



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE
Microsporum gypseum”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

CRISTIAN ISMAEL LÓPEZ ZAMORA

ASESOR: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

COASESOR: Dra. Amparo Londoño Orozco



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

“EVALUACIÓN in vitro DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE *Microsporum gypseum*”

Que presenta el pasante: Cristian Ismael López Zamora
 Con número de cuenta: 40507126-3 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcallí, Méx. a 5 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
SECRETARIO	MVZ. Guadalupe Flores Ortiz	
1er SUPLENTE	MVZ. Guadalupe Alemán Pérez	
2do SUPLENTE	MVZ. Edna Martínez Aguilera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 JHA/pm

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 223811-3 Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

DEDICATORIAS

A Dios por hacerme quien soy, por darme todo lo que tengo, por guiarme, por protegerme sin siquiera pedírselo, por perdonarme. Gracias mi Señor, porque sin ti nada sería, usted es el buen pastor que guarda mi alma, yo no le merezco y aún así tú mi Dios me aceptaste.

A mis padres por darme su amor, por darme la vida, por protegerme, por darme su confianza y por apoyarme siempre. Por estar conmigo en los momentos más difíciles y consolarme, por cuidarme de todo mal. Por darme momentos tan hermosos y maravillosos, porque siempre han sido muy buenos padres. Los amo con toda mi alma y con todo mi corazón. Te amo mamá, te amo papá.

A mi hermano que siempre me dio aliento de superarme al darme un buen ejemplo, gracias por escucharme y apoyarme en todo. Gracias por todos esos momentos que hemos pasados juntos, por crecer juntos y principalmente por ser mi hermano, te amo Hugo.

A Alejandra, tú siempre me amaste y me cuidaste, me ayudaste en toda la carrera, has estado conmigo en este duro y difícil camino, en los momentos de angustia y en las pruebas más difíciles, tú amor mío siempre estuviste a mi lado. Compartimos muchas cosas, buenas y malas, pero al estar siempre juntos, siempre estuve confiado que todo al final saldría bien. Gracias por amarme y ser mi amiga, mi compañera, mi amor y sobre todo, gracias por dejarte amar. Te amo con todo mi corazón, eres y siempre serás el amor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de estudiar, por todo lo que me entregaste. A mi Facultad, FES Cuautitlán, por darme todas las herramientas para mi formación, estoy muy agradecido con la UNAM.

A todos mis profesores que se esforzaron por darme una excelente educación, a mis compañeros que me apoyaron en la carrera y con los que compartí maravillosos momentos que nunca olvidaré.

Al doctor Tonatiuh Cruz y la doctora Amparo Londoño por apoyarnos siempre en el servicio social y durante la realización de la tesis, por sus consejos y sus conocimientos, por ayudarnos cuando lo necesitábamos. Gracias por su confianza.

A mis sinodales por ayudarme a corregir mis errores en la tesis, por sus consejos y por el tiempo que invirtieron en esta tesis.

Al Maestro Liborio Carrillo y al Doctor José Guillermo Penieres le agradezco por ayudarnos con el propóleo y a procesarlo, al MVZ Marco Antonio Mendoza por su capacitación otorgada y por ayudarnos durante la realización de la tesis, sin su ayuda este proyecto no se hubiera logrado, a todos ustedes muchas gracias.

A la Maestra Elisa Gutiérrez por su apoyo y consejos en los momentos difíciles que pasamos al final de la tesis, gracias por sus palabras de aliento.

A mis familiares, tíos, primos y sobrinos por su amor, apoyo y confianza, a todos ustedes muchas gracias.

A mis amigos, que durante todo este tiempo estuvieron conmigo, gracias por apoyarme y por ofrecerme su amistad.

A todos los animales que me ayudaron durante la carrera, a todos los que directamente o indirectamente me ayudaron a practicar y aprender, porque sin ustedes los médicos veterinarios no seríamos nada. A Bombón, Champis, Lenny, Ary, Tongo y Orejas, gracias amigos.

ÍNDICE

Índice	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. LA PIEL	2
1.1 Características	2
1.2 Anexos de la piel	2
1.3 Importancia de las patologías dermatológicas en la clínica veterinaria	4
II. DERMATOFITOSIS	4
2.1 Características	4
2.2 Etiología y patogénesis	5
2.3 Micología	6
2.4 Signos clínicos	6
2.5 Diagnóstico	7
III. CARACTERÍSTICAS DE <i>Microsporium gypseum</i>	8
3.1 Clasificación	8
3.2 Historia	8
3.3 Epidemiología	8
3.4 Signos clínicos	9
3.5 Características micológicas de <i>M. gypseum</i>	10
IV. TRATAMIENTO	12
4.1 Terapia tópica	12
4.2 Terapia sistémica	13
4.3 Limpieza del entorno	14
V. PROPÓLEO	15
5.1 Definición	15
5.2 Historia	15
5.3 Características	15
5.4 Composición química	16
5.5 Actividad biológica	17
5.6 Toxicidad	18
5.7 Propóleos mexicanos	19
OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS	20

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Propóleo	22
Microorganismos	22
Prueba de inhibición del crecimiento radial	23
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en placa	23
Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)	24
Daño celular	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Índice	Página
Figura 1: Morfología de <i>M. gypseum</i> con la tinción de azul de algodón, vista en 400x.....	11
Figura 2: Cultivo de <i>M. gypseum</i> en agar PDA.....	11
Figura 3: Propóleo recolectado de los apiarios de la FES Cuautitlán UNAM.....	16
Figura 4: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con etanol como control.....	26
Figura 5: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con clotrimazol como comparativo.....	27
Figura 6: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con ketoconazol como comparativo.....	28
Figura 7: Inhibición del crecimiento radial con el control (etanol) y los dos comparativos (clotrimazol y ketoconazol).....	29
Figura 8: Placa de 24 pozos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	31
Figura 9: Prueba de la determinación de la Concentración Fungicida Mínima a las 30 horas	34
Figura 10: Microfotografía del control a las 0 horas de la prueba, se aprecian dos macroconidios de <i>Microsporium gypseum</i> . Vista en 400x	36
Figura 11: Microfotografía de un macroconidio de <i>M. gypseum</i> tratado con 1.0 mg/ml de EEP a las 0 horas de la prueba. Vista en 400x	37
Figura 12: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.0 mg/ml de EEP a las 5 horas de la prueba, se aprecia burbujas dentro del citoplasma del hongo. Vista en 400x	38
Figura 13: Microfotografía de macroconidios tratados con 1.0 mg/ml a las 5 horas de la prueba. Vista en 400x	39
Figura 14: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.5 mg/ml a las 30 horas de la prueba. Vista en 400x	40
Figura 15: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.0 mg/ml a las 30 horas de la prueba. Vista en 400x	41

Figura 16:	Microfotografía de un macroconidio control a las 30 horas de la prueba teñidos con blanco de calcoflúor. Vista en 400x	42
Figura 17:	Microfotografía de macroconidios tratados con 1.5 mg/ml a las 30 horas de la prueba teñidos con blanco de calcoflúor. Vista en 400x	43

ÍNDICE DE TABLAS

Índice	Página
Tabla 1: Promedio del crecimiento de las colonias de <i>M. gypseum</i> sin tratamiento y tratadas con el EEP con el promedio del porcentaje de reducción del tamaño de las colonias	30
Tabla 2: Determinación de la CFM del propóleo en contra de <i>M. gypseum</i>	33
Tabla 3: Registro de las alteraciones encontradas en las observaciones al microscopio donde += alteración presente, ++= alteración muy marcada	35
Tabla 4: Promedio del diámetro de 5 macroconidios de <i>M. gypseum</i> en micrómetros, se midió el control y el hongo tratado con 1.5 mg/ml de EEP a las 0, 10 y 30 horas	44

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Índice	Página
Gráfica 1: Dilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria	32
Gráfica 2: Diámetro de macroconidios de <i>M. gypseum</i> con y sin tratamiento en micrómetros	44

RESUMEN

En los últimos tiempos se ha dado la tendencia de buscar nuevas alternativas terapéuticas de origen natural, ya que se ha incrementado la resistencia a los fármacos por parte de los microorganismos.

El propóleo ha sido utilizado desde tiempos remotos por la humanidad, conociéndose su capacidad terapéutica y su casi nula presencia de efectos secundarios. El estudio científico del propóleo se inicio en la década de los sesentas y se ha intensificado debido a la reciente demanda de productos de origen natural.

En el presente trabajo se realizó una evaluación del efecto *in vitro* de un extracto etanólico de propóleo, obtenido del apiario de la FES Cuautitlán, en contra de una cepa de *Microsporum gypseum*, proveniente de un caso clínico de un canido que presentó lesiones en la piel. Se determinó cualitativamente con la prueba de inhibición del crecimiento radial que el propóleo inhibe a *Microsporum gypseum*. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo sobre la cepa del hongo por el método de dilución en placa, la cual fue de 0.5 mg/ml. Se determinó la concentración fungicida mínima (CFM) del propóleo en contra de *M. gypseum* determinando que a las 30 horas a una concentración de 0.5 mg/ml el propóleo tiene un efecto fungicida. Se evaluó el daño celular sobre el hongo causado por el propóleo encontrando que el propóleo genera alteraciones de los macroconidios del hongo.

Este trabajo demuestra un futuro muy prometedor para el propóleo como agente terapéutico ya que no se ha encontrado una toxicidad importante comparada con los agentes terapéuticos actuales siendo esta una posibilidad casi nula. Por lo tanto, en un futuro cercano se puede implementar la utilización del propóleo como agente terapéutico contra *M. gypseum*.

INTRODUCCIÓN

I. LA PIEL

1.1 Características.

La piel constituye la barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el medioambiente. La piel es sinérgica con los sistemas orgánicos internos y, por ello, refleja los procesos patológicos primarios de otros órganos o compartidos con otros tejidos. Debido a ello, es que en la piel se pueden localizar un sinnúmero de lesiones, tanto inflamatorias como inmunológicas, endocrinas, nutricionales, psicogénicas, neoplásicas y traumáticas¹⁷.

La piel está constituida por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis⁴⁵.

A. Epidermis.

La epidermis forma la capa superficial de la piel y está expuesta a una amplia variedad de agresiones químicas, físicas y biológicas³¹. La epidermis se encuentra constituida por tres tipos de células: queratinocitos (son los más abundantes y se disponen en cinco capas: basal, espinoso, granuloso y córneo), melanocitos (células encargadas de sintetizar melanina) y células de Langerhans (se desconoce el papel de estas células, aunque algunos autores opinan que se trata de melanocitos que han perdido la capacidad de sintetizar melanina)⁴⁵.

B. Dermis.

Es la capa conjuntiva situada debajo de la epidermis y separada por la membrana basal⁴⁵. Constituido por tejido conjuntivo, en esta capa se localizan vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y los anexos de la piel (pelo, folículo piloso, glándulas sudoríparas, sebáceas). Los folículos pilosos son invaginaciones de la dermis¹⁷.

C. Hipodermis.

Situada debajo de la dermis⁴². Está constituido por tejido conectivo laxo y tejido adiposo¹⁷. Aunque realmente no forma parte de la piel, sirve de soporte⁴⁵.

1.2 Anexos de la piel.

En la piel se observan las denominadas faneras (o anexos): glándulas, pelos y uñas⁴⁵.

A. Pelo.

Los pelos están prácticamente distribuidos por toda la piel, excepto en regiones bien determinadas (palmas, plantas, labios). Son delgadas estructuras queratinizadas que se desarrollan a partir de una invaginación tubular de la epidermis, que crecen intermitentemente con fases de reposo y crecimiento; este crecimiento no es uniforme sino que va apareciendo en áreas determinadas⁴⁵. El pelo es fundamental en el aislamiento térmico y en la percepción sensitiva, constituyendo, además, una barrera contra lesiones químicas y físicas de la piel. El color del pelo es determinado por los gránulos de melanina incluidos en los queratinocitos⁴⁶.

El pelo tiene un período de crecimiento variable de una región a otra y se va desarrollando en ciclos. Cada ciclo consta de tres fases: anágen, catágen y telógen. El anágen es aquella en la que el pelo alcanza su crecimiento total⁴⁵, es decir que corresponde al crecimiento activo del pelo³¹; el catágen es la fase de transición a la de fase de reposo; y la fase de reposo es llamada telogén. Una vez concluida esta fase el pelo se pierde y es sustituido por uno nuevo⁴⁵.

a) Tipos de pelo.

Entre los mamíferos domésticos se pueden diferenciar varios tipos de pelo, según su estructura y la posición del folículo piloso se distinguen tres tipos de pelo:

- Pelo primario (pelo de cobertura): son los más característicos de la piel, generalmente son más largos y gruesos, forma una capa (manto) que protege al animal de la lluvia y el calor.
- Pelo secundario (pelos lanosos): son finos y sedosos, por lo general fuertemente rizados, su función es mantener caliente al animal reteniendo calor ya que su cantidad es mayor en invierno que en verano⁴⁶.

B. Uña.

Las uñas son placas córneas que recubren la cara dorsal de las falanges terminales de los dedos. Se compone de un cuerpo, un borde distal libre, un borde proximal oculto y dos bordes laterales⁴⁵.

C. Glándulas.

a) Glándulas sebáceas.

Las glándulas sebáceas son glándulas simples con un conducto que se abre directamente a la superficie cutánea. Su densidad y tamaño depende del lugar anatómico. Son más abundantes alrededor de las uniones mucocutáneas, espacios interdigitales, en el cuello dorsal, en el lomo, en la cola y en la barbilla. Están ausentes en el plano nasal y en las almohadillas plantares. El sebo tiene un papel protector y de comportamiento. Combinado con el sudor forma una emulsión cerosa que proporciona una barrera de protección frente a organismos patógenos.

Las glándulas sebáceas especializadas son capaces de producir feromonas y juegan un papel en el comportamiento animal³¹.

b) Glándulas sudoríparas.

Las glándulas sudoríparas son glándulas tubulares simples y en espiral. En algunas especies, existen glándulas sudoríparas específicas que están implicadas en la producción de olor. Aunque el sudor no tiene una función universal, protege la piel y sus estructuras específicas, como los párpados y las almohadillas, de daños de fricción; mantiene la flexibilidad de la piel, y proporciona defensas microbianas a través de la presencia de inmunoglobulinas, citoquinas, transferinas e iones inorgánicos como el cloruro sódico. El sudor no juega un papel importante en la termorregulación en perros y gatos³¹.

1.3 Importancia de las patologías dermatológicas en la clínica veterinaria.

De todas las patologías que se presentan en los perros y gatos, las de la piel son las más frecuentes y, a la vez, las que el dueño puede, con relativa facilidad, observar y descubrir. Esta es una de las causas por las que los animales con lesiones cutáneas son llevados a consulta con mayor asiduidad que los que poseen otros tipos de patologías¹⁷.

Es conveniente señalar que el diagnóstico de las lesiones cutáneas no siempre es fácil. Muchas de ellas tienen características macro y microscópicas muy semejantes, lo que dificulta el establecimiento de los diagnósticos diferenciales¹⁷.

II. DERMATOFITOSIS

2.1 Características.

La dermatofitosis, dermatomicosis o también denominadas “tiñas” son aquellas infecciones superficiales de la piel causadas por dermatofitos patógenos⁴². Según la Organización Mundial de la Salud los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos constituido por tres géneros (*Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*) y aproximadamente 40 especies, taxonómicamente muy relacionados¹⁸, de las cuales sólo 11 especies son agentes patógenos⁹.

Los dermatofitos viven en los tejidos queratinizados (uñas, folículos pilosos, pelos en la fase anágena y en el estrato córneo de la epidermis)¹⁵, esto debido a que tienen la capacidad de digerir la queratina de la piel y nutrirse de ella gracias a la queratinasa que producen, esta es la que le da su capacidad para invadir o parasitar dichos tejidos^{3,9,16,18,23,50}. Además, los dermatofitos son importantes ya que son capaces de crecer en los tejidos queratinizados del hombre y de los animales, es decir que tienen un potencial de zoonosis^{3,13,15,18}.

Se han realizado estudios de las diferentes especies de los dermatofitos en prácticamente todo el mundo, los cuales han mostrado que éstas varían según las áreas geográficas, factores socioeconómicos, climáticos y migraciones poblacionales^{16,23}, esto hace que la frecuencia de aislamiento de las diferentes especies varíe entre las diferentes áreas geográficas^{40,50}. Las dermatofitosis son muy frecuentes en México constituyendo del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica¹⁶. En áreas tropicales de México llega a ocupar uno de los tres primeros lugares estadísticos de frecuencia en la consulta dermatológica¹⁰.

Resulta útil clasificar a los dermatofitos según el medio donde se desarrollan naturalmente; si se encuentran en el suelo se denominan geófilos o telúricos (*Microsporum gypseum*), en animales se denominan zoófilos (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*) y antropófilos si se desarrollan en el hombre (*Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*)^{3,13,16}.

