



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA *in vitro* DEL PROPÓLEO MEXICANO SOBRE *Malassezia pachydermatis*

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
NELLY TOVARBETANCOURT

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CAROLINA MORENO RAMOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA C U

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO DICIEMBRE 2016.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue apoyado por los siguientes proyectos:

Proyecto UNAM PAPIIT IT 200915 “Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelisis del conejo, el distemper canino y la otitis canina”.

Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Apoyo CONACYT registro número 639757 mediante una beca de estudio.

Área de trabajo para el desarrollo del presente trabajo:

**Laboratorio 6** de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

**Laboratorio de Micología** del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM bajo la responsabilidad del Dr. Rubén López Martínez, la Bióloga Elva Bazán Mora y la Dra. Patricia Manzano.

**Laboratorio de Fitoquímica** de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a cargo de la Dra. Margarita Canales.

**Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM bajo la responsabilidad de la MC Sofía González Gallardo.

Los resultados parciales de este trabajo se han presentado en los siguientes foros académicos:

**VIII Congreso Internacional de Micología Médica**, celebrado los días 29, 30 y 31 de Octubre de 2015 en Acapulco, Guerrero. México.

**Reunión Internacional de Ciencias Veterinarias**, celebrado los días 1,2 y 3 de Junio de 2016 en la FMVZ, CU. México.

**IX Congreso del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**, celebrado los días 20 y 21 de Junio de 2016 en la FMVZ, CU. México.

**XII Congreso de Apicultores y 6º Congreso Cubano de Apicultura**, celebrado del 18 al 22 de Julio de 2016 en La Habana, Cuba.

**XXV Congreso de Ciencias Veterinarias**, celebrado del 3 al 7 de Octubre de 2016 en la Ciudad de Panamá

## **I. Resumen**

El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas producen. Los flavonoides y los ácidos fenólicos presentes en él, son los responsables de su actividad antimicótica. Por otro lado, la otitis canina externa es una inflamación del conducto auditivo, que representa entre el 5 y el 20 % de los motivos de consulta. El principal hongo productor de otitis externa canina es *Malassezia pachydermatis* (Mp)). Se evaluó el efecto *in vitro* del propóleo mexicano contra Mp, que fundamenta su posible uso clínico. Se obtuvo extracto etanólico de propóleo (EEP) proveniente del apiario de FES Cuautitlán, UNAM. Se trabajó con 9 cepas de Mp de origen canino proporcionadas por el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM y FES Cuautitlán, UNAM. Se les realizó la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial (ICR) utilizando discos estériles con 2, 4, 8 y 16 mg/ml de EEP y discos con 50 µg de ketoconazol (BIORAD 62866), 50 µg de clortrimazol (BIORAD 62816) 100 UI de nistatina (BIORAD 62856) y 1 µg voriconazol (BIORAD 62803). También se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima fungicida (MIF). Por último Mp fue tratada con EEP a una concentración de 25mg/ml para realizar Microscopia óptica (MO) con el fin de evaluar alteraciones en la morfología de la levadura. En la prueba ICR los diámetros de inhibición en todas las concentraciones de EEP fueron similares a los de nistatina y clortrimazol. El promedio de MIC fue de 0.15 mg/ml y MFC fue de 0.25 mg/ml. En la MO se encontraron alteraciones morfológicas de Mp tales como cambio de la forma clásica de Mp de “huella de zapato” a una forma redondeada, otras levaduras evidencian una disminución en su tamaño, lo anterior mediante análisis de imágenes fue estadísticamente significativo  $p < 0.0001$ , lo cual podrá sustentar el posible mecanismo de acción del EEP sobre Mp. En la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se observaron cambios estructurales en las levaduras de la cepa de referencia que recibieron tratamiento, se apreciaron superficies rugosas y ruptura de la superficie celular; en las levaduras de campo se observaron poros en la superficie celular y además la superficie fue más rugosa que la de referencia. En ambas cepas se observan estructuras esféricas atípicas a la morfología de Mp.

Los hallazgos fundamentan el desarrollo de una formulación tópica con propóleo mexicano como una alternativa en el tratamiento de la otitis canina, cuyos beneficios incluyen: ser un producto natural con actividad antimicótica de baja toxicidad.

Palabras clave: Propóleo, otitis canina, *Malassezia pachydermatis*.

## **II. Abstract**

Propolis is a resinous substance that is produced by honey bees. The flavonoids and the phenolic acids present on propolis are accountable for its anti-mycotic activity. In another hand, external canine otitis is an inflammation within the auditory canal in dogs; this condition is the cause of in between 5 and 20% of consults in clinic. The main cause of canine external otitis is the fungus *Malassezia Pachydermatis* (Mp). An evaluation in vitro of the Mexican propolis in a Mp culture was made in order to base its possible clinical use. An ethanolic extract was obtained from the propolis (EEP) produced in the FES Cuautitlan, UNAM apiary. Nine Mp strains of canine origin where obtained from the School of Medicine UNAM and the FES Cuautitlan UNAM mycology labs. A Radial Growth inhibition test (ICR) was done using the 9 Mp strains and sterile disks saturated with 2, 4, 8 and 16 mg/ml of EEP, 50µg ketoconazole (BIORAD 62866), 50µg clotrimazole (BIORAD 62816), 100 UI nystatin (BIORAD 62856) and 1µg voriconazole (BIORAD 62803). Also it was obtained the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MIF). Finally Mp plates were treated with a 25mg/ml concentration EEP in order to evaluate morphologic alterations of the yeast under optic microscopy (MO). In the ICR test the inhibition diameters in all the concentration of EEP were similar to those of the nystatin and clotrimazole. The MIC average was 0.15 mg/mL and the MFC average was 0.25 mg/mL. During the optic microscopy observation, morphologic alterations were perceived, from the classic Mp shape of “shoe print” to a more rounded shape, some other yeast samples showed a decrease in size. After an imagen analysis the observed changes had a statistical significance of  $p < 0.0001$  which could support the possible action mechanism of EEP over Mp. During the electron microscope observation, structural changes were observed on the reference strain yeast that received treatment. Some of these changes were: Roughness and rupture of cellular surfaces. On the samples with the field yeast the observed changes were pores on the cellular surface and a rougher surface comparing with reference sample. In both samples Mp atypical spherical morphology was observed. These findings support the development of a topical formulation containing Mexican propolis as an alternative in the canine otitis treatment with the benefit of being a natural product with antimitotic properties and low toxicity.

Key word: Propóleo, otitis canina, *Malassezia pachydermatis*.

### III. Índice de figuras

Figura 1 Cromatógrafo de gases acoplado a masas.....	17
Figura 2 Anatomía del oído canino.....	19
Figura 3 Otitis canina eritemato-ceruminosas.....	24
Figura 4 Organigrama para enfocar el diagnóstico y tratamiento de la otitis canina.....	25
Figura 5 Tinción de Gram de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	27
Figura 6 Mecanismo de acción de los antifúngicos.....	30
Figura 7 Diferentes estadios de <i>Malassezia pachydermatis</i> , microscopía electrónica de barrido 600x.....	37
Figura 8 Microscopía electrónica de barrido de <i>Cryptococcus neoformans</i> posterior al tratamiento con propóleo.....	37
Figura 9 Microscopía electrónica de barrido de <i>Candida albicans</i> posterior al tratamiento con propóleo.....	38
Figura 10 TIC correspondiente al análisis químico del propóleo de FES Cuautitlán mediante cromatografía de gases acoplado a masas.....	53
Figura 11 Prueba de inhibición de crecimiento radial de <i>Malassezia pachydermatis</i> en SDA .....	56
Figura 12 Controles negativos de la prueba de inhibición de crecimiento radial de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	56
Figura 13 Gráfica comparativa entre los antifúngicos y propóleo.....	57
Figura 14 Prueba de Concentración inhibitoria mínima en tubo con caldo Sabouraud, concentraciones de propóleo de 0.25 mg/ml a 3 mg/ml.....	58
Figura 15 Prueba de Concentración inhibitoria mínima en tubo con caldo Sabouraud concentraciones de propóleo de 0.10 mg/ml a 0.20 mg/ml.....	58
Figura 16 Prueba de concentración fungicida mínima de la cepa ATCC 14522 y de campo número 9.....	60
Figura 17 Tinción de Gram 100x de <i>Malassezia pachydermatis</i> con y sin tratamiento de propóleo.....	62
Figura 18 Gráfica comparativa del efecto de propóleo sobre el ancho de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	63



Figura 19 Gráfica comparativa del efecto de propóleo sobre la longitud de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	63
Figura 20 Microscopía electrónica de barrido de la cepa ATCC 14522 de <i>Malassezia pachydermatis</i> sin tratamiento con propóleo (A).....	64
Figura 20 Microscopía electrónica de barrido de la cepa ATCC 14522 de <i>Malassezia pachydermatis</i> sin tratamiento con propóleo (B).....	65
Figura 21 Microscopía electrónica de barrido de la cepa ATCC 14522 de <i>Malassezia pachydermatis</i> con tratamiento con propóleo (A-B).....	66
Figura 22 Microscopía electrónica de barrido de la cepa ATCC 14522 de <i>Malassezia pachydermatis</i> con tratamiento sin propóleo (A-B).....	67
Figura 23 Microscopía electrónica de barrido de la cepa de campo de <i>Malassezia pachydermatis</i> sin tratamiento con propóleo (A-B).....	68
Figura 24 Microscopía electrónica de barrido de la cepa de campo de <i>Malassezia pachydermatis</i> con tratamiento con propóleo (A-B).....	69
Figura 25 Microscopía electrónica de barrido de la cepa de campo de <i>Malassezia pachydermatis</i> con tratamiento con propóleo (A-B).....	70
Figura 26 Posible actividad biológica del propóleo mexicano de FES Cuautitlán (en base a su composición química) que permite la recuperación clínica de pacientes con otitis canina.....	72
Figura 27 Propuesta del mecanismo de acción del efecto antimicótico del propóleo de FES Cuautitlán sobre <i>Malassezia pachydermatis</i> tomando en consideración que pinocembrina, ácido benzoico y sus derivados fueron los compuestos de mayor abundancia en el análisis químico. ....	76

#### IV. Índice de cuadros

Cuadro 1 Composición cualitativa de propóleo.....	13
Cuadro 2 Causas de otitis canina.....	21
Cuadro 3 Uso de propóleo en perros.....	36
Cuadro 4 Cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> utilizadas para evaluar el efecto antimicótico del propóleo de FES Cuautitlán.....	43
Cuadro 5 Diferentes tiempos de incubación de <i>Malassezia pachydermatis</i> en AD y SDA a 33°C para determinar el tiempo óptimo de crecimiento de la levadura.....	44
Cuadro 6 Antifúngicos de uso frecuente para el tratamiento de la otitis canina....	45
Cuadro 7 Compuestos de mayor coincidencia encontrados en el análisis químico de la muestra de propóleo de FES Cuautitlán mediante cromatografía de gases acoplado a masas.....	51
Cuadro 8 Carga de antifúngicos expresada en miligramos .....	54
Cuadro 9 promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por los antifúngicos convencionales y propóleo.....	55
Cuadro 10 Lectura de la prueba de la concentración inhibitoria mínima de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	59
Cuadro 11 Lectura de la prueba de la concentración fungicida mínima de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	59
Cuadro 12 Compuestos de mayor abundancia en el EEP de FES Cuautitlán.....	75

# INDICE

<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1 PROPÓLEO.....	1
1.2 USOS DENTRO DE LA COLMENA.....	2
1.3 COMPOSICION QUIMICA DEL PROPOLE.....	2
1.4 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLE.....	4
1.5 MODO DE ACCIÓN DE PROPÓLEO.....	7
1.6 OTITIS CANINA.....	7
1.6.1 ANATOMÍA.....	7
1.6.2 ETIOPATOGENIA DE LA OTITIS EXTERNA.....	9
1.6.3 SIGNOS CLINICOS.....	13
1.6.4 DIAGNÓSTICOS.....	14
a) OBSERVACION DIRECTA.....	15
b) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.....	16
1.6.5 TRATAMIENTO.....	17
1.7 ANTIFUNGICOS.....	17
1.8 ANTECEDENTES DEL USO DE PROPÓLEO EN CANINOS.....	19
1.8.1 Neoplasias.....	19
1.8.2 Microorganismos.....	20
a) Bacterias.....	20
b) Levaduras.....	21
c) Dermatofitos.....	22
1.8.3 Estimulante de la inmunidad.....	22
1.8.4 Enfermedad paradontal.....	23
1.8.5 Oftalmopatias.....	24
1.9 ANTECEDENTES DEL EFECTO ANTIMICÓTICA DEL PROPÓLEO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	26
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	30

<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	31
6.1 Perfil Químico.....	32
6.2 Evaluación de Actividad Antifúngica.....	32
6.2.1 Microorganismos utilizados.....	32
6.2.2 Prueba de sensibilidad cualitativa:.....	33
Prueba de inhibición de crecimiento radial.....	33
6.2.3 Prueba de sensibilidad cuantitativa:.....	35
Prueba de la concentración inhibitoria mínima (CIM) .....	35
Prueba de la concentración fungicida mínima (CFM).....	36
6.3 Microscopía óptica.....	36
6.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	37
6.5 Análisis estadístico.....	37
<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1 Perfil Químico.....	40
7.2 Prueba de sensibilidad cualitativa:.....	43
7.2.1 Prueba de inhibición de crecimiento radial.....	43
7.3 Prueba de Sensibilidad Cuantitativa:.....	46
7.3.1 Prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	46
7.3.2 Prueba de la Concentración Fungicida Mínima (CFM).....	48
7.4 Microscopía óptica.....	50
7.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	53
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	60
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	66
<b>11. ANEXOS</b>	
1. Publicación.....	68
2. Medio Dixon.....	69

## 1. INTRODUCCION

Las enfermedades micóticas representan un reto en la práctica clínica y a pesar de que se han empleado una gran variedad de tratamientos, estos aún presentan ciertos inconvenientes:

- Existen cepas de hongos que han desarrollado resistencia.
- El número de antimicóticos desarrollado por la industria farmacéutica es menor en comparación con los antibióticos.
- Los tratamientos antifúngicos suelen ser costosos.
- El paciente puede sufrir daño debido a los tratamientos prolongados [18].

Lo anterior justifica el estudio de las enfermedades micóticas y el desarrollo de tratamientos alternos [44].

### 1.1 PROPÓLEO

El propóleo es una sustancia que ha sido ampliamente estudiada por su actividad antimicrobiana, principalmente se ha demostrado su efectividad antibacteriana y antimicótica por lo que se considera que es una excelente alternativa de tratamiento [25].

Es una sustancia resinosa que varía de color pudiendo ser verde parduzco hasta negro dependiendo de su origen botánico y de la presencia de flavonoides. Ocupa un lugar en la historia, los antiguos egipcios lo utilizaron para embalsamar cadáveres y del griego se origina la palabra **propóleo** que significa **pro** -delante o antes y **polis**-ciudad por lo que significa "**protección de la ciudad**" esto haciendo alusión a la forma en que las abejas lo colocan a la entrada de la piquera [29].

El propóleo es recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) de las sustancias resinosas exudadas de las yemas y cortezas de algunas plantas y árboles, posteriormente lo fraccionan con sus mandíbulas y lo humedecen con la lengua para transportarlo a la colmena.

