosis

ABSTRACT

Dermatomycosis are keratinized infections by one or several fungi. Being *Trichophyton verrucosum* the most prevalent agent in ovine, causing circular alopecic areas with light scab zones. It is usually placed on unprovided wool zones as head and neck.

The most common problems with ovine dermatomycosis is the absence of allowed treatments, needing to use treatments from other animal species. Due to the lack of

treatments, other therapies are arising such as the use of methylene blue as an agent of the photodynamic therapy.

The photodynamic therapy has been the center of investigation during these past years, because of its innocuous character that may present, according to the agent that we use. Also, taking into account that in this case, the agent is also a non-invasive treatment with easy application and utilization.

The purpose of this study is to evaluate the effect, as well as experimental treatment of methylene blue as a photodynamic agent in dermatophytosis.

Starting from a suspect flock, in which we are going to take sample to identify the causal agent and then confirm that, is a dermatomycosis. Once confirmed, the procedure is to make a partial treatment on the injuries with the methylene blue. Being these injuries periodically checked and then compared with the non-treated lesions. Through this process, we should have data to control the effect of methylene blue in dermatomycosis.

INTRODUCCIÓN

En el siguiente trabajo vamos a ver cómo interactúan dos términos discordantes como son la tiña ovina y la terapia fotodinámica.

La tiña o dermatofitosis es un tipo de dermatomicosis producida por un hongo dermatofito, veremos cuáles son sus agentes etiológicos más comunes en el entorno ovino, así como los procedimientos actuales frente a esta patología. Por otro lado, vamos a ver que es la terapia fotodinámica, sus mecanismos de actuación y como se está utilizando actualmente en diferentes ámbitos de trabajo, incluso como tratamiento en diversas patologías veterinarias. También veremos los efectos de nuestro agente elegido, que es el azul de metileno, para ver su utilidad en la terapia fotodinámica.

Por último, vamos a ver cómo interactúan estos dos conceptos en un caso clínico, en el que se ha usado una dilución de azul de metileno al 1% para tratar un lote de animales en un rebaño ovino afectado por la tiña y sus resultados. Comprobando de esta forma si la relación entre tiña ovina y terapia fotodinámica tienen posibilidades para instaurarse en un futuro como tratamiento de la dermatofitosis ovina.

DERMATOFITOSIS OVINA

Etiología

Las dermatofitosis, también conocidas como tiñas, están causadas por hongos queratinolíticos de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, que colonizan el estrato superficial de la piel. Por lo general, esta patología es poco frecuente en el ganado ovino, en comparación con lo que sucede en el ganado vacuno (Mitra et al. 1998; Martin et al. 2002).

La mayoría de tiñas ovinas están causadas por *T. verrucosum*, seguida por *M. canis*, *M. gypseum* y, con menor incidencia, *T. mentagrophytes*, siendo todos estos agentes reportados como causantes de tiñas en la especie humana (Mushin et al. 2000; Nweze et al. 2011).

La transmisión de los dermatofitos se realiza sobre todo por contacto directo, aunque también puede ocurrir por aire o por contacto con material del medio contaminado, ya que los animales pueden rascarse con objetos del medio, dejando esporas fúngicas en ellos. Estas esporas, si tienen alguna escama cutánea como estrato, pueden permanecer con capacidad infectante hasta un año. Además, se conoce la presencia de animales asintomáticos como portadores dentro de la misma especie u otra diferente, como pueden ser gatos, perros o roedores (Cabañes et al. 1997; Nweze, 2011; Summerbell et al. 2011).

Se ha visto que los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos, esto podría ser debido a que los animales jóvenes suelen estar estabulados, quedando así constantemente expuestos al agente etiológico, además de que aún no son totalmente inmunocompetentes (Mushin et al. 2000).

Además, es más normal encontrar la afección en invierno; cuando los animales están reunidos, en contacto estrecho y normalmente con humedades elevadas. También es más frecuente la enfermedad en machos que en las hembras (Mckellar et al. 1987; Mushin et al. 2000).

Cuadro Clínico

En el ganado ovino, las lesiones no son especialmente graves, pero, como toda enfermedad, afecta al bienestar animal y a la productividad del ganado ocasionando pérdidas en la producción de carne, lana y la calidad de las pieles. En el ganado vacuno, se ha visto una

asociación con la pérdida del apetito de los animales por el picor y consiguiente rascado durante largos periodos de tiempo (Abou-Gabal et al. 1976; Scott et al. 2007).

Además no hay que olvidar el factor zoonótico, ya que las especies productoras de tiña en las ovejas pueden ser transmisibles al hombre, cuando se dan las circunstancias adecuadas, como pueden ser la inmunosupresión y el contacto directo continuado (Martin 1988; Summerbell et al. 2011).

Las alteraciones que se observan con más frecuencia en el ganado ovino son lesiones costrosas de aspecto verrucoso sobre la cara y las orejas, normalmente circulares, aunque se pueden extender a otras localizaciones (dorso, escapula, cuello y tórax), asociadas a un ligero prurito (Martin et al. 2002).

En vacuno, las lesiones son normalmente elevadas y endurecidas, bien definidas, circulares, grisáceas y alopecicas, con tendencia a expandirse de las localizaciones iniciales, por lo que es normal ver lesiones multifocales. Se suelen localizar en cara y cuello (Blowey et al. 2011).

En el hombre, las lesiones suelen ser eritematosas, papulomatosas, con vesículas y pústulas de diferentes tamaños dependiendo de la reactividad que presente, ya que un mismo agente, puede producir una inflamación severa, con foliculitis postular, que puede evolucionar a supurativa o producir una lesión seca y eritematosa. Cuando la tiña es de origen animal, las lesiones se localizan en rostro y parte inferior del brazo, o en el cuero cabelludo si son niños (Summerbell et al. 2011).

La mayoría de los animales afectados se recuperan espontáneamente tras 4-6 semanas, por lo que, a veces el tratamiento no se realiza, pero es muy recomendable separar a los afectados y evitar que el resto de animales entren en contacto con equipos e instalaciones contaminados, ya que algunas de las esporas de estos hongos pueden permanecer viables hasta un año en condiciones adecuadas, por lo que se deberían limpiar y desinfectar a fondo las instalaciones en las que se presente este problema (Blowey et al. 2011; Roberson et al. 2012).

Cuando el dermatofito entra en contacto con la piel pueden ocurrir que (Jungerman et al. 1977):

- El hongo sea separado por medios mecánicos y no pueda establecerse, sobre todo por ser incapaz de competir con la flora bacteriana normal de la piel.

- Se establezca en la piel, pero no produzca una lesión reconocible. Esto puede dar lugar a portadores asintomáticos del hongo.
- Se establezca y ocasione la enfermedad clínica.

La existencia en la piel de los dermatofitos está sujeta a la presencia de tejidos muertos: la queratina del estrato corneo, pelos y uñas. El hongo para sobrevivir debe tener un crecimiento hacia abajo, con el fin de permanecer en la piel y no ser eliminado con la descamación de esta. Para poder realizar este crecimiento los hongos cuentan con una acción enzimática del tipo: lipasa, proteasa y amilasa, además de queratinasa, que les otorgan la capacidad de invadir los tejidos queratinizados (Mushin et al. 2000; Roberson et al. 2012).

Al no invadir tejido vivo, el mecanismo por el que se produce la enfermedad es por la elaboración y excreción de toxinas irritantes o alérgenos por parte del dermatofito, que al llegar a la dermis, a través de la epidermis, responde con una reacción inflamatoria, produciéndose una dermatitis por contacto biológico (Jungerman et al. 1977; Mushin et al. 2000).

Los hongos se han adaptado a vivir en la piel de un huésped específico, bajo condiciones ideales de parasitismo, elaboran cantidades mínimas o inadecuadas de toxina para no producir una reacción inflamatoria intensa y asegurar su permanencia en el huésped. Por esta razón, cuando un hongo zoofílico infecta a un ser humano este sufre una intensa reacción eruptiva, la cual puede eliminar la infección, igual que cuando un hongo humano infecta a un animal (Roderick et al. 2000).