Los dermatofitos geófilos se encuentran en el suelo colonizando sustratos queratínicos como pelos, plumas, piel y uñas de animales²³. Los dermatofitos geófilos se encargan principalmente de descomponer restos queratinizados. También pueden ser aislados de pequeños mamíferos de vida libre con ausencia de lesiones, e incluso de la piel sana de personas⁴⁵. Estos hongos producen infecciones humanas con carácter esporádico, aunque en algunas regiones son endémicos²³.

2.2 Etiología y patogénesis.

Para que los dermatofitos parasiten, existe cierta dependencia de la susceptibilidad del huésped (factores genéticos, fisiológicos, edad, respuesta inmune), así como de la cantidad del inóculo y del agente causal⁵³.

Aunque la dermatomicosis puede afectar a animales de cualquier edad, los animales jóvenes están más predispuestos a una infección⁴², aparentemente los animales menores de un año de edad parecen tener más predisposición a la infección²⁴, esto posiblemente debido a que su sistema inmune es inmaduro y tienen una baja concentración de ácidos grasos en piel, o en los animales jóvenes que carecen de inmunidad materna (falta o deficiencia del calostro) ⁴⁵. En los animales adultos, las dermatofitosis son más comunes cuando existe alguna enfermedad sistémica, inmunosupresión o estrés, como el producido durante la gestación o lactación¹³, además de que presentan síntomas clínicos más graves²⁶.

Los dermatofitos invaden el tejido queratinizado como el pelo, el estrato córneo y las uñas. Las infecciones por dermatofitos se adquieren por contacto con artrosporas (espora resultante de la fragmentación de una hifa) de fómites, tierra infectada y animales infectados. El primer paso de la infección es la adherencia de las artrosporas al estrato córneo. El segundo paso es la germinación de la espora y la producción de hifas, que secretan queratinasa e invaden el estrato córneo y los tallos del pelo en anagén⁴².

Por otro lado, la capacidad antigénica de los dermatofitos no está suficientemente clara. Las defensas del hospedador están representadas más por la inmunidad celular que por la producción de anticuerpos específicos. Se han postulado una reacción de hipersensibilidad para justificar la reacción inflamatoria que se produce ante la presencia del dermatofito en la piel. El grado de reacción inflamatoria varía; infecciones con especies no adaptadas al huésped son más inflamatorias que las producidas por especies sí adaptadas¹³.

Asimismo, es importante señalar que el material queratílico de descamación de perros infectados puede contribuir al desarrollo de la propagación de dermatofitos y hongos relacionados con las clínicas veterinarias. Esto significa que las clínicas veterinarias podrían representar una fuente de infección para perros y humanos en riesgo de exposición con los hongos en el ambiente, por lo que sería necesario mantener las clínicas con medidas de higiene apropiadas²⁴.

En los perros las dermatofitosis son mucho menos frecuentes que en gatos. Sin embargo se han descrito hasta un 5% de portadores asintomáticos. Numerosas especies de hongo pueden producir dermatofitosis en el perro, aunque *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes* representan la mayoría¹³.

En los gatos *Microsporum canis* representa cerca del 95% de las dermatofitosis. Los casos restantes se deben principalmente a *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*¹³.

2.3 Micología.

Los dermatofitos se reproducen por conidios: macroconidios (antes nombrados macroaleurioconidios) y microconidios (antes microaleurioconidios). El género *Microsporum* produce abundantes macroconidios y escasos microconidios. Los macroconidios en este género, son de muy diversas formas, como fusiformes, claviformes, ovoides, etc.; miden entre 40-60 µm de largo por 5-15 µ, de ancho, con paredes gruesas (3-5 µm), tienen septos o lóculos transversales; generan además escasos microconidios de aspecto piriforme y en algunas ocasiones pueden estar ausentes, por lo tanto se requieren medios de cultivo especiales como papa-zanahoria, Borelli y arroz para estimular su producción¹⁰.

2.4 Signos clínicos.

Los signos clínicos de las dermatofitosis en los animales domésticos son muy variables. La presentación más frecuente, especialmente en el perro, incluye eritema, alopecia, descamación, costras¹³ además de engrosamiento epidérmico⁹. Las lesiones pueden distribuirse de forma localizada o difusa⁴². El área afectada tiene un borde bien delimitado, a menudo marcado por una zona de inflamación y costras²⁶. Las manifestaciones menos típicas son las pruríticas¹³.

Las manifestaciones clínicas varían según el agente causal y la respuesta inmune del huésped. Estas infecciones pueden durar meses o años, cursar de forma asintomática o acompañarse solo con prurito⁹. La dermatofitosis debida a *M. gypseum* es mucho más inflamatoria²⁶.

2.5 Diagnóstico.

El diagnóstico de una dermatomicosis se basa en la historia clínica, examen clínico y demostrar la infección fúngica con uno, o más, de los métodos complementarios¹³.

A. Examen con la lámpara de Wood. Es un recurso más para el diagnóstico de consultorio¹⁰. Se trata de la observación de un tono fluorescente de las hifas del dermatofito, se debe realizar en una habitación oscura. El fundamento de esta prueba es que las hifas de algunas especies de *Microsporum* producen un metabolito llamado pteridina, éste absorbe la luz ultravioleta y emite una fluorescencia visible¹⁴. Aproximadamente un 50-70% de *M. canis* aislados no dan fluorescencia y *T. mentagrophytes* nunca es fluorescente, aunque la ausencia de fluorescencia a la lámpara de Wood no descarta la tiña⁴⁵. *M. gypseum* da una coloración bajo la lámpara de Wood de color verde claro¹⁰.

B. Examen microscópico del pelo y de las escamas. Se pueden utilizar varios químicos para ayudar a limpiar la queratina, lo que permite una identificación más fácil de las esporas ectóricas, cuya disposición puede ayudar a la identificación de la especie¹³, aunque esta técnica a veces produce resultados falsos negativos²⁶. La solución aclarante más utilizada es el Hidróxido de potasio (KOH) al 20%¹⁴. Otras soluciones aclarantes útiles son: dimetil-sulfóxido (DMS) al 10-20%, negro de clorazol¹⁰, azul de lactofenol y blanco de calcoflúor. El blanco de calcoflúor tiñe la quitina de la pared celular de los hongos generando fluorescencia cuando se observa con un microscopio de fluorescencia, el color de la fluorescencia depende de los filtros del microscopio y el fondo siempre se verá oscuro⁴⁷.

En el caso de *M. gypseum*, se puede observar numerosos microconidios de 2-6 µm de diámetro tanto ectótrix como endótrix, aunque predominan ectótrix¹⁰.

C. Cultivo fúngico. Los dermatofitos se identifican basándose en la apariencia y color de la colonia, en la pigmentación del reverso, en los cambios en el medio (si se utiliza el medio de cultivo llamado DTM) y en la identificación microscópica de los macroconidios¹³. Las colonias se desarrollan en un tiempo promedio de 10 a 15 días, incubadas a temperatura de 25 y 28°C, pero deben descartarse hasta los 30 días¹⁰. El cultivo tiene valor epidemiológico y confirma con certeza el diagnóstico de dermatofitosis, pero tiene el inconveniente de ser un procedimiento diagnóstico lento (requiere un mínimo de 4 ó 5 días o hasta 10 ó 15 días para casi todas las especies)¹⁸.

Los medios de cultivo utilizados habitualmente toman como base el agar glucosado y peptonado de Sabouraud, este es un medio que generalmente lleva añadido algún antibiótico (gentamicina y/o cloranfenicol) para minimizar la posibilidad de un crecimiento bacteriano. Su ventaja radica en que al ser transparente permite observar el color del reverso de la colonia⁴⁵.

El DTM (Dermatophyte Test Medium) es un agar Sabouraud al que se le ha añadido un antibiótico (generalmente cloranfenicol), un fungistático (cicloheximida) que inhibe el crecimiento de algunos hongos saprófitos, y un indicador de pH (rojo fenol). Este medio reduce la posibilidad de contaminantes bacterianos y fúngicos. Al ser un medio coloreado, no permite la observación del reverso de las colonias y tampoco va a ser adecuado para la identificación microscópica ya que disminuye la frecuencia de aparición de macroconidias⁴⁵.

El agar Mycobiotic es similar al DTM pero no incluye el rojo fenol, por lo que al ser transparente permite observar el reverso de las colonias⁴⁵.

La identificación fúngica macroscópica presta especial interés a la textura, pigmento y velocidad de crecimiento de la colonia. La identificación microscópica debe hacerse en cultivos jóvenes, ya que los dermatofitos en los cultivos, a medida que van envejeciendo, sufren un proceso llamado pleomorfismo⁴⁵.

D. Examen histopatológico de la piel afectada. El uso de esta técnica, especialmente con la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS), puede demostrar las hifas y arthroconidios en los pelos. Esta técnica permite un diagnóstico mucho más rápido que el conseguido con el cultivo fúngico¹³.

III. CARACTERÍSTICAS DE *Microsporum gypseum*.

3.1 Clasificación.

Microsporum gypseum es un dermatofito geófilo, siendo su reservorio natural el suelo³.

3.2 Historia.

Fue aislado por primera vez del suelo por Sabouraud en 1894. Bodin, en 1907, llevó a cabo un el primer estudio a fondo de este hongo con el examen macroscópico y microscópico de los cultivos³⁹.

3.3 Epidemiología.

M. gypseum es de distribución mundial²³.

M. gypseum es la única especie geofílica con clara capacidad patógena para el hombre²³, pero su incidencia en casi todo el mundo es baja²⁴. Infecta tanto a niños como adultos^{23,24}.

M. gypseum es un agente poco frecuente en las dermatomicosis humanas, reportándose un 0.25% a un 2.90%. Lo mismo ocurre con los animales domésticos reportándose de un 2.04% a un 3.7%¹⁴. Diversos estudios epidemiológicos señalan que las dermatofitosis en humanos por *M. gypseum* van del 0,4% al 6%, y una baja prevalencia de aislamientos de dermatofitos en perros teniendo valores entre 4% y 10%, siendo pocos los estudios que muestran prevalencias mayores a estos³. En México, *M. gypseum* se aísla de forma esporádica con un 3% de frecuencia¹⁰.

El periodo de incubación es variable, por lo general de siete a quince días, esto depende de la cantidad del inóculo que reciba el hospedero¹⁰.

La infección *M. gypseum* es más común en animales que en el hombre. Se ha localizado en varias especies de animales domésticos (perros, gatos, caballos y conejos) y parece que es más frecuente en perros que en gatos²³, además se han localizado en vacas, cabras, ovejas y cerdos³. El contagio humano tiene lugar a través de heridas o erosiones de la piel, al contactar con tierra o animales. La práctica de deportes sobre tierra o una profesión relacionada con la manipulación de tierra y estiércol animal pueden ser circunstancias favorables para el contagio²³.

La distribución y supervivencia de los dermatofitos geofílicos en el suelo depende de varios factores, tanto abióticos (temperatura, luz, variaciones climáticas, altitud) como bióticos (pH, nutrientes, humedad, humus, ácidos grasos, sales). Su aislamiento en áreas habitadas es consecuencia de la gran cantidad de productos orgánicos de desecho, tanto del hombre como de los animales. Se ha apuntado que las cepas del suelo presentan una virulencia más atenuada que las procedentes de animales, aunque también se afirma que todas las cepas presentan la misma virulencia independientemente del hábitat y, por supuesto, del estado sexual²³.

3.4 Signos clínicos.

Las infecciones a las que suele dar lugar son esporádicas, sin tendencia a la cronicidad, y generalmente se asocian con una acentuada inflamación³. Es bien conocido que los perros sin signos clínicos de la enfermedad pueden actuar como una fuente de infección en los humanos, por lo cual es importante determinar la presencia de dermatofitos que afectan al perro con más frecuencia y que representan un riesgo para el humano cuando es expuesto a perros infectados o portadores²⁴.

M. gypseum puede causar una presentación generalizada, afectando a grandes porciones corporales. Además, *M. gypseum* es capaz de generar la forma clínica denominada querion, que es una zona circunscrita de inflamación aguda de la piel, con foliculitis y furunculosis exudativa, producida por microorganismos tanto bacterianos como micóticos⁴⁵.

3.5 Características micológicas de *M. gypseum*.

A. Morfología de la colonia.

La colonia es ilimitada, de aspecto polvoso o arenoso, al inicio es de color blanco y luego se torna beige¹⁰.

B. Color del reverso.

No presenta algún pigmento¹⁰.

C. Velocidad de crecimiento.

M. gypseum se desarrolla en un tiempo de ocho a diez días, a temperatura ambiente en medio de agar Sabouraud¹⁰.

D. Caracteres microscópicos.

Macroconidios de pared delgada, multiseptados y vellosos²⁸. Los macroconidios son de aproximadamente 50 a 120 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho, sus septos son de 4 a 6 unidades por macroconidio (no más de 6 septos). Los macroconidios son abundantes. La mayoría de cepas tienen escasos microconidios piriformes de 4 a 6 μm de largo¹⁰.

E. Otros caracteres.

Desarrollan bien en medio con granos de arroz²⁸.

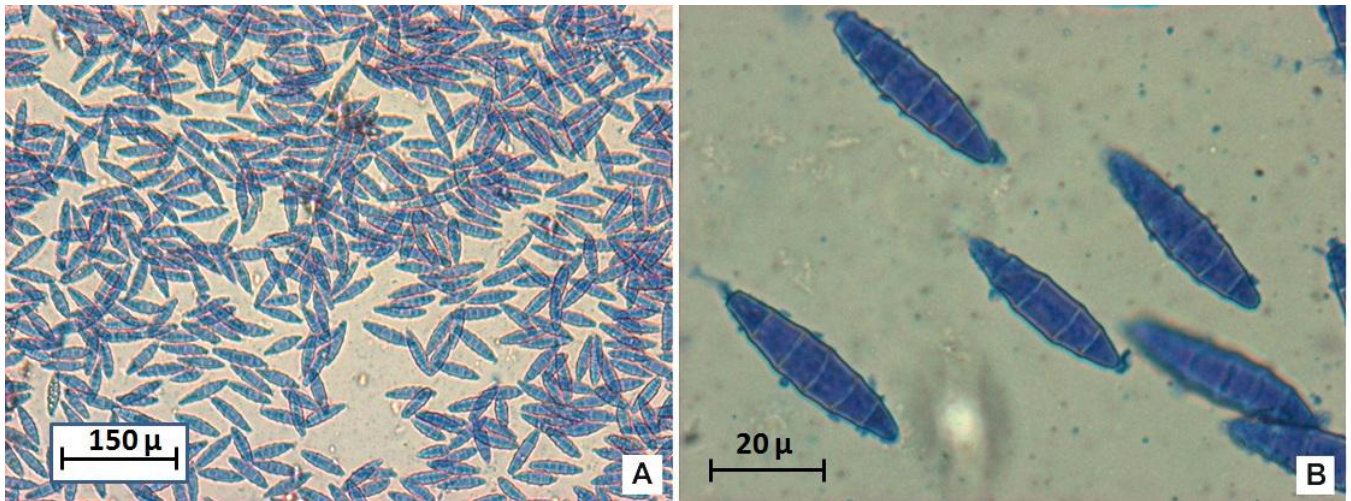


Figura 1: Morfología de *M. gypseum* con la tinción de azul de algodón, imágenes tomadas en el Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán UNAM. A: vista en 100x. B: vista en 400x.

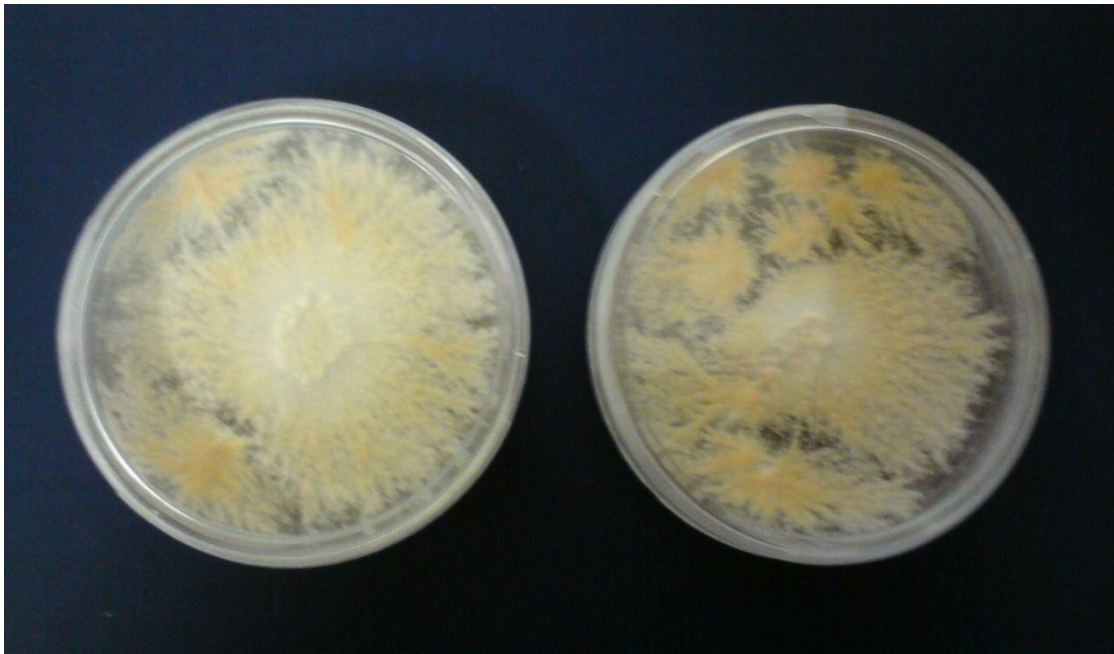


Figura 2: Cultivo de *M. gypseum* en agar PDA, cepa de un caso clínico de un canido con dermatofitosis aislado en el Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán UNAM.