Se piensa que las abejas participan activamente en la formación del propóleo al mezclar la cera y las resinas con la enzima **13-glicosidasa** presente en su saliva, esto provoca la hidrólisis de los **flavonoides glicosados** en **flavonoides agliconas**, esto es importante ya que la mayoría de los flavonoides identificados en los propóleos poseen agliconas, mientras que en materiales vegetales se presenta como glucósidos, estos últimos son descompuestos y convertidos en propóleo y alimentos según las necesidades de las abejas [25, 29].

Debido a la participación de la abeja, la composición del **propóleo** difiere de las resinas vegetales, puede considerarse un **producto de origen mixto**, vegetal y animal [25].

## 1.2 USOS DENTRO DE LA COLMENA

Dentro de la colmena las abejas fraccionan el propóleo y lo utilizan para tapar huecos y grietas, construyen barreras en la piquera para protección de cambios climáticos interrumpiendo la entrada de luz y así evitar la pérdida del vapor de agua requerido para el desarrollo de las larvas, también es una barrera protectora contra bacterias y otros microorganismos nocivos para la colmena.

Esto último es muy importante porque la temperatura interna de la colmena es de aproximadamente 34°C con una humedad superior a 65% creando así un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos que podrían ser un riesgo para la población, sin embargo, los constituyentes del propóleo actúan reduciendo las enfermedades en la colonia. También es usado para embalsamar cadáveres de intrusos que las abejas no pueden retirar de la colmena, evitando su putrefacción y la aparición de enfermedades [29].

## 1.3 COMPOSICION QUIMICA DEL PROPÓLEO

El propóleo es una sustancia soluble en solventes orgánicos como el alcohol, el benceno, la acetona y el éter por ello se han utilizado para extraer sus compuestos químicos estructurales [35].

Su composición química es muy compleja y han sido identificados más de 150 constituyentes, las diferencias en la composición están determinadas por:

- La flora del área ecológica.
- Los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas.
- Microorganismos presentes en el entorno geográfico.
- Factores climatológicos.
- Técnica de obtención.

Cualitativamente numerosas sustancias se encuentran en el propóleo de modo constante y relativamente estable (Cuadro 1) [40].

Composición	Porcentaje
Cera	30%
Resinas y bálsamos	50%
Aceites	10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

*Cuadro 1 Composición cualitativa del propóleo*

La composición química del propóleo determina la calidad del mismo, se sabe que los **compuestos fenólicos** representan más de 50% de su peso total y son los responsables de conferir su **actividad biológica** [7]. Es importante aclarar que antes de calificar un propóleo como bueno o malo se debe tomar en cuenta el fin para lo que se utilizará, ya que no hay propóleos de mala calidad.

La composición cualitativa principal del propóleo puede resumirse en:

- a. Aminoácidos; se considera que son aportados por las abejas a través del polen.
- b. Ácidos aromáticos y ésteres; principalmente **ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico**.
- c. Flavonas y flavononas; tienen elevada actividad biológica, resaltan la **pinocembrina, quercitina, galangina, pinostrobin, sakuranetina y crisina**.
- d. Terpenoides; son los responsables del aroma del propóleo y destacan el **limoneno, cimeno y estireno**.

## **FENOLES Y FLAVONOIDES**

Algunas plantas relacionadas con la actividad de la ***Apis mellifera*** desarrollan rutas metabólicas a través de las cuales sintetizan y utilizan ciertos compuestos orgánicos para combatir daños químicos y para atacar microorganismos patógenos.

Cuando se presenta alguno de los anteriores la planta comienza la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular conocidos como **metabolitos secundarios** los cuales son necesarios para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular [37]. Dentro de los metabolitos secundarios o productos naturales de interés asociados a la calidad de los propóleos están los **flavonoides** [42]

El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivos matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas [29].

Los flavonoides junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres genéricamente son denominados “compuestos fenólicos” ya que contienen un grupo fenol, químicamente están formados por una estructura básica de 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de tres átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos oxidrilos, metilos, azúcares, etc.,

generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides como: **flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides** [7].

De los flavonoides con **acción antimicótica** destacan el **Kaempferol-7,4'-dimetil-éter, Ermanina, Galangina, Pinocembrina** (de importancia en México), **Pinobanksina, Pinobanksina-3-acetato** [46].

#### **1.4 METODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO**

La importancia del propóleo como “arma química” de las abejas para proteger a la colmena de microorganismos patógenos, ha atraído la atención de numerosos científicos quienes por más de 30 años han publicado sobre la composición química, la actividad biológica y farmacológica del propóleo [23].

Químicamente, los propóleos se han estudiado por cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Sin embargo, debido a la baja reproducibilidad de estos métodos, actualmente se recomienda el uso de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [4, 35].

Una variante metodológica por electro-aspersión se ha ensayado recientemente, tanto para determinar los patrones como las cantidades de compuestos polifenólicos de los propóleos. Uno de los mejores métodos de detección se obtiene por resonancia magnética nuclear, ya que detecta compuestos sensibles o insensibles a la luz ultravioleta. Además, los métodos quimiométricos son cada vez más comunes en la literatura y se prevé la posibilidad de detectar adulteraciones [48].

Por otra parte, la preparación de la muestra es de suma importancia para garantizar el éxito del análisis, por lo que los métodos empleados para la extracción de compuestos del propóleo requieren una adecuada estandarización. Un método de extracción innovador es mediante altas presiones hidrostáticas (HHP), con este se logra extraer eficientemente los flavonoides, disminuyendo considerablemente el tiempo de extracción [35].

Los métodos por cromatografía de gases y de alta eficiencia aportan información definitiva en la caracterización de las muestras, pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento y la participación de personal con formación específica en el área instrumental [35].

En cambio, los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiados en las determinaciones de rutina, aunque presenten limitaciones en la sensibilidad y especificidad [48].



## **CROMATOGRAFIA DE GASES MASA**

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis cualitativo, para la determinación de estructuras orgánicas. Está basada en la obtención de iones mediante un bombardeo electrónico a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa.

El espectrómetro debe cumplir con las siguientes partes para realizar el análisis:

1. Sistema de inducción de muestras.
2. Fuente de iones.
3. Analizador para la separación de iones.
4. Sistema detector y registrador.

Para introducir la muestra es indispensable la vaporización de la misma a una presión de vapor igual o superior a  $10^{-6}$  mm de mercurio y a una temperatura que la muestra no pirolíce. Debido a que el propóleo es una mezcla de compuestos, la muestra en cuestión debe ser introducida a partir de un cromatógrafo.

Una vez obtenidos los iones, se separan de acuerdo con su masa y carga con la ayuda de una placa con carga positiva para repeler los iones y expulsarlos fuera del haz de electrones y ser detectados por medio de un dispositivo adecuado. Las moléculas ionizadas procedentes de un proceso primario que tengan un mayor contenido de energía, se podrán descomponer originando diversos procesos secundarios y de los procesos secundarios que tengan un alto contenido de energía se podrán descomponer a procesos terciarios. Esto hace notar que el ion de mayor masa posible, sea el ion molecular, que al ser detectado, originará en el espectro el llamado “**pico molecular**”, el pico molecular permite lograr la identificación del compuesto con base en su peso molecular. Al detectarse una señal se traducen en forma de una banda en el cromatograma.

Durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, con lo que la muestra se destruye y no puede recuperarse, esto no es un inconveniente ya que la cantidad de muestra que requiere el análisis es del orden del  $\mu\text{g}$ .

Cuando se trabaja con sistemas acoplados de cromatografía de gases a espectrometría de masas, éste último se utiliza como una “**huella química**” comparando los espectros de masas obtenidos con los espectros de compuestos patrón. Los ordenadores que controlan a los espectrómetros de masas actuales, están dotados de sistemas muy eficaces de búsqueda en bibliotecas informatizadas (figura 1) [39].

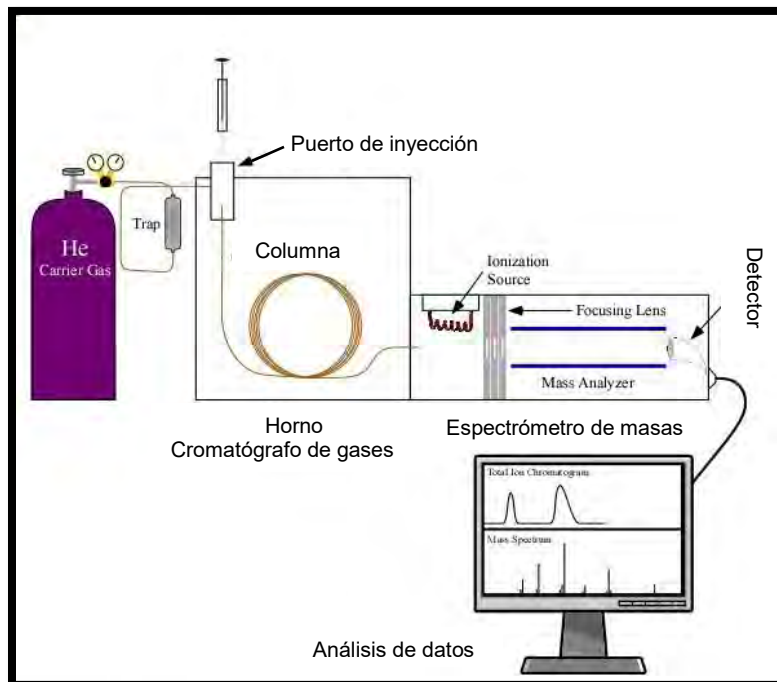


Fig. 1 Cromatógrafo de gases acoplado a masas

Un grupo de investigadores de FES Cuautitlán, UNAM realizó la caracterización química de diferentes muestras de extractos de propóleo Mexicano, recuperados de diferentes estados de la republica con la técnica GC-MS. Afirmando que el propóleo es una sustancia que contiene un gran número de compuestos, principalmente metabolitos secundarios de los flavonoides o de algún tipo de terpenos. En las muestras que fueron analizadas, se encontraron 33 compuestos en el propóleo del Estado de México, 42 en el de Puebla, 48 en el de Guanajuato, 42 en el de Querétaro y 16 en el de Veracruz. Es importante mencionar que el número de compuestos presentes en los propóleos no es necesariamente significativo en términos de actividad biológica ya que ésta depende de la naturaleza química de los componentes y su concentración en cada una de las muestras [44].

El propóleo es altamente utilizado por su variada actividad biológica, como lo refieren las revisiones de las actividades biológicas realizadas por Bankova, 2005 y Bogdanov, 2016 entre las que destacan, la antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, antifúngica, anestésico, inmunomodulador y antitumoral. [3, 6]

No hay un compuesto exacto responsable que ejerza estas múltiples actividades, diferentes estudios sugieren que hay una sinergia entre todos los componentes, pudiendo así eliminar virus como el de la influenza aviar, bacterias como *Staphilococcus aureus* y levaduras como *Malassezia pachydermatis*; esta última considerada como uno de los principales agentes causante de otitis recurrentes o crónicas en perros y gatos [24].

## **1.5 MODO DE ACCION DE PROPÓLEO**

A pesar de que muchos estudios se han concentrado en demostrar la actividad antimicótica del propóleo, pocos han demostrado su efecto sobre la morfología y estructura de los hongos.

En un estudio realizado por Londoño, 2010, se demostró a través de microscopía óptica que el EEP causa un importante daño celular en *Candida albicans*, inhibiendo la formación de tubo germinativo y deformación de algunas levaduras en presencia de 0.25 mg/ml de EEP.

En el mismo estudio al observar micrografías electrónicas de transmisión de secciones ultrafinas de *C. albicans* ATCC 10231, se identificó la formación de gránulos de almacenamiento además de alteración y ruptura de las estructuras de la cubierta externa de la levadura.

Lo anterior sugiere que el EEP debilita a la célula fúngica alterando la membrana celular y/o la pared celular.

## **1.6 OTITIS CANINA**

La otitis canina es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica que puede afectar el pabellón auricular, el conducto auditivo externo y el tímpano. El pabellón auricular y el conducto auditivo constituyen el oído externo y están recubiertos de piel, por esta razón, las otitis externas deben ser consideradas como problemas dermatológicos. Se estima que la frecuencia de otitis externa en el perro va del 10–20% de la población canina y resulta menos frecuente en los gatos (del 2 al 6%) [32].

Esta afección representa todo un reto para el clínico de pequeñas especies ya que debe dársele una resolución rápida y eficaz para evitar consecuencias (p. e. Otohematoma, rotura timpánica y hasta amputación del oído afectado) que deterioren la salud del paciente, ya que en muchos de los casos el paciente pasa de tratamiento en tratamiento sin tener buenos resultados y así se va incrementando el costo de la atención médica [33].

### **1.6.1 ANATOMIA**

Para entender la importancia de dar resolución al problema de la otitis es de necesario saber cómo está conformado y cómo funciona el sistema auditivo de los caninos. El oído es un órgano complejo que cubre dos funciones vitales:

- A. Oír (percepción del sonido)
- B. Equilibrio (mantenimiento de la posición corporal)

Con respecto a la función y basado en la anatomía, el oído se divide en tres partes:

1. Oído externo, es receptor de sonidos.
2. Oído medio, convierte las ondas sonoras en vibraciones mecánicas.
3. Oído interno, en el cual las vibraciones mecánicas son transformadas en impulsos eléctricos reconocidos por el centro de la audición en el cerebro.

El oído externo comienza con el pabellón auricular y el conducto auditivo externo (CAE) vertical que están formados por el cartílago auricular. Éste comienza en el orificio externo del oído y se enrolla en forma de embudo, transformándose en un túnel a medida que alcanza las porciones inferiores del CAE. El CAE tiene una longitud variable (5-10 cm) y se divide en las porciones vertical y horizontal, se continua hasta alcanzar la membrana timpánica; ésta forma en “L”, complica la eliminación natural de sustancias anormales del canal auditivo. El lumen del conducto auditivo tiene un diámetro de 0.5 – 1cm. (Figura 2)

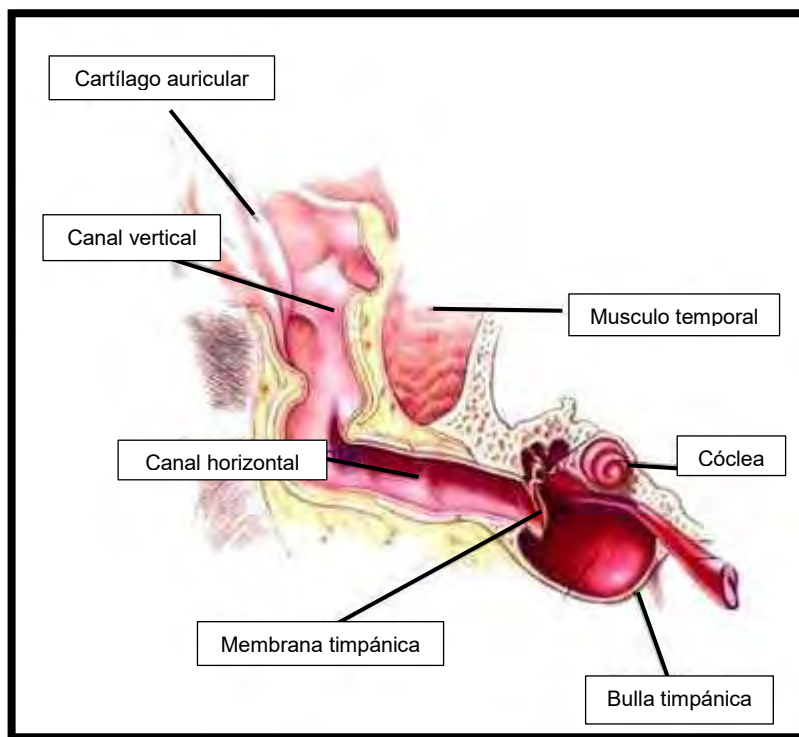


Figura 2 Farina E, 2013. Ilustración de la anatomía del oído canino [Figura]. Recuperada de [psicolmascot@gmail.com](mailto:psicolmascot@gmail.com)

La piel que recubre el conducto auditivo es una superficie relativamente lisa, tiene una epidermis delgada y una dermis que posee anexos (folículos pilosos y glándulas sebáceas y ceruminosas). El conducto vertical tiene más anexos que el conducto horizontal, está establecida una asociación entre el desarrollo de una otitis externa y la densidad de glándulas ceruminosas.

