



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"Evaluación antimicótica del propóleo sobre cepas de *Saprolegnia* spp aisladas del *Ambystoma mexicanum* (Ajolote de Xochimilco) que forman parte de la colección de animales de la DGZVS (Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre)"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MIRYAM GABRIELA NOGUEIRA MARMOLEJO

ASESOR: Dr. Tonatiuh A. Sánchez Cruz

COASESOR: M en C MVZ Alberto Olascoaga Elizarraraz

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2014



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.

DEDICATORIA

A mi mamá

Por apoyarme, estar conmigo, escucharme, aconsejarme, darme ánimo y porque no, hasta presionarme cuando más lo necesité... aun cuando dude si me encontraba en el camino correcto, ahí estabas para ayudarme.....Gracias.

A mi hermano y mi papá

Gracias por todo su apoyo y cariño en todo momento.

A mi abuelo,

Que desafortunadamente ya no está entre nosotros, siempre me gustó ver su cara cuando le hablaba de mis clases, prácticas, etc.....sé que estaría orgulloso.

A mis amigos,

Por su amistad, apoyo y ayuda en cada momento; por las risas, consejos y largas platicas con café. En especial a Karla, Paty, Erika, Beto, Edgar, Everardo, Paola, Miguel, Lulú, Javier, Gaby, Mariela, Toño y a todos los demás, sin ustedes no hubiera sido lo mismo, en verdad gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a la que debo mi formación, pasión y amor a mi carrera.

A mis asesores,

El Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez, por todo el apoyo, enseñanzas, dedicación y paciencia para lograr este trabajo.

A el M. en C. MVZ Alberto Olascoaga Elizarraraz, por tu apoyo, dedicación, paciencia y confianza durante este tiempo.

A los profesores que integraron mi jurado,

El M.A. Liborio Carrillo, MVZ. Rodolfo Córdova, MVZ. Gerardo López, MVZ. Luis Huante; por sus comentarios, aportaciones y consejos al presente trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a
Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)
de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 2238811-
3 Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA DEL PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE Saprolegina spp AISLADAS DEL Ambystoma mexicanum (AJOLOTE DE XOCHIMILCO) QUE FORMA PARTE DE LA COLECCIÓN DE ANIMALES DE LA DGZVS (DIRECCIÓN GENERAL DE ZOOLOGICOS Y VIDA SILVESTRE).

Que presenta la pasante: **MIRYAM GABRIELA NOGUERA MARMOLEJO**
Con número de cuenta: **30009743-8** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria 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 Izcalli, Méx. a 20 de agosto de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	M.A. Liborio Carrillo Miranda	
SECRETARIO	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
1er SUPLENTE	M.M.V.Z. Gerardo López Islas	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Luis Rodolfo Vázquez Huante	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

HHA/yrf

INDICE GENERAL

RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	6
1. LOS ANFIBIOS	6
1.1 CARACTERISTICAS DE LOS ANFIBIOS	7
1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ANFIBIOS	8
1.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS URODELOS	11
2 EL AJOLOTE DE XOCHIMILCO	12
2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL <i>Ambystoma mexicanum</i>	15
3 SISTEMA TEGUMENTARIO DE LOS ANFIBIOS	16
4 ENFERMEDADES DE LOS ANFIBIOS	19
4.1 DERMATOMICOSIS EN ANFIBIOS	19
4.1.1 SAPROLEGNIASIS	20
4.1.2 TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES MICOTICAS EN ANIFIBIOS	26
5 PROPÓLEO	28
5.1 PROPIEDADES DEL PROPÓLEO	30
II. JUSTIFICACIÓN	33
III. OBJETIVOS	34
IV. HIPOTESIS	35
V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	36
VI. MATERIAL Y METODOS	37

VII. RESULTADOS	42
VIII. DISCUSIÓN.....	56
IX. CONCLUSIÓN.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Anfibio del orden de los cecílidos. (Faria Helder 2009)	8
Figura 2 Anfibio del orden de los anuros, <i>Dendrobatea azureus</i> . (Animal Diversity Web 2008).....	9
Figura 3 Anfibio del orden de los urodelos, <i>Cynops orientalis</i>	10
Figura 4 <i>Ambystoma mexicanum</i> (ajolote de Xochimilco) (Animal Diversity Web 2010).....	13
Figura 5 Sistema tegumentario de un anfibio. (Myers, et al.; 2013).....	17
Figura 6 Ciclo reproductivo de la <i>Saprolegnia spp.</i> (Romero Zarco, 2012).....	21
Figura 7 Lesiones características, señaladas con flechas, que son producidas por <i>Saprolegnia spp</i> en <i>Ambystoma mexicanum</i> (ajolote de Xochimilco).....	24
Figura 8 Método de sujeción del <i>Ambystoma mexicanum</i>	38
Figura 9 caso clínico 1.	42
Figura 10 Caso clínico 2.	42
Figura 11 Caso clínico 3.....	43
Figura 12 Caso clínico 4.....	43
Figura 13 Caso clínico 5.....	44
Figura 14 Caso clínico 6.....	44
Figura 15 Caso clínico 7.	44
Figura 16 Crecimiento filamentosos y blanquecinos de la cepa compatible con <i>Saprolegnia spp</i>	45

Figura 17 Zoosporas de *Saprolegnia spp* con tinción de azul de lactofenol a un aumento de 10x.....46

Figura 18 Zoospora de *Saprolegnia spp* con tinción de azul de lactofenol con un aumento de 40x.....47

Figura 19 Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) (2, 4, 8mg/ml) apreciando zonas de inhibición y crecimiento del micelio sobre el disco de control.....48

Figura 20 Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) (2,4,8mg/ml) apreciando zonas de inhibición causadas por el propóleo y crecimiento del micelio sobre el disco control (D) (cara posterior de la caja).....49

Figura 21 Placa de 24 pozos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se observó el crecimiento del hongo en los pozos correspondientes al control y reducción del crecimiento colonial conforme la concentración del extracto hidrosoluble de propóleo aumento.....52

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Composición genérica del propóleo; Bedascarrasbure, et Al ., 2006.....29

Gráfico 2 Porcentaje de inhibición del crecimiento colonial de *Saprolegnia spp*, observándose una disminución gradual del crecimiento de la cepa conforme la concentración del EHP aumentó.....51

Gráfico 3 Dilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se demuestra el crecimiento del control y la manera que el crecimiento colonial disminuye conforme la concentración del extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) aumenta.....54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Casos clínicos de ajolotes de Xochimilco.....42

Tabla 2 Medición de los diámetros de las colonias de los 24 pozos para la prueba de CMI.....50

Tabla 3 Porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias51

Tabla 4 Promedio del crecimiento de las colonias de *Saprolegnia* spp (cm) y porcentaje de crecimiento de las colonias en la placa de 24 pozos. Nogueira 2012.....53

RESUMEN

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es una especie endémica del valle de México, que se limita a los canales del lago de Xochimilco. Este anfibio actualmente se encuentra en grave peligro de extinción por diversos factores como la introducción de especies depredadoras, contaminación y reducción de los canales donde habita y diversas enfermedades, como es el caso de *Saprolegnia spp.*

Los medicamentos empleados para el tratamiento de enfermedades micóticas en las especies domésticas pueden ser irritantes y dañinos para los anfibios, por lo que la búsqueda de tratamientos alternativos con sustancias inocuas, como el propóleo, puede ser adecuado, ya que esta sustancia tiene diferentes efectos terapéuticos que han sido probados en la medicina humana y veterinaria.

En el presente trabajo se aisló e identificó *Saprolegnia spp* de casos clínicos en ajolotes de Xochimilco y mediante pruebas cualitativas y cuantitativas se demostró el efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento del hongo, empleando extracto hidrosoluble de propóleo proveniente de Toluca, Estado de México, a una concentración de 3mg/ml, por lo cual puede ser una alternativa inocua, que posiblemente podría implementarse en la terapéutica al no ser irritante o tóxico para los animales.

I. INTRODUCCIÓN

1 LOS ANFIBIOS

La palabra anfibio proviene del griego "*amphibio*" que significa dos vidas (*amphi*-ambos, *bios*-vida), ya que la mayoría de ellos viven parte de ella bajo el agua, cuando son larvas y la otra sobre la tierra; al ser adultos, aunque algunas especies son la excepción; ya que toda su vida permanecen bajo el agua (Zippel, 2008).

Los anfibios aparecieron en la tierra hace 350 millones de años, comprendiendo alrededor de 4500 especies. Son un grupo taxonómico importante relacionado íntimamente con la evolución, al ser los primeros seres vivos en distribuirse sobre la tierra (Wright, 2001; Zippel, 2008).

Además de esto, son parte importante dentro del ecosistema siendo indicadores de la calidad del medio ambiente. Actualmente muchas de las especies de anfibios están en peligro de extinción no solo por la mala calidad ambiental, sino que también se ven involucrados factores como la introducción de especies depredadoras, enfermedades, etc. (Baitcman, 2008; Carrillo, *et al.*, 2007).

1.1 CARACTERISTICAS DE LOS ANFIBIOS

Este orden se caracteriza por ser ectotérmica, esto quiere decir que su temperatura no depende de sus mecanismos fisiológicos; sino del calor del ambiente en el que se encuentre, son carnívoros estrictos, poseen una piel cubierta en general por glándulas pluricelulares de tipo venenoso o mucoso, carecen de uñas verdaderas aunque con estructuras epidérmicas corneas en la punta de los dedos de las extremidades posteriores, su cráneo es osificado y aplanado que se articula a la columna vertebral por medio de dos cóndilos occipitales en la etapa adulta, el corazón es tricavitario en adultos, mientras que en la etapa juvenil es bicavitario (Wright, 2001; Zippel, 2008).

La gran mayoría de las especies presentan cambios morfológicos y funcionales al pasar de un estado juvenil a uno adulto, lo cual se conoce como metamorfosis y su tipo de reproducción es sexual con fertilización externa o interna (Zippel, 2008).

1.2 CLASIFICACION DE LOS ANFIBIOS

La clase anfibios se divide en tres órdenes:

El orden **Gymnophiona** o **cecílicos**, son animales fosoriales carentes de miembros locomotores, con una apariencia muy similar a una serpiente, de cráneo pesado y altamente osificado, lo que le facilita el desplazamiento bajo tierra. Este orden presenta una fertilización interna y algunas de las especies son vivíparas (figura 1) (Zippel, 2008).



Figura 1 Anfibio del orden de los cecílicos. (Foto: Faria Helder 2009)

El orden **Anura**, comprende a los sapos y ranas, es el grupo más estudiado dentro de los anfibios, los cuales no presentan cola, miembros posteriores de mayor tamaño y musculatura en comparación de los anteriores, de ojos prominentes, sus larvas son de forma ovoide que a diferencia de la larva de una salamandra sus branquias son internas, son anfibios de fecundación externa con sus excepciones (Figura 2) (Zippel, 2008).



Figura 2 Anfibio del orden de los anuros, *Dendrobate azureus*. (Foto: Animal Diversity Web 2008)

El orden de los **urodelos o caudata** (salamandras, tritones y ajolotes) comprende nueve familias con más de 370 especies. Norte América es la zona geográfica con más variedad de especies de urodelos, abarca especies acuáticas y arbóreas, son animales de fertilización interna, por medio de la transferencia del espermatóforo) (Figura 3) (Zippel, 2008).