IV. TRATAMIENTO

Las dermatofitosis suelen ser enfermedades crónicas y de difícil tratamiento, por lo que representan para el clínico las enfermedades fúngicas superficiales de terapéutica más difícil y de mayor problemática³. La curación espontánea de las dermatofitosis es altamente improbable, por lo que es necesario instaurar tratamiento¹⁸.

Es importante recalcar que el diagnóstico clínico presuntivo debe confirmarse con el estudio micológico (KOH y cultivo)¹⁸.

Los animales de pelo largo o los animales con lesiones generalizadas, deben afeitarse antes de la aplicación de los tratamientos tópicos. Preferiblemente debe realizarse en una zona aislada que pueda descontaminarse fácilmente. Con el cuidado adecuado, el afeitado elimina las esporas que se encuentran en el pelo y por lo tanto disminuye la carga sobre el animal y la contaminación posterior del entorno⁴².

4.1 Terapia tópica.

El tratamiento de una dermatofitosis sólo con la aplicación de un tratamiento tópico en una lesión localizada no es satisfactorio. No tiene ningún efecto en las hifas o esporas que pueden estar presentes en cualquier punto del animal, y por lo tanto, resulta poco efectivo sobre la contaminación ambiental¹³. El tratamiento tópico de las dermatofitosis es posible en lesiones limitadas, se debe utilizar en pacientes embarazadas o durante la lactancia o cuando existan interacciones con la terapia oral¹⁸. El tratamiento tópico ayuda a reducir y controlar las posibilidades de transmisión de la infección y de contaminación ambiental⁴⁵.

El uso de agentes terapéuticos, como el miconazol y clotrimazol, se centra en un tratamiento focal de las lesiones localizadas afeitadas junto con baños de todo el cuerpo con gluconato de clorhexidina al 1% o enilconazol al 0.2%. Estos baños completos del cuerpo se deben realizar 2 veces por semana y se debe considerar el afeitado de todo el cuerpo del animal, ya que esto mejora la eficacia de los baños¹³. La clorhexidina sola no es efectiva para eliminar la dermatofitosis o inhibir la contaminación ambiental²⁶.

El clotrimazol es uno de los primeros azólicos empleados extensamente como antifúngico en clínica humana, que usado como solución o crema al 1%, es efectivo frente a varias micosis superficiales como pitiriasis versicolor, candidiasis cutáneas y dermatofitosis, el principal efecto colateral es irritación cutánea²².

4.2 Terapia sistémica.

El tratamiento sistémico actúa más lentamente que el tratamiento tópico, pero tiene una mejor distribución en la raíz del pelo y en las capas epidérmicas, y su eficacia persiste más en el tiempo⁴⁵.

a) Griseofulvina.

El tratamiento de elección contra *M. gypseum* es la griseofulvina³⁹. Se recomienda una dosis de 10 mg/kg/día que pueden elevarse hasta 30 mg/kg/día en casos severos¹⁸. Otros autores señalan una dosis de 10 a 15 mg/kg al día, con un alimento graso para mejorar su absorción. La griseofulvina inhibe la mitosis de las células del hongo alterando el huso mitótico, también puede inhibir la síntesis de quitina⁴². Según diferentes estudios, los principales inconvenientes del uso de la griseofulvina son la necesidad de largos tratamientos, bajas tasas de curación y altos porcentajes de recaídas³. Los efectos secundarios más frecuentes son vómitos, diarrea y anorexia³⁴, aunque en ocasiones puede producir depresión, ataxia y anemia. Generalmente estos efectos colaterales se resuelven cuando se interrumpe el tratamiento²⁶. La griseofulvina es teratogénica y está contraindicada en animales gestantes¹³, además no debe utilizarse en animales muy jóvenes⁴⁰. Igualmente es hepatotóxica⁴⁵. En los gatos con una infección por el virus de la leucemia felina (VLF_e) es más frecuente que se produzca una depresión de la médula ósea²⁶. La griseofulvina ya no está disponible como tratamiento autorizado para animales de compañía en el Reino Unido⁴².

b) Ketoconazol.

El ketoconazol es un imidazol⁴⁵, su mecanismo de acción es inhibiendo la demetilación del lanosterol, un precursor de esterol en la síntesis de ergosterol, que es un componente de la pared celular del hongo⁴². El ketoconazol oral actualmente no se utiliza por su errática absorción, la posibilidad de toxicidad hepática y por la alteración secundaria en la síntesis de las hormonas esteroideas¹⁸. En perros y gatos se ha utilizado a dosis de 10 mg/kg una vez al día¹³. Se absorbe mejor a pH ácido, por lo que los antiácidos y los antagonistas del receptor H₂, como la cimetidina, no deben utilizarse conjuntamente. Los efectos adversos incluyen anorexia, aumento de las enzimas hepáticas (al ser hepatotóxico) y también puede suprimir las concentraciones basales de cortisol. La duración del tratamiento con el ketoconazol es de 3 a 6 meses⁴⁵. Se han reportado hongos resistentes al ketoconazol³⁶.

c) Itraconazol.

El itraconazol es un triazol que se une fuertemente a la queratina por lo que alcanza altas concentraciones en piel, uñas y pelos, permaneciendo en dichos tejidos en concentraciones altas hasta un mes post-tratamiento (piel y pelo) y 4 a 6 meses post-tratamiento en uñas¹⁶. La dosis en perros y gatos es de 10 mg/kg¹³. En general es bien tolerado, aunque entre el 7-12% de los enfermos pueden presentar efectos secundarios (afecciones gastrointestinales y cefalea)¹⁶. Los vómitos son un efecto secundario raro y generalmente se tolera mejor que el ketoconazol⁴².

d) Fluconazol.

El fluconazol es un triazol que se une menos a la queratina que el itraconazol. Habitualmente una dosis semanal de 150 mg consigue niveles adecuados en dermis, epidermis y tejido ungueal, pero debido a sus características cinéticas el tratamiento semanal se debe interrumpir cuando se alcanza la curación clínica. Aproximadamente el 16% de los enfermos pueden presentar efectos secundarios (náuseas, vómitos y alteraciones funcionales hepáticas)¹⁸.

e) Terbinafina.

La terbinafina es una alilamina fungicida que se caracteriza por unirse fuertemente a la queratina y tejido graso. Al suspender el tratamiento las concentraciones en estrato corneo y tejido ungueal permanecen altas de forma prolongada (4-6 meses en el caso de uñas)¹⁸. La dosis indicada es de 20-30 mg/kg por vía oral una vez al día. Bloquea la síntesis del ergosterol inhibiendo la enzima escualenoepoxidasa en la membrana⁴². Aproximadamente el 10% de los enfermos tratados pueden presentar efectos secundarios¹⁸. Los efectos secundarios potenciales incluyen anorexia, aumento de las enzimas hepáticas y trastornos gastrointestinales. No está autorizado para su uso veterinario en el Reino Unido⁴².

Debido a que los tratamientos tópicos dan pobres resultados³⁵, la tendencia actual es la administración conjunta de estos agentes terapéuticos con antifúngicos orales, mejorándose así los resultados de éstos últimos³.

En lesiones muy inflamadas, los corticosteroides tópicos en combinación con los agentes antifúngicos pueden acelerar la resolución de la enfermedad clínica⁴⁵.

4.3 Limpieza del entorno.

La descontaminación del entorno es un complemento importante del tratamiento clínico, puesto que las esporas del hongo pueden sobrevivir durante períodos prolongados fuera del animal. Las esporas pueden diseminarse a través de las corrientes de aire. El número de animales infectados se relacionan directamente con los niveles de esporas en el entorno. Por lo tanto, es más fácil tratar las infecciones en los hogares donde sólo existe un animal⁴².

Las intervenciones recomendadas para controlar la contaminación del entorno incluyen confinar al animal infectado en una zona aislada; aspirar las alfombras y los muebles tapizados; desinfectar las superficies con algún desinfectante cada vez que sea posible; desinfectar los utensilios de aseo como peines y cepillos; no introducir nuevos animales hasta terminar el tratamiento; la descontaminación debe de continuar hasta que se obtenga dos o tres cultivos micológicos negativos del animal afectado⁴². Es imprescindible la desinfección del hospital veterinario, como en cualquier enfermedad infecciosa, especialmente si el animal se afeita en la clínica⁴⁰. Para la desinfección, es recomendable el uso de clorhexidina al 1% en agua, cal azufrada al 2.5% en agua, yodóforos o soluciones cloradas⁴⁵.

V. PROPÓLEO

5.1 Definición.

Etimológicamente la palabra propóleo se deriva del griego pro (en defensa de) y polis (ciudad) que significa “en defensa de la ciudad”; con ella se designa a la sustancia que recubre la colmena de las abejas (*Apis mellifera*) y cumple funciones defensivas^{41,43,63}.

Geopropolis o geopropóleo es un tipo de propóleo producido por himenópteros (Hymenoptera: Meliponinae) conocidos como abejas meliponas o abejas sin aguijón, el cual contiene materiales arcillosos del suelo. Estas abejas sin aguijón viven en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en Centro y Sudamérica, África, Asia y Australia⁴³.

5.2 Historia.

Esta sustancia es conocida por el hombre desde tiempos remotos. La utilizaban los sacerdotes egipcios y más tarde, los griegos, quienes lo denominaron "propóleo"⁸. Este producto de la colmena ha sido utilizado desde tiempos antiguos por las propiedades farmacéuticas que se le han atribuido, tales como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antiúlcero, hepatoprotector, antitumoral, entre otras⁴¹.

Los egipcios y los sacerdotes utilizaban el propóleo para embalsamar los muertos, ya que ellos sabían que las abejas momificaban a los intrusos que no podían ser expulsados de la colmena⁸.

A partir de la década de los 60 se efectuaron las primeras investigaciones científicas que revelaron la compleja estructura del propóleo y pusieron de manifiesto numerosas aplicaciones farmacológicas⁴⁵.

5.3 Características.

El propóleo es una sustancia resinosa y altamente adhesiva, recolectada, transformada y usada por las abejas para sellar los agujeros⁴¹, regular la temperatura interior de la colmena⁵⁶, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los intrusos⁴¹ así como también de mantener libre a la colmena de bacterias y hongos patógenos⁵⁶. También es utilizado para recubrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.), que quedan embalsamados evitando su descomposición⁸.

Las abejas (*Apis mellifera* L.) lo obtienen por adición de cera y secreciones salivares al material resinoso, gomoso ó balsámico que recolectan de diversas plantas¹³. En el proceso de recolección, transporte y almacenamiento a la colmena, las abejas adicionan sustancias enzimáticas y cera, de secreciones

glandulares de la hipofaringe y glándulas cereras presentes en los esternitos del abdomen. Adicionalmente, puede añadir microelementos del entorno, donde el producto final es de consistencia viscosa⁴⁹ y cuando ha permanecido durante más de cinco meses en la colmena presenta una estructura quebradiza⁵⁶.

La coloración es muy variada y puede poseer tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo, amarillento o verde, y en algunos casos llega a ser negro, según sea el origen botánico y geográfico⁴⁹.



Figura 3: Propóleo recolectado de los apiarios de la FES Cuautitlán UNAM.

5.4 Composición química.

La composición química del propóleo es bastante compleja y depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colonia⁵. Esto significa que distintas partes de la colmena tendrán diferente composición del propóleo, por lo que será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos aún cuando estén ubicadas en la misma zona geográfica, puesto que lo elaboran de acuerdo a sus necesidades y fuentes de materia prima disponibles⁴⁵.

Del propóleo se han identificado como principales componentes: alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos, ácidos p-cumáricos prenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides, minerales y azúcares⁴¹.

Básicamente se compone de un 50-55% de resinas y bálsamos vegetales, 30-40% de cera de abeja, 5-10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales)^{5,63}. Se considera que la cera y las mezclas mecánicas presentes en el propóleo, no tienen actividad terapéutica probada; el resto de los componentes constituyen la parte biológicamente activa⁴⁵. En general, el propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presenta como un material duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C⁴⁹.

La amplia diversidad en la composición química de este producto apícola ha traído como consecuencia la necesidad de control de su calidad y su normalización en general⁴¹.

5.5 Actividad biológica.

Las propiedades farmacéuticas que se le han atribuido son:

- Antibacteriano^{8,14,25,41,43,45,50,55,59,61}
- Antifúngico^{8,14,25,34,35,41,47,49,54,59,61}
- Antiviral^{8,14,25,41,49}
- Antiprotozoarios^{25,49}
- Antiinflamatorio^{8,25,41,43,45,49,59}
- Antioxidante^{8,14,25,43,49,59}
- Antiúlcero^{14,41}
- Hepatoprotector^{25,41,49}
- Antitumoral^{14,25,41,43,45,49,59,61}
- Inmunomodulador^{8,14,49}
- Cicatrizante^{8,45,49}
- Anestésico^{14,25,45,49}

Estas propiedades han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, ésteres del ácido caféico, ácidos y ésteres fenólicos, que actualmente son considerados los principales componentes bioactivos del propóleo^{7,47}, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en las plantas superiores, en las partes aéreas de las mismas, en capullos y hojas jóvenes especialmente en aquellas con sistema vascular⁴⁵. Aunque actualmente se ha demostrado que la actividad antimicrobiana del propóleo se da gracias al sinergismo de sus componentes y no de un solo componente²⁵.

Los flavonoides desempeñan un papel considerable en la terapéutica por sus múltiples funciones fisiológicas, se ha encontrado que posee funciones antioxidantes que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres⁴⁵. Se ha determinado que los flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana, además de provocar un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño causado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto por un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico. Se ha determinado que el propóleo desorganiza la membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma, provocando una bacteriolisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas²⁵.

Existen estudios que han comprobado la eficacia del propóleo (provenientes de diferentes áreas geográficas) en contra de algunos microorganismos. Se ha demostrado que el propóleo inhibe el crecimiento de:

Bacterias:

*Escherichia coli*²⁵, *Helicobacter pylori*²⁵, *Bacillus subtilis*⁶¹, *Corynebacterium equi*⁶¹, *Micrococcus lysodeikticus*⁶¹, *Pseudomonas aeruginosa*^{25,61}, *Enterobacter aerogenes*⁴⁴, *Mycobacterium smegmatis*⁶¹, *Mycobacterium phlei*⁶¹, *Staphylococcus aureus*^{25,61}, *Staphylococcus epidermidis*⁶¹, *Streptococcus mutans*^{20,43,45,56,63}, *Pasteurella multocida*²⁵, *Prevotella intermedia*⁴⁵, *Prevotella nigrescens*⁴⁵, *Porphyromonas gingivalis*⁴⁵, *Thermoactinomyces intermedius*⁶¹, *Micrococcus luteus*⁶¹, *Propionibacterium acnes*⁶¹, *Flavobacterium meningosepticum*⁶¹, *Helicobacter pylori*⁶¹.

Hongos:

Trichophyton rubrum^{2,54}, *Trichophyton mentagrophytes*^{2,47,54}, *Epidermophyton floccosum*⁵⁴, *Microsporium gypseum*^{2,61}, *Candida albicans*^{45,47}, *Candida nonalbicans*⁴⁷, *Aspergillus niger*⁴⁷, *Alternaria alternata*⁴⁷, *Penicillium digitatum*⁴⁷, *Botrytis cinerea*⁴⁷, *Ascosphaera apis*⁴⁷, *Plasmopara viticola*⁴⁷, *Arthroderma benhamiae*⁶, *Kloeckera apiculata*⁶¹, *Saccharomyces cerevisiae*⁶¹, *Malassezia pachydermatis*^{34,35}.

5.6 Toxicidad.

Múltiples estudios realizados en el mundo han demostrado la buena tolerancia a este producto natural administrado por vía oral, no lográndose establecer la dosis letal por su alta tolerancia⁸. No obstante, en medicina humana, se ha reportado que el propóleo es una causa reconocida de dermatitis por contacto de tipo ocupacional en apicultores, la primera descripción de esto se realizó en el año 1975. Se reporta que el propóleo genera hipersensibilidad retardada (tipo IV) en humanos¹¹.