La piel y los anexos generan de manera constantes células exfoliantes y secreciones glandulares. Estos materiales generan la cera ótica y el cerumen, que al perecer tiene una función protectora ya que se han identificado en el cerumen canino inmunoglobulinas A, G y M. La más predominante en oídos sanos y enfermos es la Ig G y cuando hay otitis hay un incremento significativo.

El conducto auditivo tiene un mecanismo de limpieza a través del movimiento de la epidermis o migración de células epiteliales, contribuyendo a la salida del cerumen, bacterias, levaduras y detritus.

La membrana timpánica separa el oído externo del oído medio, está ubicada en posición medial, al examen otoscopio tiene forma cóncava y en la parte dorsal un área blanca en forma de “C”, donde se inserta el manubrio del hueso martillo.

El oído medio consiste en la cavidad, la pared media de la membrana timpánica, los huesos auditivos (martillo, yunque, estribo), ligamentos, músculos y nervios asociados y por último el tubo auditivo. En el oído normal la única comunicación entre el oído medio y el ambiente externo es a través del tubo auditivo (por ello se dificulta la llegada de aire a estas estructuras lo que predispone que el oído se enferme).

La cavidad timpánica se divide en tres partes: dorsal, media y ventral; la porción ventral es la porción más grande y cuando se produce otitis media esta parte actúa como reservorio para atrapar detritus y toxinas. Ésta es la porción menos accesible para examinar y si hay de por medio un tímpano roto se dificulta aún más el examen [33].

### **1.6.2 ETIOPATOGENIA DE LA OTITIS EXTERNA**

En el curso de las otitis externas, el CAE alterado se vuelve un sitio favorable para la multiplicación de los agentes patógenos. Se observa en particular un estrechamiento de la luz del CAE y una disminución de la migración epitelial fisiológica. Por otra parte la inflamación favorece la formación de un edema que provoca un exudado. Además las glándulas ceruminosas incrementan su actividad y adoptan un aspecto quístico.

Esto promueve una disminución de la fracción lipídica del cerumen por dilución en las secreciones apócrinas. Todos estos acontecimientos son responsables de un aumento de la humedad en el conducto y disminuye la función bacteriostática del cerumen. Por lo anterior todos los agentes patógenos (bacterias, levaduras y parásitos) pueden dañar a los queratinocitos del CAE y favorecer la acumulación de restos en el lumen.

La otitis externa es un problema complejo, es un signo de muchas enfermedades y no es un diagnóstico específico, además de que tiene diferentes causas. El sistema de clasificación más adecuado las divide en:

- Causas predisponentes.
- Causas primarias o secundarias.
- Causas perpetuantes.

En la mayoría de los casos crónicos está presente más de una causa (cuadro 2). En cada paciente, se deben identificar todos los factores que sean posibles como contribuyentes a la otitis. Muchas otitis crónicas tienen al menos una causa primaria y varios factores perpetuantes y la falta de reconocimiento y corrección de ellos puede fomentar fracasos terapéuticos.

Cada paciente y cada oído se deben considerar de forma individual adaptando la terapia para cada uno de ellos. En el 50% de los casos crónicos, la membrana timpánica puede encontrarse lesionada posibilitando la extensión de la infección dentro del oído medio, produciendo otitis media, aunque muchas de estas pueden darse también con tímpanos sanos. Esta integridad del tímpano en la otitis crónica resulta solo aparente en determinados casos, ya que puede inflamarse, estirarse, deformarse, formar pseudobridas y extensiones polipoides hacia el oído medio y alterar su permeabilidad. La membrana timpánica puede formar bolsillos hacia el oído medio y quistes epidermoides queratinosos [28, 32, 33].

*Cuadro 2. Causas de otitis canina: predisponentes, primarias, secundarias y perpetuantes (tomado de Mendoza, 2011)*

## 1. CAUSAS PREDISPONETES

<b>CONFORMACIÓN</b>	Conductos estenóticos Pelos en los conductos Pabellones auriculares pendulosos Pabellones auriculares pilosos cóncavos
<b>HUMEDAD EXCESIVA</b>	Oído de nadador Humedad ambiental elevada
<b>PRODUCCIÓN EXCESIVA DE CERUMEN</b>	Glándulas hiperactivas
<b>EFFECTOS DEL TRATAMIENTO</b>	Traumatismos causados por hisopos Agentes tópicos irritantes Sobreinfección por cambio de microflora
<b>ENFERMEDAD ÓTICA OBSTRUCTIVA</b>	Neoplasias Pólipos Granulomas
<b>ENFERMEDAD SISTÉMICA</b>	Inmunosupresión o virosis Debilitamiento Estados catabólicos

## 2. CAUSAS PRIMARIAS

<b>PARÁSITOS</b>	<i>Otodectes cynotis</i> <i>Demodex canis</i> , <i>D. cati</i> , <i>Sarcoptes scabiei</i> , <i>Notoedres cati</i> Niguas- <i>Eutrombicula</i> Moscas- <i>Stomoxys calcitrans</i> Garrapatas- <i>Otobius megnini</i>
<b>MICROORGANISMOS</b>	Dermatofitos <i>Sporotrix schenckii</i>
<b>ESTADOS DE HIPERSENSIBILIDAD</b>	Atopia Hipersensibilidad por contacto Hipersensibilidad alimentaria Reacciones medicamentosas
<b>TRASTORNOS DE LA QUERATINIZACIÓN</b>	Seborrea idiopática primaria Hipotiroidismo, Hiperadrenocortisismo Desequilibrio de hormonas sexuales Afecciones relacionadas con los lípidos
<b>CUERPOS EXTRAÑOS</b>	Pelo Arena, suciedad Medicaciones y secreciones endurecidas
<b>TRASTORNOS GLANDULARES</b>	Hiperplasia de glándulas ceruminosas Hiperplasia de glándulas sebáceas Alteración del índice de secreción Alteración del tipo de secreción
<b>ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS</b>	Lupus eritematoso Pénfigo foliáceo Pénfigo eritematoso
<b>AFECCIONES VARIAS</b>	Dermatitis solar Vasculopatía, vasculitis Celulitis juvenil Dermatitis o granuloma eosinofílico Foliculitis eosinofílica estéril

### 3. CAUSAS SECUNDARIAS

<b>BACTERIAS</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Escherichia sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>
<b>LEVADURAS</b>	<i>Malassezia pachydermatis</i> <i>Candida albicans</i>
<b>RESPUESTAS PATOLÓGICAS EPIDÉRMICAS</b>	Migración de células epiteliales alterada Hiperqueratosis Hiperplasia de pliegues epiteliales
<b>DÉRMICAS</b>	Edema Fibrosis
<b>LUMINALES</b>	Estenosis
<b>CARTILAGINOSAS</b>	Mineralización
<b>CAMBIOS DE LA MEMBRANA TIMPÁNICA</b>	Dilatación Divertículo Cambios epiteliales
<b>CAVIDAD DEL OÍDO MEDIO</b>	Purulenta simple Caseosa o Queratinosa Colesteatoma Proliferativa Osteomielitis destructiva

### 4. FACTORES PERPETUANTES

<i>Malassezia</i> (30%)	<i>Proteus</i> (10%)
<i>Pseudomonas</i> (20%)	<i>Staphylococcus coagulasa +</i> (30%)
<i>Streptococcus</i> (<5%)	<i>Bacteroides</i> (<5%)

Este tipo de factores (bacterias y hongos) por sí mismos no pueden desencadenar una otitis externa, pero impiden la recuperación del paciente. Por ello es importante elegir un tratamiento tópico dirigido específicamente contra bacterias Gram + y *Malassezia* (principal agente causal de otitis) para que haya una rápida curación.



### 1.6.3 SIGNOS CLINICOS

Se distinguen dos formas de otitis externas:

- Otitis eritemato–ceruminosa (OEC). La OEC es la más frecuente, se caracteriza por eritema y por la producción excesiva de cerumen de distintos colores (verde, negra, marrón, blanca, amarilla y rojiza) con un olor desagradable. (Figura 3)
- Otitis supurativas (OS). La OS se caracteriza por la producción de pus abundante y maloliente.

Ambos tipos de otitis pueden cursar con evidente prurito auricular que origina reacciones de rascado o movimientos de la cabeza. Se puede observar dolor intenso que puede ocasionar una respuesta de agresión por parte del perro. Debido al abundante rascado el paciente llega a consulta con múltiples lesiones y rasguños en el pabellón auricular así como en el resto de la cara y cuello.



*Figura 3 Otitis eritemato-ceruminosa (Foto, Tovar N, 2015)*

Las podemos clasificar de la siguiente manera:

- Según la parte del oído que esté afectado la podemos clasificar en Otitis Externa, media e interna.
- Según la causa la podemos clasificar en Otitis bacteriana, micóticas, parasitaria y alérgicas.
- Según el tiempo de desarrollo se clasifican en agudas, sub-agudas y crónicas.

### 1.6.4 DIAGNOSTICO

Una buena historia clínica y un examen general minucioso son herramientas indispensables para llegar al diagnóstico. El clínico debe apoyarse en el uso del otoscopio para revisar el interior del oído y valorar la extensión de las lesiones. Aunado a lo anterior y en caso de ser otitis refractarias el uso de citología exfoliativa y/o cultivo con antibiograma serán de gran ayuda para indicar el tratamiento adecuado (Figura 4)

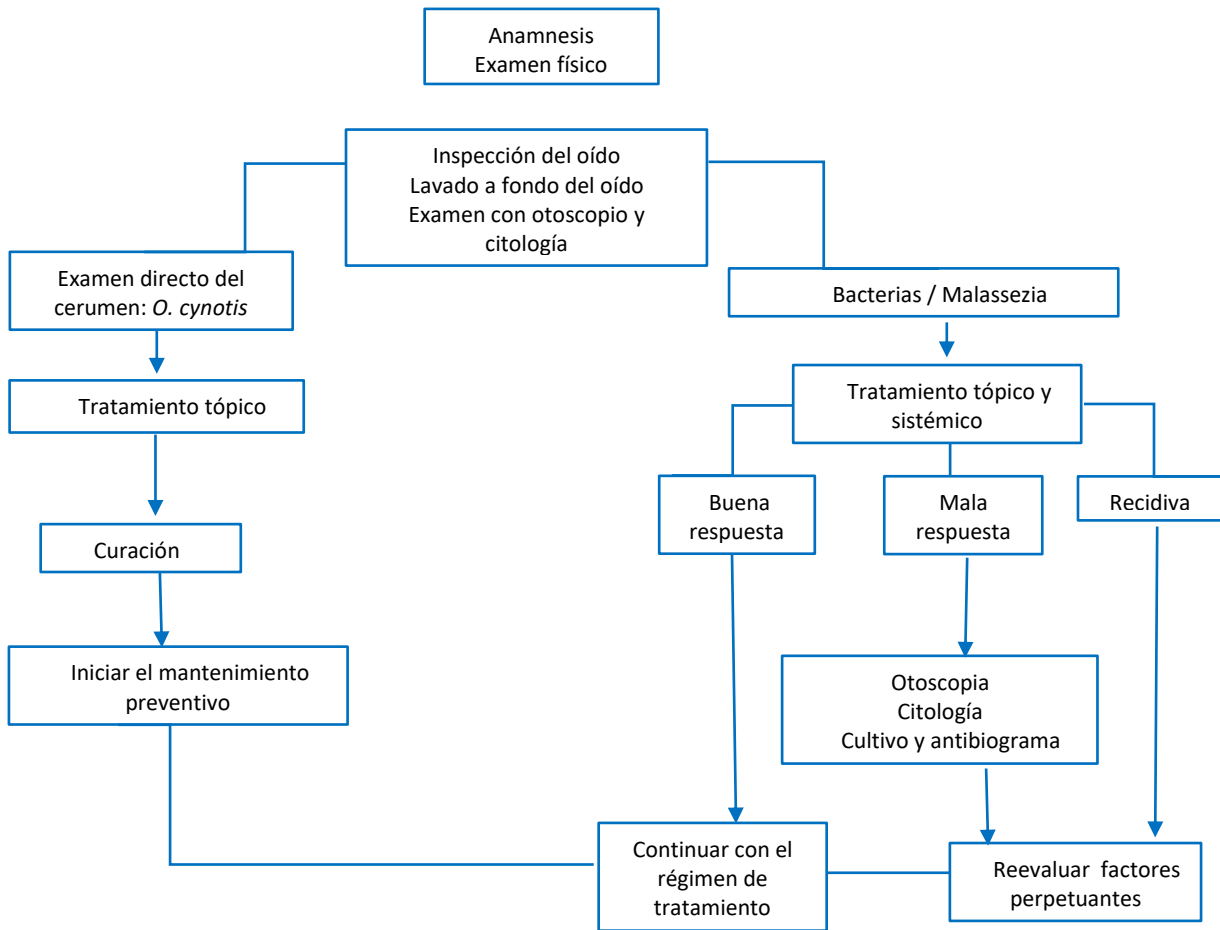


Fig.4 Organigrama para enfocar el diagnóstico y tratamiento de la otitis canina

Tomado de VIRBAC, México S.A. de C.V. División animales de compañía Actualización Científica y Tecnológica para Médicos Veterinarios.

### **a) OBSERVACION DIRECTA**

El examen microscópico directo de las secreciones y escamas presentes en la otitis es una herramienta valiosa para el médico veterinario. Debe realizarse en la clínica en cualquier caso de otitis externa y repetirse como una forma de control del proceso, permitiendo evaluar la respuesta al tratamiento en forma precisa. Varios estudios han demostrado que la observación directa es más sensible que los cultivos y antibiogramas para detectar la presencia de bacterias y levaduras.

La sensibilidad de este estudio para detectar bacterias Gram +, bacterias Gram – y levaduras es del 84, 100 y 100% respectivamente.

Se recomienda usar el antibiograma solo en casos con presencia de bacterias. También se recomienda el uso del cultivo y antibiograma en casos crónicos y recurrentes o cuando no se ha obtenido una respuesta al tratamiento inicial [28].

El examen microscópico directo de las escamas se realiza de manera ordinaria con hidróxido de potasio (KOH) o bien con pequeños pedazos de cinta adhesiva transparente (scotch tape test) que se colocan sobre las lesiones haciendo presión sobre ellas para que las escamas se adhieran. Posteriormente estos pedazos de cinta se impregnan (colorean) con azul de lactofenol, azul de metileno o una mezcla de tinta Parker azul con KOH, por último se observan al microscopio para determinar la presencia de bacterias y/o levaduras, en caso de ser una levadura el agente primario de la patología se debe buscar la morfología típica de *Malassezia pachydermatis*. (Figura 5)

La tinción de Albert (azul de toluidina, verde de malaquita, ácido acético glacial, etanol y agua destilada) es superior al método anterior ya que facilita la observación de estructuras que se tiñen de color púrpura [33].