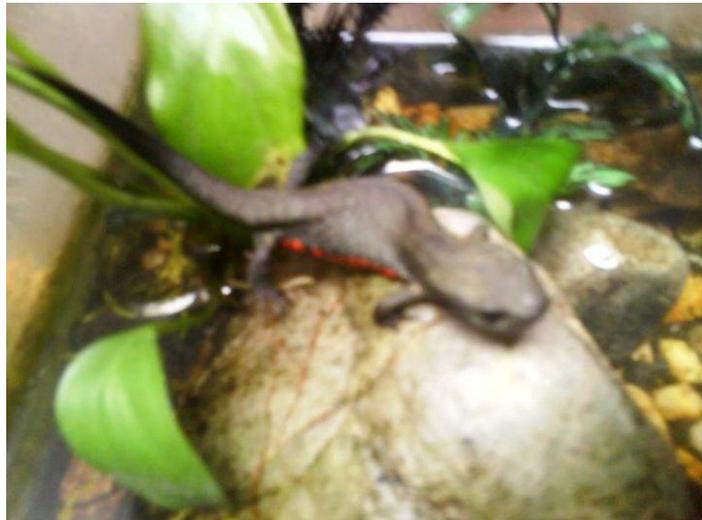


Figura 3 Anfibio del orden de los urodelos, *Cynops orientalis*.
(Foto: Nogueira 2010)

1.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS URODELOS

Este tipo de anfibios al eclosionar no presentan extremidades, solo cuentan con branquias, mientras que la forma adulta presenta ya cuatro extremidades, su columna vertebral se encuentra escasamente diferenciada (Zippel, 2008).

Algunos urodelos juveniles alcanzan una madurez interna y son aptos para reproducirse sin cambiar su apariencia juvenil, proceso conocido como neotenia, un ejemplo de esto es el ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) ya que al no pasar por el proceso de metamorfosis conserva todas las características físicas de las larvas, como lo son las branquias y cola ancha para poder propulsarse bajo el agua, aunque claro pocos ejemplares han pasado por el proceso de metamorfosis; adaptándose así a la respiración y desplazamiento terrestres (Kelly, 2008; Wright, 2001).

En el orden de los urodelos, podemos encontrar a la familia *Ambystomatidae*, la cual comprende más de 30 especies que se distribuyen en el norte del continente Americano. Dentro de esta clasificación se encuentra el ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), especie endémica que actualmente habita el sistema de canales de Xochimilco en la Ciudad de México (Arreola, 2011; Wright, 2001; Zippel, 2008).

2 EL AJOLOTE DE XOCHIMILCO

Dentro de la cultura mexicana, en náhuatl el ajolote es conocido como Axolotl, que quiere decir juguete de agua, monstruo acuático o gemelo del agua. Otra tradición prehispánica hace referencia al dios Azteca hermano gemelo de Quetzalcoatl (Bartra, 2011).

El ajolote de Xochimilco es considerado una especie nativa del lago de Xochimilco en la ciudad de México, desafortunadamente se encuentra casi extinto de su habitat natural, se caracteriza por ser un animal solitario que solo interactua con otros de su especie en la época reproductiva, que va de marzo a junio (Arreola, 2011).

Pertenece al orden de los urodelos, su forma es robusta y anguiliforme; su piel es suave y fina, sobre sus costado se aprecian surcos perpendiculares a lo largo del tronco (costillas), la cabeza es grande y aplanada con respecto al resto del cuerpo. Sus ojos son pequeños, carecen de párpados y su visión es muy limitada (Vazquez-Covarrubias, 2011).

La cola es más larga o de igual tamaño en relación al resto del cuerpo, presenta un pliegue cutáneo que comienza por el lado superior en la base de la cabeza y por el lado inferior desde la zona anal, lo que le facilita la

natación. Poseen cuatro extremidades pequeñas con cuatro dedos en los miembros anteriores y cinco en los posteriores, ambas presentando membranas interdigitales (Figura 4) (Vazquez-Covarrubias, 2011).



Figura 4 *Ambystoma mexicanum* (ajolote de Xochimilco) (Foto: Animal Diversity Web 2010)

A ambos lados de la cabeza se encuentran las branquias, que dependiendo de la calidad del agua y cantidad de oxígeno en la misma; pueden estar muy desarrolladas o no, que junto a la piel y pulmones; escasamente desarrollados, realizan el intercambio gaseoso. (Vazquez-Covarrubias 2011)

Su tamaño es de 25 a 30 cm en la etapa adulta, siendo las hembras las más grandes y voluminosas. (Vazquez-Covarrubias, 2011).

Para lograr diferenciar un macho de una hembra de ajolote hay que esperar a que estos lleguen a su etapa de madurez sexual, entre los 6 y 18 meses de edad. Por lo general las hembras son de mayor tamaño, mientras que los machos presentan unos abultamientos en la zona cloacal (Vazquez-Covarrubias, 2011).

A diferencia de la mayoría de los anfibios que presentan metamorfosis, el ajolote de Xochimilco es capaz de reproducirse conservando sus características larvarias, a lo que se le conoce como neotenia (Foster, et al., 2012).

2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL *Ambystoma mexicanum*

(Myers, et al.; 2013)

Reino	Animal
Phylum	Cordados
Subphylum	Vertebrados
Clase	Anfibia
Orden	Caudata
Sub-orden	Salamandroidea
Familia	Ambystomatidae
Género	<i>Ambystoma</i>
Especie	<i>mexicanum</i>
Nombre común	Ajolote de Xochimilco

3 SISTEMA TEGUMENTARIO DE LOS ANFIBIOS

Una característica que define a los anfibios es su piel; la cual carece de pelo o plumas que la cubran, siendo altamente permeable, glandular y vascularizada (Meteyer, et al., 2005; Zippel, 2008).

La piel de muchas especies de anfibios está cubierta por capas de queratina fina y moco, lo que solo proporciona una protección relativa (Zippel, 2008).

La epidermis de los anfibios está conformada por un estrato germinativo, uno intermedio y un estrato corneo superficial, que se encuentra queratinizado en las formas adultas de los anfibios (Figura 5); el cual es mudado periódicamente, proceso conocido como ecdisis, el cual puede durar de días hasta semanas dependiendo de la especie, edad, estado fisiológico, temperatura, entre otros (Maynero, et al., 2008).

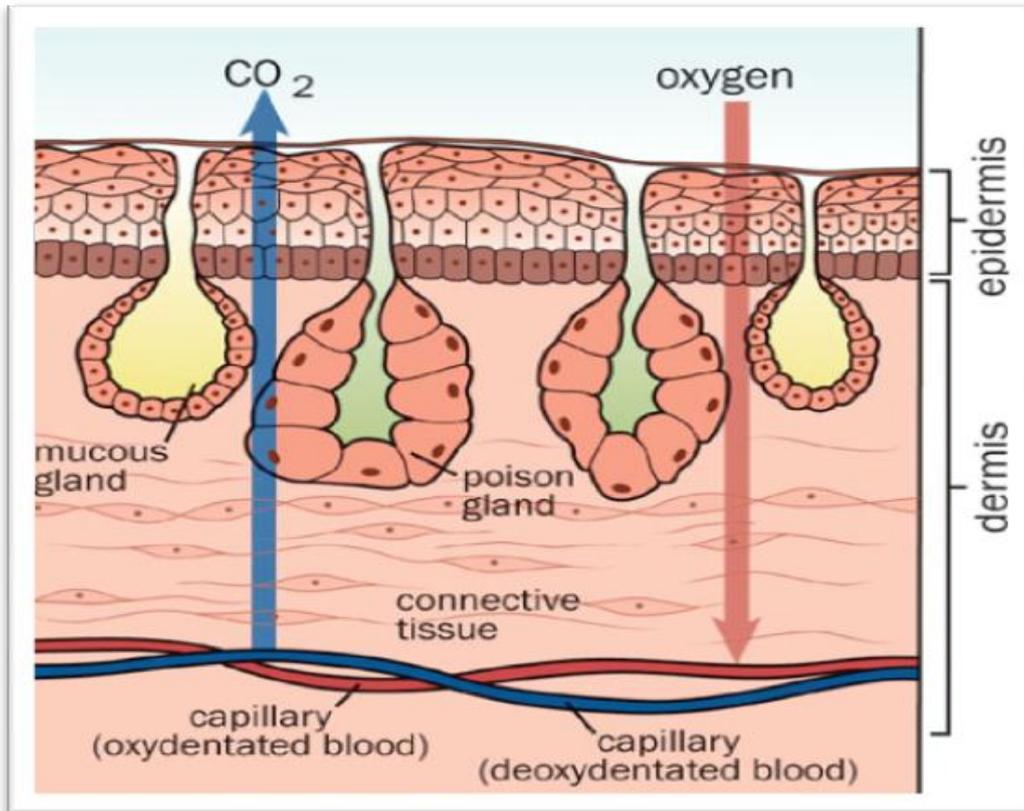


Figura 5 Sistema tegumentario de un anfibio. (Foto:Myers, et al.; 2013)

Las glándulas que conforman la piel de los anfibios están compuestas de tres tipos: alveolar que se localizan en todo el cuerpo, pudiendo ser mucosa o venenosa, las tubulares se localizan a los costados del hocico y su función es la limpieza de las fosas nasales y las unicelulares, que solo están presentes en la etapa de larva y su función es la degradación de la sustancia gelatinosa de la que se conforman los huevos (Maynero, et al., 2008).

El moco (mucus) característico de la especie es producido en las células mucosas y células epiteliales ordinarias, que permiten la permeabilidad al oxígeno, mantiene la piel húmeda y facilita la respiración cutánea, además crea una barrera que retrasa la colonización por microorganismos. La piel de los anfibios es sumamente delgada y delicada que ante cualquier laceración deja vulnerable al anfibio y dando lugar al crecimiento o invasión de agentes patógenos (Zippel, 2008; Meredith, *et al.*, 2012).

4 ENFERMEDADES DE LOS ANFIBIOS

Desde los años 80's se ha observado una disminución importante en las especies de anfibios, debido a la pérdida de su hábitat, introducción de especies depredadoras, enfermedades emergentes y reemergentes, siendo en combinación la causa de la extinción de especies de anfibios (Meteyer , *et al.*, 2005).

Al igual que todos los animales, los anfibios sufren de diferentes enfermedades que son provocadas por diversos factores como microorganismos, calidad del agua, mala alimentación, entre otros, afectando principalmente sistema respiratorio, digestivo y piel (Meredith, *et al.*, 2012).

4.1 DERMATOMICOSIS EN ANFIBIOS

Los hongos son microorganismos eucariontes que forman parte de la microflora normal en animales y plantas. A la enfermedad producida por un hongo se le denomina micosis y sus manifestaciones clínicas son muy variadas pudiendo ser localizadas o sistémicas, para que estos microorganismos puedan colonizar una animal deben de existir suficientes mecanismos agresores que lo permitan. (Sumano López, *et al.*, 1997)

Dentro de las enfermedades micóticas que afectan a los animales; en el caso particular de los anfibios, éstas son más comunes en grandes colonias que se mantienen en cautiverio o vida libre, actualmente la de mayor impacto ambiental es la Chytridiomicosis producida por *Batrachochytrium dendrobatidis*, mientras que en cautiverio la más común es la Saprolegniasis (*Saprolegnia spp*) (Foster, et al., 2012).