Esta lesión depende en gran medida de la reactividad del huésped, así como del agente infeccioso, es decir, cuando tenemos una tiña clínicamente caracterizada, el dermatofito ha excedido los límites de una reacción huésped parasito o el umbral reactivo del huésped ha sido alcanzado. Este umbral se alcanza al superar los medios de defensa innatos; como son los factores inespecífico del suero, inhibición de las queratinasas fúngicas, la barrera que suponen los queratinocitos y otras barreras inmunológicas como es la reacción de Th1 mediada por linfocitos (Jungerman et al. 1977; Summerbell et al. 2011).

La clínica aparece al excretar el dermatofito sustancias que ocasionan una reacción inflamatoria, donde se produce eritema, exudación, calor y alopecia. El dermatofito no suele ser capaz de vivir en la zona inflamada, por lo que se desplaza a la zona periférica de la lesión, volviendo a reproducir estos efectos en la nueva zona de hospedaje, volviendo a desplazarse lejos de la reacción, formando así la típica lesión anillada de “herpes circinado”, que aparece

como una zona circular alopécica, con una zona central de curación con inflamación en los bordes. Llegado a un punto, la expansión termina y la lesión se hace estática desapareciendo la lesión por sí misma (Jungerman et al. 1977; Summerbell et al. 2011).

Esta curación “espontanea” podría ser debida a que el animal no es el huésped natural o bien a que adquiere inmunidad rápidamente. Aunque también se ha visto que es de naturaleza recurrente en el mismo animal, lo que permite sospechar que éste sigue infectado y, ante una bajada de defensas, vuelve a mostrar sintomatología. Pidiendo considerar, a estos animales como portadores asintomáticos (Jungerman et al. 1977).

Diagnóstico

Las lesiones de la tiña pueden ser confundibles por lo que es esencial establecer un correcto diagnóstico diferencial con respecto a enfermedades como: sarna, urticaria, infecciones bacterianas, dermatitis seborreica, etc. Es más, esta es una enfermedad que se llega a sobre-diagnosticar al considerar como dermatofitosis cualquier lesión pruriginosa circular u oval. En este sentido, cabe señalar que la piel suele responder con un patrón circular u oval en la mayoría de reacciones inflamatorias. (Scott et al. 2007).

El diagnóstico es posible mediante la observación al microscopio de los dermatofitos, a partir muestras, procedentes del raspado de la piel y/o pelos arrancados de los bordes de la lesión, a las que se ha podido añadir KOH y dejado reposar un tiempo. Esta prueba no es infalible, pues si no se observan hifas o esporas en el microscopio no indica que sea negativo a tiña, pero en el caso de que las encontremos podemos instituir la terapia en un corto periodo de tiempo. No obstante, para poder confirmar o descartar por completo tendremos que realizar un cultivo, que también nos permitirá realizar una identificación del agente. Por esta razón se ha de coger muestra suficiente y a, ser posible, de manera aséptica, para evitar contaminaciones indeseadas (Summerbell et al. 2011).

La toma de muestras para el cultivo se deberá realizar limpiando el área de la que se recogerán las muestras, primero con agua y jabón y luego con alcohol, para eliminar posibles contaminantes y bacterias. A la hora de sembrar la muestra en el medio se deberá hacer con la mayor asepsia posible. Se suele emplear el agar de Sabouraud-glucosa, agregado con cloranfenicol y ciclohexamida, ya que este medio inhibe en cierta medida el crecimiento bacteriano, al igual que el de ciertos hongos saprofitos (Jungerman et al. 1977).

Para que crezcan hongos en un medio de cultivo, este debe ser específico y de normal se le incluyen sustancias, como antibióticos, para evitar el crecimiento de bacterias por

contaminación de la piel, ya que los cultivos de hongos suelen ser de crecimiento lento, no pudiendo descartar que vaya a crecer hasta pasado un mínimo de 21-30 días (Jungerman et al. 1977; Summerbell et al. 2011).

Aunque hay otros medios como: el Agar Mycobiotic, el Dermasel suplementado selectivamente o el agar suplementado con ciclohexamida y cloranfenicol que desarrolla un cambio en la pigmentación. Además se recomienda añadir gentamicina en los medios para muestras que vengán contaminadas. También tenemos el DTM (dermatophyte test médium) que permite realizar un proceso selectivo para dermatofitos en muestras que presentan un elevado índice de contaminación. En este medio, el crecimiento de los dermatofitos, incrementa el pH y provoca un viraje de color del medio (Summerbell et al. 2011).

La incubación tiene lugar en estufa a 30°C, aunque hongos como *T. verrucosum* crecen mejor a 37°C, y debe mantenerse un mínimo de 21-30 días. Los recipientes que contienen el medio deben permitir el intercambio de gases (Roderick et al. 2000; Summerbell et al. 2011).

La identificación del hongo requiere de un estudio microscópico de las esporas y el micelio, no sirve la morfología de la colonia, que como mucho es orientativa. Lo malo de esta técnica, es que es muy lenta. A continuación veremos las características más importantes de los agentes etológicos a la hora de identificarlos (Summerbell et al. 2011):

- *Trichophyton verrucosum*: es el principal agente causal de las tiñas en rumiantes. Necesita medios de enriquecidos con tiamina e inositol. Las colonias son de crecimiento lento, pudiendo no aparecer hasta los 10-14 días de incubación. Las colonias son elevadas, lisas, amarillento grisáceas. Al microscopio tienen hifas ramificadas y las clamidosporas suelen estar dispuestas en cadenas, si se cultiva en un medio enriquecido con leche. No suele presentar macroconidias. Las microconidias presentan forma de gota. Vira el pH del medio a alcalino. No presenta crecimiento perforante del pelo.
- *Microsporum canis*: las colonias son de crecimiento rápido de aspecto algodonoso, pudiendo ser de un amarillo brillante o naranja en el reverso del cultivo. Al microscopio, presenta numerosas macroconidias grandes de paredes gruesas en forma de huso y multiseptadas. No producen cambios en el pH del medio. Y en pelo se puede apreciar un crecimiento perforante.
- *Microsporum gypseum*: las colonias son planas y granulares, con crecimiento blanco arenoso en forma de pelusa en superficie de color café. Microscopicamente, vemos macroconidias numerosas, grandes y multiseptadas,

de forma elíptica y pared fina. No cambian el pH del medio, y presentan crecimiento perforante del pelo.

- *Trichophyton mentagrophytes complex* (incluye a *Arthroderma vanbreuseghemii*): es de crecimiento rápido, presenta colonias granulares de color blanco-amarillento, y reverso rojo/marrón. Macroconidias escasas, en forma de clavo de paredes delgadas. Microconidias numerosas casi esféricas pudiendo presentar apéndices espirales. Viraje suave del pH del medio a alcalino. Presenta crecimiento perforante del pelo.

También se puede emplear la lámpara de Wood, para aproximar el diagnóstico, pero hongos como el *T. verrucosum* y *T. mentagrophytes* no muestran fluorescencia por lo que no siempre es útil como técnica diagnóstica. Es más aunque facilita la recogida de muestras, sólo suele ser útil con *M. canis* ya que de los dermatofitos que hemos visto es el único que presenta fluorescencia positiva a la lámpara de Wood (Pier et al. 1994; Roderick et al. 2000).

Tratamiento y prevención

El tratamiento de la tiña ha pasado por diversas fases a lo largo de los años, dividiéndose, en su mayoría, en dos tipos: sistémico y tópico. Aunque también hay que tener en cuenta los mecanismos naturales que llevan a abortar la clínica, como pueden ser el propio ciclo del pelo y la suspensión de la producción de queratina, por la intensa inflamación producida (Jungerman et al. 1977).

El mayor problema con los tratamientos es que la Unión Europea ha prohibido el uso de algunos fármacos para los animales de abasto, como la griseofulvina por su acumulación en tejidos y su efecto teratógeno; los tratamientos tópicos, como el yodo al 5%, no se suelen usar por teñir la lana. Además de que son prolongados en el tiempo, resultando trabajosos para el ganadero que debe aplicarlo. Por esta razón, se están estudiando otras posibilidades terapéuticas como la utilización de aceites esenciales o la aplicación de la terapia fotodinámica (Jungerman et al. 1977; Mugnanini et al. 2013).