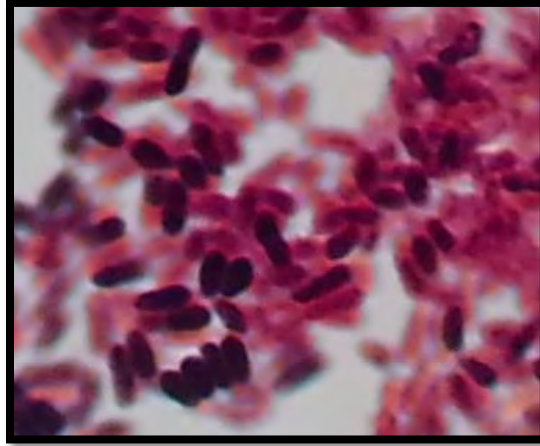


Figura 5 Tinción de Gram de *Malassezia pachydermatis* 100x, obsérvese la forma de "huella de zapato" (Foto, Tovar N, 2015)

### **b) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION**

El cultivo no es necesario para el diagnóstico, se emplea con fines de investigación, por lo que no se considera un procedimiento de rutina. La siembra se realiza en medio Sabouraud (SDA) agregando además en la superficie del medio aceite de oliva, girasol, maíz u otro (para el crecimiento de especies de *Malassezia* lípido-dependientes). Un método de identificación para *M. pachydermatis* es sembrarla sin el componente oleoso, si hay crecimiento bajo estas condiciones entonces es *M. pachydermatis* debido a su naturaleza no lipídodependiente [49].

También se puede utilizar medio Dixon (ADm) e incubar a 31°C durante 72 horas, con este medio se puede obtener un mejor desarrollo de las colonias de todas las especies del género *Malassezia*.

En el caso exclusivo de *Malassezia pachydermatis* después de siete días de incubación en ADm, las colonias son mates, pálidas y de color crema (5 mm en promedio). Las células son pequeñas y ovaladas. Las gemas se forman en una base ancha (la más grande de todas las especies) dejando una cicatriz de gemación prominente [49].

La reacción de catalasa es determinada utilizando una gota de peróxido de hidrógeno 10 volúmenes sobre el frotis o en el portaobjetos. La producción de burbujas de gas indica liberación de oxígeno, lo que traduce una reacción positiva. Para *M. pachydermatis*, la reacción de catalasa usualmente es negativa o muy débil. Al inocular urea la lectura es positiva ya que existe un cambio de color en el medio amarillo pálido a rojo fucsia [49].

### **1.6.5 TRATAMIENTO**

Debe de ir dirigido a retirar el exceso de suciedad y cerumen, reducir la inflamación y eliminar la infección.

Una correcta limpieza del canal auricular es imprescindible para permitir la acción de cualquier terapia tópica que se desee aplicar en la zona.

Una de las situaciones que debe tener en claro el médico veterinario para el tratamiento de la otitis externa es que existe una inflamación del recubrimiento epitelial del conducto auditivo y por lo tanto las glándulas se volverán quísticas, aumentando la producción de cerumen (defectuoso) ocasionando la otitis eritemato-ceruminosa. La inflamación conduce a la infección bacteriana o fúngica. En el caso de la otitis externa, es altamente recomendable utilizar los corticosteroides por vía tópica para controlar de forma satisfactoria la inflamación, resolver el prurito y aliviar el dolor.

En la mayoría de los casos, el Médico Veterinario no puede permitirse el lujo de afinar su diagnóstico y precisar qué tipo de infección hay. Frente a esta situación, el Médico Veterinario debe elegir un antibiótico de amplio espectro que pueda utilizarse contra los principales patógenos presentes en las otitis (*Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus coagulasa* +).

El tratamiento solo de las infecciones bacterianas no proporcionará demasiados éxitos al médico veterinario ya que la afección por *Malassezia pachydermatis* es el factor perpetuante de por lo menos el 30% de los casos. Además los fallos terapéuticos pueden deberse simplemente a la presencia de ácaros de los oídos p. e. *Otodectes cynotis*, los cuales no se ven afectados por el efecto del antimicrobiano; por todo lo anterior se recomienda asociar al uso de un antibiótico un fármaco con efecto fungicida y acaricida. Los agentes imidazólicos como clotrimazol, tiabendazol, miconazol y nistatina (polieno) son eficaces en estos casos. De estos el tiabendazol cuenta con la capacidad de eliminar eficientemente al *Otodectes cynotis*. En determinadas ocasiones puede ser necesaria la utilización de la medicación por vía sistémica.

### **1.7 ANTIFUNGICOS**

Un antimicótico es aquel que produce una alteración en la célula fúngica, ya sea inhibiendo su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia (directa o indirectamente), lo que facilitara el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. La síntesis de estos fármacos inició en el siglo XX con la aparición de la anfotericina B [18].

Pueden ser fungistáticos o fungicidas, según inhiban el crecimiento o produzcan lisis en los hongos. Casi todos los antimicóticos clásicos son de espectro reducido. Algunos se emplean de manera empírica, otros no son antimicóticos en el sentido estricto, sino antisépticos que actúan como fungistáticos de modo indirecto al modificar condiciones locales [42]. Los antifúngicos actúan de manera diversa sobre el hongo, estos mecanismo de acción se resumen en la Figura 6.

### ***Antifúngicos que actúan sobre la pared celular***

Los **lipopéptidos** inhiben la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que se produce la muerte del hongo [13].

Ejemplo de lipopéptidos:

1. Papulacandinas
2. Triterpenos glicosilados
3. Equinocandinas (caspofungina, anidulofungina, micafungina)

### ***Antifúngicos que actúan en membrana celular***

Los **polienos y azoles** afectan las membranas fúngicas. Los primeros se unen a ergosterol presente en la membrana del hongo, esto provoca la formación de poros y reduce el número de proteínas, glúcidos, cationes mono y divalentes, por tanto ocurre la muerte del hongo [36].

Ejemplo de polienos:

1. Nistatina
2. Natamicina
3. Amfotericina B

Por otro lado, los **azoles** inhiben el citocromo P450-3-A de la célula fúngica mediante la enzima C-14- $\alpha$ -dimetilasa, esto provoca una baja en la síntesis de ergosterol que trae como consecuencia el aumento de los esteroides tóxicos intermedios y un aumento en la permeabilidad de la membrana; al final se interrumpe el crecimiento del hongo [36].

Ejemplo de azoles:

1. Imidazol (imidazol, clotrimazol)
2. Triazoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol)
3. Triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol)

Los que pertenecen a las **alilaminas** actúan de manera similar a los azoles, inhiben la síntesis de ergosterol al inhibir la enzima escualeno epoxidasa, esto produce una disminución en la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de membrana, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo [18].

Ejemplo de alilaminas

1. Terbinafina
2. Naftifina

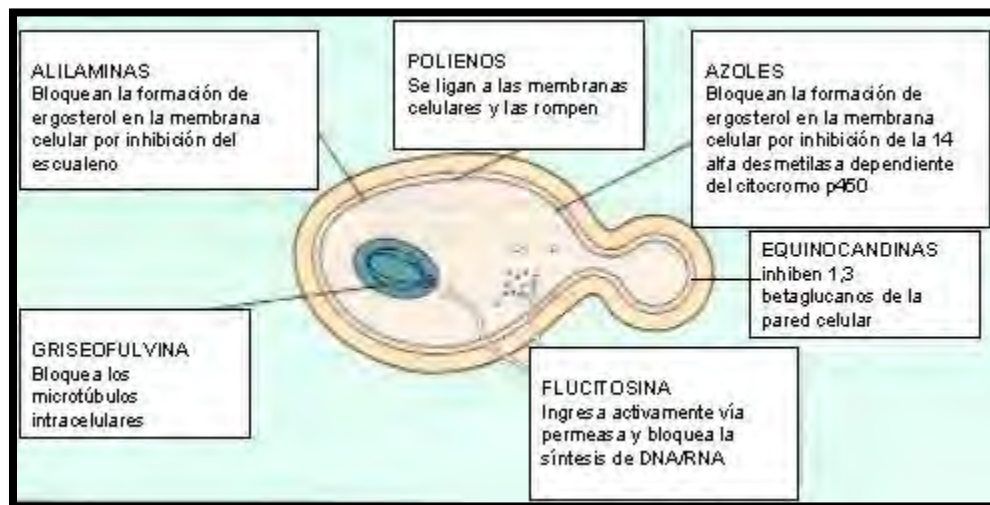


Figura 6 Tapia, C. (2005). Mecanismo de acción de los antifúngicos. [Figura]. Recuperado de Medwave

## 1.8 ANTECEDENTES DEL USO DE PROPÓLEO EN CANINOS

El propóleo posee una actividad biológica diversa, su efectividad se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* en casos clínicos de perros con una patología clínica preexistente. Tovar y col., 2015 mediante una revisión bibliográfica con respecto al uso de propóleo en perros reportan lo siguiente:

### 1.8.1 NEOPLASIAS

En oncología se ha utilizado contra células de TVT (tumor venéreo transmisible), esta es una neoplasia contagiosa y de transmisión sexual, con un origen confuso que afecta solo a caninos, de distribución mundial, detectándose principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Su diagnóstico puede hacerse a través de citología o exámenes histológicos. La evaluación citológica de un aspirado de aguja fina revela la presencia de abundantes células ovales y redondas. No existe predisposición de género o raza, solo se observa una gran prevalencia en animales en edad reproductiva. El TVT puede tener una localización extra-genital

y producir metástasis. La quimioterapia ha sido usada para tratar al TVT con la desventaja de una recidiva futura del tumor y en muchos casos los efectos tóxicos de la terapia se producen, además se ha reportado que algunos tumores son resistentes a este tratamiento. Investigaciones científicas de origen brasileño confrontaron *in vitro* a células de TVT obtenidas a través de biopsia de perros con este padecimiento, se les adicionó propóleo a diferentes concentraciones y se evaluó el efecto a las 6,24 y 48 horas. Después de 6 horas se observó una significativa actividad antiviral a bajas concentraciones, sin embargo esto disminuía conforme aumentaba el tiempo [5].

El artemisinina C es un componente aislado comúnmente del propóleo brasileño y se reporta que posee una alta actividad citotóxica contra células tumorales *in vitro*. Esta citotoxicidad fue relacionada hacia la fragmentación de DNA e inducir apoptosis [5, 11].

Una nueva línea de investigación es el geopropóleo [7] utilizado en la eliminación de células de Osteosarcoma canino (OSA). El geopropóleo es producido por abejas sin aguijón (*Melipona fasciculata*), lo recolectan del material resinoso de las plantas y le adicionan tierra o arcilla, sus propiedades biológicas no han sido investigadas, como las del propóleo producido por la *Apis mellifera*. Tiene actividad antimicrobiana, anti-inflamatoria y antitumoral. Muchas investigaciones han estudiado la actividad antitumoral del propóleo, pero poco se sabe de la actividad citotóxica del geopropóleo hacia las células de OSA, éste es un tumor maligno y común en los perros. El OSA guarda similitud con el osteosarcoma de pacientes humanos pediátricos por ello el perro resulta un excelente parámetro para evaluar el comportamiento del geopropóleo contra esta neoplasia. En su estudio Costa Cinaglia, demuestra el efecto citotóxico del geopropóleo al confrontarlo con células de osteosarcoma después de 6 horas de incubación usando 50 µg; 24 horas y 50 µg; 48 horas y 10 µg y por último 72 horas y 10 µg; en conclusión en todos los periodos de tiempo las células fueron sensibles al geopropóleo [9].

## **1.8.2 MICROORGANISMOS**

### **a) Bacterias**

Existen ciertas bacterias que causan enfermedad en los perros, una de las más importantes es *Staphylococcus aureus*. Las bacterias pertenecientes a este género son consideradas como bacterias comensales de la piel y mucosas en los animales y en el hombre; son clasificadas de acuerdo a su potencial de virulencia en dos grandes grupos: coagulasa negativos (Ej: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* entre otros) y coagulasa positivos (Ej: *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hycus*). Las infecciones piogénicas de piel conocidas como piodermas en los caninos, son



producidas en más 60% de los casos por especies de *Staphylococcus coagulasa* positivos, específicamente por las especies de *S. aureus* y *S. intermedius*, los cuales se consideran iniciadores de estas patologías con tendencia al desarrollo de piodermas crónicos, recurrentes, profundos y predisponentes a la infección secundaria bacteriana en especial por *Pseudomonas spp*, *Proteus spp* y *E. coli* [1, 23].

Algunas mascotas en especial los caninos, son considerados reservorios de especies bacterianas ampliamente resistentes a los antibióticos como *S. aureus*, por ello se han desarrollado investigaciones en busca de nuevas alternativas de tratamiento y una de ellas es el uso de extractos de propóleo en aplicación tópica, esta propuesta es económica y efectiva [26]. Lo anterior fue analizado por Principal et al en 2005 al confrontar extractos etanólicos de propóleo a concentración de 20 y 40 %, siendo ésta última la más efectiva contra *S. aureus*, sin embargo también observó que no fue mejor la inhibición que éste ejercía sobre la bacteria al comparar la respuesta de sensidiscos impregnados con penicilina [23].

#### **b) Levaduras**

La otitis externa (OE) comúnmente conocida como "infección de oído", es una condición caracterizada por la inflamación del conducto auditivo externo. Las infecciones del oído son una de las principales razones por las que los perros se presentan a consulta. Los perros con OE a menudo presente hinchazón y eritema del tejido epitelial del conducto auditivo externo, aumento de la secreción de las glándulas ceruminosas en el oído, cambios en el comportamiento, dolor y prurito. Los factores ambientales como la temperatura alta y la humedad pueden influir en la incidencia de la OE en los perros [8, 10].

Al realizar cultivos de pacientes con OE se ha observado que *Malassezia pachydermatis* es la levadura patógena más comúnmente aislada, *Candida spp* es sólo en ocasiones aisladas de exudados de perros con OE. Además, en la mayoría de las muestras *M. pachydermatis* se asocia con *S. aureus*, lo que confirma la simbiosis entre estos dos microorganismos. Así mismo se ha demostrado la aplicación tópica de extractos de propóleo como una nueva terapia para el tratamiento de la OE en los perros, sobre todo si se tiene en cuenta que esta formulación tiene un amplio espectro antimicrobiano, efecto anti-inflamatorio, es natural y no caro. Una futura formulación de gotas para los oídos de suficiente viscosidad queda en manos de los estudiosos para el tratamiento de la OE [8].

### **c) Dermatofitos**

Esta es una infección superficial de la piel causada por dermatofitos patógenos del género *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*. Los dermatofitos viven en tejido queratinizado como uñas, folículos pilosos, pelo y estrato córneo de la piel. Son de gran interés en el ámbito clínico ya que tiene un alto potencial zoonótico. Diversos tratamientos han sido propuestos para combatir estas afecciones, sin embargo en algunas ocasiones resultan ineficientes y poseen efectos secundarios. Los nuevos tratamientos antimicóticos se han involucrado con componentes naturales como el propóleo, Cruz Sánchez y col., 2014 reportaron tres casos clínicos de dermatofitosis. Una vez obtenido el diagnóstico confirmativo de los perros afectados, el tratamiento constaba de baños semanales con un jabón comercial elaborado con propóleo durante 3 a 8 semanas y el uso de un ungüento de uso tópico una vez por semana por tres semanas. Desde la segunda semana de tratamiento todos los cultivos fueron negativos y al finalizar el tratamiento los tres perros se recuperaron de sus lesiones. Lo anterior concluye que el uso de componentes antimicóticos alternativos será de ayuda para limitar el desarrollo de *Microsporum* [37].