4.1.1 SAPROLEGNIASIS

La descripción de *Saprolegnia* se realizó en el año de 1970 por Seymour, obteniendo las cepas de peces y empleando como sustrato las semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*) en agua destilada estéril, considerando solo sus aspectos morfológicos, y ha sido reconocida como una de las principales especies patógenas relacionadas con hongos en peces y anfibios (Zaror, et al., 2004).

La Saprolegniasis además de ser el término general para designar una infección cutánea localizada o generalizada causada por hongos acuáticos en anfibios mantenidos a temperaturas mayores a 20°C, también puede observarse en anfibios terrestres con condiciones extremadamente húmedas (Aguilar, et al., 2010).

La *Saprolegnia* presenta un ciclo reproductivo muy complejo (Figura 6), ya que cuenta con una reproducción sexual y una

asexual. Dentro de la reproducción asexual los extremos de las hifas se dilatan para formar zoosporangios claviformes, separándose de la hifa que los originó por un septo transversal, una vez terminada la división el citoplasma se divide dando lugar a diversas mitosis, como resultado esporas piriformes uninucleadas con dos flagelos apicales, uno liso y el otro barbulado, siendo activa por un breve periodo de tiempo, después se enquista y da lugar a las zoosporas secundarias que permanecen móviles por más tiempo que las primarias, a este fenómeno se le conoce como poliplanetismo, dando lugar al enquistamiento y liberación de las zoosporas dando la oportunidad de encontrar un sustrato adecuado u hospedero (Adams, 2009) (Romero Zarco, 2012).

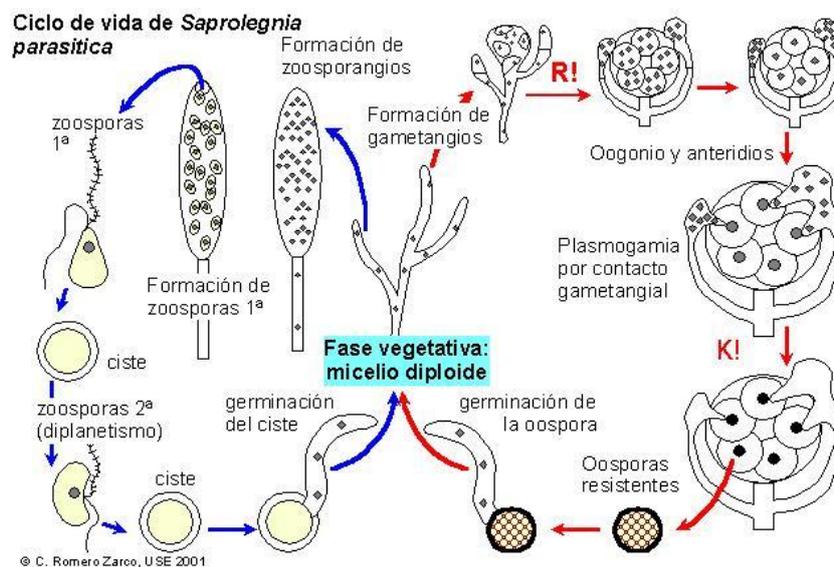


Figura 6 Ciclo reproductivo de la *Saprolegnia* spp. (Foto: Romero Zarco, 2012)

La fase de reproducción sexual se caracteriza por la producción de un anteridio y una oogonia, del mismo modo que ocurre con los zoosporangios, los gametangios se separan de la hifa de origen por medio de septos transversales y en cada uno de ellos ocurre una meiosis, el resultado de este proceso son gametangios femeninos y masculinos que no son liberados al agua sino que el masculino es atraído hacia el gametangio femenino dando lugar a una gametogonia y origen a un cistogonio, de pared muy gruesa que le sirve como defensa ante medio adversos para su desarrollo (Maceda, et al., 2003)

La Saprolegniasis es una micosis externa, que como ya se mencionó afecta a peces y anfibios, siendo una enfermedad de fácil diagnóstico, ya que se observan lesiones filamentosas de color blanco grisáceo, que corresponden al micelio del hongo formando masas algodonosas, que pueden ser observadas en pequeñas lesiones sobre la piel e ir proliferando hasta cubrir por completo el cuerpo del animal (Maceda, et al., 2003)

Esta infección se produce después de algún suceso inmunodepresor significativo y puede propagarse con facilidad. Los grandes cambios en la temperatura, mal manejo, agresión entre animales, infecciones bacterianas o parasitarias, reducción de la secreción de mucus. En el caso de las heridas en la epidermis las esporas germinan y la atraviesan dando lugar al desarrollo del micelio (Aguilar, *et al.*, 2010).

Al parecer las hifas de este hongo secretan una toxina ya que se observa una gran cantidad de células muertas alrededor de ellas; a partir de ahí se extiende por toda la dermis colonizando toda la piel del animal, aunque se pueden dar casos en los que las hifas invaden músculos y órganos internos (Aguilar, *et al.*, 2010).

Debajo del agua se observa una capa algodonosa que parece cubrir la piel de color blanco a gris (figura 7), sobre tierra tiene la apariencia de una capa de limo blanco que cubre la pie (Aguilar, *et al.*, 2010).

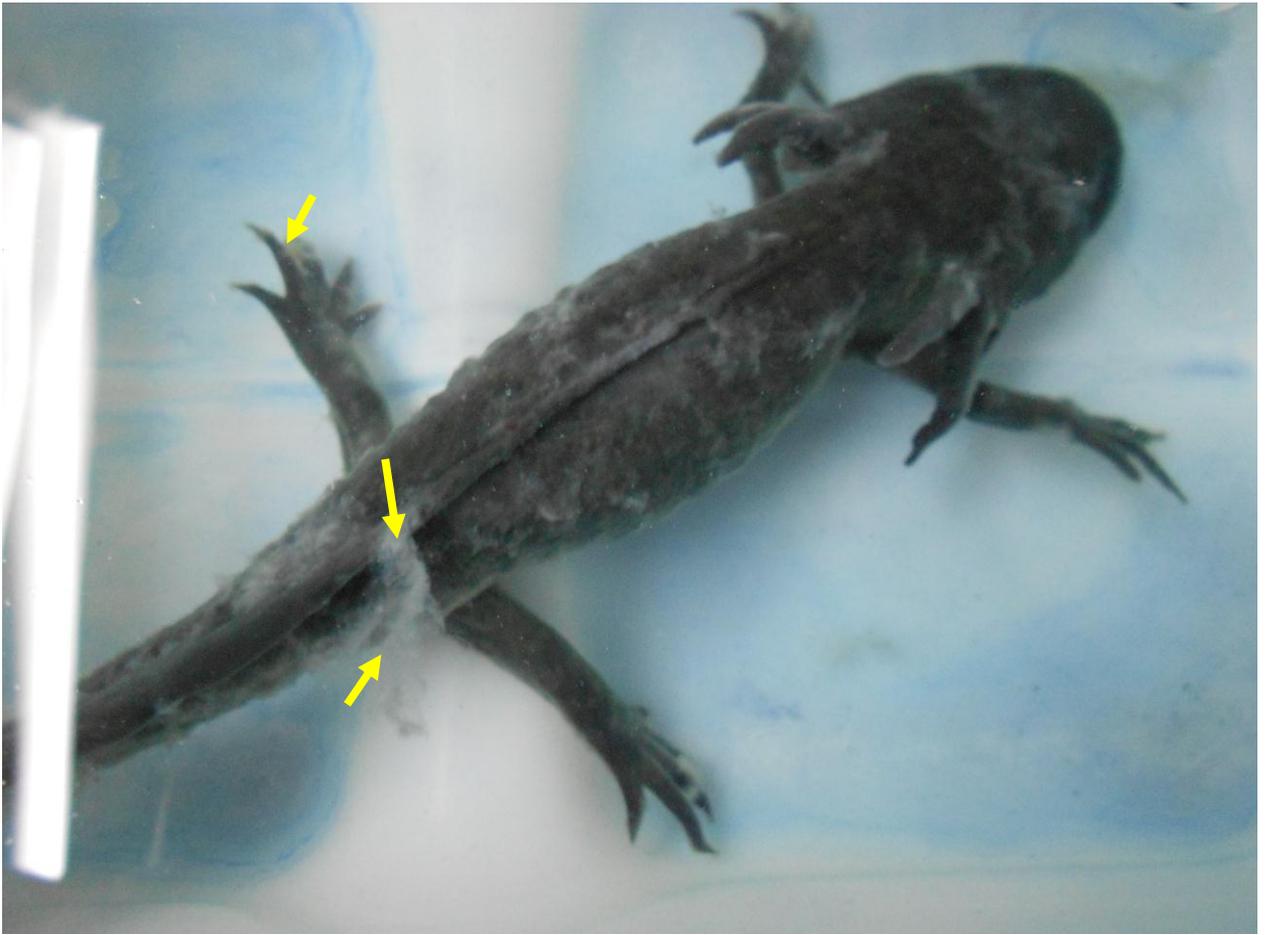


Figura 7 Lesiones características, señaladas con flechas, que son producidas por *Saprolegnia* spp en *Ambystoma mexicanum* (ajolote de Xochimilco) (Foto: Servin 2012, Nogueira 2012)

Se cree que la muerte después de la infección por saprolegniasis es producida por la alteración en la termorregulación y osmoregulación a través de la piel y mucosas comprometidas (Aguilar, et al., 2010).

El diagnóstico de esta enfermedad está poco estudiado en anfibios, mientras que en la acuicultura existe una gran variedad de estudios relacionados con la enfermedad. Este puede realizarse con un preparado en fresco de un raspado para demostrar la presencia de hifas con una tinción de azul de lactofenol y cultivo del hongo en medios de cultivo sólidos (Aguilar, *et al.*, 2010).

Las principales medidas de control y tratamiento directo o indirecto de ésta enfermedad en animales en cautiverio, siendo el mantenimiento de las instalaciones el principal, realizando cambios parciales o totales al agua para eliminar la materia orgánica que pueda estarse acumulando y contar con un sistema de filtración (Foster, *et al.*, 2012).

4.1.2 TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES MICOTICAS EN ANIFIBIOS

Los fármacos empleados para eliminar este tipo de enfermedades son conocidos como antimicóticos, clasificándose en fungicidas y fungistáticos, pudiendo alterar la síntesis de las macromoléculas, alterando la membrana, inhibidores de la síntesis de ergosterol, pero existen algunos inconvenientes en el uso de antimicóticos ya que existen muy pocos a disposición, con mayor efecto secundario y con la posibilidad de generar resistencia (Sumano López, et al., 1997).

En el caso de la Saprolegniasis existen diferentes tipos de tratamientos, los cuales han sido estudiados y probados en peces y anuros. La gran mayoría consiste en el aumento de la temperatura ambiental (mayor a los 22°), baños con itraconazol a razón de 1mg por cada litro de solución salina al 0.6% durante 5 minutos a una hora por 5 días por lo menos, baños en solución hipertónica de cloruro de sodio (10 a 25 gramos) disueltos en agua destilada por media hora, baños de 72 horas en cloruro de benzal (0.25mg/litro) o de manera directa sobre la lesión con cloruro de benzalconio (2mg/litro). En caso de presentar un desequilibrio electrolítico por acumulación de líquido subcutáneo o celómico se sugiere el mantenimiento continuo

en solución ringer lactato hasta que se resuelva la lesión cutánea (Aguilar, *et al.*, 2010).