Aunque esto no quiere decir que no haya tratamiento para las tiñas. En ganado vacuno está permitida la aplicación tópica de enilconazol, pero no está aprobado para ovino. Al igual que para pequeños animales está permitido usar el itraconazol y en Australia se está estudiando el uso de la terbinafina (Pier et al. 1994; Guiavet, 2013).

Para disminuir la incidencia de la tiña en el rebaño deberemos actuar en los siguientes puntos (Roberson et al. 2012):

- Limpieza y desinfección de las instalaciones, ya que estos agentes son sensibles a desinfectantes o detergentes fuertes.
- Retirada de restos que contengan queratina.
- Control de los animales externos e internos a la explotación.
- Tratamiento de los animales afectados y control *a posteriori* de estos animales, ya que el proceso puede recidivar al quedar, los animales, como portadores asintomáticos. En algunos países de Europa Este se ha controlado bastante bien la aparición de tiñas mediante la vacunación.

Es decir, en el tratamiento de animales de abasto, se deberá destruir la cama utilizada, desinfectando el equipo y objetos en el ambiente con el cual los pacientes han estado en contacto. No se deberán introducir animales sanos en el área donde hay infectados. Y el personal que trate a los animales debería hacerlo con guantes desechables y lavarse las manos tras cada tratamiento (Blowey et al. 2011).

Como hemos comentado anteriormente en ciertos países de Europa del Este parece que se ha controlado bastante bien la aparición de la tiña, causada por *T. verrucosum*, mediante las vacunas. Estas vacunas están basadas en las reacciones de hipersensibilidad ya que los dermatofitos tienen una baja antigenicidad, pero pueden ser altamente alergénicos (Jungerman et al. 1977; Piorkowski, J. 2006).

Por esta razón se puede aplicar por vía intradérmica una vacuna frente al dermatofito, de esta forma cuando el animal entre en contacto con él, presentará una reacción inflamatoria más intensa y el dermatofito solo se podrá encontrar 2-3 días después que la erupción se haya hecho evidente, acortando el período de afección y de curación posterior, siendo que la autocuración natural puede tardar unas 4-16 semanas (Piorkowski, J. 2006; Lund et al. 2008; Roberson et al. 2012; Lund et al. 2014).

Terapia fotodinámica

Introducción

La terapia fotodinámica es una forma de quimioterapia en la que se usa un espectro de luz no dañino como agente activador de una sustancia fotosensibilizante (FS), que suele ser un tinte o sustancia no tóxica, de manera que el efecto terapéutico está circunscrito a la región en la que se aplicó la luz (Castano et al. 2005).

La reacción fotodinámica depende de tres elementos básicos: el agente fotosensibilizante, la fuente de luz y el oxígeno. En principio se desarrolló como terapia antitumoral, comprobándose posteriormente su utilidad como tratamiento de enfermedades no malignas (Castano et al. 2005).

Esta terapia se presenta como una opción para el tratamiento de problemas dérmicos resistentes diferentes fármacos como pueden ser los antibióticos (Fernandez-Guarino et al. 1999).

El empleo de la terapia fotodinámica se remonta a varios cientos de años atrás, llegándose a encontrar referencias del Antiguo Egipto en el uso de sustancias fotosensibilizadoras para el tratamiento de diversas enfermedades como la psoriasis o el vitíligo (De La Paz et al. 2013).

Los primeros datos recogidos con base científica en relación con la terapia fotodinámica se consiguen a principios del siglo XX, donde se estudia el efecto del naranja de acridina como agente foto-oxidante en presencia de luz y oxígeno. Por otro lado, en el instituto Pasteur se demostró que el oxígeno era una parte imprescindible para que reaccionase el FS. Posteriormente se conoce esta acción como terapia fotodinámica y se empiezan a realizar pruebas en pacientes para tratar el cáncer de piel, lesiones sifilíticas y tuberculosas, usando como FS a la eosina (De La Paz et al. 2013).

La primera generación de fotosensibilizadores, aceptados como tal, fueron los derivados de la hematoporfirina (la porfirina de la sangre), habiéndose realizado diferentes estudios sobre ella y recibiendo el nombre de "Photodyn". Este ha sido el FS más comúnmente utilizados, y aceptado como tratamiento en diversos países, para estadios tempranos y tardíos de cáncer pulmonar, cáncer esófago y estómago, de vejiga y cáncer cervical. Actualmente, se

están realizando estudios sobre su funcionalidad frente al sarcoma de Kaposi, cáncer en cerebro, intestino, mama y piel... y otras afecciones como la psoriasis (Sharman et al. 1999).

A pesar de que el “Photodyn” es muy utilizado tiene varias desventajas: por su acumulación en el tejido cutáneo, hasta diez semanas post-inyección, lo que provoca sensibilidad cutánea y que el paciente deba evitar la luz del sol. Siendo especialmente problemático en pacientes con tratamientos de larga duración. Por esta razón, se han buscado otros agentes que puedan servir como sustancias fotoestimulantes (Sharman et al. 1999).

Estos FS, que podrían ser considerados de segunda generación, son sustancias como el azul de metileno, del que hablaremos más adelante, el ácido 5-aminolevulinico y otros derivados porfirínicos. Estas y otras sustancias de características similares se han probado principalmente, solas o en combinación con la terapia fotodinámica, frente a diferentes tipos de cáncer (Sharman et al. 1999).

Como ejemplo tenemos el tratamiento del cáncer esofágico por medio de la terapia fotodinámica, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) utilizando una versión purificada de la hematoporfirina, que recibió el nombre de “Photofrin”. Aunque, con el tiempo, han surgido otras sustancias y se han empleado para tratar afecciones diversas (Sharman et al. 1999; De La Paz et al. 2013).

Características de la terapia fotodinámica.

La terapia fotodinámica según Sharman et al. (1999) y Gómez-Hernández et al. (2011). presenta una serie de ventajas:

- No es invasiva.
- Es específica para el tejido diana.
- Es bien tolerada por el organismo.
- Permite el tratamiento de múltiples lesiones en una misma sesión.
- Evita que se produzcan resistencias.
- No tiene toxicidad acumulativa, permitiendo la repetición los tratamientos.
- Los fármacos son inocuos en ausencia de luz.

Asimismo, presenta también inconvenientes (Ochsner. 1996; Sharman et al. 1999; DeRosa et al. 2002):

- Excesiva destrucción tisular de la zona tratada.
- Pérdida de la fotoprotección cutánea.

- Ocasional desequilibrio sistémico y metabólico según la sustancia fotosensibilizante utilizada, sobre todo si la aplicación es sistémica.

Para que la terapia fotodinámica (TFD) surta efecto, se debe alcanzar una concentración suficiente del agente fotosensibilizante en el tejido diana, a la vez que se aplica la fuente de luz, siendo esto complicado en enfermedades ampliamente extendidas, por lo que estos casos no se recomienda. Aun así, para una enfermedad avanzada, la TFD puede mejorar la calidad de vida y alargar la supervivencia; pudiendo ser una terapia curativa en enfermedades tempranas y localizadas (Brown et al. 2004).

A lo largo del tiempo se han empleado distintos tipos de agentes fotosensibilizantes (véase tabla 1). El FS ideal debería (Ochsner, 1996; Sharman et al. 1999; Fernandez- Guarino et al. 2007):

- Presentar escasa toxicidad,
- Tener selectividad por el tejido diana.
- Depurarse o eliminarse más rápidamente por el tejido sano que por el tejido enfermo.
- Ser eliminado rápidamente del organismo.
- Capacidad para penetrar en el tejido diana.
- Ser activado por una longitud de onda que pueda penetrar en los tejidos.
- Ser capaz de producir suficiente cantidad de moléculas citotóxicas para eliminar el tejido diana o el agente etiológico que está en él.

El fotosensibilizante debería absorber la luz en el espectro rojo o cercano, ya que su capacidad de penetrar en los tejidos es mayor, las ondas de longitud más cortas penetran menos en el tejido y poseen mayor capacidad fotosensibilizante de la piel. La banda de absorción lumínica debería del FS ser amplia para poder alcanzar el efecto deseado con la mínima dosis posible (Papageorgiou et al. 2000).