#### **1.8.3 ESTIMULANTE DE LA INMUNIDAD**

La inmunización activa o vacunación es el proceso de prevenir o reducir las manifestaciones de un agente patógeno en la especie humana o animales, para ello se ha buscado el mejorar la respuesta de las vacunas para hacerlas más eficientes mediante el uso de adyuvantes que incrementen su inmunogenicidad y extiendan la duración de protección efectiva. Además, el uso de adyuvantes puede reducir la cantidad requerida de antígeno o el número de dosis necesarias para inducir una respuesta inmune protectora. El adyuvante ideal debe ser económico, biodegradable, biológicamente inerte y estimular la respuesta inmune celular y humoral; muchas de las sustancias químicas utilizadas para este fin no llegan a cubrir todos los requerimientos antes mencionados, esto ha hecho que los investigadores dirijan sus estudios hacia los productos naturales, de estos el propóleo ha llamado la atención ya que posee la cualidad de estimular la inmunidad [11].

Estudios recientes han probado el extracto etanólico de propóleo (EEP) en combinación con vacunas de parvovirus canino (CPV) y coronavirus canino (CCoV) para mejorar la producción de anticuerpos después de la inmunización. Después de la tercer dosis a los 21 días se midió en suero IgG y se comprobó que la co-administración de EEP mejoró significativamente la especificidad sérica de IgG como respuesta hacia CPV en animales inoculados con las más altas concentraciones del antígeno, y no tuvo influencia en los niveles de anticuerpos

contra CCoV .Los resultados indican que el EEP tiene actividad inmunomoduladora dependiente del tipo y concentración de antígeno utilizado , siendo capaz de incrementar los niveles de anticuerpos para CPV. Otros estudios sigieren una mejora de la inmunidad en caso de Distemper canino [19, 30].

#### **1.8.4 ENFERMEDAD PARADONTAL**

No podemos pasar por alto su efecto potencial en la enfermedad paradontal de la boca de los perros. Es la enfermedad oral más común en perros representando un 80 % de prevalencia en la población. Esta enfermedad es progresiva e involucra dos estados: gingivitis (reversible) y periodontitis (irreversible). Es causada por acumulación de placa en el diente. La placa es una membrana lisa, contaminada con saliva, bacterias y detritus celulares. Las bacterias y los productos del metabolismo bacteriano causan inflamación del tejido blando. La placa comienza a mineralizarse a la forma de cálculo, el cual migra dentro de la gingiva, causando inflamación adicional, pérdida de ligamento periodontal, pérdida de hueso y finalmente pérdida de dientes. Esta patología debe prevenirse para evitar problemas infecciosos, debe instaurarse el cepillado de la cavidad oral de la mascota y hacer usos de antisépticos orales. Para su tratamiento se ha usado la Clorhexidina que tiene una gran eficacia en la inhibición de placa oral y tiene buena actividad antiséptica contra patógenos de la cavidad oral sin embargo tiene una desventaja ya que pigmenta el esmalte y puede causar ulceraciones en la mucosa, estos efectos justifican el uso de este material sólo para pocos días, lo que hace que su aplicación no se recomiende en la prevención de la enfermedad periodontal, que requiere un uso prolongado del agente antimicrobiano elegido para este propósito. El uso de xilitol en la medicina veterinaria se utiliza en el agua de bebida, tiene un efecto reductor sobre la formación de la placa bacteriana por vía oral [12].

Muchas investigaciones continúan su análisis mirando hacia los fármacos naturales como el propóleo y otras; su uso en la prevención de la enfermedad paradontal se logra mediante la inhibición de la formación de la placa. Es importante mencionar que estos fármacos combinan su actividad antimicrobiana sin inducir resistencia bacteriana pero inhibiendo la adherencia microbiana sobre la superficie del diente lo que sugiere un gran potencial para su uso en terapias en cavidad oral y como una ayuda en la higiene oral sin causar efectos secundarios graves [12,48].

### **1.8.5 OFTALMOPATIAS**

Debido a que el propóleo posee numerosas propiedades medicinales, se conoce que ha sido empleado en el tratamiento de enfermedades oculares con efectividad en el hombre y los animales.

Se ha utilizado en perros y gatos que padecían de blefaritis, conjuntivitis de origen infeccioso, edemas corneales, obstrucción de conductos lagrimales, queratoconjuntivitis seca, úlceras corneales y glaucoma [20].

Giral y col, 2007 reportan en su estudio la gran utilidad de los preparados oftálmicos a base de productos apícolas, estos autores refieren un tiempo de curación más rápido y la no presencia de efectos indeseables o adversos durante la aplicación de los mismos. Los animales en que se emplearon colirios alopáticos y que no curaron, respondieron muy positivamente al tratamiento con la suspensión oftálmica de propóleos [41].

Es importante recordar que las pruebas *in vitro* no reflejan las condiciones reales encontradas en infecciones clínicas, únicamente son de utilidad para poder realizar posteriormente estudios *in vivo* y con esto la elaboración de productos comerciales para tratar las diferentes patologías.

En la cuadro 3 se resume las distintas formas en que se ha probado un efecto positivo del propóleo en caninos (tomado de Tovar, 2015) [50].

<b>Efecto</b>	<b>Enfermedad</b>	
<b>Antimicótico</b>	<b>Otitis canina</b> <i>Malassezia pachydermatis</i> <i>Candida ssp.</i>	Experiencia clínica
	<b>Dermatofitos</b> <i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum gypseum</i>	Experiencia clínica
<b>Antineoplásico</b>	<i>Tumor venéreo transmisible</i>	Experimental ( <i>in vitro</i> )
	<i>Osteosarcoma</i>	
	<i>Enfermedad de Cushing</i>	Experiencia clínica
<b>Bactericida</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas ssp.</i> <i>Proteus ssp.</i> <i>E. coli.</i>	Experimental ( <i>in vitro</i> )
<b>Immunoestimulante</b>	<i>Distemper canino</i> <i>Parvovirus canino</i>	Experimental ( <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> en ratones)
<b>Oftálmico</b>	<i>Blefaritis</i> <i>Conjuntivitis</i> <i>Queratoconjuntivitis</i> <i>Glaucoma</i>	Experiencia clínica
<b>Paradontal</b>	<i>Gingivitis</i> <i>Paradontitis</i>	Experiencia clínica
<b>Metabólico</b>	<i>Enfermedad del hígado</i>	Experiencia clínica
<b>Antiparasitario</b>	<i>Giardiasis</i>	Experimental ( <i>in vivo</i> en ratas)
	<i>Trypanosomiasis</i>	Experimental ( <i>in vivo</i> en ratones)

Cuadro 3 Perspectivas del uso de propóleo *in vitro* e *in vivo* en perros

## 1.9 ANTECEDENTES DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DEL PROPOLEO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Muchos estudios se han enfocado en desarrollar modelos experimentales para comprobar la actividad antimicrobiana del propóleo pero poco se sabe del tipo de daño que causa en los microorganismos y más aún sobre un agente o una acción en particular, un ejemplo de esto es el efecto fungicida que posee el propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*.

Satish K, 2014 realizó un estudio donde muestreo perros con síntomas de dermatitis, las muestras fueron sembradas en agar dextrosa Sabouraud y posteriormente fueron procesadas para microscopia electrónica de barrido. Al



Fig. 7 Diferentes estadios de *Malassezia pachydermatis*, Microscopia Electrónica de barrido, 600X.

escanear las muestras se observaron levaduras de *Malassezia pachydermatis* cuya forma puede ir de globosa a elíptica con los extremos redondeados debido a su reproducción asexual. A 600X midió las levaduras y registro longitudes de 3.16 a 5.29 micras dependiendo de la edad y el estado en el que se encuentre (figura 7). Si bien este investigador no evaluó el propóleo si brinda con su estudio una imagen de la normalidad de *M. pachydermatis* [45].

Otro hongos que ha recibido el interés de los científicos es *Candida albicans*, Hee

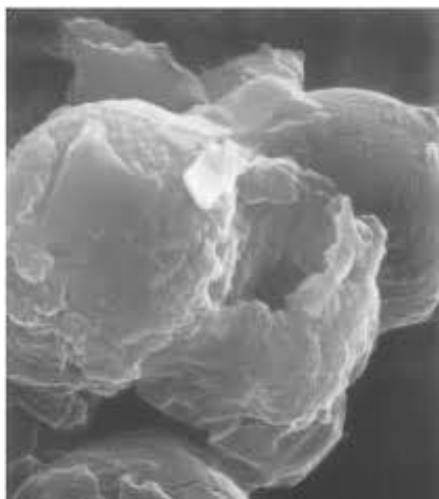


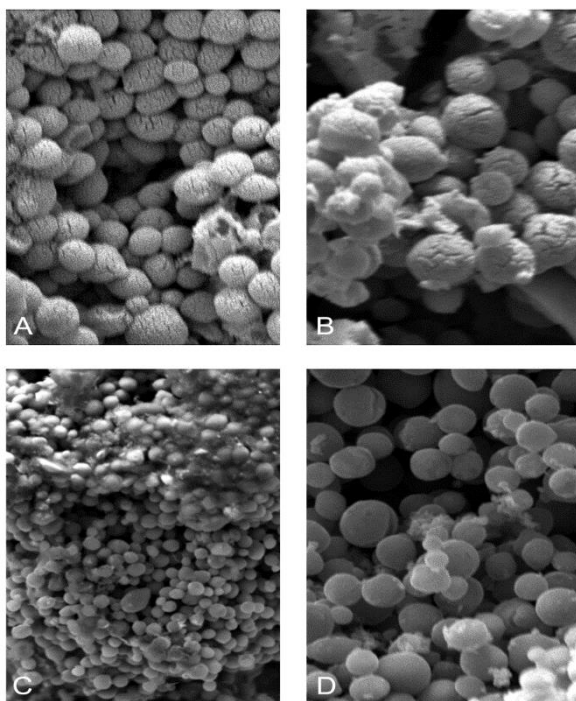
Fig. 8 Microscopia Electrónica de Barrido ce *C. neoformans* después del tratamiento con propóleo. Se aprecia ruptura de la célula, 5000X

Youn Chee, 2002 utilizo propóleo coreano contra *Cryptococcus neoformans* ATCC 2344 y *Candida albicans* KCTC 7965. Determino la concentración mínima inhibitoria del propóleo haciendo dos ensayos; en el primero cultivo en microcaldos los hongos y utilizó en propóleo a una concentración final de 1 a 64 mg/ml (diluciones dobles), para *C. neoformans* fue de 2 mg/ml y para *C. albicans* de 16 mg/ml. En el otro ensayo incluyo al propóleo en agar dextrosa Sabouraud y fue de 4 y 16 mg/ml respectivamente. La concentración mínima fungicida para *C. neoformans* fue 8 mg/ml [17].

El propóleo mostro actividad fungicida contra *C. neoformans* y actividad fungistática contra *C. albicans*. A la microscopía electrónica de barrido la morfología celular de *C. neoformans* fue afectada por el tratamiento de propóleo, se observó ruptura de la superficie celular del hongo (figura 8).

Takaisi y Schilcher (1994) sugirieron que la inhibición de la división celular fue el posible mecanismo de acción antimicrobial del propóleo, sin embargo este estudio mostro la muerte de *C. neoformans*, más que la inhibición por propóleo [47].

Mello M. et al, 2006 estudió el efecto del propóleo verde de Brasil sobre *C. albicans* (ATCC 18804) y evidenció hiperplasia y cambios en la superficie celular



con una concentración de 0.43  $\mu\text{g/ml}$ . La actividad antifúngica del propóleo es producir cambios en la pared celular por lo que hay un incremento en el volumen, ruptura de membrana y alteraciones en la división celular, resultando en defectos en la textura de la pared celular hija (figura 9), también inhibe la formación del tubo germinativo. El autor especula que lo anterior se debe a una interacción con los compuestos sulfidrilos celulares tal como lo hacen los imidazoles. Consecuentemente hay una alteración en la permeabilidad celular lo que explica los cambios en la morfología y tamaño de los organelos internos tales como mitocondria y vacuolas[31].

Fig. 9 Microscopía Electrónica de Barrido de *Cándida Albicans*. Cuadros A, B muestran una pared celular con separaciones en su superficie debido al tratamiento, C aglomeración celular por el tratamiento, D hongo sin tratamiento

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En el tratamiento de la otitis canina donde *Malassezia pachydermatis* es el principal agente causal, usualmente se emplean antimicóticos como el ketoconazol o el Itraconazol que tienen efectos colaterales, por ello es importante fundamentar científicamente al propóleo como una nueva alternativa en el tratamiento de este tipo de afección.

El propóleo ha probado su eficacia *in vitro* contra diferentes agentes etiológicos importantes en la otitis canina [8] e *in vivo* en casos clínicos [23].

Se desconoce que existan trabajos que evidencien el daño sobre la estructura celular de *Malassezia pachydermatis* producida por propóleo.

Debido a la acción antimicótica del propóleo es importante el desarrollo de prototipos farmacológicos de fácil aplicación elaborados con propóleo mexicano como una alternativa para el tratamiento de la otitis canina, además de tener la ventaja ser un producto de origen natural.



### 3. HIPOTESIS

Si el extracto etanólico de propóleo posee una actividad antimicótica entonces provocara un daño sobre la estructura celular de *Malassezia pachydermatis* causando inhibición en su crecimiento *in vitro*.

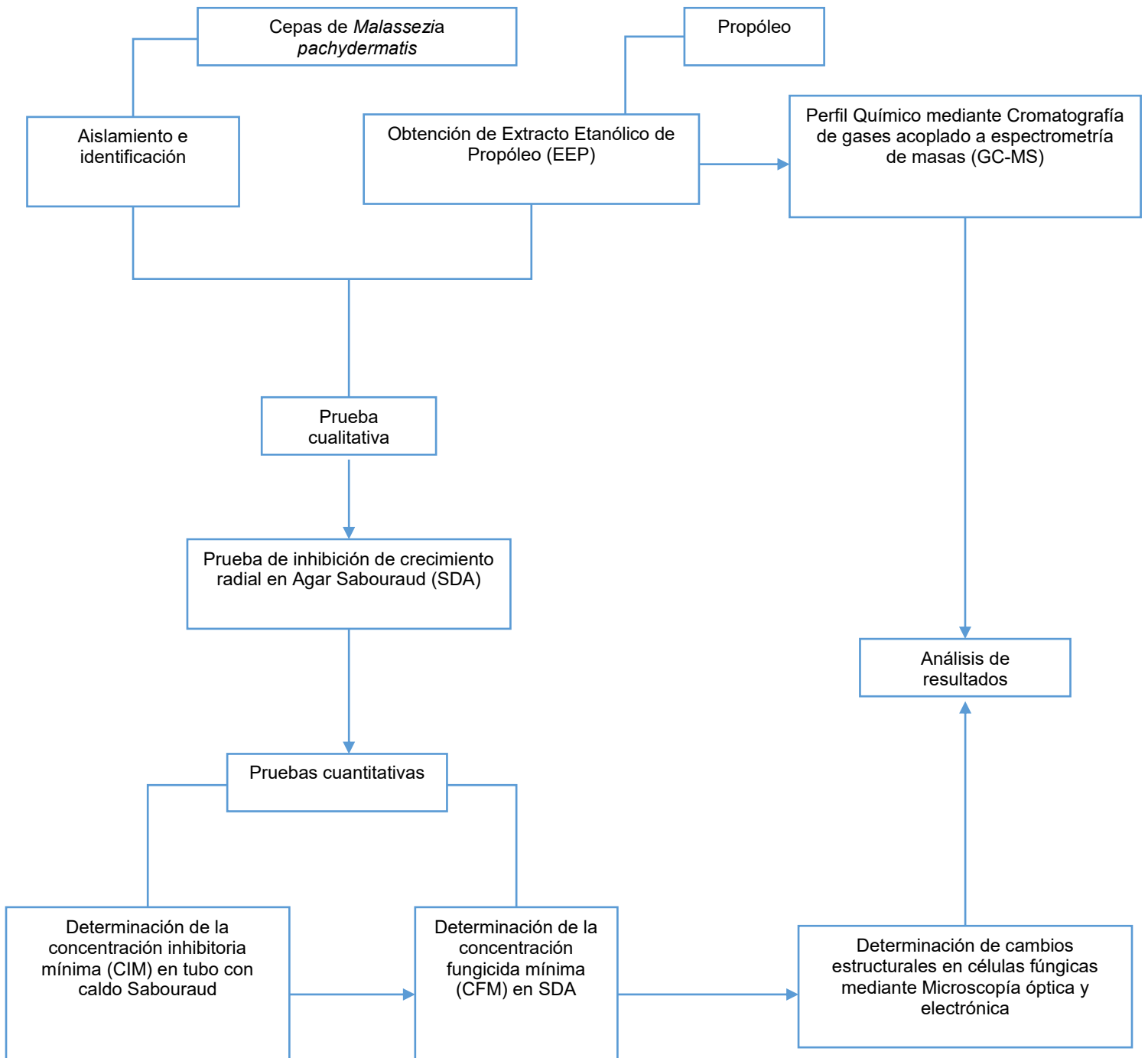
#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto *in vitro* del Extracto Etanólico de Propóleo sobre la estructura celular de *Malassezia pachydermatis*.