Por lo anterior, los tratamientos empleados para el control de la saprolegniasis de manera convencional pueden llegar a ser altamente irritantes para los anfibios, dada las características de su piel que es muy delgada y no posee escamas, como en el caso de los peces. (Servín Zamora, 2010)

Dentro de las instalaciones del Zoológico de Chapultepec el tratamiento de elección ante la enfermedad consiste en separar al ejemplar en una tina colocando azul de metileno, sal de mar, acriflavina (aplicando dos gotas del producto comercial) realizando cambios diarios del agua, y en casos severos se limpia totalmente la lesión y se aplica con un hisopo una gota de verde de malaquita. (Servín Zamora, 2010)

A pesar de que este método ha sido efectivo, los tratamientos son largos e irritantes para los ajolotes; el uso de productos inocuos de origen vegetal puede ser una alternativa para la prevención y tratamiento de la enfermedad, por lo que se propone el propóleo como una alternativa natural para su tratamiento. (Servín Zamora, 2010)

5 PROPÓLEO

Las abejas elaboran diferentes productos, los cuales son denominados derivados de la colmena, como lo son, la miel, la jalea real, cera de panal, veneno de abeja, polen y propóleo (Fierro-Morales, 2000).

El propóleo, que proviene del griego "Propolis" que significa "defensa o defensor de la ciudad"; es el resultado de la mezcla de sustancias activamente secretadas o exudadas por las heridas de ciertos árboles y plantas, junto con ceras, secreciones salivares de las abejas y otras sustancias; este producto es empleado para barnizar el interior de la colmena con el propósito de desinfectar, sellar grietas en el panal, reducir vías de acceso, consolidar componentes estructurales, recubrir los cadáveres de los intrusos en su colmena, como escarabajos, lagartijas, etc, quedando embalsamados (Yanucci, *et al.*; 1998).

Su consistencia puede ser variable ya que al encontrarse a temperaturas bajas es sólido y frágil, mientras que al estar en altas temperaturas es suave y pegajoso (Bedascarrasbure, *et al.*; 2006).

La composición química del propóleo es compleja y muy variada ya que depende de diferentes factores para obtener sus características terapéuticas, desde un punto de vista macroscópico podemos decir que está compuesto de la siguiente manera (gráfico 1) (Bedascarrasbure, *et al.*; 2006):

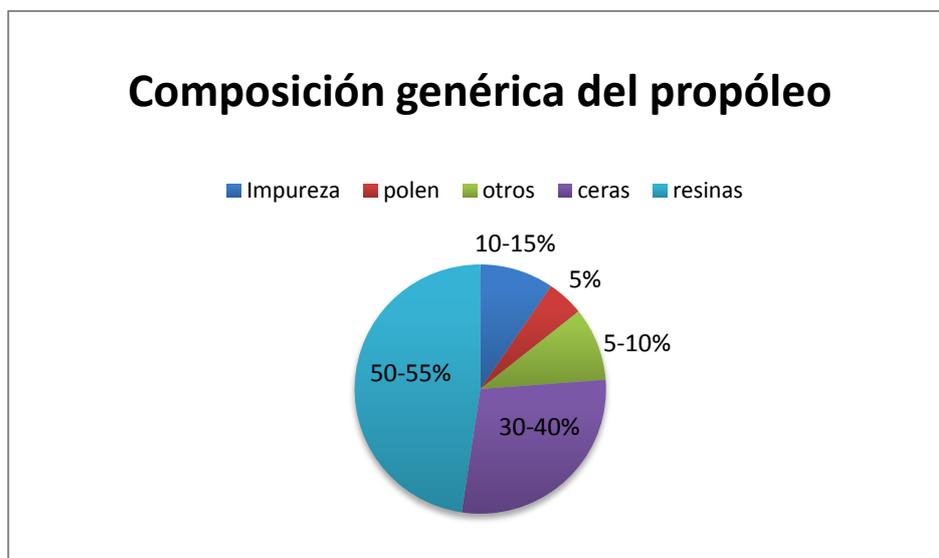


Gráfico 1 Composición genérica del propóleo; Bedascarrasbure, *et al.*., 2006.

Como ya se mencionó anteriormente, estos porcentajes son muy variables, ya que depende de la zona, región climática, tipos de plantas en la región y disponibilidad de las mismas (Yanucci, *et al.*; 1998).

5.1 PROPIEDADES DEL PROPÓLEO

Los beneficios aportados por el propóleo son poco conocidos en la medicina alópata, pero en los últimos años y gracias a los avances en la medicina preventiva, se ha incrementado el consumo de productos naturales, por lo que la apiterapia, considerada dentro de la fitoterapia, ha ido ganando lugar dentro de la Medicina convencional (Bedascarrasbure, *et al.*, 2006).

Actualmente se han aislado más de 150 compuestos del propóleo, como aminoácidos, ácidos aromáticos, flavonas, entre otros, que varía dependiendo de su origen botánico y geográfico, entre otros factores ya mencionados anteriormente, tiene un efecto terapéutico diferente (Bedascarrasbure, *et al.*, 2006).

La capacidad antibacteriana fue una de las primeras propiedades descubiertas, ya que en tiempos antiguos los egipcios, quienes lo llamaban "cera negra" lo usaban para embalsamar cadáveres. En algunos estudios ha demostrado tener capacidad bacteriostática y bactericida, siendo los flavonoides, galangina y pinocembrina, derivados del ácido benzoico, que actúan desactivando la energía de la membrana citoplasmática e inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndola más vulnerable ante el sistema inmunológico. El mayor efecto antibacteriano se presenta en bacterias Gram

(+) y numerosas bacterias Gram (-) como *Staphylococcus aureus*, de igual manera logra la inhibición de *Candida albicans* y algunos *Aspergillus* (Bedascarrasbure, et al., 2006).

En los últimos años se ha empleado al propóleo como un gran recurso terapéutico, solo o combinado con otros terapéuticos logra potencializar el efecto de algunos antibióticos, ya que desafortunadamente en los últimos años se ha descubierto la resistencia de los microorganismos ante el efecto de diversos antibióticos (Bedascarrasbure, et al., 2006).

Otra de las características importante del propóleo, que le dio un espacio importante en el tratamiento de heridas es su capacidad antimicrobiana, cicatrizante y antiinflamatoria (Bedascarrasbure, et al., 2006).

En la medicina Veterinaria se ha empleado este producto para el control y tratamiento de enfermedades que afectan a las especies domésticas, se han reportado casos de TVT (tumor venéreo transmisible) dando como resultado la inhibición de la actividad de las células de origen cancerígeno, en el tratamiento de úlceras corneales inducidas en conejos, logrando una regeneración epitelial (Giral , et al., 2007)

Se han realizado estudios en los cuales se han demostrado con gran éxito el uso del propóleo, como es en caso de las bacterias y hongos que comúnmente producen otitis en los perros, donde diferentes agentes patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Malassezia pachydermatis* han sido aislados. Los resultados obtenidos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) han demostrado la inhibición del desarrollo de dichos agentes, demostrando que el propóleo puede utilizarse como antibiótico, antiinflamatorio y antimicótico ante este padecimiento. (UNNE, 2009)

Además se ha estudiado el uso de este producto en afecciones oftálmicas más comunes en perros y gatos de diversas edades y razas, dando buen resultado, demostrando que es un tratamiento alternativo de estas enfermedades, sin presentarse efectos adversos en los pacientes. (Giral, et al., 2007).

II. JUSTIFICACIÓN

Dados los resultados favorables observados en especies domésticas ante el uso del propóleo como alternativa para el tratamiento de enfermedades, se puede considerar una opción más dentro de la medicina aplicada en animales de fauna silvestre, al ser un fármaco con varias propiedades medicinales, de fácil adquisición y bajo costo. Todo lo anterior puede servir como una ventana a la implementación de tratamientos en especies prioritarias o que se encuentren en peligro de extinción, como es el caso del ajolote de Xochimilco, ya que como se ha mencionado con anterioridad los fármacos empleados como antimicóticos en los animales domésticos son irritantes para ellos.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar el efecto antimicótico del propóleo sobre cepas de *Saprolegnia spp* obtenidas de *Ambystoma mexicanum* (Ajolote de Xochimilco).

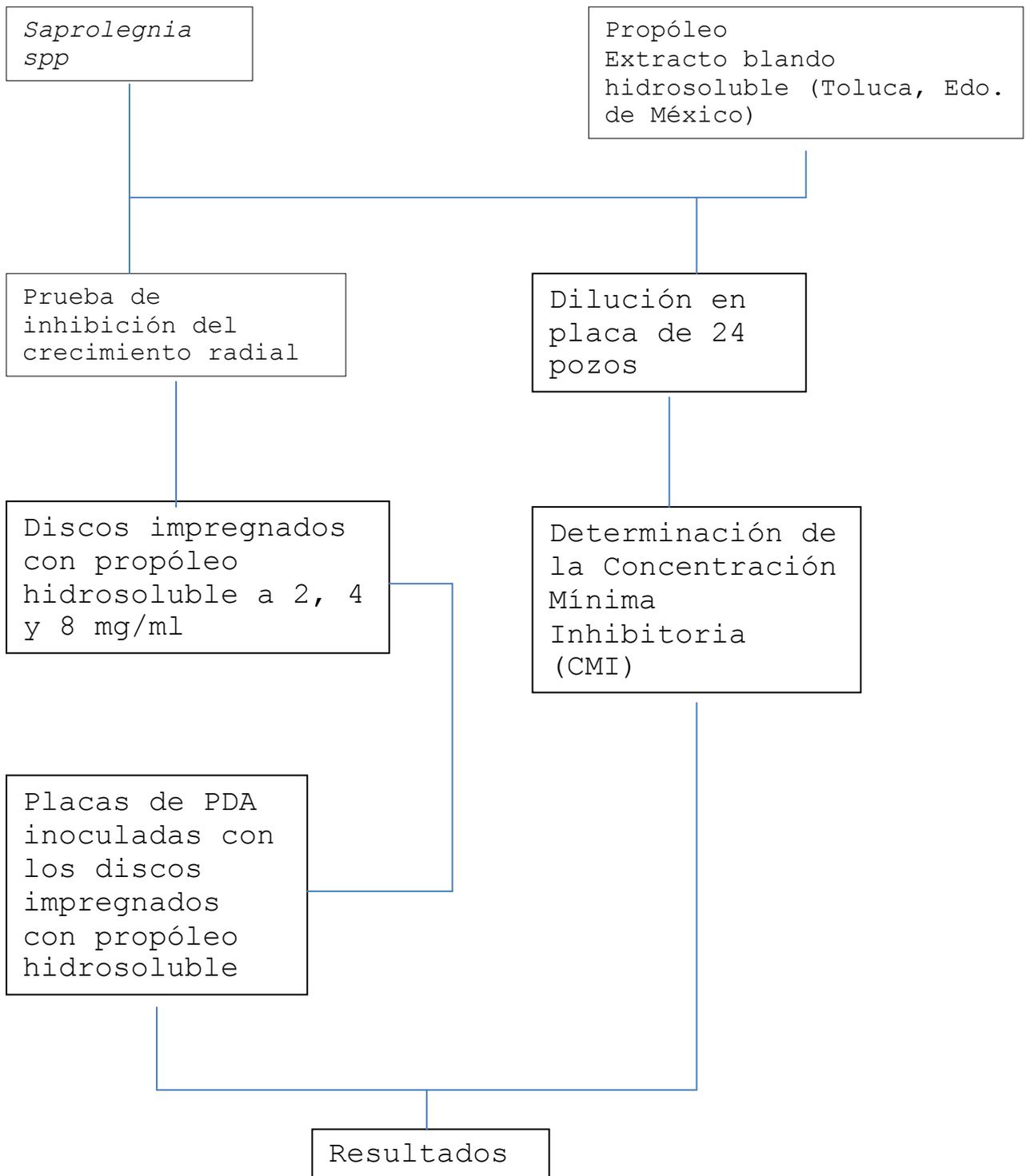
3.2 Objetivos específicos

1. Obtención de casos clínicos en ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) compatibles con dermatomicosis por *Saprolegnia spp*.
2. Aislamiento e identificación de cepas de *Saprolegnia spp* de casos compatibles con la enfermedad.
3. Evaluación del efecto antimicótico del propóleo sobre las cepas aisladas de *Saprolegnia spp*.