La producción del fotosensibilizante debería ser fácil para poder realizar una producción a gran escala y debería proceder de un componente puro de composición y vida estable, con capacidad para disolverse en agua o en un solvente acuoso inocuo (Brown et al. 2004).

La fuente de luz debe reunir dos rasgos importantes: una longitud de onda capaz de penetrar y profundizar en el tejido diana y capacidad para distribuirse homogéneamente. Papageorgiou et al. (2000) demostraron mayor eficacia al combinar fuentes de luz azul con

roja, ya que actúan sinérgicamente, al asociarse una acción antibacteriana con una acción antiinflamatoria. Con la fuente de luz azul se cubría el pico máximo de absorción, y con la luz roja penetraría más.

Además, la emisión de luz roja aumenta la permeabilidad de la membrana celular al calcio, que actuaría como coadyuvante a la hora de conseguir los objetivos que deseamos con la TFD (Papageorgiou et al. 2000)

Lo ideal de la terapia fotodinámica es que el intervalo entre aplicación del fotosensibilizante y la aplicación de luz sea el mínimo posible. Al limitar el fotosensibilizante y la dosis de luz se evita sobredosificar (Fernandez- Guarino et al. 2007).

Mecanismos de acción

El uso de colorantes no tóxicos en combinación con la luz visible, es decir, la terapia fotodinámica, se conoce desde hace tiempo. Sin embargo ha sido recientemente cuando se ha empezado a utilizar de forma creciente (Sharman et al. 1999; Brown et al. 2004).

Aunque, en un principio se desarrolló como terapia antitumoral, sus aplicaciones más conocidas son sobre enfermedades de baja agresividad, ya que los tratamientos se pueden alargar en el tiempo (Sharman et al. 1999).

Para probar su efectividad *in vivo* es necesario entender como la luz interactúa con los tejidos y los efectos relativos con su absorción. Además de comprender como interactúa el fotosensibilizante con las células (Wainwright M. 1998).

La terapia fotodinámica se basa en la unión de un fotosensibilizante a una célula diana y su activación, mediante una luz con una longitud de onda concreta, provocando la liberación de sustancias citotóxicas. Por separado, el FS y la luz no tienen efectos citotóxicos suficientes sobre la célula diana. El FS se debe de forma tópica sobre las áreas afectadas y activarse con la longitud de onda adecuada. En Australia, se está utilizando la luz solar como la fuente lumínica de la TFD (Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

Cuando se aplica una longitud de onda específica sobre el FS se excita un electrón de la órbita exterior, que se posiciona en una órbita de alta energía, esta excitación dura poco tiempo y puede perder su energía al emitirla en forma de luz o de calor. Aunque puede ocurrir que este estado de excitación inicial de paso a otra de más larga duración, conocida como forma triplete que podrá permanecer más tiempo en la célula (Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

El efecto de la TFD sobre las células se debe sobre todo a una cadena de reacciones químicas, conocidas como reacción de tipo I y de tipo II (Castano et al. 2004; Castano et al. 2005):

- Reacción de tipo I: se produce una transferencia de electrones entre el FS activado y las moléculas circundantes provocando una liberación de radicales libres. Estos radicales son altamente activos e interaccionan con moléculas endógenas de oxígeno, produciendo compuestos de oxígeno altamente reactivos como superóxidos, hidroxilos, peróxidos de hidrogeno, radicales libres, etc., que provocan daños en la integridad de las membranas celulares y en sus estructuras internas, por ejemplo al producir la cadena de oxidación de los lípidos, causando la lisis celular.
- Reacción de tipo II: interacciona del FS con el oxígeno, para que esta reacción se lleve a cabo el FS debe estar en su forma triplete, activando al oxígeno a su forma activa u oxígeno singlete, lo que le permite interactuar con un gran número de sustancias de forma directa, como los aminoácidos o los lípidos. Este oxígeno desencadena daños oxidativos en membranas y paredes celulares, además de en la cadena del ADN.

Los daños en la cadena del ADN se deben a la acción producida sobre los aminoácidos y sus enlaces proteicos, así como a la acción en los enlaces glucídicos de la cadena. Aunque para que estos daños sean suficientes para producir la muerte celular, deben superar los mecanismos de reparación de la célula para que se desencadene la apoptosis celular (Sharman et al. 1999; Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

La supervivencia del oxígeno singlete es muy corta, limitando su radio de acción a las zonas circundantes a la aplicación de la luz sobre el FS (Sharman et al. 1999; Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

Como ya hemos visto las reacciones tipo I y II actúan a diversos niveles de la célula, pero también tienen cierta afinidad por sus organelas como puede ser el aparato de Golgi, las mitocondrias y los lisosomas, favoreciendo que, si no se ha producido un daño estructural importante, su funcionalidad quede seriamente comprometida (Sharman et al. 1999; Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

Para que el FS pueda hacer el efecto deseado se le ha de aplicar una fuente de luz determinada. Además, la correcta aplicación exige tener en cuenta la distribución espacial del tejido sobre el que queremos aplicar la TFD, lo que supone un grado mayor de dificultad al no

ser los tejidos homogéneos, modificando de esta forma la penetración de la luz. Esta penetración está limitada por la dispersión, la absorción y el factor anisotrópico, que mide la dirección de la dispersión. Conociendo estos factores lumínicos se puede maximizar la dosis de luz (DeRosa et al. 2002; Brown et al. 2004).

El problema con la TFD es que una excesiva o inadecuada fuente de luz puede provocar el fotoblanqueamiento del FS, efecto que no siempre es deseable. Esto ocurre cuando el oxígeno singlete u otros radicales reaccionan con el FS, reduciendo su eficacia en las posteriores sesiones de tratamiento. Aunque hay veces en la que este producto resultante posee más eficacia que el original, lo normal es que el fotoblanqueamiento conlleve una pérdida de eficacia. Hay que tener en cuenta, que, si el blanqueamiento ocurre antes de producir la lisis celular, no se produce el daño tisular; este efecto se suele buscar en los tejidos sanos para que no se vean afectados por la TFD, mientras que para los tejidos afectados se busca un aumento de profundidad para que la terapia tenga éxito (Papageorgiou et al. 2000; DeRosa et al. 2002).

La actuación de la TFD sobre las células suele terminar en la muerte celular, que se puede dar tanto por apoptosis como por necrosis, en función del tipo celular, la localización del FS en la célula y la dosis de luz aplicada (Wainwright. 1998; Sharman et al. 1999).

Dahle et al. (1998) comprobaron que durante la TFD había células que morían por su efecto directo, mientras otras, adyacentes a estas, se lisaban por la propagación del daño celular a través de las conexiones celulares. Esto indicaba que la apoptosis celular estaba influenciada por la comunicación celular, siendo este efecto mayor cuando la muerte se produce por necrosis que por apoptosis.

Por otro lado, el daño que sufre el ADN se produce por varias vías, la primera por acción directa de la luz, que posee acciones pre-mutagénicas, así como las moléculas con oxígeno activo, que producen un daño oxidativo en el ADN. Este efecto, realizado por el FS, se debe a la formación del oxígeno singlete y la formación de radicales activos. Y aunque se ha visto que el ADN resulta dañado por acción de la TFD, estos daños no están relacionados con la letalidad celular, ya que se tiene que superar además la capacidad de reparar daños de la célula (Sharman et al. 1999; Castano et al. 2004; Castano et al. 2005).

Aplicaciones terapéuticas

Se han realizado diferentes estudios sobre la terapia fotodinámica en diferentes campos terapéuticos (Fernandez-Guarino et al. 2007; Song et al. 2011; Wallis et al. 2012):

- Patología tumoral: linfoma cutáneo de células T; carcinoma escamoso; metástasis cutáneas, enfermedad de Paget, sarcoma de Kaposi, queratocantoma, linfoma cutáneo de células B, melanoma, enfermedad de Bowen, eritroplasia de Queyrat, queilitis actínica.
- Patología inflamatoria: acné; psoriasis; morfea; alopecia areata; liquen plano...
- Patología infecciosa: verrugas vulgares; infecciones por hongos (incluido diversos tipos de tiña); leishmaniosis cutánea, etc.