#### **5. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ❖ Obtención de propóleo de los apiarios de FES Cuautitlán.
- ❖ Obtener el extracto etanólico del propóleo (EEP).
- ❖ Determinar la composición química del extracto etanólico mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- ❖ Obtención de hisopados de pabellones auriculares de perros con signos clínicos de otitis para el aislamiento de *Malassezia pachydermatis* proporcionados por la Medicina de CU, UNAM y el hospital de pequeñas especies de FES Cuautitlán, UNAM.
- ❖ Evaluación del efecto antimicótico del EEP mediante las siguientes pruebas:
  1. Inhibición del crecimiento radial (ICR).
  2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).
  3. Determinación la concentración fungicida mínima (CFM).
- ❖ Evaluar el daño estructural que causa el EEP a *Malassezia pachydermatis* mediante microscopía óptica y electrónica.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6.1 Perfil Químico

Se analizó por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS por sus siglas en inglés) los compuestos volátiles emitidos por la muestra del EEP.

El análisis se realizó en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a cargo de la Dra. Margarita Canales.

El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo de gases (modelo 6850) acoplado a un espectrómetro de masas (modelo 5975C, Agilent Technologies)

Columna para el análisis HP-5MS con 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y un film de 0.25 micras.

Los resultados obtenidos fueron analizados bajo la asesoría del Dr. Guillermo Penieres Carrillo, responsable del laboratorio de Química Inorgánica de FES Cuautitlán.

## 6.2 Evaluación de Actividad Antifúngica

### 6.2.1 Microorganismo utilizado

Para evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo de FES Cuautitlán se utilizaron 9 cepas de *Malassezia pachydermatis* de campo de origen canino y una cepa de referencia ATCC (por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) (cuadro 4).

Identificación	Procedencia
Cepa 1	Hospital de pequeñas especies, FESC
Cepa 2	Hospital de pequeñas especies, FESC
Cepa 3	Clínica veterinaria particular Edo. de Mex.
Cepa 4	Clínica veterinaria particular Edo. de Mex.
Cepa 5	Clínica veterinaria particular Edo. de Mex.
Cepa 6	Clínica veterinaria particular Edo. de Mex.
Cepa 7	Facultad de Medicina UNAM, CU
Cepa 8	Facultad de Medicina UNAM, CU
Cepa 9	Facultad de Medicina UNAM, CU
Cepa de referencia	ATCC 14522

Cuadro 4 Cepas de *Malassezia pachydermatis* utilizadas para evaluar el efecto antimicótico del propóleo de FES Cuautitlán.

Para su conservación las levaduras fueron suspendidas en Caldo Dixon a una temperatura de 33°C.

## 6.2.2 Prueba de sensibilidad cualitativa

**Prueba de inhibición de crecimiento radial (Documento CLSI M44-A** (por sus siglas en inglés Clinical and Laboratory Standards Institute)

### 1) Activación de la cepa

Se sembraron las levaduras en agar Dixon (ADM) y Sabouraud (SDA) para determinar el tiempo óptimo de crecimiento de las cepas haciendo revisiones cada 24 horas (cuadro 5). Este dato se utilizó para determinar el tiempo de incubación en el desarrollo de las pruebas de sensibilidad cualitativa, cuantitativa y de microscopía.

Todas las pruebas se incubaron en estufa a 33°C

Identificación de la cepa	ADM 24 hrs.	ADM 48 hrs.	ADM 72 hrs.	SDA 24 hrs.	SDA 48 hrs.	SDA 72 hrs.
1	-	+	+	-	+/-	+
2	-	+	+	-	+/-	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+/-	+	+
5	+	+	+	+/-	+/-	+
6	-	+	+	-	+/-	+
7	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
8	-	-	+/-	-	+/-	+/-
9	+	+	+	+/-	+	+
*ATCC 14522	-	+/-	+	+/-	+	+

Cuadro 5 Diferentes tiempos de incubación de *Malassezia pachydermatis* en ADM y SDA a 33°C para determinar el tiempo óptimo de crecimiento de la levadura

### **b) Preparación del inóculo**

Con base en lo anterior se realizó la siembra de las 10 cepas en agar dextrosa Sabouraud (SDA, BD Bioxo) e incubo a 33°C durante 72 horas para posteriormente suspender el material de cada una de las cepas en Solución Salina Fisiológica estéril hasta alcanzar la concentración del tubo No.1 de la escala de Mc Farland por comparación de turbidez.

### **c) Medios de prueba:**

- Agar Dixon (ver anexo 2)
- Agar dextrosa Sabouraud (SDA, BD Bioxo, Lote 9188299)

## **2) Preparación de los discos**

### **a) Discos con EEP**

Se emplearon discos estériles de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro impregnados con 10 µl de EEP a las siguientes concentraciones 2, 4, 8 y 16 mg/ml y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Dichas concentraciones se prepararon mezclando EEP con Dimetil Sulfoxido (DMSO, ACS, Fermont, Lote 8304431, Productos Químicos monterrey, S.A. de C.V.),

### **b) Discos para antifungigrama**

Se emplearon discos impregnados con antifúngicos de la marca BIO-RAD (cartuchos de 50 discos) (cuadro 6).

Antifúngico	Nombre	Concentración	Símbolo	Código
CTR	Clotrimazol	50 mg	CTR 50	62816
VCZ	Voriconazol	1 mcg	VCZ 1	62803
NY	Nistatina	100 UI	NY 100	62856
KET	Ketoconazol	50 mg	KET 50	62866

Cuadro 6 Antifúngicos de uso frecuente para el tratamiento de la otitis canina

### **3) Realización de la prueba**

A partir del inóculo de *Malassezia pachydermatis* preparado a una concentración del tubo No.1 de Mc Farland, se realizó un sembrado masivo con hisopo en cajas de Petri con SDA, posteriormente se colocaron los discos impregnados con propóleo (este procedimiento se hizo para cada una de las cepas).

De igual forma se prepararon dos cajas más para los testigos negativos, para este paso sólo se utilizó la cepa 9, los disco que se utilizaron se impregnaron con etanol y DMSO con el fin de demostrar que estas sustancias no intervienen en el efecto antifúngico del propóleo.

Todas las cajas se incubaron a 33°C durante 72 horas.

La prueba se realizó por duplicado, una caja para evaluar la efectividad del EEP y la segunda para evaluar la efectividad de los antifúngicos conocidos.

Para la evaluación de los resultados se midieron los halos de inhibición presentes en todas las cajas con ayuda de un Vernier.

#### **6.2.3 Prueba de sensibilidad cuantitativa**

**Concentración inhibitoria mínima (CIM)** (modificado de Lozina et al., 2006)

Se realizó para todas las cepas ya que todas presentaron sensibilidad al EEP y a los antifúngicos en la prueba cualitativa.

Se prepararon por duplicado tubos de ensaye con:

- 1 ml de caldo Sabouraud
- Partiendo de una solución stock de EEP (100 mg EEP/ 1ml DMSO) se les adicionó diferentes concentraciones de EEP: 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 3 mg/ml
- 100 µl de inóculo.

Para la preparación del control positivo se colocó en un tubo 100 µl de inóculo y 1 ml de caldo Sabouraud.

Para el control negativo se colocó en un tubo de ensaye 1 ml de caldo Sabouraud

Todos los tubos se incubaron a 33°C durante 72 horas.

La lectura de los resultados se realizó mediante una evaluación visual de la turbidez de los tubos y así detectar el primer tubo con crecimiento de la levadura (uno anterior a éste será la lectura de la CIM).

La levadura y el inóculo utilizados para esta prueba se prepararon como se describió en la prueba de inhibición de crecimiento radial.

### **Concentración fungicida mínima (CFM) (Londoño, 2008)**

Se realizó para todas las diluciones propuestas en la CIM.

Se prepararon por duplicado cajas de Petri septadas con SDA y se sembraron por estría tomando 10 µl de cada tubo de la CIM incluyendo el control positivo y el control negativo.

La lectura de los resultados se realizó observando la presencia o ausencia de crecimiento en cada uno de los septos de las cajas (la última concentración donde no se observe crecimiento será la CFM)

Todas las cajas se incubaron a 33°C durante 72 horas.

### **6.3 Microscopía óptica**

#### **Microorganismo utilizado**

Para evaluar los cambios morfológicos y estructurales producidos por el EEP se trabajaron dos cepas de *Malassezia pachydermatis*:

- 1 cepa de referencia ATCC 14522
- 1 cepa de campo (identificada con el número 9)

La levadura y el inóculo utilizados para esta prueba se prepararon como se describió en la prueba de inhibición de crecimiento radial.

#### **Protocolo de microscopía óptica**

Se prepararon 4 tubos estériles, en cada tubo se colocó:

- 1 ml de caldo SDA
- 100 µl de inóculo
- 1 ml de EEP a una concentración de 25 mg/ml.

Para preparar el control positivo se colocó en un tubo caldo Sabouraud y 100 µl de inóculo.

Todos los tubos se incubaron a 33°C durante 72 horas.

De cada cepa se prepara cuatro muestras:

Muestra 1 Cepa ATCC 14522 sin tratamiento de EEP

Muestra 2 Cepa ATCC 14522 con tratamiento de EEP

Muestra 3 Cepa No.9 de campo sin tratamiento de EEP

Muestra 4 Cepa No.9 de campo con tratamiento de EEP



Se realizaron frotis tomando azadas de cada uno de los tubos preparados y cada frotis se observó en un microscopio óptico (Axioskop 40, Carl Zeiss) con objetivo de 100x. Para la lectura de los resultados, a cada una de las muestras se les realizó tinción de Gram.

#### **6.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La levadura y el inóculo utilizados para esta prueba se prepararon como se describió en la prueba de inhibición de crecimiento radial.

Se prepararon 4 tubos estériles, en cada tubo se colocó:

- 1 ml de caldo SDA
- 100 µl de inóculo
- 1 ml de EEP a una concentración de 25 mg/ml.

Para preparar el control positivo se colocó en un tubo estéril la levadura cosechada con ayuda de un hisopo y 1 ml de caldo Sabouraud.

Todos los tubos se incubaron a 33°C durante 72 horas.

Tanto la cepa ATCC 14522 y la cepa de campo se prepararon de la siguiente manera:

Muestra 1 Cepa ATCC 14522 sin tratamiento de EEP

Muestra 2 Cepa ATCC 14522 con tratamiento de EEP

Muestra 3 Cepa No.9 de campo sin tratamiento de EEP

Muestra 4 Cepa No.9 de campo con tratamiento de EEP

Al finalizar la incubación y previo al protocolo de microscopía electrónica de barrido las muestras fueron preparadas de la siguiente manera con el fin de eliminar el caldo Sabouraud:

- Centrifugar los tubos a 1500 rpm durante 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante.
- Primer lavado de los pellets, para el lavado agregar solución buffer de fosfatos 1X estéril, agitar en vortex y centrifugar a 1500 rpm durante 2 min.
- Decantar el sobrenadante para obtener pellets limpios.

### ***Protocolo de microscopía electrónica de barrido para levaduras***

Se realizó bajo la sugerencia de la Dra. Sofía González quien está a cargo del microscopio electrónico de barrido de la UIM, FESC-UNAM.

- Los pellets limpios se fijaron con glutaraldehído 2%, se agregó la cantidad suficiente para cubrirlos.
- Se agitaron los cuatro tubos en vortex e incubaron 2 horas a 4°C, al finalizar la incubación se centrifugaron a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado.
- Los pellets obtenidos en este último proceso se resuspendieron en solución buffer de fosfatos 1X estéril y se conservaron a 4°C.

Previo a la observación de los resultados se colocó una gota de cada una de las muestras fijadas en el portamuestras del microscopio electrónico de barrido al cual se le colocó previamente cinta electroconductiva y se incubaron a 37°C durante 10 min para el secado de las muestras.

A continuación se bañaron las muestras con oro a 10 microamperios durante 300 segundos en un cobertor ionico Denton Vacuum DESKV.

Finalmente se observó cada una de las muestras en el microscopio electrónico de barrido (JOEL, JSM-6010LA).

### ***6.5 Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico de la Prueba de inhibición de crecimiento radial y MEB se utilizó la prueba de ANOVA del paquete estadístico Graph Pad Prism 5 Project, Versión 5.01, 2007.

# ***RESULTADOS***

## 7.1 Perfil químico

Mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a masa los compuestos volátiles de mayor coincidencia según la biblioteca digital son los que aparecen en el cuadro 7 y se grafican en el TIC (por sus siglas en ingles Total Ion Chromatogram) de la figura 10.