IV. HIPOTESIS

El propóleo tiene un efecto antimicótico sobre el crecimiento de las cepas de *Saprolegnia spp* que afectan al *Ambystoma mexicanum* (ajolote de Xochimilco).

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN



VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Propóleo

Se empleó un extracto blando de propóleo hidrosoluble, proveniente de Toluca, Estado de México.

Animales

Se empleó a la colonia de *Ambystoma mexicanum*, alojada en las instalaciones del Zoológico de Chapultepec, las muestras se obtuvieron de casos clínicos con lesiones compatibles a las producidas por *Saprolegnia spp*, siendo un total de siete muestras.

Obtención de muestras

Para la colección de las muestras los ejemplares deben ser sujetados con mucho cuidado, más adelante se explica el método de sujeción de los ajolotes, ya que al tener una piel tan delicada podemos llegar a dañarlos; las lesiones compatibles con *Saprolegnia spp* se desprende con facilidad de la piel, una vez obtenida la muestra es colocada en cajas Petri desechables con agar dextrosa papa para su cultivo.

6.2 MÉTODO DE SUJECIÓN



Figura 8 Método de sujeción del *Ambystoma mexicanum*. (Foto: Servín 2012, Nogueira 2012)

Para la correcta sujeción de los ejemplares, estos fueron sostenidos de la parte ventral, empleando los dedos índice y pulgar frente a la cabeza del animal para evitar su huida, es importante no presionar muy fuerte al ejemplar ya que puede salir lastimado, en caso de que el ajolote sea muy inquieto se puede emplear una red de poro fino, como las que se emplean en peces (Figura 5).

En aquellos casos que se requiera contener químicamente a los ejemplares, se realiza colocando al ejemplar en tinas de agua limpia con benzocaína (80 mg/litro)

6.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Saprolegnia spp*

Se realizaron las siguientes etapas de identificación del hongo:

1. Aislamiento del hongo en SPD (agar papa dextrosa):

Para el cultivo de este hongo, se emplearon cajas de Petri desechables de 10 ml, con agar dextrosa papa, dejándolas a temperatura ambiente dejando crecer el inóculo por un periodo de 48 a 72 hrs, las cajas fueron selladas con parafilm para evitar una posible contaminación.

2. Identificación de la cepa mediante la tinción de azul de algodón.

a) En un portaobjetos limpio sobre una superficie blanca, se coloca una gota del colorante azul de algodón de lactofenol en el centro del portaobjetos.

b) Se transfiere una cantidad pequeña de la colonia del hongo, que en este caso es *Saprolegnia spp*, con el asa de inoculación y se coloca sobre el colorante.

c) Se cubre la preparación con un cubreobjetos, sin presionar para no dañar las colonias o estructuras a observar.

d) Se observa con los objetivos de 10 y 40x del microscopio.

6.4 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL

Para el método de inhibición del crecimiento radial, se empleó la técnica modificada de Wang y Bun, 2002, al tratarse de hongo filamentosos, empleando agar dextrosa papa en cajas de Petri desechables de 10 ml, y empleando discos de papel de 5mm de diámetro aproximadamente, los cuales fueron impregnados con un stock extracto de propóleo hidrosoluble (EPH) que fue preparado a 2, 4 y 8 mg/ml de concentración. Los discos fueron colocados en cajas de Petri de manera que cada disco no tocara los bordes de la misma, con el objetivo de observar halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con EHP (Londoño Orozco, 2010).

Después se realizó un sembrado en el centro de la caja con el inóculo correspondiente a *Saprolegnia spp*, colocando las cajas en incubación por 48 hrs. para posteriormente, de manera cualitativa observar los halos de inhibición producidos por el propóleo (Londoño Orozco, 2010).

6.5 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM)

Para esta prueba se prepararon microplacas de Petri desechables con una capacidad de 2 ml por pozo, con agar dextrosa papa, adicionadas con diferentes concentraciones de propóleo: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3 mg/ ml de un stock de 100 mg/500 microlitros y un control sin extracto (Londoño-Orozco, 2010).

Se empleó el cultivo correspondiente a *Saprolegnia spp*, inoculando el centro de cada pozo, desprendiéndolo con capilares y colocándolo en el centro de cada pozo e incubando por un periodo de 48 horas y midiendo el área de crecimiento, para así poder determinar la CIM que presenta el propóleo sobre *Saprolegnia spp* (Londoño-Orozco, 2010).

VII. RESULTADOS

7.1 CASOS CLÍNICOS

Para la elaboración de este trabajo se emplearon a siete ejemplares adultos de *Ambystoma mexicanum* (ajolote de Xochimilco), con lesiones que eran compatibles con un cuadro de saprolegniasis (Ver Tabla 1).

Tabla 1 Casos clínicos de ajolotes de Xochimilco

Casos de de <i>Ambystoma mexicanum</i>	Lesiones compatibles con <i>Saprolegnia spp</i>
<p>Caso clínico 1</p> <p>Lesiones algodonosa en las branquias</p>	 <p>Figura 9 caso clínico 1.</p>
<p>Caso clínico 2</p> <p>Crecimiento algodonoso en incisión quirúrgica</p>	 <p>Figura 10 Caso clínico 2.</p>

Caso clínico 3

Crecimiento algodonoso
en incisión quirúrgica

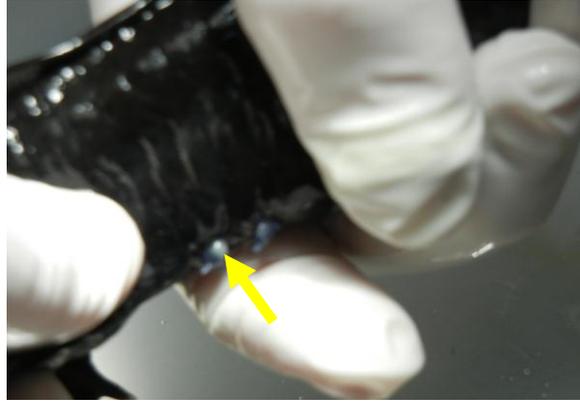


Figura 11 Caso clínico 3.

Caso clínico 4

Crecimiento algodonoso
en incisión quirúrgica

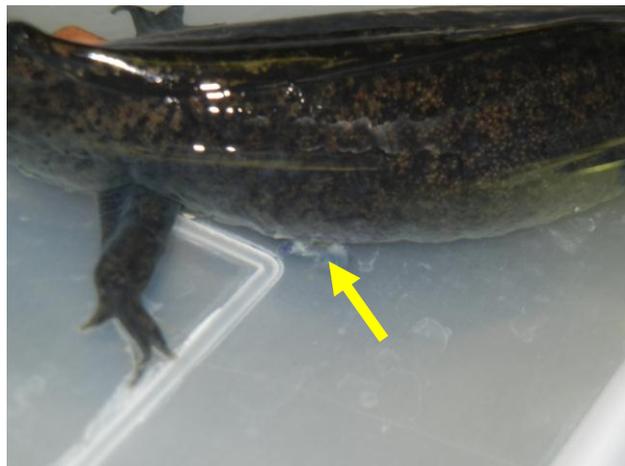


Figura 12 Caso clínico 4.

Caso clínico 5

Crecimiento algodonoso en incisión quirúrgica



Figura 13 Caso clínico 5.

Caso clínico 6

Fractura expuesta de la articulación femoro-tibial, con crecimiento algodonoso en la herida

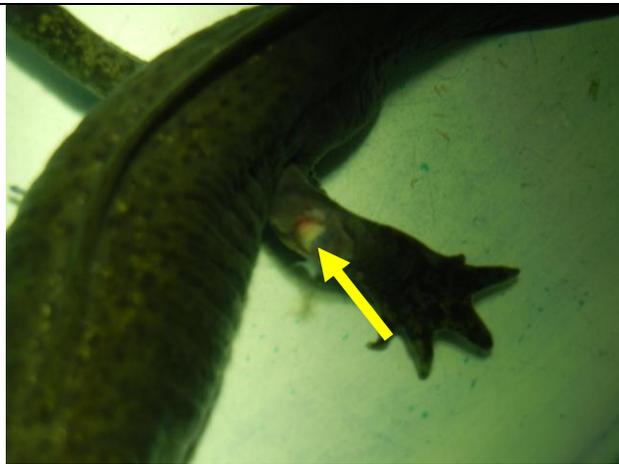


Figura 14 Caso clínico 6.

Caso clínico 7

Presentó un crecimiento algodonoso sobre un gran porcentaje de su cuerpo.



Figura 15 Caso clínico 7.

7.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Saprolegnia spp*

De las muestras obtenidas de casos clínicos compatibles con *Saprolegnia spp*, se aisló e identificó la cepa realizando observación directa, empleando cajas de Petri con agar dextrosa papa para su sembrado y cultivo, se observó el crecimiento de estructuras filamentosas de color blanquecino, característico de este hongo (Figura 13).