Aunque se consideraba esta hipersensibilidad como una dermatosis profesional en los apicultores, en las últimas décadas se han reportado casos de hipersensibilidad en las personas que utilizan con frecuencia productos naturales que contiene propóleo con fines terapéuticos o cosméticos³⁰.

Las reacciones alérgicas al propóleo surgen, por lo general, en personas que son alérgicas a los productos de las abejas, o a sus picaduras, así como a las personas que padecen de algún tipo de problema alérgico⁴⁵. Aun así, la dermatitis alérgica de contacto por propóleo es poco común³⁰.

Se sabe que la cera de abeja produce dermatitis de contacto, y dado que el propóleo contiene este producto, se debe tener especial cuidado con los individuos sensibles a la cera de abeja. Además, se han reportado sustancias alergénicas presentes en el propóleo como los ácidos y esteres fenólicos: 3, 3-dimetilalilcafeato, cafeato de isoprenilo y el derivado feniletil éster del ácido cafeico⁴³.

5.7 Propóleos mexicanos.

En México la información científica respecto a los propóleos, su actividad biológica y composición química es muy limitada²⁵, ya que no se han estudiado a profundidad el origen botánico o químico de los propóleos mexicanos^{25,46}. Se han analizado propóleos provenientes del Estado de México^{25,32,46}, Distrito Federal^{56,63}, Veracruz²⁵, Querétaro²⁵, Puebla^{20,25}, Yucatán²⁵, Guanajuato^{20,25}, Oaxaca²⁰, San Luis Potosí⁴⁶, Jalisco¹, Zacatecas⁴⁶ y Sonora^{27,59}.

Gutiérrez en 2011 analizó una muestra de propóleo de la FES Cuautitlán, se determinó su perfil químico encontrando un total de 33 compuestos, de los cuales el 3.296% correspondían a flavonoides, los cuales fueron el 1.006% de naringenina y 2.290% de pinocembrina²⁵.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la actividad *in vitro* del propóleo de la FES Cuautitlán contra una cepa de *Microsporum gypseum*.

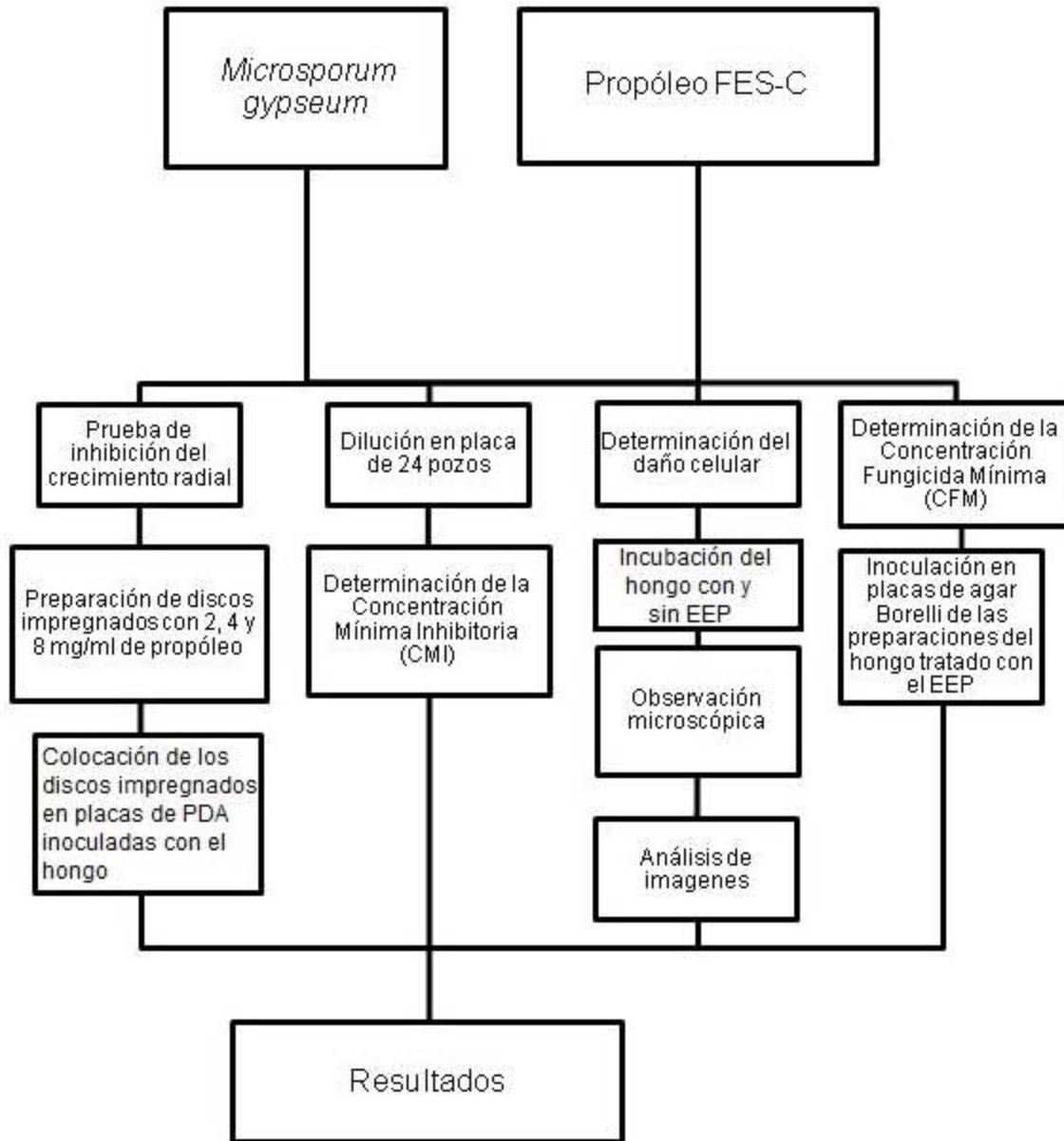
OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar cualitativamente la inhibición causada por el propóleo sobre *Microsporum gypseum* mediante la prueba de inhibición del crecimiento radial.
- 2) Obtener la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre la cepa del hongo por el método de dilución en placa.
- 3) Determinar la concentración fungicida mínima del propóleo sobre la cepa del hongo.
- 4) Evaluar el daño celular sobre el dermatofito causado por el extracto etanólico de propóleo mediante microscopía óptica y análisis de imágenes.

HIPÓTESIS.

El propóleo de la FES Cuautitlán tiene efecto antimicótico *in vitro* a bajas concentraciones sobre una cepa de *Microsporum gypseum* aislada de un caso clínico de un cánido con dermatofitosis.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN



MATERIAL Y MÉTODOS

Propóleo.

Se utilizó extracto etanólico de propóleo (EEP) proveniente del apiario de la FES Cuautitlán UNAM, éste fue procesado en el Laboratorio de Microbiología (Laboratorio 6) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 y en el Laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica de la FES Cuautitlán campo 1.

Primeramente, el propóleo en bruto se limpió de todas las impurezas mecánicas que contenía (cera, piedras, hojas, tallos, etc.) y se trituró. Para llevar a cabo la extracción de los componentes del propóleo por la técnica de maceración, se pesaron 100 gramos del propóleo y se colocaron en un frasco ámbar con 300 mililitros de etanol absoluto durante 10 días, entonces se procedió a decantar y posteriormente a filtrar el contenido.

El líquido resultante de la filtración se destiló en un Rotovapor Büchi R-205 B-490 con unas constantes de 85 revoluciones de rotación, una temperatura del vapor de 27°C y con una temperatura del baño de 55°C, esto para eliminar el exceso de etanol contenido en el propóleo. Adicionalmente, para llevar a sequedad por evaporación, se colocó el extracto durante 24 horas en una campana de vacío, obteniendo de esta manera el extracto etanólico de propóleo (EEP). Se pesó el EEP obteniendo 66.06 gramos, se colocó nuevamente en frascos ámbar, se identificó y se almacenó a temperatura ambiente en oscuridad.

Microorganismos.

Se empleó una cepa de *Microsporium gypseum* proveniente de un caso clínico de dermatofitosis canina aislada en el Laboratorio de Microbiología de la UIM de la FES Cuautitlán.

El caso clínico fue un cánido macho criollo de 2 meses de edad, que presentaba lesiones eritematosas y alopecia en el miembro anterior izquierdo en la zona de la articulación radio-carpiana y en las falanges de ambos miembros posteriores.

Para realizar cada prueba, se preparó previamente la cepa de *Microsporium gypseum* sembrándola en placas de agar Dextrosa y Papa (ADP, DIBICO) y se incubó a 28°C durante 7 días, hasta que tuvo un desarrollo apreciable en la superficie del agar.

Prueba de inhibición del crecimiento radial.

La elaboración de la prueba de inhibición del crecimiento radial se realizó según la técnica descrita por Wang y Bun 2002. Se prepararon discos de papel Whatman estériles con un diámetro de 0.5 cm para ser impregnados con el extracto etanólico de propóleo y otros discos con etanol al 70% para ser utilizados como los discos control, debido a que el etanol al 70% fue el diluyente del propóleo. Se impregnaron los discos con EEP, con la ayuda de una micropipeta, a las concentraciones de 2, 4 y 8 mg por disco, para lograr esto, se preparó un stock de EEP diluido con etanol al 70% (40 miligramos de EEP en 300 microlitros de etanol) para obtener las diluciones. Para los discos control de etanol al 70% se impregnaron a cada disco con un 10 µl de etanol al 70%. Como comparativo, se utilizaron discos comerciales de ketoconazol (BIORAD62866) y clotrimazol (BIORAD62816), que contienen 50 µg por disco de ketoconazol y clotrimazol respectivamente.

Para inocular la cepa primeramente se perforó el cultivo del hongo con un tubo de cristal de 5 mm de diámetro interno para lograr inóculos de con dicho diámetro. Se colocó el inóculo en el centro de una placa Petri de 100 mm conteniendo ADP (DIBICO), y alrededor del inóculo se colocó a una distancia de 30 mm del límite micelial los discos impregnados con el EEP. Adicionalmente, en cada placa se colocó un comparativo (ketoconazol o clotrimazol) o el control (etanol), además de una placa que sólo contenía el control con los comparativos. Todas las placas se hicieron por duplicado.

Todas las placas se incubaron a 28° C hasta que la superficie del agar quedo cubierta por el micelio y se logró observar la formación de zonas de inhibición con formas de medias lunas, esto en 10 días.

Determinación de concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en placa.

Para la realización de la prueba para determinar la concentración mínima inhibitoria, se procedió de acuerdo a la técnica descrita por Londoño 2010. Se preparó una solución patrón del propóleo y de esta se hicieron diluciones de está para lograr las siguientes concentraciones: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.50 y 0.25 mg/ml de EEP. Se utilizó una placa de 24 pozos en donde se adicionó a cada pozo 1 ml de ADP mezclado con cada una de las diferentes concentraciones de los extractos. Se tomaron tres pozos para cada dilución y para el control negativo (medio sin extracto).

Una vez solidificado el medio, se inoculó en el centro de cada pozo con un fragmento del cultivo de *M. gypseum* de 1.60 mm de diámetro tomado con un capilar (LAUKA 07035). Se incubó la placa de 24 pozos a 28°C durante cinco días, ya que en ese tiempo se observó el total desarrollo del dermatofito en los pozos control.

Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM).

Para la determinación de la concentración fungicida mínima, se realizó conforme a la técnica descrita por Soares 2001. Primeramente se realizó una suspensión de *M. gypseum* en medio líquido de Sabouraud (marca DIBICO) ajustándolo por comparación visual hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Esta suspensión se distribuyó en ocho tubos Eppendorf llenándolos con 1 ml cada uno para así poder aplicarles el EEP.

Se elaboró una solución patrón que contenía 30 mg de EEP en 1 ml de etanol al 70%, con este stock se logró inocular a las suspensiones del hongo a las siguientes concentraciones: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/ml de EEP, se homogenizó cada preparación con el agitador tipo vortéx al momento de agregar el EEP. La preparación del hongo con la concentración de 0 mg/ml de EEP fue el control de la prueba.

Con una micropipeta se inocularon 5 µl de cada preparación del hongo en una placa Petri de 60 mm con agar Borelli y se incubaron las placas a 28°C, el inóculo se homogenizó previamente con el agitador tipo vórtex (Genie-2), cada concentración se inoculó por duplicado en cada caja. Se inoculó cada preparación del hongo en otras placas Petri con agar Borelli a las 5, 10, 24 y 30 horas, con el objetivo de evaluar el efecto del EEP sobre la cepa de *M. gypseum* a diferentes horas de exposición al propóleo.

Pasaron siete días y observamos el crecimiento micelial del hongo en las placas control, se procedió entonces a medir el diámetro de las colonias que crecieron.

Daño celular.

Para la evaluación del daño celular de *M. gypseum* causado por el propóleo, se realizó conforme a la técnica descrita por Londoño 2010. Se utilizaron las preparaciones del hongo tratadas con el EEP a las concentraciones de 0, 1.0 y 1.5 mg/ml que fueron elaboradas en la prueba de la determinación de la CFM. Se tomó una alícuota de la suspensión del hongo para cada preparación con un asa bacteriológica y se montó en un portaobjetos agregándole además una gota de azul de algodón y un cubreobjetos para la observación al microscopio. A continuación se incubaron a 28°C las suspensiones del hongo para su posterior evaluación. Las preparaciones se montaron en portaobjetos de igual manera a las 5, 10, 24 y 30 horas.

Adicionalmente, a las 30 horas de la prueba se realizó la tinción con blanco de calcoflúor (M2R Sigma, preparado al 0.1%) a las concentraciones de 0 y 1.5 mg/ml de EEP. Esta tinción se realizó con el mismo procedimiento que la tinción de azul de algodón. El objetivo de esta tinción fue determinar si el propóleo causó alguna alteración en la estructura de la pared celular del hongo. Esta tinción genera fluorescencia, por lo tanto se utilizó el microscopio de fluorescencia del Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM para su observación.

Se tomaron fotografías del hongo tratado a las diferentes concentraciones empleando un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axioscop 40) teniendo acoplada una Cámara (Evolution VF Cooled Color Media Cybernetics) y procesadas por medio del Software Q Capture Pro 6.0. Con las imágenes obtenidas se evaluaron las diferencias en la morfología de los macroconidios de *M. gypseum* a las diferentes concentraciones y horas de exposición al propóleo.

Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico del diámetro de cinco macroconidios de *M. gypseum* de la preparación control y cinco del hongo tratado a 1.5 mg/ml, para esto se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 4, calculando con el programa el análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS

Prueba de inhibición de crecimiento radial.

Pasados 10 días se pudo observar que los discos impregnados con el EEP formaron zonas de inhibición en forma de medias lunas alrededor del micelio del hongo, esto se apreció en las tres cajas y en sus repeticiones.

En la caja con el control, se observó que este no inhibió al hongo ya que este creció sobre el disco impregnado con etanol (ver Figura 4).

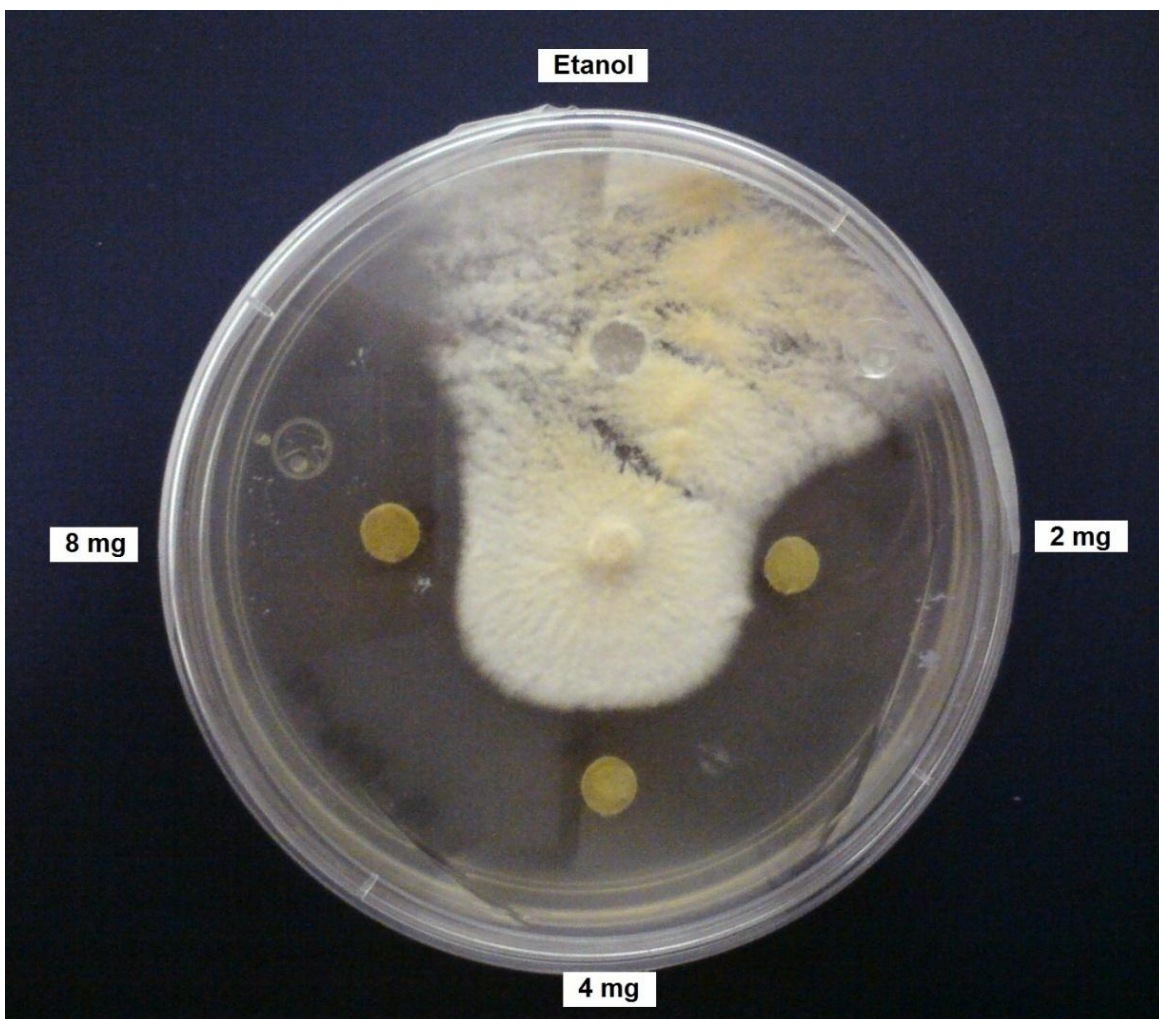


Figura 4: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con etanol como control, se puede apreciar las zonas de inhibición causadas por el propóleo sobre el hongo, además del crecimiento de éste sobre el disco impregnado con etanol.