Gran parte de los estudios realizados sobre la TFD se refieren a su utilización en el tratamiento para tumores, al poder actuar contra todos los tipos de cáncer, al carecer de la especificidad de los quimioterápicos y de la necesidad de usar radiación (Brown et al. 2004).

La TFD es una opción terapéutica que se está desarrollando en medicina humana y también en medicina animal. Sobre todo se han realizado estudios sobre el efecto terapéutico en carcinomas de diversos tipos, tanto en gatos y perros como en caballos (Buchholz et al. 2013).

En gatos se ha aplicado en carcinomas de células escamosas cutáneas. En caballos sobre todo para los carcinomas de células transicionales de la vejiga. En perros se ha aplicado la TFD en combinación con la cirugía para resolver carcinomas de células escamosas de la cavidad oral (Buchholz et al. 2013).

Para poder tratar a los animales, se recurre a aplicar el FS por vía sistémica y una vez se alcance la concentración adecuada, con el animal sedado o con anestesia general, se procede a aplicar la fuente de luz. Como se ha mencionado con anterioridad, el oxígeno es fundamental para que la TFD tenga éxito, ya que los tumores hipóxicos son parcialmente resistentes a la TFD. De esta forma al intubar y dar un aporte extra de oxígeno conseguiremos evitar parcialmente este hecho (Buchholz et al. 2013).

En la región tratada mediante la TFD en los animales, veremos cómo se forma una costra en la superficie del tumor que se acabará cayendo al cabo de unas semanas, durante las cuales la piel y la mucosa se irán reepitelizando. Esta piel permanecerá algo más delgada y sin pelo por unos meses, hasta volver a la normalidad. Y, como en estos casos, se aplica el FS de forma sistémica, tras la TFD el animal no deberá tomar el sol para evitar quemaduras, ya que tardará un tiempo en eliminarlo de su sistema (Buchholz et al. 2013).

El problema de la TFD en veterinaria es que muchos clínicos desconocen su existencia y que los FS más utilizados (como el 5-ALA para el carcinoma) no están al alcance de todos, ya sea por disponibilidad o por precio (Buchholz et al. 2013).

En ciertos animales, se ha visto como efecto adverso cierta hiperemia e inflamación en la zona donde se aplicó la TFD, pero no suele ser habitual y en estos casos se procede a aplicar un antiinflamatorio (Buchholz et al. 2013).

Azul de Metileno

El azul de metileno (AM) es una sustancia que pertenece a la familia de las fenotiacinas. Sus características de color están causadas por su banda de absorción de luz, comprendida entre los 550 y los 700nm, con un máximo de absorción a los 640nm. Su actuación como FS en la TFD está determinado por su concentración, así como por el ratio de tinte-superficie (Pereira et al. 2013).

Es una sustancia que la ciencia médica ha utilizado con distintos fines. Actualmente se utiliza para (Weasley et al. 1999; Hiraku et al. 2014):

- Descontaminar unidades de plasma para trasplantes.
- Ser capaz de inactivar virus extracelulares.
- Tratar la metahemoglobinemia.
- Utilización en distintos tipos de pruebas diagnósticas por su capacidad de colorante.
- Utilización como marcador tumoral para diferentes tipos de cirugías, como la cromoendoscopia.
- Para reducir el volumen y peso de los tumores en modelos animales.

Como ya se ha comentado con anterioridad en la TFD los mecanismos de actuación del azul de metileno también son debidos a las reacciones de tipo I y de tipo II, produciendo daños en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Aunque una alta concentración del tinte puede provocar que las moléculas del azul de metileno actúen por si mismas como agentes reductores, esta reacción se puede ver modificada por el pH, así como por la cantidad de melanina que posea el tejido, ya que el azul posee cierta preferencia por la melanina (Tardivo et al. 2005).

La capacidad del azul de metileno como FS en la TFD se deriva de sus propiedades redox, que le permiten reducir u oxidar los medios biológicos, además de ser capaz de atravesar las membranas celulares fácilmente, lo que posibilita su efecto sobre el ADN. Este daño se ve incrementado por la presencia de NADH e iones metálicos. Cuando el AM se expone a su espectro de luz específico, causa el daño por la generación de oxígeno singlete. Así mismo, puede producir daño no dependiente de la luz, al causar un cierto efecto oxidativo metalo-dependiente, sobre todo si este metal es el cobre (Tardivo et al. 2005; Hiraku et al. 2014).

Este efecto metalo-dependiente, que incrementa la efectividad del AM en la TFD, puede acarrear ciertas consecuencias, como se verá más adelante. Esta reacción se produce porque cuando está el AM en presencia de NADH e iones metálicos como Cu (II) y Fe (III), el NADH tiene la posibilidad de reducir al AM y los iones metálicos mediante la generación de metabolitos reactivos (véase imagen 1) (Hiraku et al. 2014).

EL AM posee capacidad lítica en las células al actuar sobre el gen p53, encargado de corregir errores en la síntesis normal del ADN, siendo la célula incapaz de arreglar los daños causados. Así se inician los mecanismos de apoptosis celular, tanto por los efectos producidos en el ADN, como por los daños causados en otras organelas, tales como: mitocondrias, aparato de Golgi, etc., así como por su actuación a nivel de la membrana celular (Hiraku et al. 2014).

Los FS tienden a localizarse en las membranas celulares debido a la elevada superficie que estas poseen y a su elevada concentración de proteínas y lípidos, provocando la lisis celular o por lo menos cierta gravedad celular (Pereira et al. 2013).

El AM se ha probado como FS en TFD en el tratamiento de hongos como *T. rubrum*, como antimicrobiano y antivírico, aunque se pueden presentar problemas terapéuticos si el agente causal puede formar biofilms, ya que el tinte no será capaz de penetrarlo, anulando su actuación (Girollo et al. 2007; Pereira et al. 2013; Machado de Sena et al. 2014; Wallis et al. 2014).

Una ventaja del AM en su actuación frente a los hongos es que tiene múltiples sustratos sobre los que actuar, evitando que se produzca una selección de cepas fotorresistentes. En adición, se han hecho diferentes estudios con diversas sustancias para poder reducir la dosis del AM, manteniendo su efecto antifúngico (CTAC, HPS, SDS...) (Pereira et al. 2014) El efecto antifúngico del AM se ha demostrado exitoso frente a *C. albicans* y *T. rubrum* (Girollo et al. 2009; Wallis et al. 2012).

En animales de experimentación, se ha visto que el azul de metileno podría tener cierto poder carcinogénico en órganos como páncreas e intestino delgado, cuando se utiliza de forma sistémica, efecto que no es dependiente de la luz, aunque se tienen que realizar más estudios en la materia para ver si produce tal efecto (Hiraku et al. 2014).

OBJETIVOS

La revisión bibliográfica que hemos visto hasta ahora nos ha permitido conocer la enfermedad a tratar, la terapia fotodinámica a emplear y el agente fotosensibilizante. Estos conocimientos previos nos van a servir de introducción para poder entender mejor como se pueden relacionar.

Conocer como ha sido la evolución de la terapia fotodinámica y que posibilidades de futuro presenta.

Por tanto en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Determinar la utilidad de la terapia fotodinámica con azul de metileno (solución acuosa al 1%) sobre lesiones de tiña (*A. vanbreuseghemii*) en ovejas.
- Valorar la evolución de dichas lesiones al cubrirlas con la citada solución de azul de metileno, una o dos veces por semanas.
- Valorar la ausencia de riesgos para los animales expuestos a la terapia.

APLICACIÓN PRÁCTICA

La dermatomicosis es una patología difícil de eliminar una vez se ha instaurado en un rebaño ovino, ya sea porque el ganadero la ignora, decide no tratarla o porque si se decide hacerlo esto sea insuficiente, sobre todo porque requiere medidas de limpieza exhaustivas, complicadas de conseguir en determinadas parideras.