Cuadro 7 Compuestos de mayor coincidencia encontrados en la muestra de propóleo de FES Cuautitlán mediante GC-MS

Pico	*TR	Area %	Qual	ID Libreria	Otros nombres químicos	Propiedad
1	9.174	0.11	90	Acetofenona	Metil fenil cetona; feniletanona; acetilbenceno	En los seres humanos se sintetiza a Ac. Benzoico (ver ácido benzoico) , es una cetona aromática
2	9.688	1.17	97	Ácido benzoico, metil ester	Benzoato de metilo; Ac. Benzoico,éster metílico	Bactericida (Gram +) y fungicida
3	10.351	1.53	95	Bencil metil cetona	Bencilo metil cetona; Fenilacetona	Es un derivado del benzaldehído por lo tanto es desinfectante y por la cetona fungicida y antiséptico
4	10.981	4.94	96	Ácido benzoico	Acido benzoico	Como conservador en alimentos actúa contra moho y aflatoxinas
5	11.152	1.18	94	Ácido benzoico, etil ester	Ac. Benzoico, éster etílico; Etil benzoato	Actua contra moho y aflatoxinas
6	19.892	1.46	91	Alfa-Bisabolol	Bisabolol	Anti-irritante, antiinflamatoria, antimicrobiana
7	21.103	1.12	91	Ácido pentadecanoico, etil ester	Éster etílico del ácido Pentadecainoico; Palmitato de etilo	Es el ester del Ac palmítico, es un inhibidor de hongos

<b>8</b>	23.304	1.22	99	Ácido n-hexadenoico	Ac. palmítico	Antiinflamatorio
<b>9</b>	23.711	15.46	98	Ácido hexadenoico, etil ester	Ac. Palmítico, éster etílico; Ac. palmítico	Antiinflamatorio
<b>10</b>	25.008	0.34	97	Nonadecano	Nonadecano, n-Nonadecano	Combustible (parafina)
<b>11</b>	25.098	6.55	99	2-nonadecanona	Nonadecan-2-ona	Repelente vs insectos y otros animales
<b>12</b>	25.492	0.46	95	9-ácido octadecenoico	Ac. oleico	Acelera la cicatrización de la piel, es antioxidante
<b>13</b>	25.745	1.37	99	Ácido linoleico etil ester	Ester etílico del ácido linoleico; Etil linoleato	Antiinflamatorio
<b>14</b>	25.813	10.40	99	Oleato de etilo	Ester etílico del ácido oléico	Antiinflamatorio, cicatrizante
<b>15</b>	26.088	2.80	97	Ácido octadecanoico etil ester	Ácido esteárico etil ester; ácido octadecanoico	Hidrata y humecta la piel. Regenera y protege la barrera natural de la piel.
<b>16</b>	26.507	2.15	99	Oxirano tetradecil	Hexadecano 1,2 epoxi; hexadeceno epóxido	Hidrocarburo de la familia de los alcanos presente en la cera
<b>17</b>	27.394	8.07	97	2 Heptadecanona	2-Heptadecanona	Es un alcano de la cera de las abejas la cual tiene acción antiinflamatoria y cicatrizante
<b>18</b>	29.800	6.60	99	4H-1-Benzopiran-4-ona, 2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-fenyl-, (S)	Pinocembrina	Antimicrobiano

\*Tiempo de retención (TR)

TIC Propóleo FES Cuautitlán

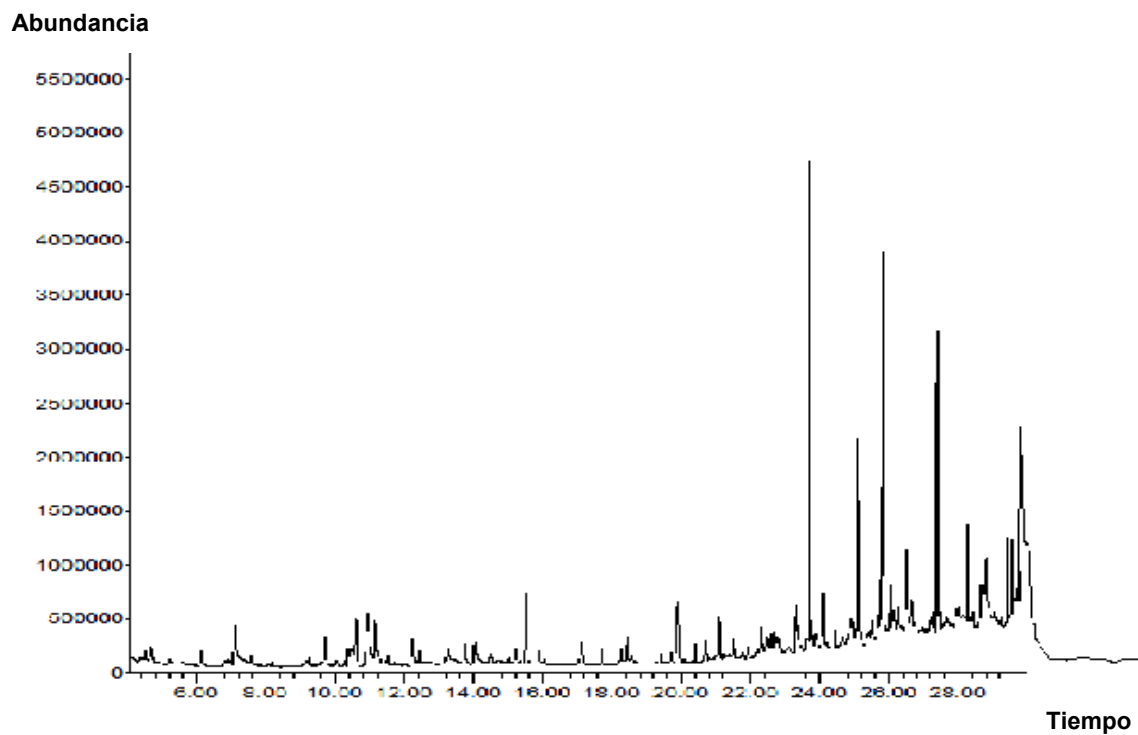


Fig. 10 TIC correspondiente al análisis de propóleo de FES Cuautitlán mediante GC-MS

## 7.2 Prueba de Sensibilidad Cualitativa

### 7.2.1 Prueba de Inhibición de Crecimiento Radial

Una vez sembradas las cepas en los medios SDA y ADM se determinó el tiempo óptimo de crecimiento para las 10 cepas de *Malassezia pachydermatis* utilizadas, el cual fue de 72 horas a 33°C; por lo tanto este fue el tiempo que se estipuló como el idóneo para cosechar las cepas y realizar la preparación del inóculo.

Debido a que todas las concentraciones de propóleo se expresaron en miligramos (mg), se realizó la conversión a mg de las concentraciones a las cuales venían los antifúngicos convencionales (cuadro 8).

Antifúngico	Carga del disco	Carga del disco en mg
NY1	100 IU	0.02059
NY2		
CTR1	50µg	0.05
CTR2		
VCZ1	1 µg	0.001
VCZ2		
KET1	50µg	0.05
KET2		
P2A	2 mg	2 mg
P2B		
P4A	4 mg	4 mg
P4B		
P8A	8 mg	8 mg
P8B		
P16A	16 mg	16 mg
P16B		

Cuadro 8 Carga de antifúngicos expresada en mg, donde NY-nistatina, CTR-clotrimazol, VCZ-voriconazol, KET-ketoconazol, P2 A y B-propóleo 2mg, P4 A y B-propóleo 4mg, P8 A y B-propóleo 8mg y P16 A y B-propóleo 16mg.

Los diámetros de los halos de inhibición producidos por propóleo se expresan en el cuadro 9, en esta misma tabla se expresan los diámetros de los antifúngicos conocidos.

<i>Antifúngico</i>	<i>Diámetro de los halos de inhibición mm</i>	<i>Carga del disco/mg</i>
NY1	25.75	0.02059
NY2		
CTR1	26.00	0.05
CTR2		
VCZ1	36.42	0.001
VCZ2		
KET1	53.50	0.05
KET2		
P2A	25.33	2
P2B		
P4A	24.42	4
P4B		
P8A	24.50	8
P8B		
P16A	24.00	16
P16B		

*Cuadro 9 Promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por los antifúngicos convencionales y propóleo.*

Al valorar los halos de inhibición, se observó que las levaduras expresaron una gran susceptibilidad a Ketoconazol seguido de Voriconazol, los halos de Nistatina y Cotrimazol se observaron semejantes a los de propóleo, además todas las cepas expresaron ser sensibles a todas las concentraciones de propóleo utilizadas (figura 11).



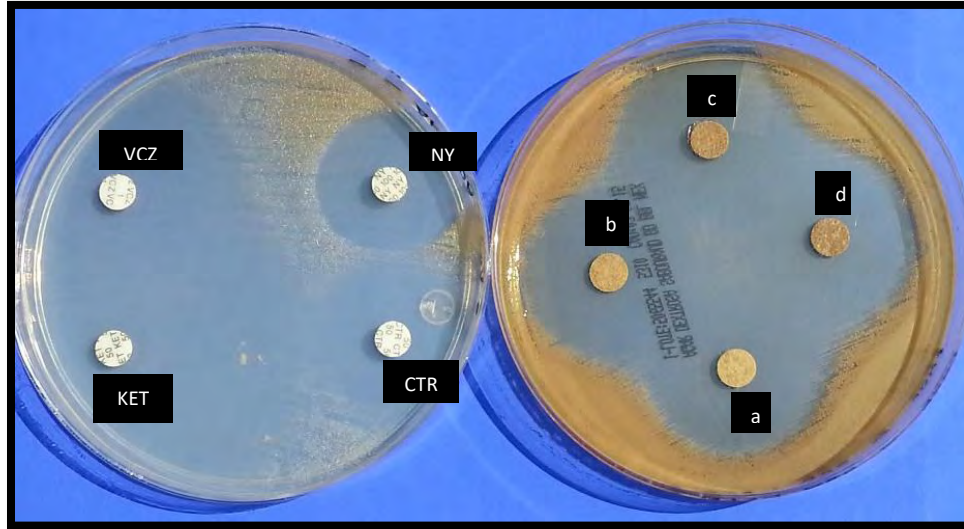


Fig. 11 Prueba de inhibición de crecimiento radial de *Malassezia pachydermatis* en SDA; Ketoconazol (KET), Voriconazol (VCZ), Nistatina (NY) y Clotrimazol (CTR). Concentraciones de propóleo a-2mg/ml, b. 4mg/ml, c-8mg/ml, d-16mg/ml.

Por otro lado ninguna cepa desarrollo halos de inhibición ante los discos impregnados con alcohol y DMSO (figura 12).



Fig. 12 Controles negativos de la prueba de inhibición de crecimiento radial de *Malassezia pachydermatis*, los sensidiscos impregnados con alcohol y DMSO no provocan la formación de halos de inhibición.

Al analizar los datos estadísticamente se demostró que todas las concentraciones de propóleo formaron halos de inhibición del mismo diámetro. Ketoconazol fue el antimicótico al cual las levaduras fueron más sensibles seguida la respuesta por Voriconazol. Por otro lado los halos de inhibición producidos por Nistatina y Clotrimazol no muestran diferencia significativa con los producidos por las diferentes concentraciones de propóleo (figura 13).

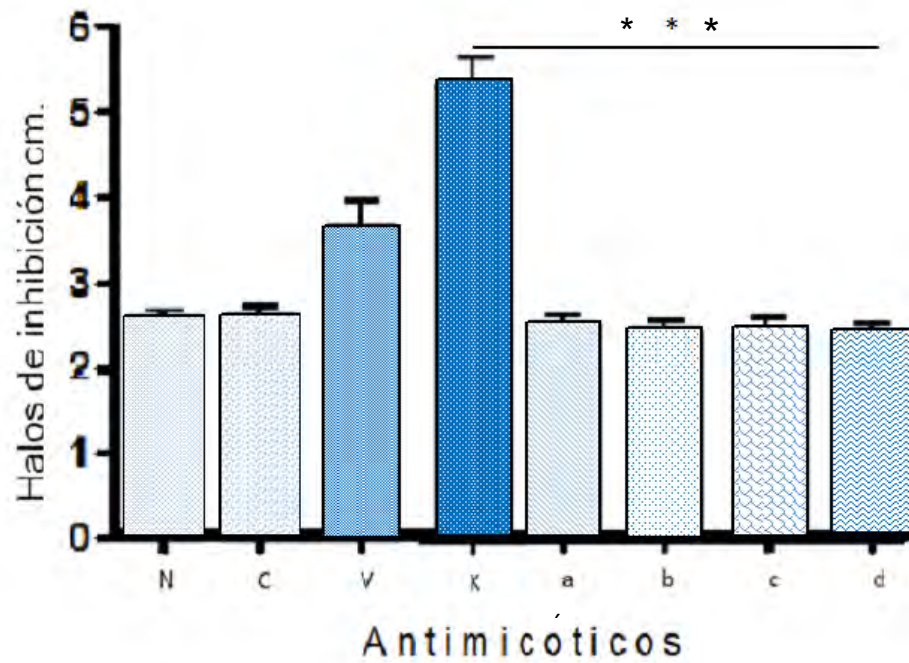


Fig. 13 La gráfica demuestra como *Malassezia pachydermatis* fue más sensible a Ketoconazol (K) y Voriconazol (V). Las mediciones de los halos de inhibición de Nistatina (N), Clotrimazol (C) y Propóleo (a, b, c y d) no muestran diferencia significativa. Los halos de propóleo con respecto a Ketoconazol si presentan una diferencia significativa ( $p < 0.0005$ ).

### 7.3 Prueba de Sensibilidad Cuantitativa

#### 7.3.1 Prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Para determinar la CIM se observó el grado de turbidez de los tubos con ayuda de un espejo y a tras luz, todos los tubos con concentraciones mayores a 0.25 mg/ml de propóleo tuvieron turbidez y sedimentación (figura 14), lo que dificultó la lectura. Los controles positivo y negativo demuestran como el crecimiento de la levadura causa turbidez (figura 15).

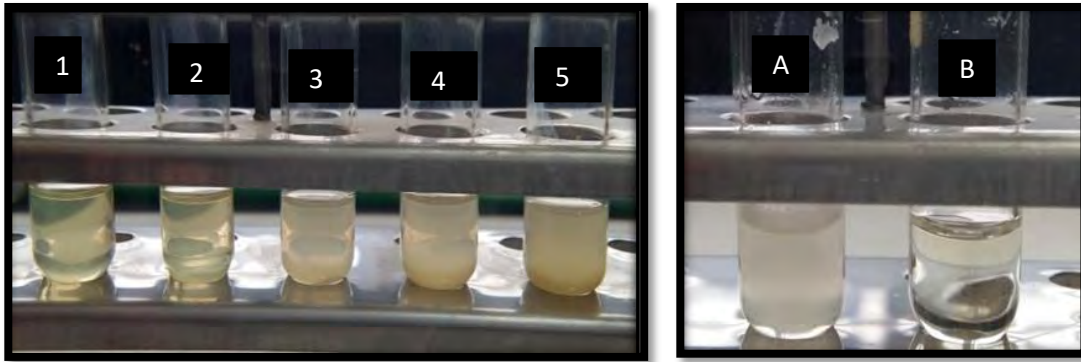


Fig. 14 Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) en tubo con caldo Sabouraud; cada tubo fue preparado con SDA, inóculo y diferentes concentraciones de propóleo: (tubo 1) 0.25 mg/ml, (tubo 2) 0.50 mg/ml, (tubo 3) 1 mg/ml, (tubo 4) 1.5 mg/ml y (tubo 5) 3 mg/ml. Los tubos control de la CIM fueron (A) Tubo control positivo- caldo Sabouraud y levadura, (B) Tubo control negativo-caldo Sabouraud. En el control positivo se observa una nata en la superficie del caldo debida al crecimiento de *Malassezia pachydermatis*. La CIM es difícil de determinar ya que todos los tubos muestran turbidez.

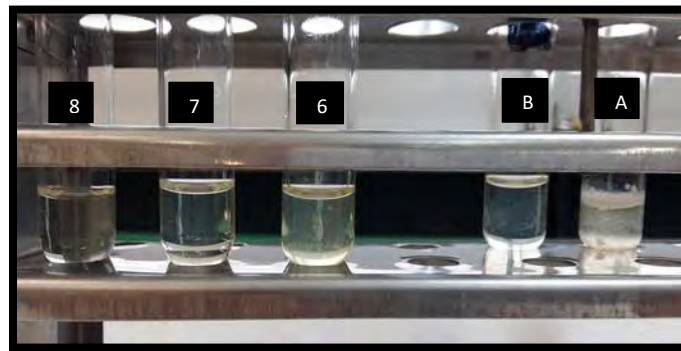


Fig. 15 Prueba de Concentración inhibitoria mínima en tubo con caldo Sabouraud; (A) tubo control positivo, (B) tubo control negativo, en el tubo A se aprecia el crecimiento de la levadura. Los tubos 6, 7 y 8 con caldo Sabouraud, inóculo y 0.20 mg/ml, 0.15 mg/ml y 0.10 mg/ml de propóleo respectivamente mostraron un aspecto claro.