En las cajas que contenían los discos impregnados del EEP junto con el comparativo de clotrimazol, se formaron zonas de inhibición por parte del propóleo y por el clotrimazol, esto se observó en las dos cajas. Aunque el clotrimazol formó una mayor zona de inhibición comparado con el propóleo (ver Figura 5).

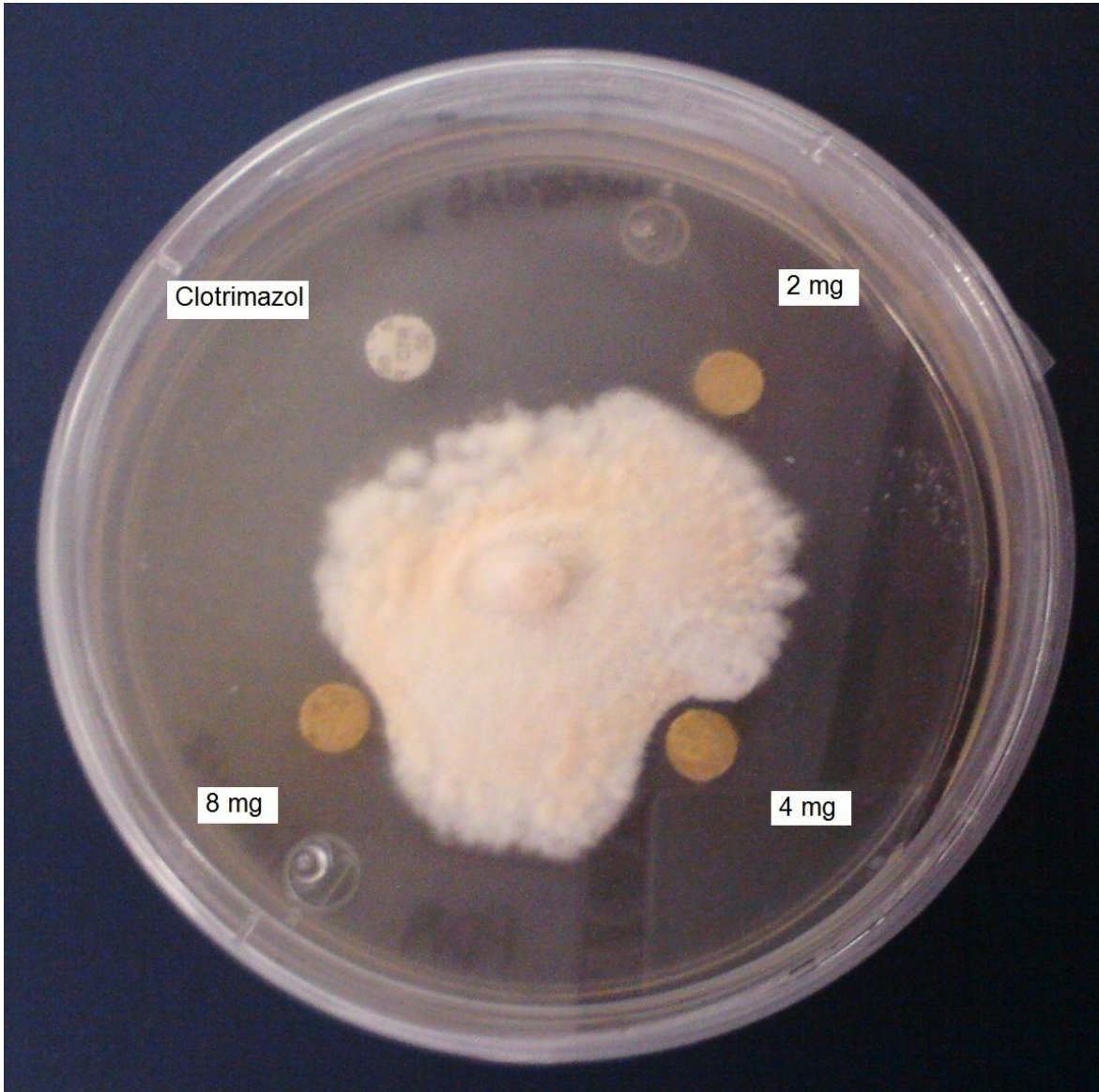


Figura 5: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con clotrimazol como comparativo, se observan las zonas de inhibición causado por los discos impregnados con el EEP y por el disco de clotrimazol.

Las cajas que contenían los discos de ketoconazol variaron entre sí, ya que en una se formó una pequeña zona de inhibición (comparándola con el disco de clotrimazol) pero en la otra caja el hongo creció sobre el disco de ketoconazol (ver Figura 6).

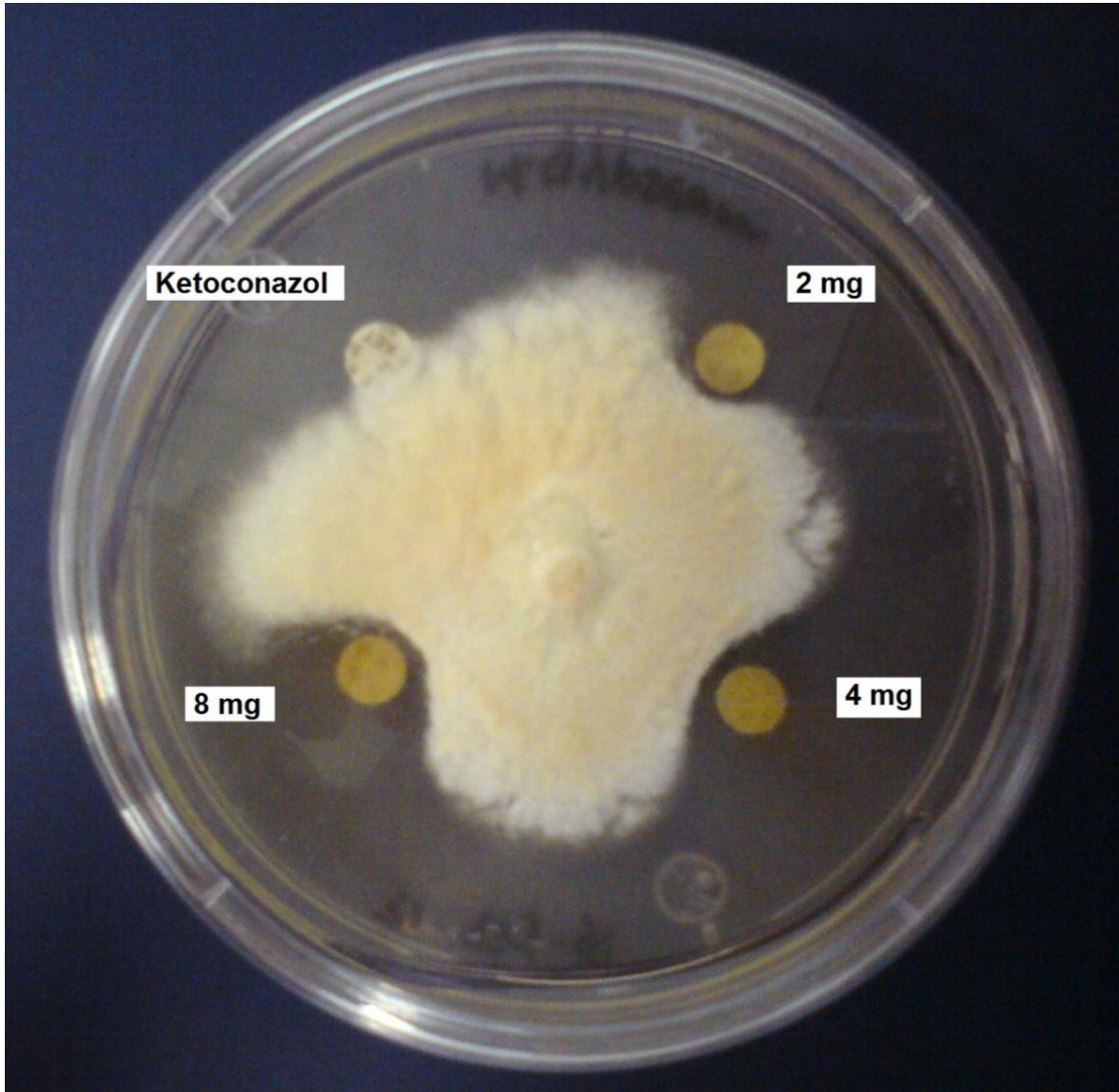


Figura 6: Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de EEP (2, 4 y 8 mg) y con ketoconazol como comparativo, se puede observar las zonas de inhibición causadas por las concentraciones del propóleo y se aprecia el crecimiento del hongo sobre el disco de ketoconazol.

En la caja que solo contenía los discos comparativos (clotrimazol y ketoconazol) y el control (etanol) se observó lo mismo que en las cajas anteriores, una gran inhibición debido al clotrimazol, una nula inhibición por el etanol y una débil inhibición debido al ketoconazol (ver Figura 7).

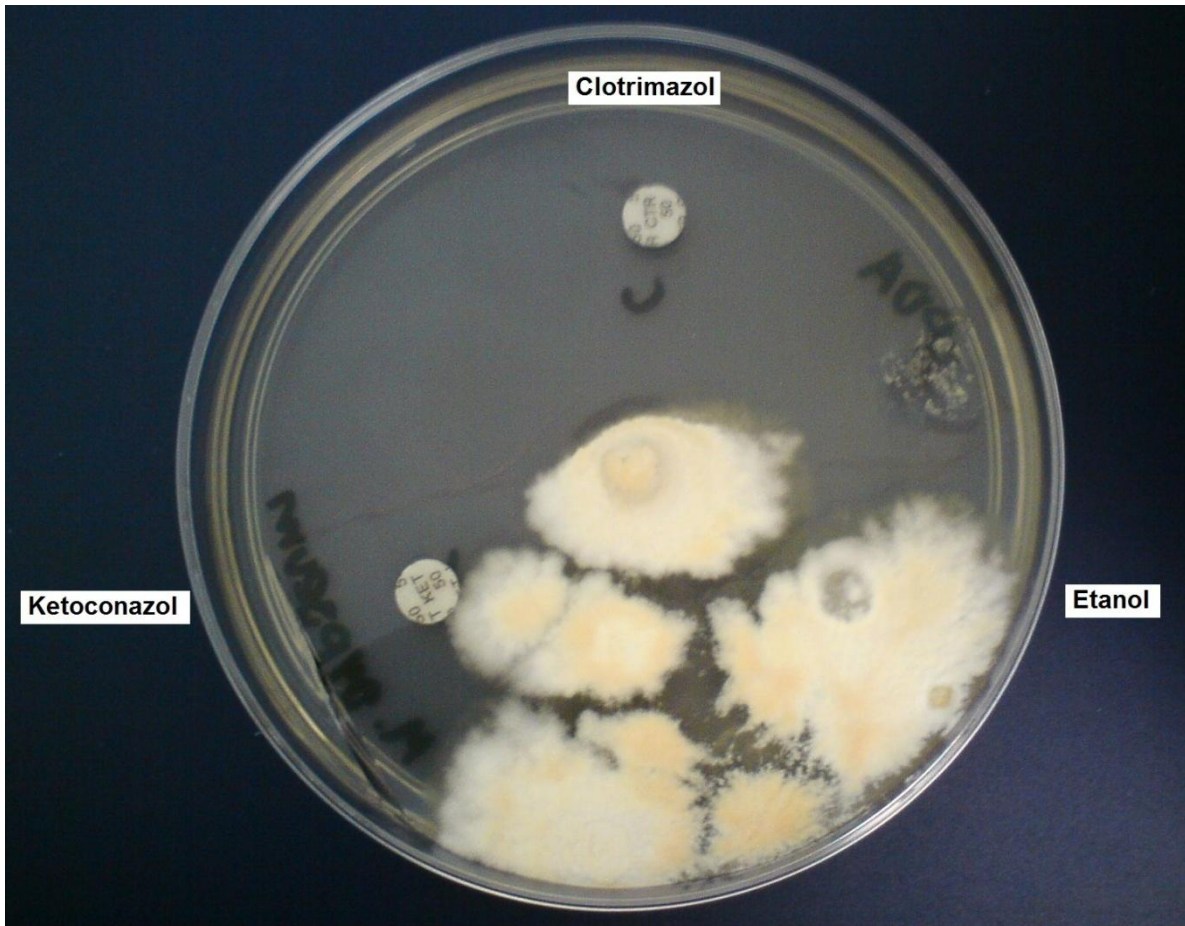


Figura 7: Inhibición del crecimiento radial con el control (etanol) y los dos comparativos (clotrimazol y ketoconazol), se aprecia la zona de inhibición causada por el disco de clotrimazol, el crecimiento del hongo sobre el disco de etanol y la poca inhibición del disco ketoconazol sobre el mismo.

Determinación de concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en placa de 24 pozos:

La lectura de los resultados se llevó a cabo al quinto día después de realizada la prueba, una vez que creció totalmente el hongo en los tres pozos del control. Se midieron el diámetro de las colonias que crecieron y se obtuvo el promedio de las tres colonias.

El control creció casi en la totalidad del diámetro del pozo, cada pozo mide 2 cm de diámetro, por lo tanto, el crecimiento del control lo consideramos con el 100%. En los pozos con la concentración de 0.25 mg/ml crecieron colonias de menor diámetro que en los controles, por lo cual se determinó una reducción en el crecimiento de esas colonias. A partir de la concentración de 0.5 mg/ml, no se observó crecimiento del hongo.

Concentración del EEP (mg/ml)	Promedio del diámetro de las tres colonias (cm)	Promedio del porcentaje de reducción del tamaño de la colonia (%)
Control	1.8	0
0.25	0.9	50
0.5	0	100
1.0	0	100
1.5	0	100
2.0	0	100
2.5	0	100
3.0	0	100

Tabla 1: Promedio del crecimiento de las tres colonias de *M. gypseum* (en centímetros) sin tratamiento y tratadas con el EEP (en miligramos por mililitro) con el promedio del porcentaje de reducción del tamaño de las colonias.