Además, los tratamientos actuales son arduos y laboriosos para el ganadero que debe aplicarlos, esto conlleva que al final o deja de tratar la enfermedad o no aplique tratamientos como debería.

Las experiencias previas desarrolladas en medicina humana, mediante el uso del azul de metileno como sustancia fotosensibilizante, nos ha servido de partida para llevar a cabo una aplicación, de similares características, en veterinaria.

Por tanto, en esta segunda parte del TFG vamos a realizar una valoración práctica de la TFD utilizando como SF el azul de metileno en un caso clínico de dermatomicosis ovina.

Material y Métodos

El trabajo se llevó a cabo en una explotación de ganado ovino situada en San Mateo de Gallego, provincia de Zaragoza. El rebaño estaba compuesto por 1500 ovejas de raza Rasa Aragonesa y unos pocos animales INRA.

La reposición del rebaño estaba compuesta por 200 corderas de raza Rasa Aragonesa, entre las cuales unas 20-30 presentaban una dermatitis exfoliativa no pruriginosa con alopecias de patrón focal-multifocal, compatibles con varios procesos dérmicos que afectan al ganado ovino, entre los que se incluyen:

- Dermatofilia (*Dermatophilus congolensis*).
- Foliculitis estafilocócica (*Staphylococcus aureus*).
- Dermatofitosis.
- Dermatitis pustular vírica (poxvirus).
- Dermatitis por contacto con zinc.

Ante la sospecha de una dermatomicosis, a partir de las lesiones observadas, se tomaron muestras de las mismas para poder identificar el agente causal. Ante la dificultad inicial de la

toma de muestras, debido a la fácil contaminación de los medios, se opta por un protocolo que minimice el riesgo de contaminación. Por tanto, se procedió del siguiente modo:

- 1- Limpieza mecánica del área lesionada, quitando toda la suciedad visible de la zona de la que queremos tomar la muestra
- 2- Desinfección de la zona con etanol de 70.
- 3- Raspado de la zona lesionada y envío de las muestras precintadas y etiquetadas al laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Miguel Servet.

Análisis de laboratorio: las muestras remitidas al citado laboratorio se cultivaron en diferentes medios de cultivo:

- DTM (Dermatophyte Test Medium).
- Agar glucosado patata adicionado con 50 mg/l de cloranfenicol.
- Medio de cultivo de agar de Sabouraud con dextrosa adicionado de cloranfenicol.
- Agar modificado de dermasel al que se le han añadido tween 80, huevo y cloranfenicol.

Una vez conocido el diagnóstico, a partir de los animales afectados, se decidió tratar 10 corderas afectadas con una dilución de azul de metileno al 1% en agua. El tratamiento se aplicó sobre las áreas alopecicas hasta la resolución del problema. Tras la aplicación de la solución de azul de metileno, se deja que las corderas estén en una zona donde el sol alcance, permitiendo que realice su función como fotosensibilizador en la terapia fotodinámica.

De las 10 corderas a tratar a 5 se les aplicó el azul de metileno una vez por semana, y a las 5 restantes se les aplicó 2 veces por semana en las lesiones, para poder comparar si hay alguna diferencia entre las dos pautas terapéuticas. El resto de corderas afectadas servirá como testigo.

Resultados y discusión

El examen macroscópico y microscópico de las colonias que crecieron en los medios de cultivo, a partir de las muestras tomadas en las lesiones de los animales afectados, permitieron identificar a *Arthroderma vanbreuseghemii* como el agente etiológico (La identificación se realizó morfológicamente y la confirmación por biología molecular).

Como se ha mencionado anteriormente *Arthroderma vanbreuseghemii* forma parte del complejo de *T. mentagrophytes*, que aunque reportado como agente causal de la dermatofitosis, este agente es de los menos habituales en nuestras latitudes, aunque en países

como India su incidencia es mayor, aunque sin llegar a alcanzar a *T. verrucosum* como agente etiológico principal de la tiña (Monga et al. 1980). Este hallazgo plantea dudas sobre el origen de esta infección y los agentes implicados tanto directa como indirectamente.

El tratamiento con azul de metileno en combinación con la luz solar, en todas las lesiones tratadas, permitió observar que estas detenían su crecimiento tras el primer tratamiento regresando las lesiones a una velocidad superior que en las corderas no tratadas.

A las 4 semanas de iniciado el tratamiento no se apreciaron lesiones cutáneas, aunque no se mostró una clara diferencia entre el grupo tratado una vez por semana y el que fue tratado dos veces por semana. Las imágenes 2 y 3 permiten apreciar la evolución y curación de las lesiones en animales tratados 1 o 2 veces por semana, respectivamente. Como se puede apreciar en las imágenes, al final de la cuarta semana no hay lesiones apreciables en los animales.

Es más, en el tiempo que duró el tratamiento no se apreció ninguna reacción adversa en la lesión: agravamiento, aparición de lesiones secundarias, lamido o rascado anormal por parte de los animales, etc.

Las corderas no tratadas acababan recuperándose, como ya se ha mencionado anteriormente, por autocuración que suele ser lo habitual, aunque el tiempo empleado era mayor, de unos 2-4 meses, en comparación con el mes que tardaban las tratadas con el azul de metileno al 1%.

Para poder tener una valoración objetiva de la eficacia el azul de metileno, deberíamos compararlo con los tratamientos habituales de la dermatomicosis, como no hay un tratamiento específico para ovino, tenemos que recurrir al de vacuno. Este tratamiento a base de enilconazol, también se debe aplicar de forma tópica, con una frecuencia que varía entre una vez por semana hasta 3 veces por semana según la gravedad de las lesiones. La duración del tratamiento suele ser de dos semanas, viéndose la mejoría de las lesiones al cabo de dos semanas, tras el último tratamiento, o de un mes si las lesiones fueron graves (Rochette et al. 2003).

A la vista de estos resultados, la terapia fotodinámica con azul de metileno al 1% es una buena opción terapéutica frente a las dermatomicosis ovinas causadas por *A. vanbreuseghemii*, teniendo en cuenta la facilidad del tratamiento, ya que se puede aplicar sin problemas en el ganado afectado, con un manejo mínimo. Por otro lado, el coste económico de este tratamiento es muy inferior al de los antimicóticos comerciales, a lo que hay que

añadir la inocuidad del azul de metileno y que ciertos antimicóticos no se pueden usar en el ganado ovino.

A pesar de estos resultados tan prometedores, nos resta por conocer si este tratamiento, además de producir la curación clínica de la enfermedad, elimina por completo el agente etiológico causante de la patología en el animal, es decir, si este tratamiento, como la evolución de la clínica parece indicar, elimina el estado portador.

No obstante, a pesar de los buenos resultados, no hay que olvidar que estamos ante una enfermedad que suele relacionarse con situaciones de inmunosupresión, como puede ser el estrés y con diversas circunstancias, cómo es el hacinamiento de animales en invierno. Por esta razón también se debe trabajar en la prevención evitando las situaciones que aumentan el estrés del rebaño e intentar mantener unas instalaciones lo más limpias posible.

CONCLUSIONES

Tras haber visto cómo actúan las dermatofitosis y cómo actúa la terapia fotodinámica y el azul de metileno, y tras la aplicación de dicha TFD, mediante la cobertura con azul de metileno al 1% de las lesiones causadas por dermatofitosis en corderas de reposición, podemos concluir que:

- La dermatomicosis es una patología difícil de eliminar una vez se ha instaurado en un rebaño ovino, ya sea porque se decide no tratar o porque si se decide hacerlo esto sea insuficiente, sobre todo porque requiere medidas de limpieza exhaustivas, complicadas de conseguir en determinadas parideras actuales.
- Es una enfermedad que suele relacionarse con situaciones de inmunosupresión, como puede ser el estrés y con diversas circunstancias, cómo es el hacinamiento de animales en invierno.
- Los tratamientos actuales son arduos y laboriosos para el ganadero que debe aplicarlos, esto conlleva que al final deje de tratar o no lo aplique como debería.
- La terapia fotodinámica resulta una alternativa terapéutica válida y efectiva para tratar los signos clínicos de la dermatomicosis ovina causada por *A. vanbreuseghemii*.
- El azul de metileno como el agente fotosensibilizante, en solución acuosa al 1% aplicada una o dos veces por semana, resuelve en cuatro semanas las lesiones originadas por *A. vanbreuseghemii*.
- La terapia fotodinámica con azul de metileno resulta inocua, económica y fácil de aplicar.