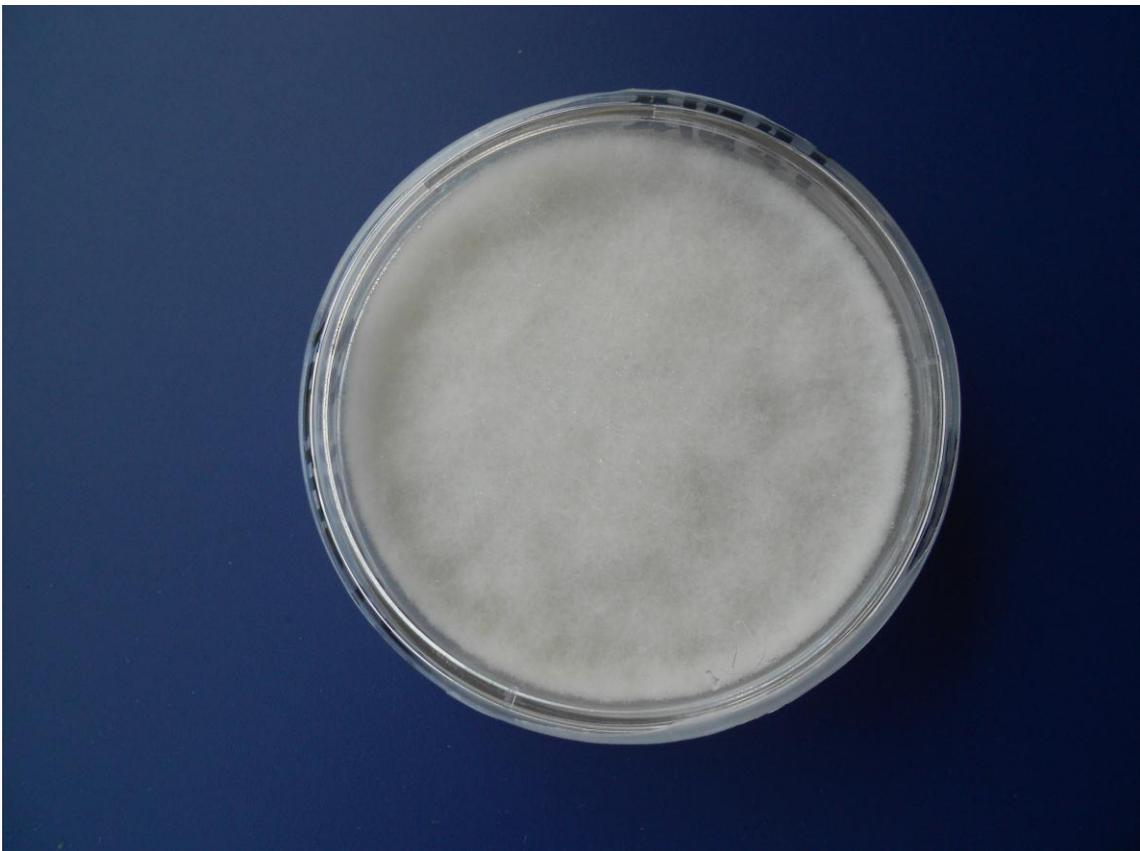


Figura 16 Crecimiento filamentosos y blanquecino de la cepa compatible con *Saprolegnia spp*. (Noguiera, 2012)

Se realizó la tinción de azul de lactofenol del cultivo obtenido de los casos compatibles con *Saprolegnia spp*, observándose a un aumento de 10x y 40x estructuras filamentosas sifonales que corresponden a las hifas de *Saprolegnia spp*. Además, del mismo modo, se observaron estructuras de forma esférica a piriforme que son sugerentes a zoosporas del mismo hongo (Figuras 14 y 15).

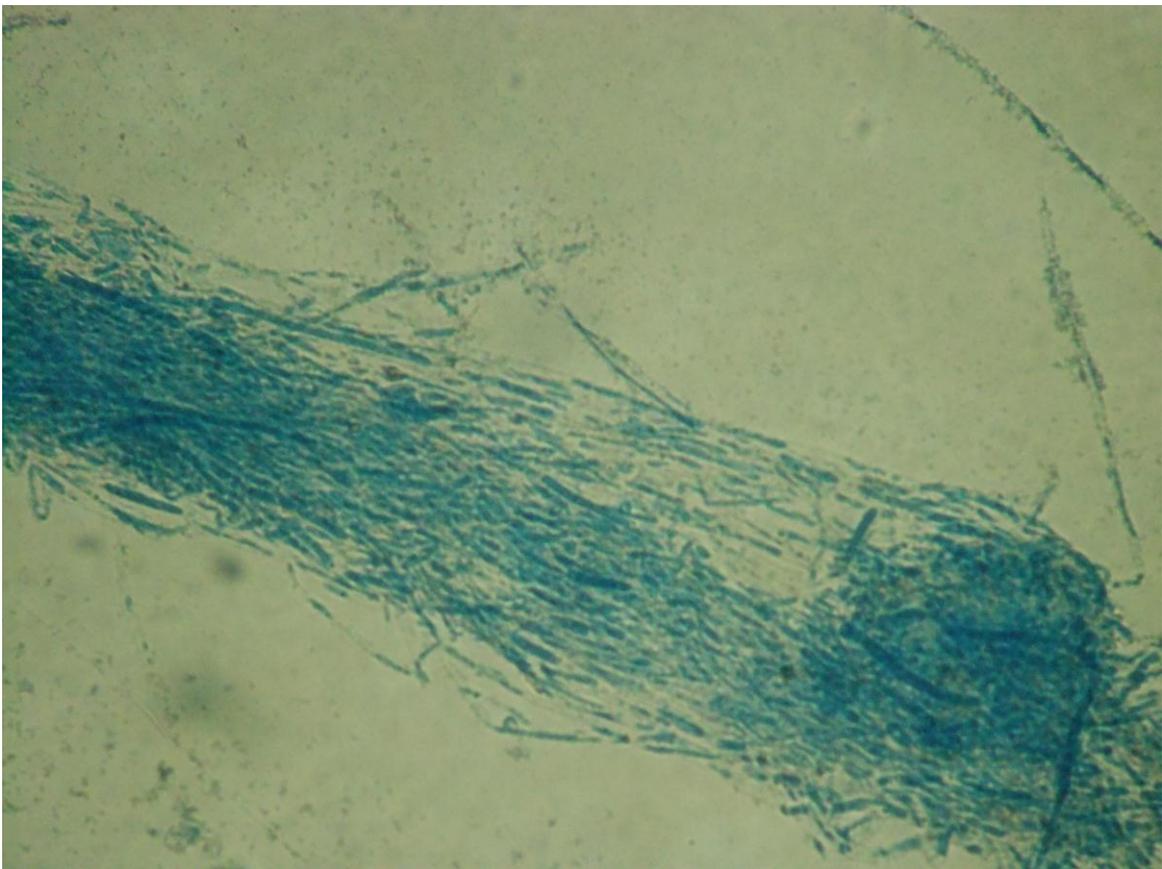


Figura 17 Zoospororas de *Saprolegnia spp* con tinción de azul de lactofenol a un aumento de 10x. (Nogueira, 2012)

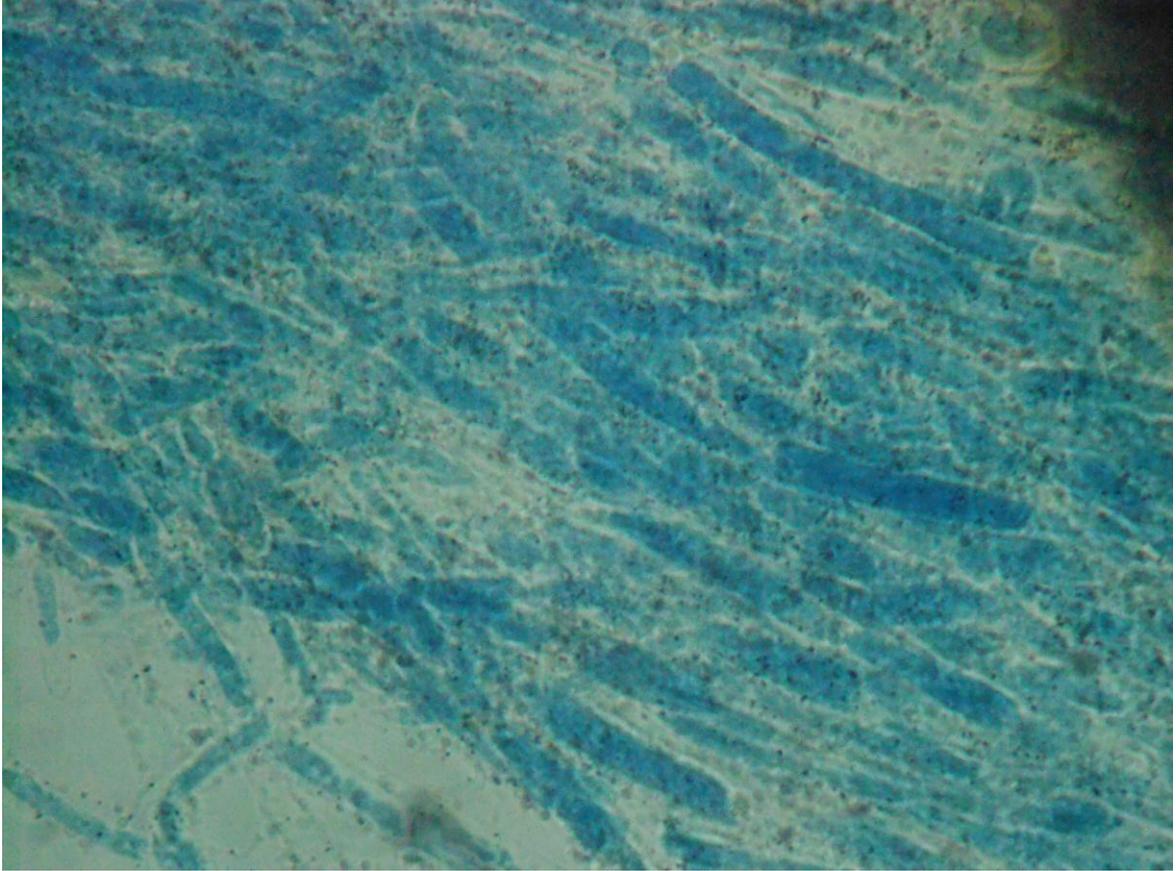


Figura 18 Zoospora de *Saprolegnia spp* con tinción de azul de lactofenol con un aumento de 40x. (Nogueira, 2012)

7.3 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL

Para esta prueba se colocaron los discos de papel impregnados con extracto hidrosoluble de propóleo a concentraciones de 2, 4 y 8mg/ml, pasadas 72 horas se realizó la lectura de la prueba cualitativa; observándose zonas de inhibición alrededor del micelio del hongo (Figuras 16 y 17).