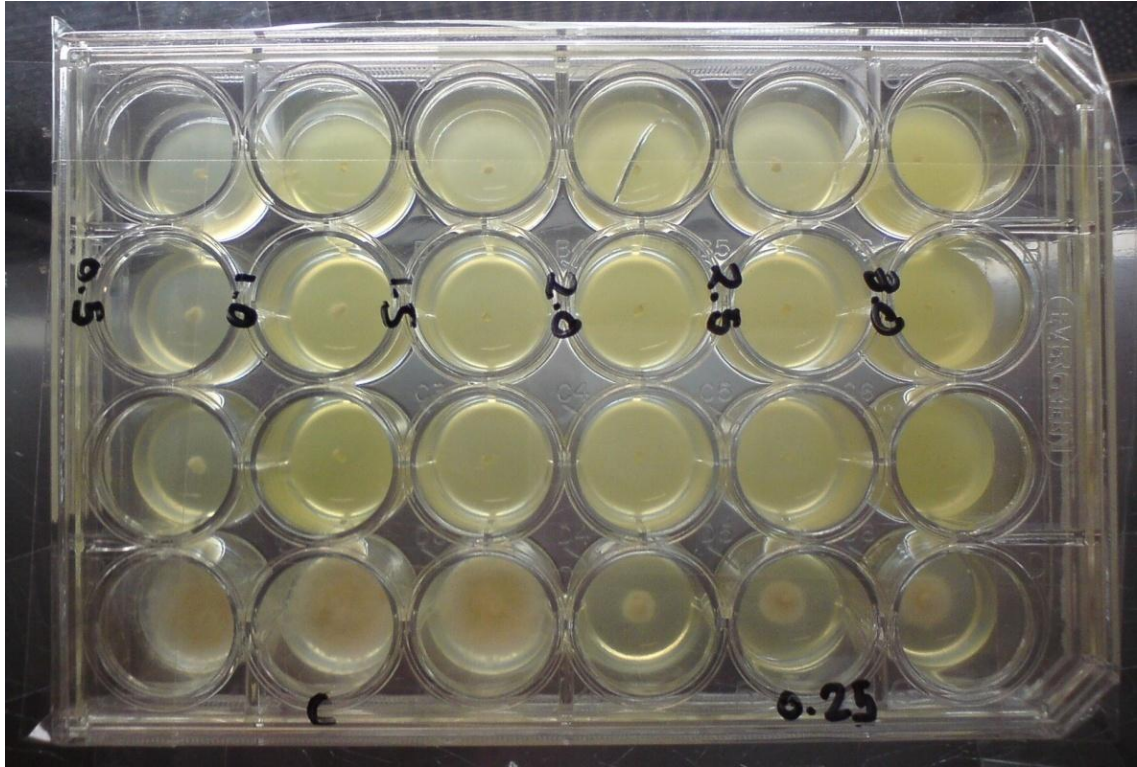
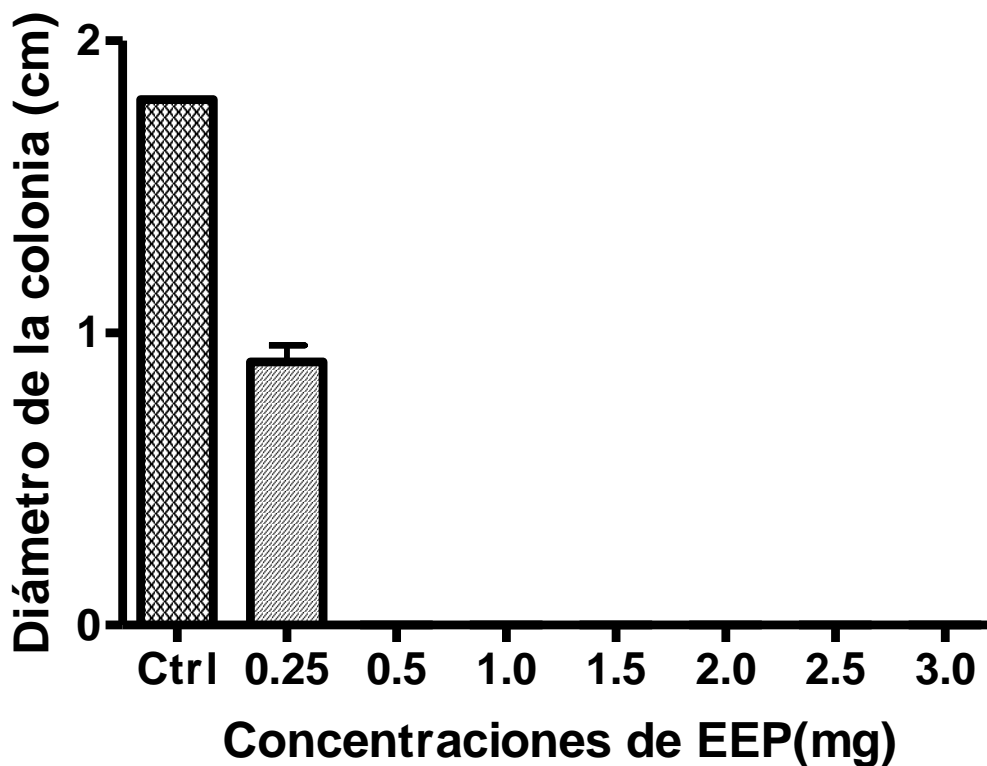


Figura 8: Placa de 24 pozos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se aprecia el crecimiento del hongo en todo el pozo en las placas control y la reducción del crecimiento en los pozos con la concentración de 0.25 mg/ml. A partir de los pozos de 0.5 mg/ml ya no se apreció crecimiento del hongo.

Dilución en placa *M. gypseum*



Gráfica 1: Dilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se demuestra el crecimiento del control (Ctrl) y de la concentración de 0.25 mg/ml, para las siguientes concentraciones ya no se observó crecimiento.

A partir de la concentración de 0.5 mg/ml no se presentó crecimiento del inóculo en ningún pozo. Por lo tanto, la Concentración Mínima Inhibitoria del propóleo contra *M. gypseum* es de 0.5 mg/ml.

Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM):

Transcurrieron cinco días después de la inoculación de las placas con agar Borelli y se realizó la medición del diámetro de las colonias, observándose lo siguiente:

Concentración de EEP (mg/ml)	0 horas		5 horas		10 horas		24 horas		30 horas	
	Promedio del diámetro de la colonia (cm)	% de reducción	Promedio del diámetro de la colonia (cm)	% de reducción	Promedio del diámetro de la colonia (cm)	% de reducción	Promedio del diámetro de la colonia (cm)	% de reducción	Promedio del diámetro de la colonia (cm)	% de reducción
Control	3.9	0 %	2.0	0 %	4.0	0 %	4.4	0 %	4.0	0 %
0.25	3.0	23 %	2.7	0 %	3.5	13 %	3.0	32 %	2.4	40 %
0.5	2.4	39 %	1.8	10 %	2.5	38 %	2.4	46 %	0	100 %
1.0	3.4	13 %	1.3	35 %	1.8	55 %	0	100 %	0	100 %
1.5	3.7	5 %	1.9	5 %	1.8	55 %	0	100 %	0	100 %
2.0	2.1	46 %	2.0	0 %	1.6	60 %	0	100 %	0	100 %
2.5	1.9	51 %	0	100 %	0.9	78 %	0	100 %	0	100 %
3.0	1.25	68 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %	0	100 %

Tabla 2: Determinación de la CFM del propóleo en contra de *M. gypseum*.

Con esto, se determinó que hubo un efecto fungicida por parte del propóleo en contra de *M. gypseum* a una concentración de 3.0 mg/ml a las 5 horas y a la concentración de 0.5 mg/ml a las 30 horas, ya que presentaron un porcentaje de inhibición del 100% (ver Figura 9).

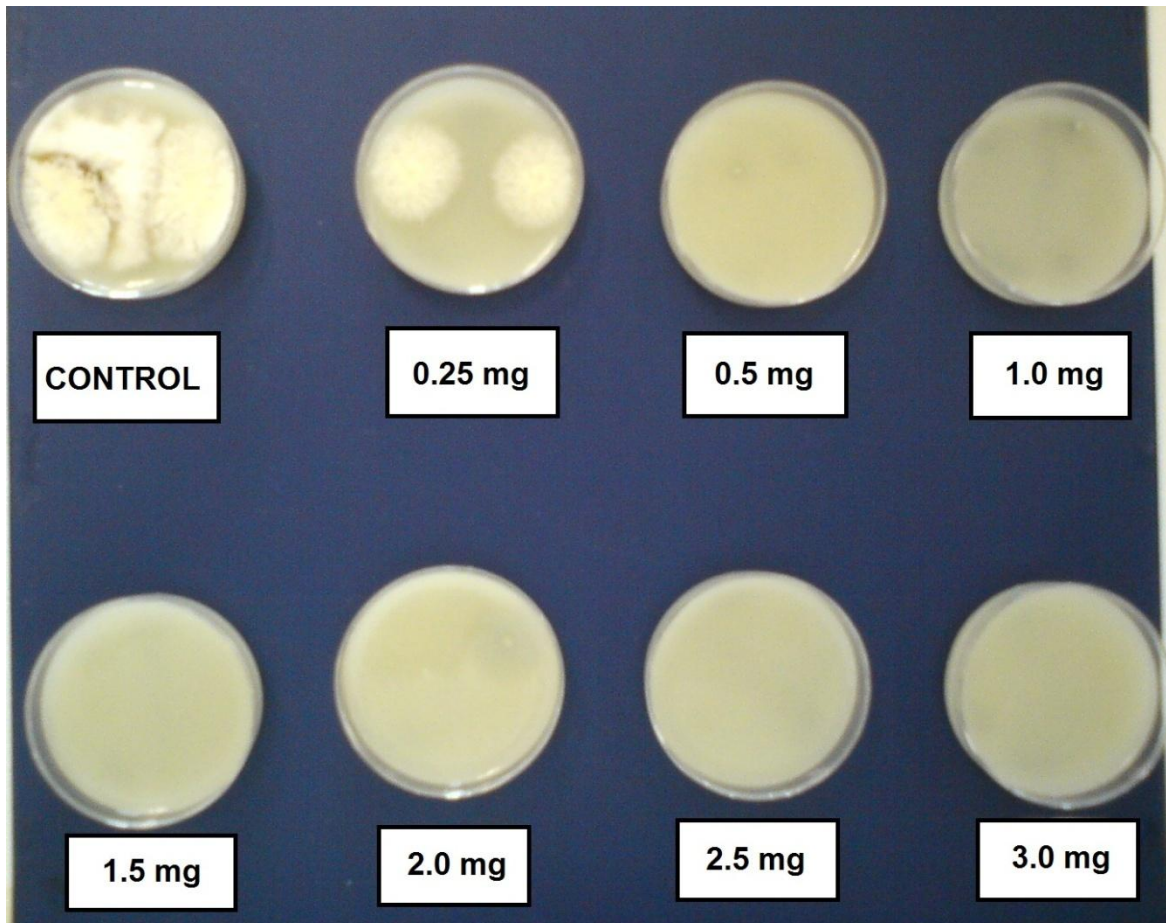


Figura 9: Prueba de la determinación de la Concentración Fungicida Mínima a las 30 horas, se aprecia el crecimiento en la placa control y en la placa de 0.25 mg/ml, siendo la CFM 0.5 mg/ml.

Daño celular:

Se observaron las imágenes obtenidas analizando 10 macroconidios por campo, a las distintas concentraciones del EEP (0, 1.0 y 1.5 mg/ml) y a las diferentes horas después de la aplicación del EEP sobre el hongo (0, 5, 10, 24 y 30 horas).

En las preparaciones sin tratamiento (0 mg/ml de EEP) a las 0 horas, se observaron macroconidios con la morfología de *M. gypseum* descrita por Koeman 1991 y Bonifaz 2010, es decir que observamos macroconidios sin ninguna alteración (ver figura 10), y además observamos escasa presencia de hifas (como también lo reporta Bonifaz 2010), lo cual presenta *M. gypseum* cuando esté no tiene alguna alteración. A partir de las 5 horas en las preparaciones del hongo sin tratamiento, se observaron macroconidios con formación de hifa en uno de sus extremos. En las siguientes observaciones (10, 24 y 30 horas) la presencia de hifas fue más evidente.

Contrariamente, encontramos diversas alteraciones en la morfología de los macroconidios tratados con EEP desde de las 0 horas, las cuales se iban acentuando con el paso del tiempo. Las alteraciones que encontramos fueron: pared celular con bordes irregulares (ver figura 11, 12, 13, 14, 15 y 17), citoplasma con abundantes burbujas que le dan apariencia espumosa (ver figura 11, 12), macroconidios con disminución o sin citoplasma entre algunos septos o en toda la célula (ver figura 13, 14 y 15), e hifas sin citoplasma (ver figura 13). Además, se observaron algunos macroconidios sin alteraciones morfológicas aparentes.

		Pared celular con bordes irregulares	Citoplasma de apariencia espumosa	Disminución o ausencia de citoplasma entre los septos	Hifas sin citoplasma
Control	0 horas	-	-	-	-
	5 horas	-	-	-	-
	10 horas	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	-
	30 horas	-	-	-	-
1.0 mg/ml	0 horas	+	+	+	+
	5 horas	+	+	+	+
	10 horas	+	+	+	+
	24 horas	++	++	+	+
	30 horas	++	++	++	+
1.5 mg/ml	0 horas	+	+	+	+
	5 horas	+	+	+	+
	10 horas	+	+	+	+
	24 horas	++	++	++	+
	30 horas	++	++	++	+

Tabla 3.- Registro de las alteraciones encontradas en las observaciones al microscopio donde += alteración presente, ++= alteración muy marcada.

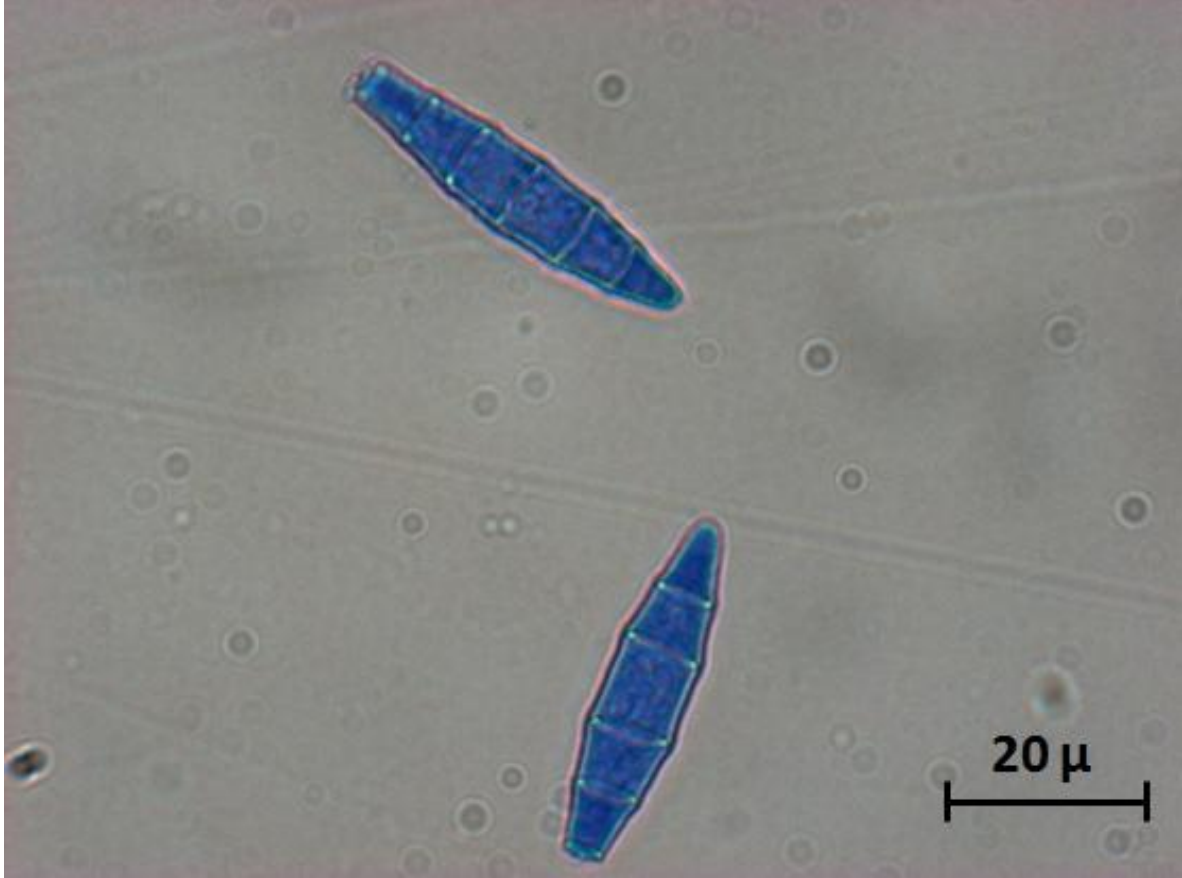


Figura 10: Microfotografía del control a las 0 horas de la prueba, se aprecian dos macroconidios de *Macrosporium gypseum*. Vista en 400x.



Figura 11: Microfotografía de un macroconidio de *M. gypseum* tratado con 1.0 mg/ml de EEP a las 0 horas de la prueba. Vista en 400x.



Figura 12: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.0 mg/ml de EEP a las 5 horas de la prueba, se aprecia burbujas dentro de su citoplasma. Vista en 400x.



Figura 13: Microfotografía de macroconidios tratados con 1.0 mg/ml a las 5 horas de la prueba. Vista en 400x.



Figura 14: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.5 mg/ml a las 30 horas de la prueba. Vista en 400x.



Figura 15: Microfotografía de un macroconidio tratado con 1.0 mg/ml a las 30 horas de la prueba. Vista en 400x.