Aunque no hay que olvidar que se debe trabajar en situaciones que no aumenten el estrés en el rebaño e intentar mantener unas instalaciones higiénicas, para evitar al máximo la aparición de síntomas, su transmisión y/o su recidiva.

Conclusions

After seeing the dermatomycosis' action, photodynamic therapy and methylene blue's action through cover dermatomycosis lesions in replacement lambs with a 1% of blue color of the methylene solution, we can have several conclusions.

- Dermatomycosis is a pathology difficult to remove when is set up in an ovine flock. Either the treatment is not decided or it is inadequate. Specially because extreme hygienic measures are required, that are complicated to reach in some farrowing.
- This illness is often linked with immunosuppression situations, such as stress, and different circumstances, as the animal overcrowding in winter.
- The current treatments are strenuous and laborious for the breeder who must apply them. This leads to either the breeder does not treat the sheep at all or that the breeder does not apply the treatment correctly.
- Photodynamic therapy results in a therapeutic alternative that is valid and effective for clinical symptoms of ovine dermatomycosis caused by *A. vanbreuseghemii*.
- Methylene blue as photosensitizer agent to make it possible, once or twice weekly application at 1% solution can solve the *A. vanbreuseghemii*'s injuries in four weeks.
- Photodynamic therapy with methylene blue is innocuous, economic and easy to apply.

Although it cannot be forgotten the fact, that one must work in non-stressful situations and try to keep hygienic facilities in order to avoid the appearance of symptoms, its transmission and/or recurrence.

VALORACIÓN PERSONAL

A través de este trabajo he tenido la oportunidad de trabajar en diferentes ámbitos de la profesión veterinaria, lo que me ha permitido ampliar mi campo de miras sobre lo que se puede hacer y cómo se puede llegar a alcanzar dicho objetivo. Así cómo me ha permitido conocer cómo se relacionan diferentes departamentos a la hora de realizar un estudio.

Además me ha permitido aprender sobre el tema del que he realizado la revisión bibliográfica y la aplicación práctica, que me ha parecido muy interesante y que tiene muchas oportunidades de futuro, aunque de momento, tiene una importancia relativamente baja. Pero creo que esto podría cambiar si hubiera medios disponibles para realizar más estudios que le diesen la oportunidad necesaria.

También me ha permitido valorar mejor mis aptitudes de trabajo en equipo, mis competencias con otros idiomas y mi capacidad de discernir entre la información relevante y la que es prescindible o no relacionada con el tema principal.

Bibliografía:

- Abou-Gabal M.; El-Galil G.A; El-Nor E.A; El-Rehim D.A. (1976) "Animal ringworm in upper Egypt". Sabouraudia, 14: 33-36.
- Blowey R.W.; Weaver A.D.; (2011) "Color atlas of diseases and disorders of cattle" 3ª edición- Ed: Elsevier Pp: 35-36 ISBN: 978-0-7234-3602-7
- Buchholz J.; Walt H. (2013) "Veterinary photodynamic therapy: a review." Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 10: 342-347.
- Brown S.B.; Brown E.A.; Walker I. (2014) "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment." Lancet Oncology, 5: 497-508.
- Cabañes F.J.; Abarca M^ªL; Bragulat M^ªR. (1997) "Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain". Mycopathologia, 137:107-133.
- Castano A.P.; Deminova T.N.; Hamblin M.R.; (2005) "Mechanisms in photodynamic therapy: part two cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death". Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2: 1-23.
- Castano A.P.; Deminova T.N.; Hamblin M.R.; (2004) "Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization". Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 1: 279-293.
- Dahle J.; Kaalhus O.; Moan J.; Steen HB. (1997) "Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies". Proceedings of the National Academy of Sciences, 5: 1773-1778.
- De La Paz, M.P.; Gllaberte, Y.; Pardo, J.; Rezústa, A. (2013) "Terapia fotodinámica in vitro con hipericina en hongos causantes de micosis cutáneas." Tesis doctoral Universidad de Zaragoza.
- DeRosa M.C.; Crutchley R.J. (2002) "Photosensitized singlet oxygen and its applications". Coordination Chemistry Reviews, 233-234: 351-371.
- Fernández- Guarino M.; García-Morales I.; Harto A.; Montull C.; Pérez-García B.; Jaén P. "Terapia fotodinámica: nuevas indicaciones" <http://www.actasdermo.org/es/terapia-fotodinamica-nuevas-indicaciones/articulo/13107640/> Fecha de consulta: 09/02/2015
- Figueiredo Souza L.W.; Souza S.V.T.; Botelho A.C.C. (2014) "Randomized controlled trial comparing photodynamic therapy based on methylene blue dye and fluconazole for toenail onychomycosis." Dermatologic therapy, 27: 43-47.
- Giroldo L.M.; Poliana M.; de Oliveira M.A.; Munin E.; Procopio L.; Silva M. (2009) "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in Candida albicans". Lasers Medical Science, 24: 109-112.
- Gómez Hernández C.; Domínguez Martín A.; García Kass A.I.; García Núñez J.A. (2011) "Aplicación complementaria de terapia fotodinámica y de la radiación láser de Er:YAG al tratamiento no quirúrgico de la periodontitis crónica: estudio comparativo de sus efectos clínicos, antiinflamatorios y antimicrobianos" Avances en Odontoestomatología, 27: 147-160
- "Guiavet" 13ª edición Ed: Veteriindustria, (2013) grupo Asís. ISBN: 978-84-92569-78-6.
- Hiraku Y.; Goto H.; Kohno M.; Kawanishi S.; Murata M. (2014) "Metal-mediated oxidative DNA damage induced by methylene blue". Biochimica et Biophysica Acta, 1840: 2776-2782.
- Jungerman P.F.; Schwartzman R.M. (1977) "Micología medica veterinaria" Ed: E.C.S.A. Pp: 17-42 ISBN:78-157469.

- Komine C.; Tsujimoto Y. (2013) "A Small Amount of Singlet Oxygen Generated via Excited Methylene Blue by Photodynamic Therapy Induces the Sterilization of *Enterococcus faecalis*". *Journal of Endodontics*, 39: 411-414.
- Lund A.; DeBoer DJ. (2008) "Immunoprophylaxis of Dermatophytosis in Animals" *Mycopathologia*, 166: 407-424.
- Lund A.; Bratberg A.M.; Naess B.; Gudding R. (2014) "Control of bovine ringworm by vaccination in Norway" *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158: 37-45.
- Machado-de-Sena R.M.; Corrêa L.; Kato I.T.; Prates R.A.; Senna A.M.; Santos C.C.; Picanço D.A.; Ribeiro M.S. (2014) "Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans*-induced murine vaginitis". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11: 275-282.
- Martin W.B.; Aitken I.D. (2002) "Enfermedades de la oveja" 2ª edición Ed: Acribia. Pp: 341. ISBN: 84-200-0987-3.
- Mckellar Q.; Fishwick G.; Rycroft A. (1987) "Ringworm in housed sheep." *Veterinary record*, 121: 168-169.
- Mitra S.K.; Sikdar A.; Das P. (1998) "Dermatophytes isolated from selected ruminants in India". *Mycopathologia*, 142: 13-16.
- Monga D.P.; Mohapatra L.N. (1980) "A compilation of published reports of mycoses in animals in India" *Mycopathologia*, 72:3-11.
- Mugnaini L., Nardoni S., Pistelli L., Leonardi M., Giuliotti L., Benvenuti M.N., Pisseri F., Mancianti F. (2013) "A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*." *Mycoses*, 56: 333-337.
- Mushin T.M.; Salih T.H. (2001). "Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq." *Mycopathologia*, 150: 49-52.
- Nishisaka T.; Ennyu H.; Takeno T.; Okuba I. (1993) "Photodynamic therapy with methylene blue as photosensitizer". *Nippon Kagaku Kaishi numero 7*: 867-873.
- Nweze E.I. (2011) "Dermatophytoses in domesticated animals". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 53: 95-99.
- Ochsner M. (1997) "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours". *Journal of photochemistry and photobiology B-biology*, 39: 1-18.
- Pandey V.S.; Mahin L.; Vanbreuseghem R. (1979) "Prevalence and distribution of ringworm by *Trichophyton verrucosum* in sheep in the high atlas of Morocco." *Annales de la societe belge de médecine tropicale*. 59: 385-389.
- Papageorgiou P.; Katsambas A.; Chu A. (2000) "Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of *acne vulgaris*". *British Journal of Dermatology*, 142: 973-978.
- Pereira J.; Reis R.; Penido M.; de Lima C.J.; Marmo L. (2013) "Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*". *Micopathology*, 175: 159-164.
- Pier A.C.; Smith J.M.B; Alexiou H.; Ellis D.H; Lund A.; Pritchard R.C. (1994) "Animal ringworm- its aetiology, public health significance and control." *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32: 133-150.