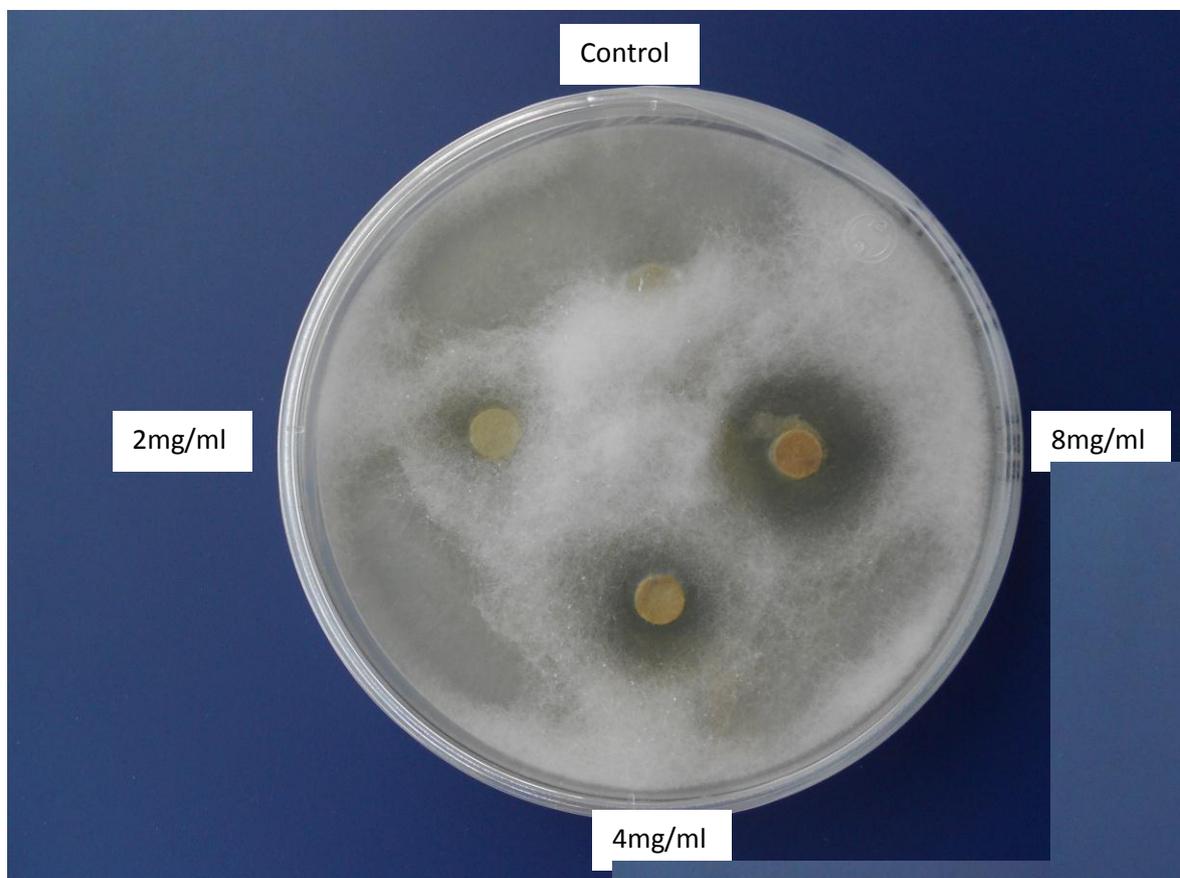


Figura 19 Inhibición del crecimiento de extracto hidrosoluble de propóleo zonas de inhibición y crecimiento control. (Nogueira, 2012)

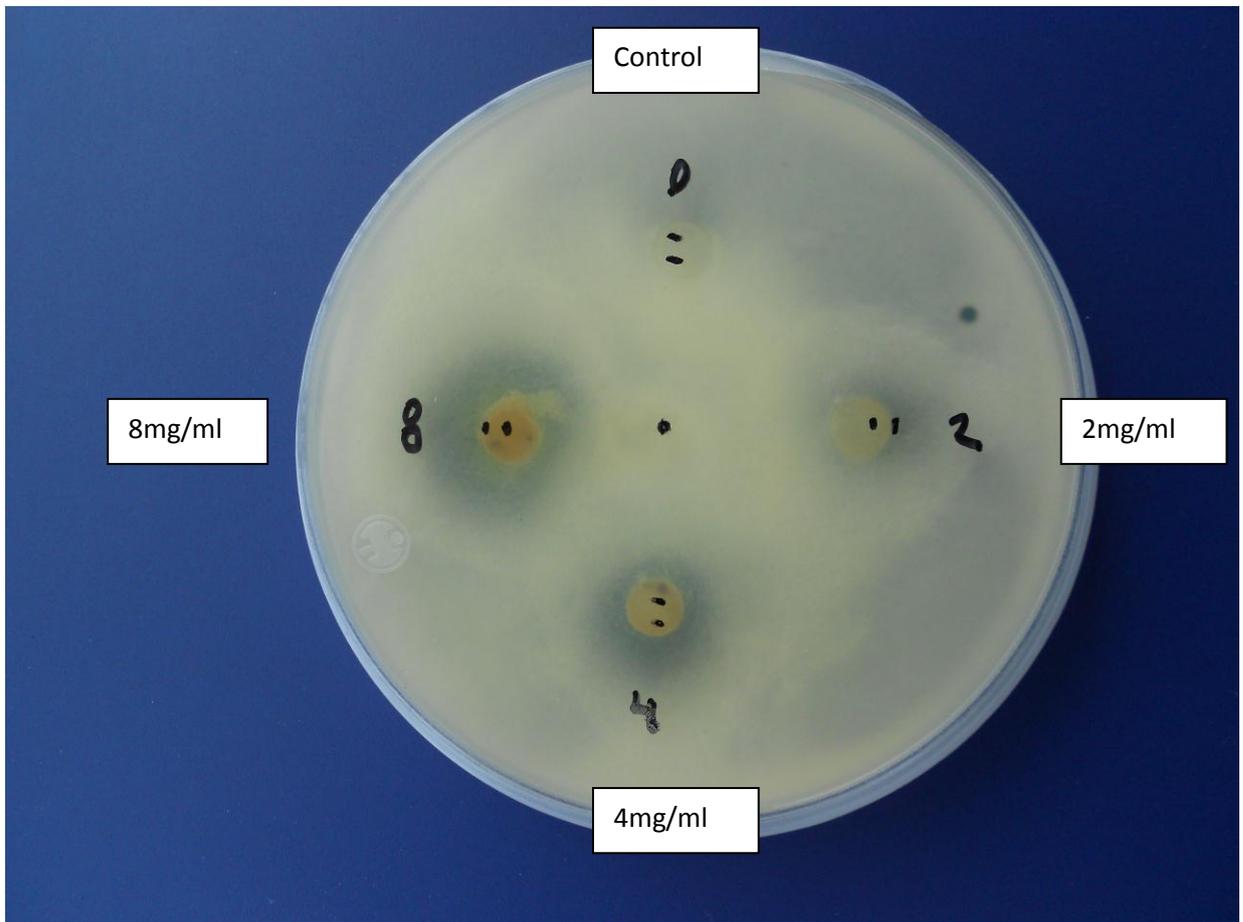


Figura 20 Inhibición del crecimiento radial con tres concentraciones de extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) (2,4,8 mg/ml) apreciando zonas de inhibición causadas por el propóleo y crecimiento del micelio sobre el disco control (D) (cara posterior de la caja). (Nogueira, 2012)

7.4 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM)

La lectura de los pozos se realizó en el tercer día después de realizada la prueba, se midieron los diámetros de las colonias que crecieron y se obtuvo el promedio de los tres pozos, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 1, 2 y 3).

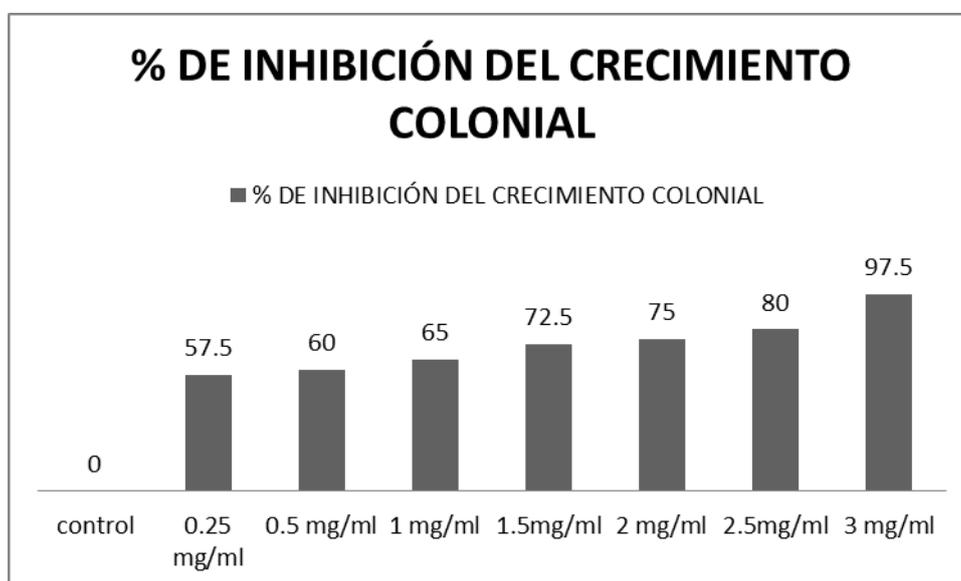
Tabla 2 Medición de los diámetros de las colonias de los 24 pozos para la prueba de CMI.

CONCENTRACION	CRECIMIENTO (cm)		
	pozo 1	pozo 2	pozo 3
control	1.6	0.8	1.6
0.25 mg/ml	0.5	0.6	0.6
0.5 mg/ml	0.5	0.5	0.6
1 mg/ml	0.5	0.4	0.5
1.5mg/ml	0.3	0.4	0.3
2 mg/ml	0.5	0.4	0.2
2.5 mg/ml	0.3	0.3	0.2
3 mg/ml	0.1	0	0

Tabla 3 Porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias

CONCENTRACION	% DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO COLONIAL
Control	0
0.25 mg/ml	57.5
0.5 mg/ml	60
1 mg/ml	65
1.5mg/ml	72.5
2 mg/ml	75
2.5mg/ml	80
3 mg/ml	97.5

Gráfico 2 Porcentaje de inhibición del crecimiento colonial de *Saprolegnia spp*, observándose una disminución gradual del crecimiento de la cepa conforme la concentración del EHP aumentó.



El pozo que corresponde al control creció en su totalidad midiendo 1.6 cm, por lo que se consideró el 100%. En los pozos con la concentración de 0.25 mg/ml se observó una reducción del crecimiento de las colonias, a partir de la concentración de 3 mg/ml no se observó un crecimiento significativo de la colonia (Tabla 4) (Gráfico 3).