En la preparación del hongo sin tratamiento a las 30 horas teñida con blanco de calcoflúor, se observaron macroconidios sin ninguna alteración en la pared celular (ver figura 16).

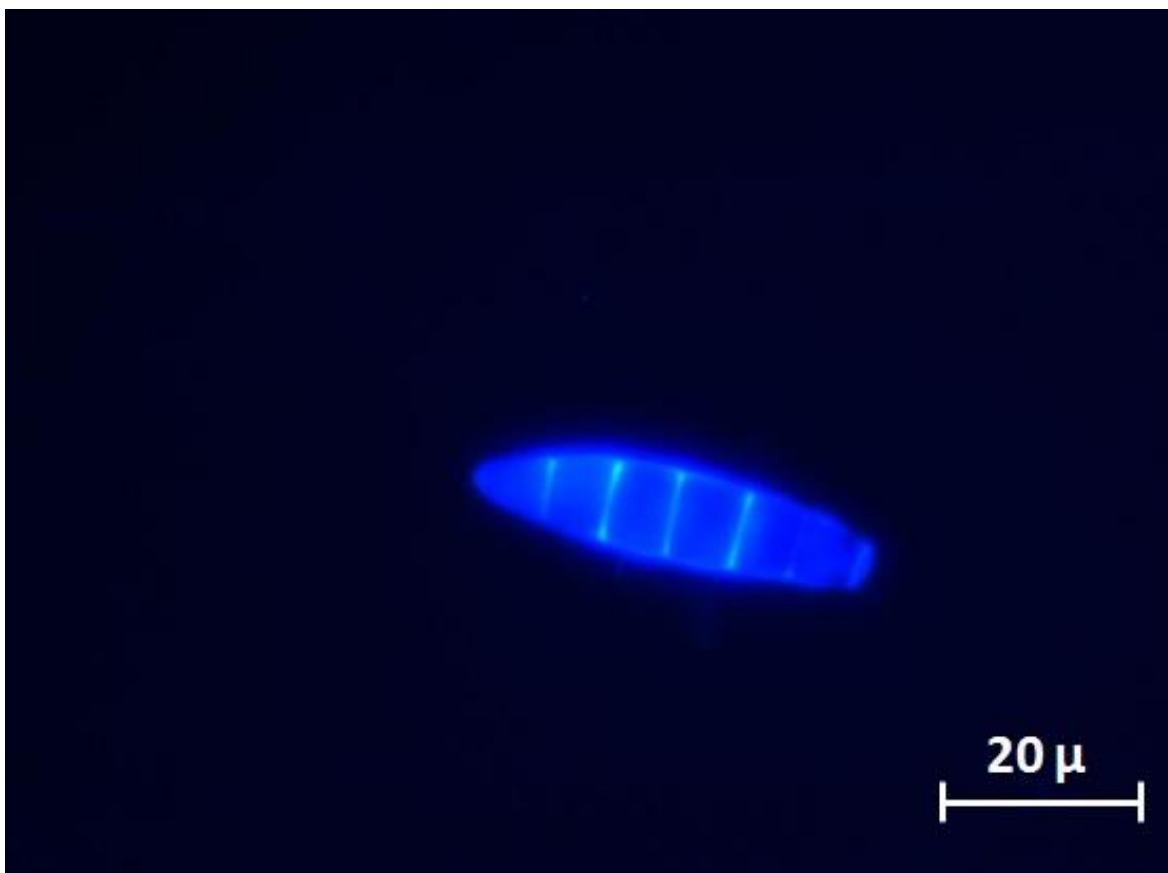


Figura 16: Microfotografía de un macroconidio control a las 30 horas de la prueba teñidos con blanco de calcoflúor. Vista en 400x.

Los macroconidios tratados con el propóleo presentaron sus bordes irregulares pero no se observó alguna ruptura en su pared celular (ver Figura 17), lo que sugiere que el propóleo no causa un daño directo sobre la pared celular de *M. gypseum*.

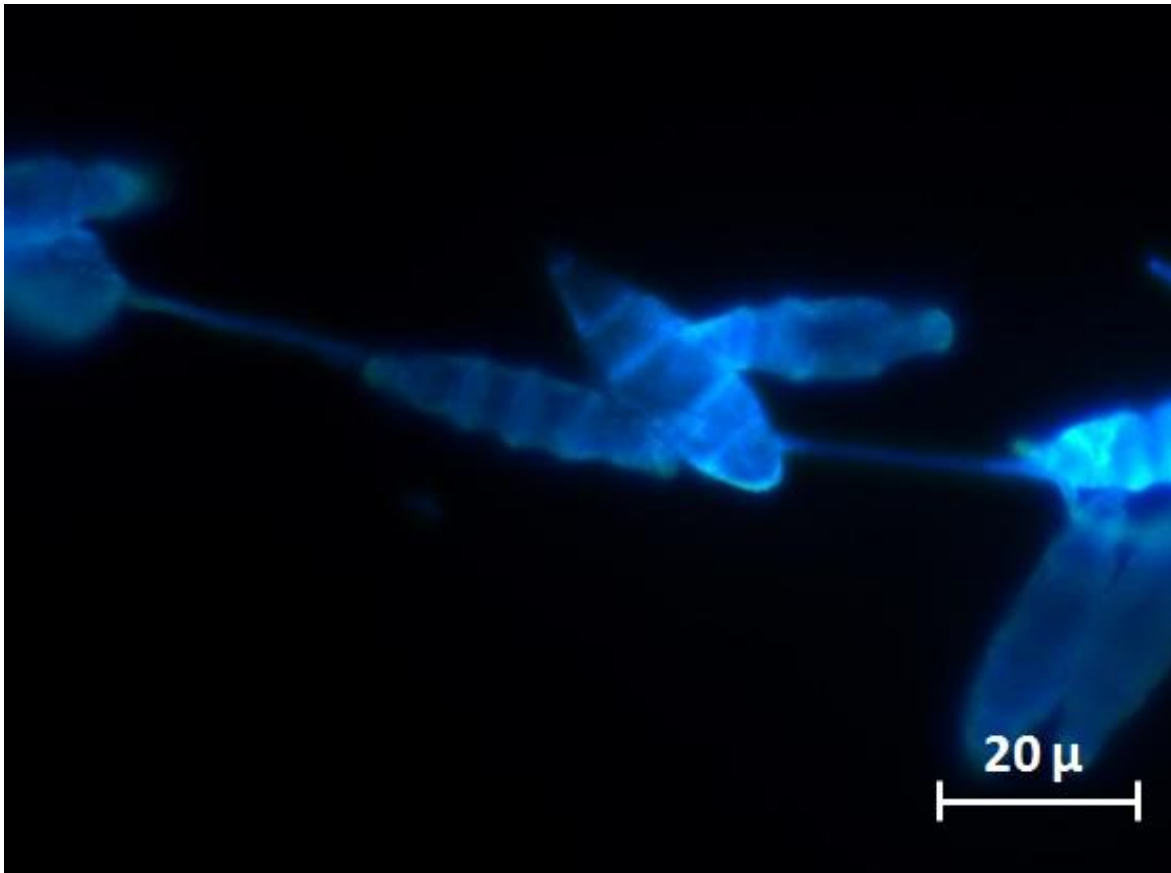


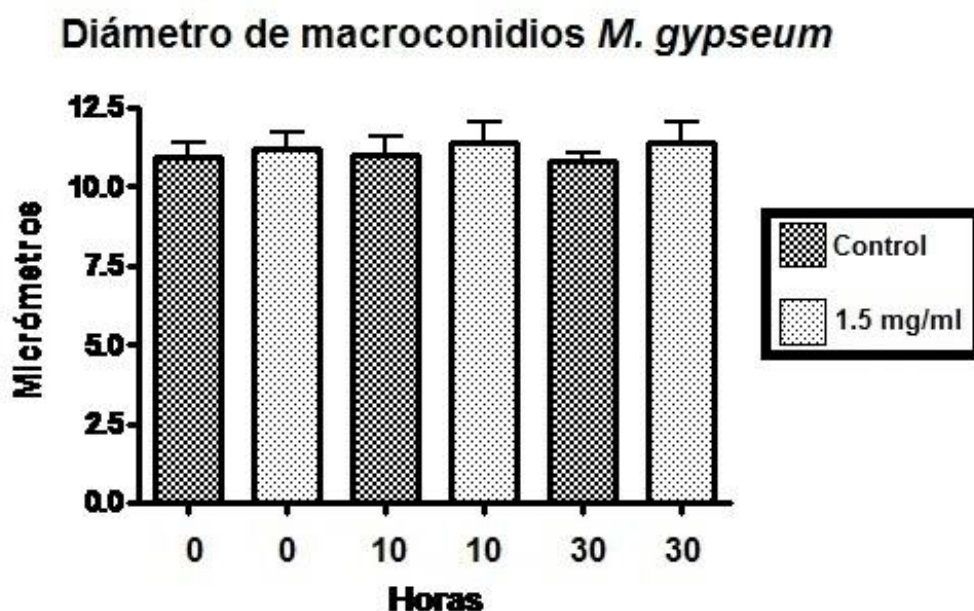
Figura 17: Microfotografía de macroconidios tratados con 1.5 mg/ml a las 30 horas de la prueba teñidos con blanco de calcoflúor. Vista en 400x.

Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico, se realizó la medición del diámetro de 5 macroconidios de la preparación control a las 0, 10 y 30 horas, y para la concentración de 1.5 mg/ml a las 0, 10 y 30 horas, esto con el Software Q Capture Pro 6.0.

	0 horas	10 horas	30 horas
Control	10.96786	11.03559	10.81503
1.5 mg	11.18198	11.31533	11.37713

Tabla 4: Promedio del diámetro de 5 macroconidios de *M. gypseum* en micrómetros, se midió el control y el hongo tratado con 1.5 mg/ml de EEP a las 0, 10 y 30 horas.



Gráfica 2: Diámetro de macroconidios de *M. gypseum* con y sin tratamiento en micrómetros.

Al determinar la variación entre los diámetros de los macroconidios por el análisis de varianza (ANOVA), se calculó un valor de $P > 0.05$ lo cual indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de los macroconidios de *M. gypseum* sin tratamiento con los macroconidios de *M. gypseum* tratados con el EEP.

DISCUSIÓN

Al finalizar la elaboración de las cuatro pruebas para determinar la actividad del propóleo en contra de *Microsporium gypseum*, se demostró en las cuatro pruebas que éste es sensible al propóleo de la FES Cuautitlán.

En la prueba de inhibición de crecimiento radial se demostró la sensibilidad del hongo al propóleo, ya que en todos los discos impregnados con el propóleo a las diferentes concentraciones formaron halos de inhibición en forma de medias lunas. Además, el hongo creció sobre los discos impregnados con etanol, de esta manera se comprobó que el etanol no tiene actividad antifúngica contra *M. gypseum*, lo cual evidencia que dentro del extracto etanólico de propóleo (EEP) solamente el propóleo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo. Asimismo encontramos que esta cepa de *M. gypseum* fue resistente al ketoconazol, ya que la inhibición del hongo fue muy pobre, a comparación del disco de clotrimazol, e inclusive el hongo creció sobre un disco de ketoconazol en una de las repeticiones. Por lo tanto, si el perro de donde se obtuvo la cepa del hongo hubiera sido tratado con ketoconazol, posiblemente no se hubieran obtenido buenos resultados terapéuticos.

Santos 2010 refiere que las técnicas de difusión en agar con disco tienden a mostrar resultados variables debido a factores como la temperatura y al tiempo de incubación, Trejos 2009 menciona que a temperaturas bajas las sustancias difunden lentamente sobre el agar. En nuestra experimentación existió diferencia entre el tamaño de los halos producidos por el propóleo, como lo observado en una de las placas con el disco de ketoconazol (figura 6) en donde el disco con 4 mg de EEP generó un halo de inhibición ligeramente mayor al disco de 8 mg de EEP, posiblemente debido a que no existió una difusión igual del propóleo en el agar, o también a que no estandarizamos correctamente la distancia entre el inóculo central y los discos con el propóleo. Como lo menciona Prats 2005 y Trejos 2009, no existen técnicas de difusión en agar estandarizadas para el estudio de la sensibilidad de hongos filamentosos, por lo cual es necesario estandarizar los parámetros cuando se prueba alguna sustancia antifúngica. De tal manera que si se investiga para la estandarización de alguna técnica de difusión en agar con disco, se podría evaluar con mayor exactitud la actividad de cualquier muestra de propóleo en contra de algún hongo filamentoso, y como lo indica Prats 2005, podría ser un método cuantitativo y determinar la concentración mínima inhibitoria con esta técnica, a diferencia de la que utilizamos que solo es una prueba cualitativa. Pero, Trejos 2009 indica que existen muchos problemas para la estandarización en los hongos filamentosos porque muchas veces estos hongos presentan problemas en su metabolismo al asimilar lentamente los nutrientes del agar lo que provoca un lento crecimiento, generando que no siempre crecerá de la misma manera aunque existan las mismas condiciones (temperatura, tiempo, pH, tipo de agar).

En la prueba de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en placa, encontramos que en los pozos con la concentración de 0.25 mg/ml crecieron colonias de menor diámetro que en los controles, posiblemente a esa concentración el propóleo incapacita a *M. gypseum* para crecer plenamente. A partir de la concentración de 0.5 mg/ml, en ningún pozo existió crecimiento del hongo, por lo cual determinamos que la CMI es de 0.5 mg/ml.

Para la prueba de daño celular se tomó el doble de la CMI, la cual fue 1.0 mg/ml, y el triple de la CMI, 1.5 mg/ml, como lo indica Londoño 2010. En la preparación control a las diferentes horas, se observó que algunos macroconidios no se tiñeron uniformemente y escasamente se observaron macroconidios rotos, aunque cabe señalar que estas modificaciones en los macroconidios no se percibieron similares a las alteraciones observadas en las preparaciones del hongo tratadas con el propóleo.

En las preparaciones del hongo tratadas con el EEP, encontramos alteraciones morfológicas que nos sugiere que a nivel de citoplasma existió una alteración debido al propóleo, estas alteraciones las observamos en los macroconidios con citoplasma de aspecto grumoso, los macroconidios con un espacio entre la pared celular y la membrana celular, y a la ausencia de coloración por la tinción del citoplasma entre algunos septos. Todas estas alteraciones sugieren que el contenido del citoplasma disminuyó o se contrajo. Aunado a esto, observamos en las preparaciones con la tinción de blanco de calcoflúor que el EEP no causa una ruptura de la pared celular del hongo, insinuando también que el daño que causa el propóleo en *M. gypseum* es a nivel de citoplasma.

A las 30 horas de la prueba, en la preparación control existió la formación de una capa de color blanca de aspecto filamentosa que creció en la superficie del caldo contenido en el tubo Eppendorf, además de que el caldo ya no era un líquido fluido, lo que prueba que el hongo creció generando hifas en el tubo. Las preparaciones tratadas con el propóleo siempre fueron líquidas y no se formó ninguna capa en la superficie, sugiriendo así que el hongo dejó de crecer en estas preparaciones debido al propóleo.

Realizamos la prueba de daño celular de acuerdo a la técnica reportada por Londoño 2010 preparando una suspensión de *M. gypseum* ajustándolo por comparación visual con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, de esta manera solo pudimos reportar las alteraciones morfológicas del hongo a causa del propóleo, sin embargo, si además hubiéramos ajustado el inóculo con una cámara de Neubauer como Santos 2010 lo indica, habríamos podido hacer un conteo de macroconidios para determinar a qué grado el EEP impide la reproducción del hongo.

En la prueba de la determinación de la concentración fungicida mínima (CFM), observamos a las 30 horas de la prueba el mismo resultado encontrado en la prueba de la determinación de la CMI, es decir que no existió crecimiento del

hongo a una concentración de 0.5 mg/ml, así corroboramos que el propóleo es fungicida en la cepa de *M. gypseum* a una concentración de 0.5 mg/ml a las 30 horas de la exposición del hongo al propóleo. Cabe señalar que observamos una inhibición del hongo a una concentración de 2.5 mg/ml a las 5 horas, pero a las 10 horas existió crecimiento nuevamente a esa concentración, esto se podría explicar con el efecto Eagle o también llamado efecto paradójico que Lovesio 2001 describe. El efecto Eagle es un fenómeno en donde una proporción de células sobrevivientes al efecto de un fármaco aumentan significativamente a medida que la concentración del fármaco aumenta por arriba de la CMI, Azanza 2008 reporta que se ha descrito este fenómeno para hongos filamentosos, aunque aclara que no se ha señalado su repercusión práctica ya que este fenómeno solo se presenta *in vitro*.