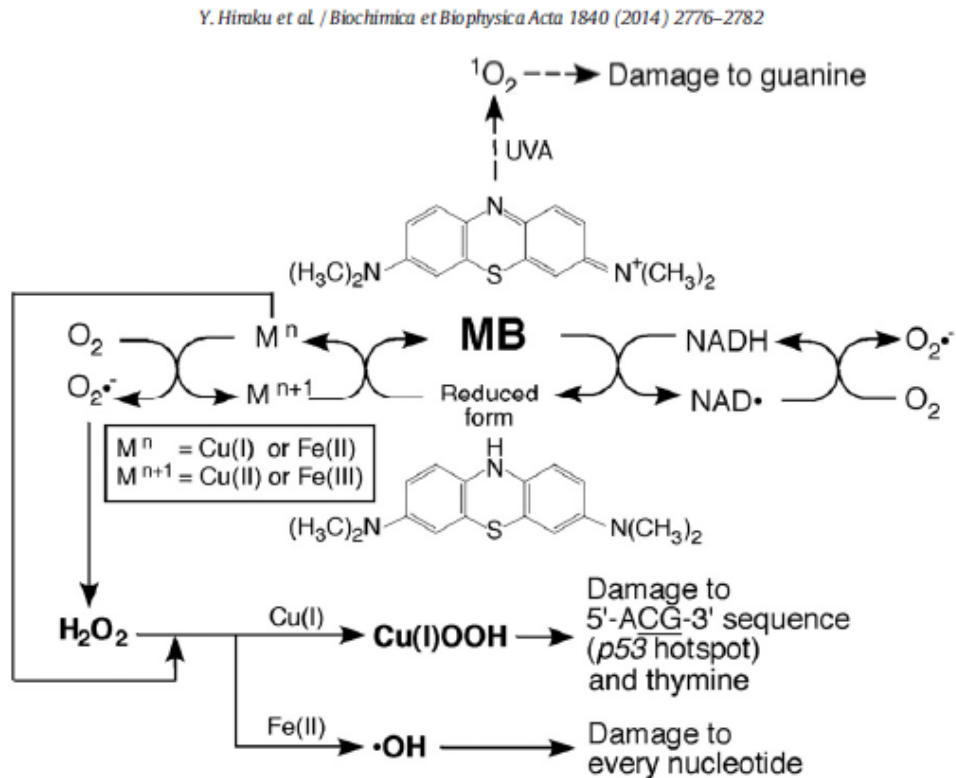
- Piorkowski J. (2006) "Effectiveness of the Alopec vaccine against dermatomycosis" *Medycyna weterynaryjna*, 62: 647-677.
- Roberson, J.R.; Baird A.N.; Pugh D.G.; (2012) "Sheep and Goat Medicine Chapter 10: Diseases of the Integumentary System" 2ª edición Ed: Elsevier Saunders. Pp: 256-290 ISBN: 978-1-4377-2353-3
- Rochette F.; Engelen M.; Vanden Bossche H. (2003) "Antifungal agentes of use in animal health – practical applications" *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26: 31-53.
- Roderick J.; Gerald L.; Mandell M.D.; Richard D.; Diamond M.D. (2000) "Atlas of infectious diseases. Fungal infections Chapter 13: Dermatophytosis (Ringworm) and other superficial mycoses" Ed: Current Medicine Group Pp: 191-203 ISBN: 978-1-4757-9313-0.
- Scott D.W. (2007) "Color atlas of farm animal dermatology" Ed: Blackwell Pp: 17-19, 111-114, 157-158 ISBN: 978-0-8138-0512-0
- Sharman W.M.; Allen C.M.; van Lier J.E. (1999) "Photodynamic therapeutics basic principles and clinical" *Drug Discovery Today*, 4: 507-517.
- Song D.; Lindoso J.A.L.; Oyafuso L.K.; Kanashiro E.H.Y.; Cardoso J.L.; Uchoa A.F.; Tardivo J.P.; Baptista M.S. (2011) "Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis". *Photomedicine and laser surgery*, 29: 711-715.
- Summerbell R.C; Weitzman I.; Padhye A.A. Versalovic J.; Carrol K.C.; Funke G. Jorgesen J.H.; Landry M.L.; Warnock D.W. (2011) "Manual of clinical microbiology: Chapter 121: Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton and agents of superficial mycoses" 10ª edición. Pp: 1919-1942 ISBN: 9781555813710.
- Tardivo J.P.; Del Giglio A.; Santos de Oliveira C.; Santesso D.; Couto H.; Batista D.; Severino D.; de Fatima R.; Baptista M.S. (2005) "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2: 175-191.
- Villanueva-Saz, S. Moros-Salvador, E. Rezusta-López, A.Pérez-Laguna, V. Ferrer-Mayayo, L.M. Ramos-Antón, J.J. Lacasta-Lozano, D.M.Pardo-Cortinas, M. Navarro-Combalia, L. Martínez-Castillero, M. Navarro Rodrigo, T. Ortín-Pérez, A. Marca-Andrés, M.C. Loste Montoya, A. Verde-Arribas, M.T. (2015) "Photodynamic therapy: Methylene blue application in the treatment of dermatophytosis caused by Trichophyton spp. in sheep" Poster for WVA/WMA Global Conference On One Health, 20-21 mayo 2015 (Madrid).
- Wallis L.; Vilas S.; de Carvalho A. C. (2012) "Distal and lateral toenail onychomycosis caused by Trichophyton rubrum: treatment with photodynamic therapy based on methylene blue dye". *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89: 184-186.
- Wainwright, M. (1998) "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 13-28.

ANEXOS

Tabla 1: Modificado de: Sharman et al. (1999) "Photodynamic therapeutics basic principles and clinical"

Fotosensibilizante	Longitud de onda (nm)	Modo de aplicación	Dosis habitual (mg/kg)	Dosis de luz (J/cm ²)	Duración de fotosensibilidad cutánea
Derivados hematoporfirínicos	630	IV o tópico	2.0-5.0	100-200	2-3 meses
Azul de metileno	668	<i>Ex vivo</i>	1μM	50.000 lux	n/a
Acido 5-Aminolevulinico	635	Tópico, oral o IV	<60 (oral) <30(IV)	100-200	1-2 días
Verteporfina	690	IV	0.1-2.0	100-200	3-5 días
Temoporfina	52	IV	0.1-0.3	8-12	Más de 6 semanas
Texafirina	732	IV	0.6-7.2	150	Minima
Ftalocianinas	670-680	IV	0.5-2.0	100	8-10 días
Naftalocianinas	750-780	IV	-	-	-
N-aspartato clorina e6	664	IV	0.5-3.5	25-100	3-7 días
Rodaminas	511	<i>Ex vivo</i>	25 μM	1-10	n/a
Hipericina	590	Tópico	-	-	-

Imagen 1: Fuente: Hiraku et al. (2014) "Metal-mediated oxidative DNA damage induced by methylene blue".



Fuente: Imágenes aportadas por Ferrer Mayayo, L.M.

Imagen 2: ovejas tratadas una vez por semana



Imagen 3: ovejas tratadas dos veces por semana