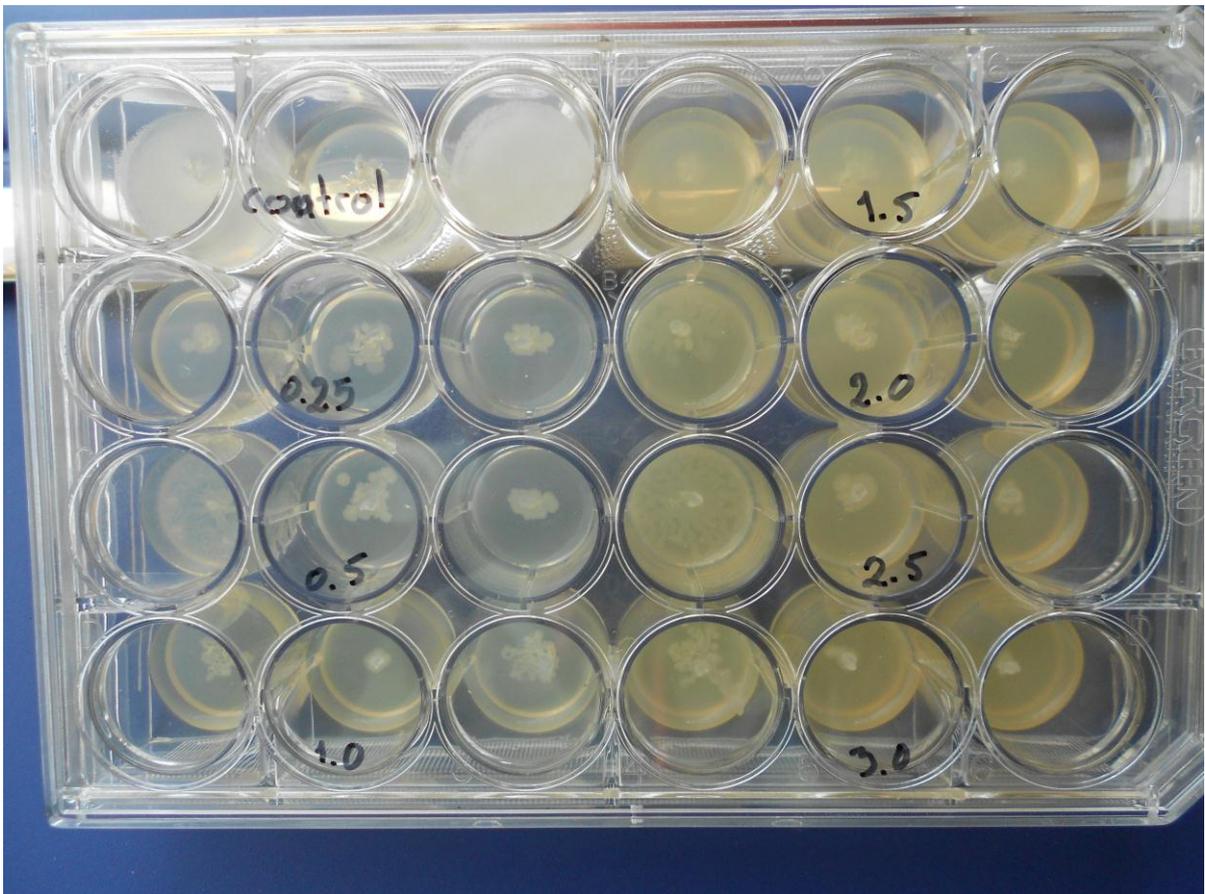


Figura 21 Placa de 24 pozos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se observó el crecimiento del hongo en los pozos correspondientes al control y reducción del crecimiento colonial conforme la concentración del extracto hidrosoluble de propóleo aumento. (Nogueira, 2012)

Tabla 4 Promedio del crecimiento de las colonias de *Saprolegnia spp* (cm) y porcentaje de crecimiento de las colonias en la placa de 24 pozos.

CONCENTRACION DE PROPÓLEO HIDROSOLUBLE (mg/ml)	PROMEDIO DIÁMETRO DE LAS TRES COLONIAS (CM)	% DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS
Control	1.33	100
0.25	0.56	42.5
0.5	0.53	40
1.0	0.46	35
1.5	0.33	25
2.0	0.36	27.5
2.5	0.26	20
3.0	0.03	2.5

Dilución en placa *Saprolegnia* spp

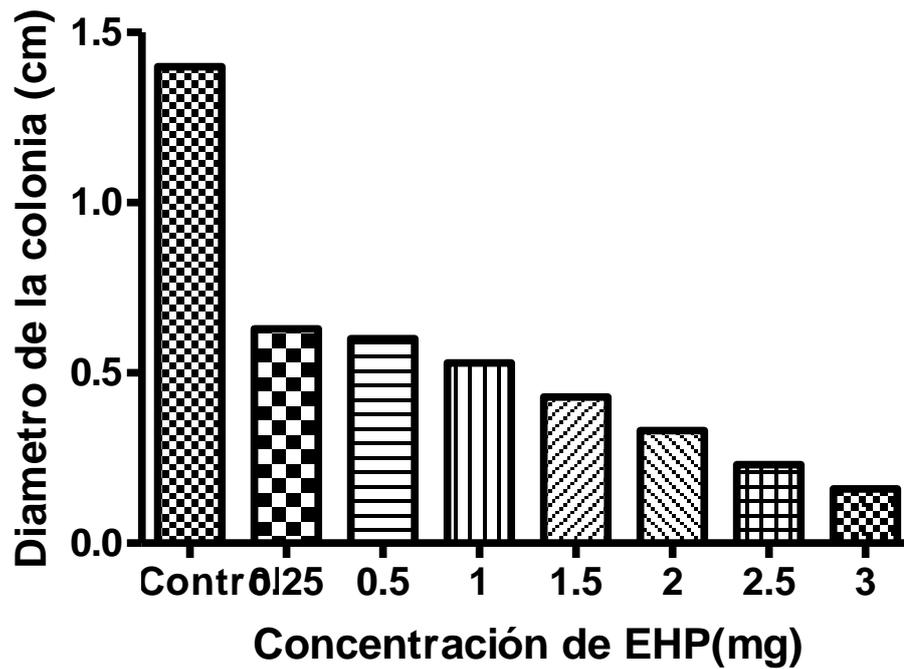


Gráfico 3 Dilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se demuestra el crecimiento del control y la manera que el crecimiento colonial disminuye conforme la concentración del extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) aumenta.

VIII. DISCUSIÓN

Los tratamientos convencionales empleados para el Saprolegniasis son efectivos en peces, ranas y sapos, pero en el caso de los ajolotes de Xochimilco son altamente irritantes para la piel, pudiendo causar lesiones como úlceras.

Al termino de este trabajo se logró demostrar que el propóleo tiene una actividad antimicótica contra *Saprolegnia spp*, inhibiendo el crecimiento a una concentración de 3 mg/ml.

Se observó en la prueba de inhibición de crecimiento radial *Saprolegnia spp* es sensible al extracto hidrosoluble de propóleo en las concentraciones de 2, 4 y 8 mg/ml, notando la presencia de medias lunas alrededor de los discos impregnados con el extracto.

En la prueba de concentración mínima inhibitoria realizada en microplaca desechable de 24 pozos, se observó que a la concentración de 3 mg/ml de extracto hidrosoluble de propóleo incapacita el crecimiento del hongo.

Dentro de la medicina veterinaria se ha demostrado la eficacia del propóleo en los tratamientos de algunas afecciones de en animales domésticos, como refiere Giral (2007) en el tratamiento de úlceras corneales inducidas en conejos, en afecciones oftálmicas en perros, mientras que la UNNE (2009) lo ha empleado en otitis caninas, y Londoño (2007) empleando propóleo para el tratamiento de tiña en bovinos, todos obteniendo resultados positivos en el manejo y tratamiento de las afecciones.

Por lo anterior se puede considerar una alternativa inocua el uso del extracto hidrosoluble del propóleo para el tratamiento de la Saprolegniasis en anfibios como lo es ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Tomando en cuenta que es preferible que el propóleo haya sido trabajado de manera hidrosoluble que en base etílica, evitando de esta una posible irritación sobre la piel de los anfibios.

IX. CONCLUSIÓN

Se evaluó la actividad antimicótica del extracto blando hidrosoluble de propóleo, obtenido de Toluca, Estado de México, que se realizaron sobre las cepas de *Saprolegnia spp* obteniendo resultados inhibitorios a una concentración de 3 mg/ml de propóleo.

En la prueba cualitativa de inhibición de crecimiento radial, determinó que en las concentraciones de 2, 4 y 8 mg/ml; mientras que en la prueba cuantitativa de concentración mínima inhibitoria en microplaca de 24 pozos, determinó que el propóleo actúa sobre *Saprolegnia spp* a una concentración de 3 mg/ml.

Por lo anterior se determinó que el propóleo disminuye el crecimiento del hongo, permitiendo ofrecer una alternativa inocua para los ajolotes de Xochimilco; se sugiere la estandarización y método de aplicación del propóleo para obtener resultados favorables en el tratamiento de esta enfermedad que afecta en su mayoría a los anfibios que se encuentran en cautiverio.

Bibliografía

Adams, Cory K. 2009. Threat of Saprolegnia to Southeastern amphibians sheet#6.

Aguilar, Roberto, y otros. 2010. *Atlas de medicina de animales exóticos* . s.l. : Bayer, Intermedica.

Arreola, Roberto. 2011. www.biodiversidad.gob.mx. [En línea] CONABIO.

Baitcman, Eric. 2008. *Amphibian medicine* . Tufts University : s.n..

Bartra, Roger. 2011. *Axolotiada, Vida y Mito de im anfibio mexicano*. s.l. : Fonde de Cultura Económica.

Bedascarrasbure, Enrique, y otros. 2006. *Propóleos, caracterización y normalización de propóleos argentinos*. s.l. : Magna.

Carrillo , Luis y Pavejeau , Lissette. 2007. *Guía de información global*. s.l. : Amphibian ark.

Fisher, Peter. 2005. *Unusual Pets Care Vol II*. s.l. : Education Network.

Foster, Aiden y Foil Carol. 2012. *Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos*. s.l.

Giral , T., Hugues, B. y Soto, C.J. 2007. *Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en tratamiento de las oftalmopatía en animales afectivos*. Cuba : Recvet.

[http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Ambystoma mexicanum/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Ambystoma_mexicanum/). 2012

Kelly, Ned. 2008.

<http://magylatina91.blogspot.mx/2008/05/la-neotenia-la-eterna-juventud-de-los.html>. *Biología en las clases: La neotenia: La eterna juventud de los anfibio*.

Londoño Orozco, Amparo. 2010. *Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propoleo mexicano y de tres plantas que Apis mellifera usa para su producción.* Cuautitlán Izcalli : s.n.

Maceda, Alberto y González, Irene. 2003. <http://alaquairum.net/saprolegnia.htm>.

Majchrzak, Amy. 2012. *Ambystoma mexicanum.* Michigan : Animal Diversity.

Maynero, Raul, Camargo, Arley y Da Rosa, Ines. 2008. *Anfibios. Sección de Zoología de Vertebrados.*

Meredith, Anna y Redrobe , Sharon. 2012. *Manual de animales exóticos . s.l.*

Meteyer , C.U. y Green , D.E. 2005. *Emerging disease in free-living amphibians, a National perspective.* Madisson, WI, USA : National Wildlife Health-Center.

Myers, P., y otros. 2013. Animal Diversity.

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Ambystoma_mexicanum/classification/#Ambystoma_mexicanum.

Romero Zarco, C. 2012. *Introducción a la Micología .* [En línea] Universidad de Sevilla.

<http://www.aloj.us.es/carromzar/Botanica I/Temas Botanica I/T5 Ameboides.html>.

Servín Zamora, Erika. 2010. *Ajolote de Xochimilco. .*

Sumano López, Héctor y Ocampo Cambreiros, Luis. 1997. *Farmacología Veterinaria.* s.l. : McGraw Hill.

UNNE, investigadores de la. 2009. *Actividad antrimicrobiana de extractos de propóleos para uso en tratamiento de la otitis canina, una enfermedad común en perros.* *portalveterinaria.*

Vazquez Covarrubias, Daniel A. 2011 *El genero Ambystoma en México*. México : IPN, Laboratorio de histología animal.

Wright, Kevin. 2001. *Amphibian medicine and captive husbandry*. s.l. : Krieger publishing company.

Yanucci, Humberto y del Estero, Santiago. 1998. *Propoleos*.

Zaror, L. y varios. 2004. *Saprolegnia parasítica en salmones y truchas del sur de Chile*. s.l. : ISSN 0301-732X, 2004. Vol. 36.

Zippel, Kevin. 2008. *Introduccion to Amphibians*.