Diversos estudios han determinado la eficacia del propóleo ante diversos agentes patógenos, como también coincidió en esta tesis, ya que encontramos que en las cuatro pruebas realizadas se evidenció la sensibilidad de la cepa de *Microsporum gypseum* ante el propóleo. Yamamoto 1997 reportó un estudio en donde se determinó la CMI de un extracto de propóleo brasileño en contra de *M. gypseum*, encontrándose una CMI de 0.0625 mg/ml. Agüero 2010 realizó un estudio en donde se determinó la CMI de un propóleo argentino en contra de *M. gypseum*, encontraron una CMI de 0.016 mg/ml. Comparando estos resultados con los nuestros, encontramos una variación amplia entre los resultados, ya que nosotros encontramos una CMI de 0.5 mg/ml y las CMI de los dos autores no sobrepasan el 0.1 mg/ml. Estas variaciones se pudieron deber a muchos factores, como a la composición de los extractos de propóleo utilizados en cada experimentación, ya que las sustancias que componen al propóleo varían entre el lugar en donde se encuentra el apiario, la época del año y la recolección así como también en el procesamiento de los propóleos. Además, pudo existir variación entre las cepas de *M. gypseum* utilizadas, ya que algunas cepas son más resistentes o más susceptibles a las diversas sustancias que tienen una acción antimicótica. Por último, aunque la CMI que reportamos nosotros en esta tesis es mayor a la reportada por Yamamoto 1997 y Agüero 2010, sigue siendo una concentración baja y por lo tanto adecuada para la elaboración de productos terapéuticos a base de propóleo.

Debido a que *Microsporum gypseum* tiene una clara capacidad patógena en los animales domésticos y en los humanos, este representa un gran potencial zoonótico para personas de cualquier edad. Bonifaz reporta a *M. gypseum* como un dermatofito esporádico, aunque esto no demerita su potencial zoonótico.

La literatura señala el tratamiento contra las dermatofitosis es poco efectiva cuando solo se emplea una vía de administración, ya sea solo la terapia tópica o la terapia sistémica, como reporta Martínez 2010. Aunque, la terapia conjunta de estas dos resulta más efectiva pudiéndose acortar los tiempos de administración de los fármacos, esto no disminuye la posibilidad de la presencia de efectos colaterales.

Martínez 2010 reportó 15 casos de dermatofitosis en humanos de los cuales 9 casos fueron causados por *M. gypseum*, estas personas fueron previamente tratadas con agentes tópicos y orales, principalmente ketoconazol, itraconazol, terbinafina y fluconazol, encontrándose mejores resultados en la terapia conjunta (oral y sistémica). Pero de los 15 casos aislados, las lesiones causadas por *M. gypseum* presentaron menor respuesta a los fármacos, esto concuerda con nuestros resultados, ya que encontramos una resistencia del hongo hacia el ketoconazol en la prueba de inhibición del crecimiento radial.

Este trabajo demuestra un futuro muy prometedor para el propóleo como agente terapéutico ya que no se ha encontrado una toxicidad importante comparada con los agentes terapéuticos actuales siendo esta una posibilidad casi nula, además de que mostro actividad antifúngica a una concentración baja (0.5 mg/ml) a las 30 horas. Por lo tanto, en un futuro cercano se puede implementar la utilización del propóleo como agente terapéutico contra *M. gypseum*, asimismo de que podría ser el tratamiento indicado en pacientes pediátricos, geriátricos, gestantes y en pacientes con daño hepático y/o renal, ya que los agentes terapéuticos utilizados en la actualidad son contraindicados para estos grupos de individuos tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria. Otra ventaja que el propóleo tiene es que se ha demostrado ser hepatoprotector, a comparación de la mayoría de los antifúngicos que son hepatotóxicos. Para lograr esto, solo se necesita más investigación para determinar la factibilidad del propóleo como agente terapéutico pudiendo utilizar modelos biológicos en donde se replique la dermatofitosis y se pruebe algún producto con propóleo. Aunque Callejo 2001 y Lasa 2004 reportan casos de dermatitis por contacto por propóleo en humanos, principalmente apicultores, refieren que los casos han sido reportes esporádicos y son poco comunes, además no han existido reportes oficiales de hipersensibilidad por propóleo en los animales, por lo que se requiere más investigación en modelos biológicos para determinar dicha hipersensibilidad en los animales.

Dado que en México no existe alguna normativa oficial en donde se especifiquen las pruebas necesarias para determinar la calidad de algún propóleo, a diferencia de otros países como Brasil, Argentina, Bélgica, Rusia, Bulgaria y Cuba en donde si contemplan una norma para esto, se tiene trabajar para que en México se tengan normas similares para así garantizar que los propóleos que se desean utilizar para la elaboración productos terapéuticos sean de una calidad óptima y avalar que este tenga una actividad biológica. Además, si se impulsa a generar controles de calidad se lograría más demanda de propóleo, generando así que los apicultores mexicanos tengan un ingreso más por este subproducto de la colmena, ya que muchos apicultores desconocen el potencial del propóleo e inclusive ven al propóleo como desecho. Es por eso, la investigación y la difusión del propóleo tiene que aumentar en el país, no solo en la medicina veterinaria sino también en la medicina humana, a fin de que todos en México nos podamos beneficiar con este gran producto natural, y como nuestro país es el productor de miel número tres a nivel mundial, tenemos el potencial como país para ser unos de los mayores productores de propóleo a nivel mundial.

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antimicótica *in vitro* del propóleo de la FES-C en contra de una cepa de *Microsporium gypseum*, demostrando en todas las pruebas realizadas que este hongo fue sensible al propóleo de la FES-C.

Se determinó cualitativamente con la prueba de inhibición del crecimiento radial que el propóleo de la FES-C inhibo una cepa de *Microsporium gypseum*.

Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre la cepa del hongo por el método de dilución en placa, la cual fue de 0.5 mg/ml.

Se determinó la Concentración Fungicida Mínima del propóleo en contra de *M. gypseum* determinando que a una concentración de 0.5 mg/ml a las 30 horas el EEP tuvo un efecto fungicida.

Se evaluó el daño celular sobre el hongo causado por el propóleo encontrando que éste genera alteraciones de los macroconidios del hongo, los macroconidios tratados presentaron el citoplasma de aspecto espumoso, mayor espacio entre la pared celular y la membrana citoplasmática, así como disminución del contenido citoplasmático y paredes celulares irregulares.

Determinamos que el propóleo disminuyó la capacidad de reproducción de *M. gypseum*.

RECOMENDACIONES

- Para obtener resultados más homogéneos en la prueba de inhibición del crecimiento radial, se recomienda estandarizar la distancia entre los discos impregnados con EEP y el inóculo central del hongo además de las constantes de incubación (tiempo y temperatura de incubación) para lograr que el EEP difunda siempre de la misma manera.
- Para la prueba de daño celular, se recomienda realizar un conteo de macroconidios con una cámara de Neubauer después de haberlo ajustado con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland para estandarizar el inóculo, así se podrá contar el número de macroconidios por campo en las preparaciones, de tal manera que se evaluará si existe un aumento o descenso en el número de macroconidios en las preparaciones al transcurso del tiempo.
- Se sugiere continuar con esta línea de investigación para determinar el mecanismo de acción del EEP contra *Microsporium gypseum*.
- Se recomienda realizar pruebas para determinar la eficacia del propóleo *in vivo* en modelos biológicos en donde *M. gypseum* cause la enfermedad, de tal manera que se establezca una terapéutica correcta con algún producto a base de propóleo, además de evaluar si éste genera alguna hipersensibilidad en los animales domésticos.
- Se propone establecer una normatividad en México que regule la calidad de los propóleos que se utilizan en la elaboración de productos terapéuticos, a fin de estandarizarlos para asegurar su calidad y eficiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aceves E, Estudio químico y actividad fungicida de los constituyentes de los propóleos de distintas zonas del estado de Jalisco. Tesis doctoral. Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias. CUCBA. Universidad de Guadalajara.
2. Agüero M, González M, Lima B, Svetaz L, Sánchez M, Zacchino S, *et al.* Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 194-201.
3. Andrino M, Blanco J, Durán C, Fernández S, Cruzado M, García M. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 169-171. Onicomicosis canina producida por *Microsporum gypseum*. A propósito de un caso. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 169-171.
4. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 63-67.
5. Ávila O, Hernández D C. Composición y actividad antimicrobiana del aceite de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes: Boraginaceae (Barredor). Tesis de Lic. en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, 2005.
6. Azanza J, Montejo M. Anidulafungina en el tratamiento de la infección fúngica invasora. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Supl 14: 14-20.
7. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Alvarez A, Rodríguez E. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23 (3): 369-372.
8. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Alvarez A. El Propóleos: un valioso producto de la colmena. *Horizonte Agroalimentario* 2001; 5: 4-7.
9. Bohórquez L, Cardona-Castro N. Diagnóstico diferencial de las micosis superficiales con enfermedades dermatológicas. *Rev CES Med* 2010; 24(1): 37-52.
10. Bonifaz A. *Micología médica básica*, tercera edición. Editorial Mc Graw Hill, México, 2010; 61-97.
11. Callejo A, Armentia A, Lombardero M, Martínez C, Rebollo S, Sedano E, *et al.* Hipersensibilidad a propóleos, caso clínico. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 16: 113 - 117.

12. Cantón E, Pemán J. Curvas de letalidad en antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 82-85.
13. Carlotti D. Tratamientos de la dermatofitosis. En: Locke P, Harvey R, Mason I. Manual de dermatología en pequeños animales. Ediciones S, Colección BSAVA (British Animal Veterinary Association). Reino Unido, 1999: 313-318.
14. Chaillou L, Herrera H, Maidana J. Estudio del propóleo de Santiago del Estero, Argentina. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2004; 24(1): 11-15.
15. Costa E, *et al.* Surtos interespecíficos de dermatomicosis por *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. *Rev. Saúde Pública* 1994; 28: 337-40.
16. Cruz R, Ponce E, Calderón L, Delgado N, Vieille P, Piontelli E. Micosis superficiales en la ciudad de Valparaíso, Chile. Período 2007-2009. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (5): 404-409.
17. De Buen N, Guzmán M, Ordóñez C, Chávez G. Atlas de dermatología diagnóstica en perros y gatos. Editorial Inter-Médica. Argentina, 2008: 30-33.
18. Del Palacio A, Garau M, Cuétara M. Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 68-71.
19. Duarte I, Herrera M. Concentración mínima inhibitoria de Anfotericina B contra *Candida albicans*. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* 1995; 30 (1-2): 45-50.
20. Egas M, Duarte G, King B, Rivero J. Estudio químico y biológico de una muestra de propóleos recolectada en el Estado de Guanajuato. *Rev. Latinoamer. Quim.* 2012, 39: 231.
21. Fierro W. Evidencia científica del propóleo desde el punto de vista médico. Memorias de Congreso Internacional de propóleos; 2000 septiembre 1-2, Buenos Aires Argentina. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2000.
22. Fernández B, Pereiro Jr. M, Llovo J, Otero X, Toribio J. Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica in vitro de la terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 290-293.
23. García P, Ruiz J, García L, Linares M. Dermatofitosis por *Microsporum gypseum*: Descripción de ocho casos y revisión de la literatura. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 147-149

24. Granjeno E, García Z, Cervantes R, Guzmán R. Prevalencia de dermatomicosis en perros en el área urbana de Cuernavaca, Morelos, México. Vet. Méx. 2000; 31 (2): 161-164.
25. Gutiérrez E. Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2011.
26. Harvey R, Mckeever P. Manual Ilustrado de Enfermedades de la piel en perro y gato. Grass Editions. 2001: 210-213.
27. Hernández J, Goycoolea F, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, et al. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. Planta Med 2007; 73: 1469 - 1474.
28. Koneman E. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México, 1991: 451-453.
29. Koning H, Liebich H. Anatomía de los animales domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso, Tomo 2. Editorial médica Panamericana 2da edición. España 2005.
30. Lasa O, Egin P, Sánchez A, Ratón J, Díaz J. Dermatitis alérgica de contacto por propóleo. Med Cutan Iber Am 2004; 33 (3): 117 - 119.
31. Lloyd D, Patel A. Estructura y funciones de la piel. En: Locke P, Harvey R, Mason I. Manual de dermatología en pequeños animales. Ediciones S, Colección BSAVA (British Animal Veterinary Association). Reino Unido, 1999: 1-13.
32. Londoño A, Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. Tesis de doctoral, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2010.
33. Lovesio C. Empleo de antimicrobianos en terapia intensiva. En: Lovesio C. Medicina Intensiva. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 2000.
34. Lozina L, Boehringer S, Dáquino M, Acosta O. Eficacia del Propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de distintas Técnicas in Vitro. Acta Farm. Bonaerense 2006; 25 (4): 560-563.
35. Lozina L, Boehringer S, Koscinczuk P, Acosta O. Resultados preliminares para determinar la eficacia terapéutica de gotas óticas con propóleos en el tratamiento de otitis externas en caninos. Universidad Nacional del Noreste, Comunicaciones científicas y Tecnológicas, Argentina 2006: V-407.

36. Manzano P, Méndez L, Hernández F, López R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx* Vol. 144 No. 1, 2008: 23-26.
37. Martínez E, Pérez M, Alas R, Rivas E, *et al.* Dermatofitoma extraungueal. Comunicación de 15 casos. *Dermatol Rev Mex* 2010; 54(1): 10-13.
38. Méndez L, Manzano P, Velásquez V, Millan B, Hernández F, *et al.* Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 320 - 322.
39. Monteiro C, Martins C, Monteiro C, Paiva M, Fagundes R. Kerion Celsi por *Microsporum gypseum*. *An bras Dermatol* 2009; 78(3): 319-321.
40. Nardin M, Pelegri D, Manias V, Méndez E. Agentes etiológicos de micosis superficiales aislados en un Hospital de Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; 38: 25-27.
41. Palomino G, Lady R, García P. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de antioquia (Colombia). *Vitae* 2009; 16 (3): 388-395.
42. Patel A, Forsythe P. *Dermatología en pequeños animales, colección soluciones Saunders en la práctica veterinaria.* Editorial Elsevier Saunders. España, 2010: 169-175.
43. Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cien. Inv. Agr.* 2008; 35(1): 17 - 26.
44. Prats G. *Microbiología clínica.* Editorial Médica Panamericana. España. 2005: 103 - 105.
45. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villareal J, González A. Uso del propóleo en odontología. *Acta Odontológica Venezolana* 2010: 48 (2): 1 - 13.
46. Quintero M, Londoño A, Hernández F, Manzano P, López R, Soto C. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 46 - 50.
47. Quintero M, Londoño A, Soto C, García C, Carrillo L, Penieres J, Cruz T. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* A. Méndez-Vilas (Ed.) 2011; 3: 1068-1073.
48. Rejas J. *Manual de dermatología de animales de compañía.* Universidad de León. 1997: 13-18.

49. Salamanca G, Correa I, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Trop.* 2007; 25(2): 95-102.
50. Sanabria R, Fariña N, Laspina F, Balmaceda MA, Samudio M. Dermatofitos y hongos levaduriformes productores de micosis superficiales. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 2001; 1(1): 63-68.
51. Santos P, Córdoba S, Rodero L, Carrillo A, Lopardo H. *Tinea capitis*, experiencia de 2 años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27(2): 104 - 106.
52. Sartorio Y, Bracho J, Valdés G, Piloto A, García G, López M. Estudio preliminar de la estabilidad del extracto hidroalcohólico de propóleos al 5% por el método cinético isotérmico acelerado y su efecto acelerador de la epitelización. *Revista Apiciencia* 2000; vol. 2, no. 2: ISSN: 1608-1862.
53. Segundo C, Martínez A, Arenas A, Fernández R, Cervantes R. Dermatomicosis por *Microsporum canis* en humanos y animales. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 39-41.
54. Soares M, Cury A. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against, Dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2001; 32(2): 130-134.
55. Terán C, Hernández D. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes (Barredor). Tesis de Lic. en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, 2006.
56. Titaux G, López A, Correa A, Rivero F. Aislamiento y caracterización de los compuestos antioxidantes y antimicrobianos presentes en el extracto etanólico de un propóleo recolectado en el Distrito Federal. *Rev. Latinoamer. Quim.* 2012, 39: 235.
57. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica* 2002; 43: 37-55.
58. Trejos E. Evaluación de parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar. Tesis de Lic. en Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 2009.
59. Valencia D, Alday E, Robles R, Garibay A, Galvez J, Salas M, *et al.* Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry* 2012; 131: 645 - 651.

- 60.** Vilata J. Micosis cutáneas. Editorial Médica Panamericana S.A. España. 2005: 135 - 141.
- 61.** Yamamoto T. Present state of basic studies on propolis in Japan. En: Mizrahi A, Lensky Y. Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy. Editorial Springer. EU, 1997: 107-120.
- 62.** Ye X, Wang H. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatín-like proteín from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. Biochemical and Biophysical Research Communication 1999; 263: 130 - 134.
- 63.** Zarco G, Rivero B, Duarte G, Ramírez A, Correa A, Rivero J. Composición química de propóleos recolectados en la zona rural de México. Rev. Latinoamer. Quim. 2012, 39: 232.