Debido a que las concentraciones que van de 0.10 a 0.20 mg/ml de propóleo no muestran turbidez, la CIM en promedio para todas las cepas fue de 0.25 mg/ml (cuadro 10).

Cepa	EEP 0.10 mg/ml	EEP 0.15 mg/ml	EEP 0.20 mg/ml	EEP 0.25 mg/ml	EEP 0.5 mg/ml	EEP 1 mg/ml	EEP 1.5 mg/ml	EEP 3 mg/ml
1	-	-	-	+/-	+	+	+	+
2	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+
3	-	-	-	+/-	+	+	+	+
4	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+
5	-	-	-	+/-	+	+	+	+
6	-	-	-	+/-	+	+	+	+
7	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+
8	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+
9	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+
ATCC 14522	-	-	-	+/-	+	+	+	+

Cuadro 10 Lectura de la CIM de *Malassezia pachydermatis* (0.25 mg/ml) a las 72 horas. pos incubación. Tubo con aspecto claro (-), tubo con aspecto turbio (+) y tubo con poca turbidez pero con presencia de sedimento (+/-)

### 7.3.2 Prueba de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)

Debido a las características de la prueba anterior y al reto que representa hacer una lectura confiable, la CFM se corrió para todas las concentraciones probadas en la CIM. La CFM para las cepas 2, 4, 5 y 7 fue de 0.10 mg/ml ya que el crecimiento de colonias de la levadura fue de menos de 3 o bien no hubo crecimiento en esta concentración. Para las cepas 1, 3, 6, 8 y ATCC 14522 la CFM fue de 0.15 mg/ml (cuadro 11).

Cepa	EEP 0.10 mg/ml	EEP 0.15 mg/ml	EEP 0.20 mg/ml	EEP 0.25 mg/ml	EEP 0.5 mg/ml	EEP 1 mg/ml	EEP 1.5 mg/ml	EEP 3 mg/ml	CFM mg/ml
1	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15
2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
3	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15
4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
6	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15
7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
8	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15
9	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15
ATCC 14522	+	-	-	-	-	-	-	-	0.15

Cuadro 11 Lectura de la CFM de *Malassezia pachydermatis* a las 72 horas pos incubación

Para desarrollar las pruebas de microscopía se eligieron únicamente dos cepas; la cepa ATCC 14522 que fue sensible al efecto antifúngico de propóleo y la cepa 9 que también mostro ser sensible a propóleo además de que fue una con mejor desarrollo en las tres primeras pruebas (figura 16).

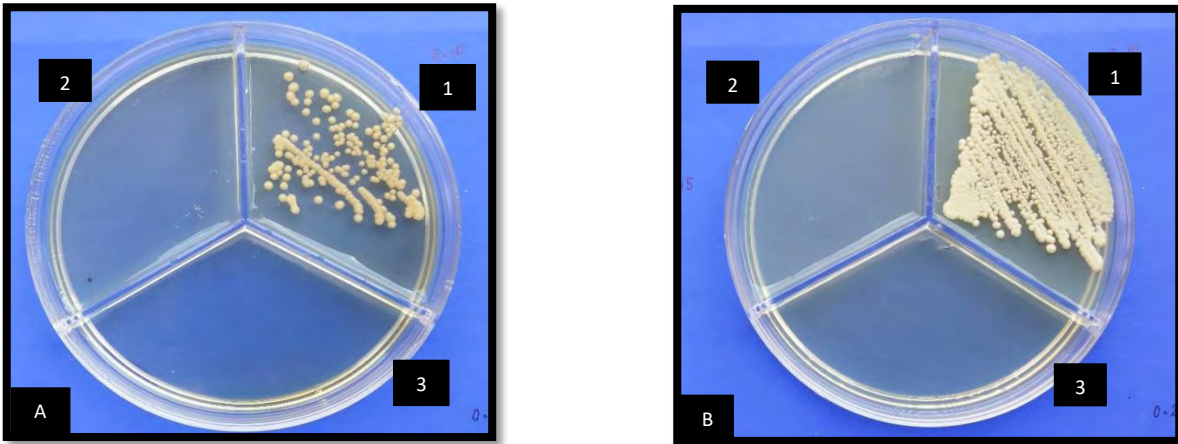


Fig. 16 CFM de la cepa de campo No. 9 (A) y de la cepa ATCC 14522 (B), el crecimiento de la levadura fue inhibido por efecto del propóleo, el valor de éste para ambas cepas fue de 15 mg/ml de propóleo. En ambas figura la concentración de propóleo fue (1) 10 mg/ml, (2) 15 mg/ml y (3) 20 mg/ml.

Para la interpretación de los resultados se consideró lo establecido por el CLSI (por sus siglas en ingles Clinical and Laboratory Standards Institute) que indica lo siguiente:

**Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)**

a) Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

Para los **antifúngicos fungistáticos**, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ( $\geq 50\%$ ), comparada con el crecimiento control.

Para los **antifúngicos fungicidas**, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Determinación de la CFM, se obtiene a partir de la CIM; de acuerdo con el CLSI, debe haber menos de tres colonias para ser considerada como CFM [16].

b) Método de difusión en disco M44-A

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido.

#### **7.4 Microscopía óptica**

En la tinción de Gram las levaduras no tratadas con propóleo en comparación con las levaduras tratadas con 25 mg/ml de propóleo muestran cambios en su morfología, se observaron con una forma redondeada (figura 17).

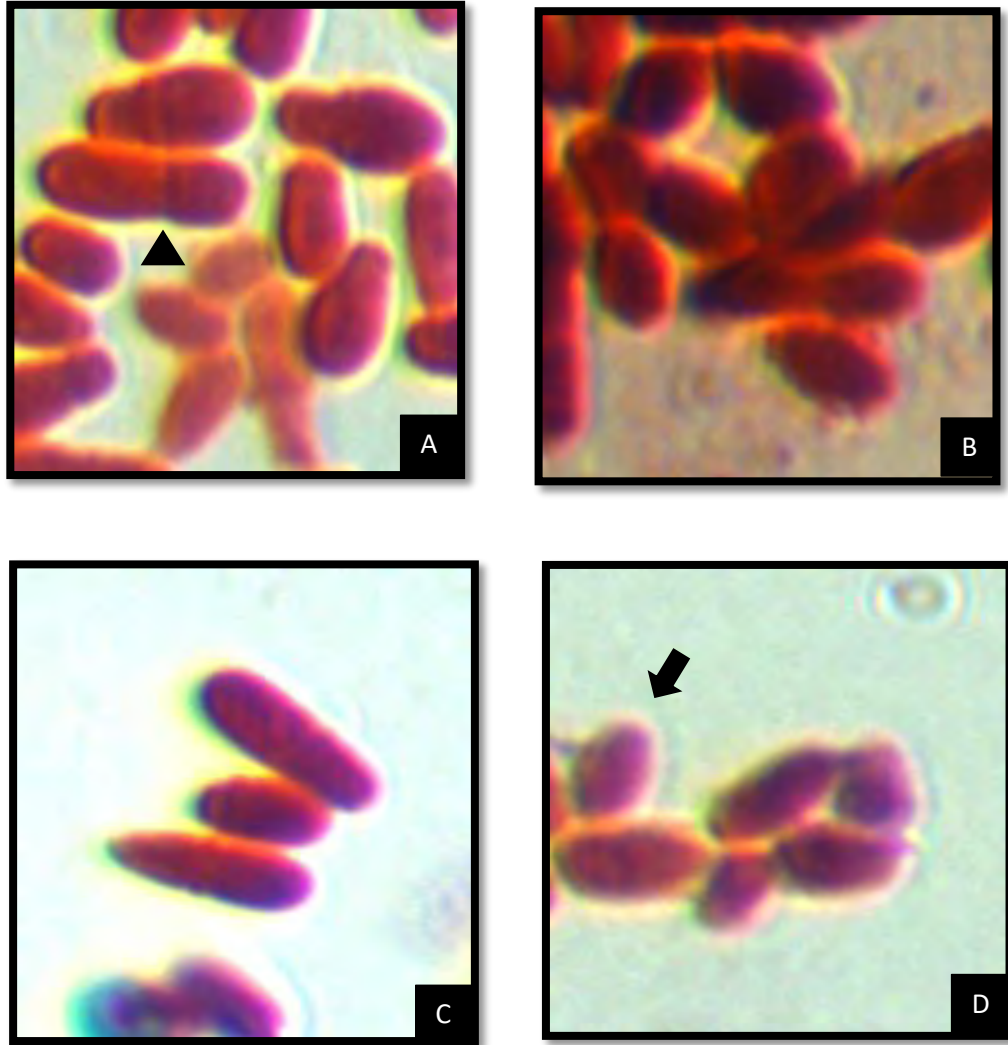


Fig. 17 Tinción de Gram de *Malassezia pachydermatis* 100x. (A) Cepa de campo sin tratamiento, (B) Cepa de campo tratada con 25 mg/ml de EEP, se pierde la forma de “huella de zapato” (triángulo) debido al tratamiento con propóleo. (C) Cepa ATCC 14522 sin tratamiento y (D) Cepa ATCC 14522 tratada con 25 mg/ml, las levaduras tratadas adquieren una forma redondeada (flecha); visualmente esto corresponde a una disminución en la longitud y un incremento en el ancho de la levadura.

Al realizar el análisis estadístico de las mediciones de largo y ancho de los cuerpos de las levaduras se observó un ligero incremento en el ancho de las levaduras tratadas (figura 18) y un decremento en la longitud (figura 19), lo anterior comprueba un cambio en la morfología.

Gráfica comparativa del efecto de propóleo sobre el ancho de *Malassezia pachydermatis*  
**M. pachydermatis ancho micras**

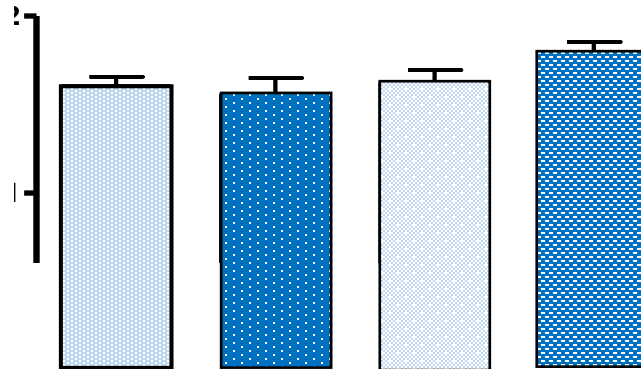


Fig. 18 Efecto de propóleo a una concentración de 25 mg/ml sobre el ancho de la levadura. La cepa ATCC 14522 tratada (ATCC ctx) no muestra una diferencia significativa en comparación con la no tratada (ATCC stx), por otro lado la cepa de campo tratada (Campo ctx) tampoco muestra diferencia significativa en comparación con la no tratada (Campo stx).

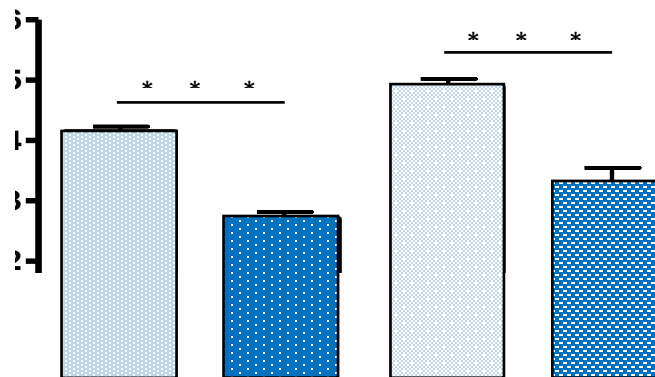


Fig. 19 El tratamiento de *Malassezia pachydermatis* con 25 mg/ml provoca un decremento en la longitud del cuerpo de la levadura. La cepa ATCC 14522 tratada (ATCC ctx) muestra diferencia significativa en la longitud en comparación con la no tratada (ATCC stx)  $p < 0.0001$ . La cepa de campo tratada (Campo ctx) presenta diferencia significativa en comparación con la no tratada (Campo stx)  $p < 0.0001$ .



## 7.5 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las micrografías electrónicas de barrido de *Malassezia pachydermatis* de la cepa ATCC 14522 sin tratamiento de propóleo mostraron diversos estadios de la levadura, se observaron levaduras inmaduras, en estado de gemación y maduras. Los cuerpos de las levaduras tuvieron una forma cilíndrica u oval y la superficie de las células se observaron lisas e íntegras. La manera en la que las levaduras forman cúmulos fue evidente. Por otro lado se observó una serie de estructuras de morfología variable que aparentemente sirven de soporte a las levaduras (parecido a una matriz extracelular) lo que hace pensar que corresponde a un biofilm. (figura 20 A y B)

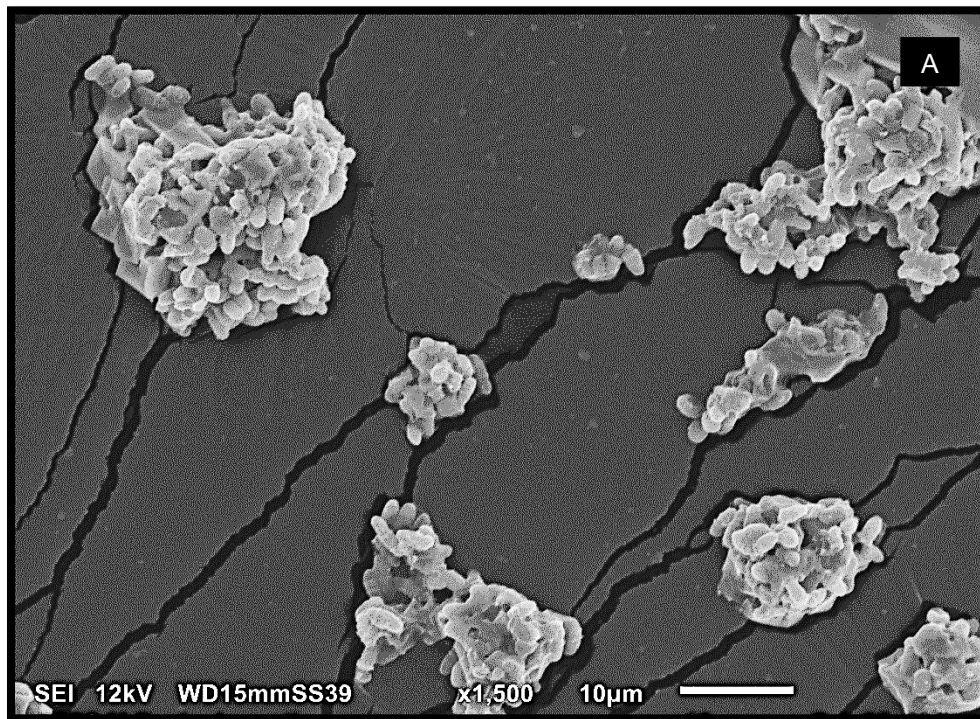


Figura 20 A Microscopía electrónica de barrido de la cepa ATCC 14522 de *Malassezia pachydermatis* sin tratamiento con propóleo

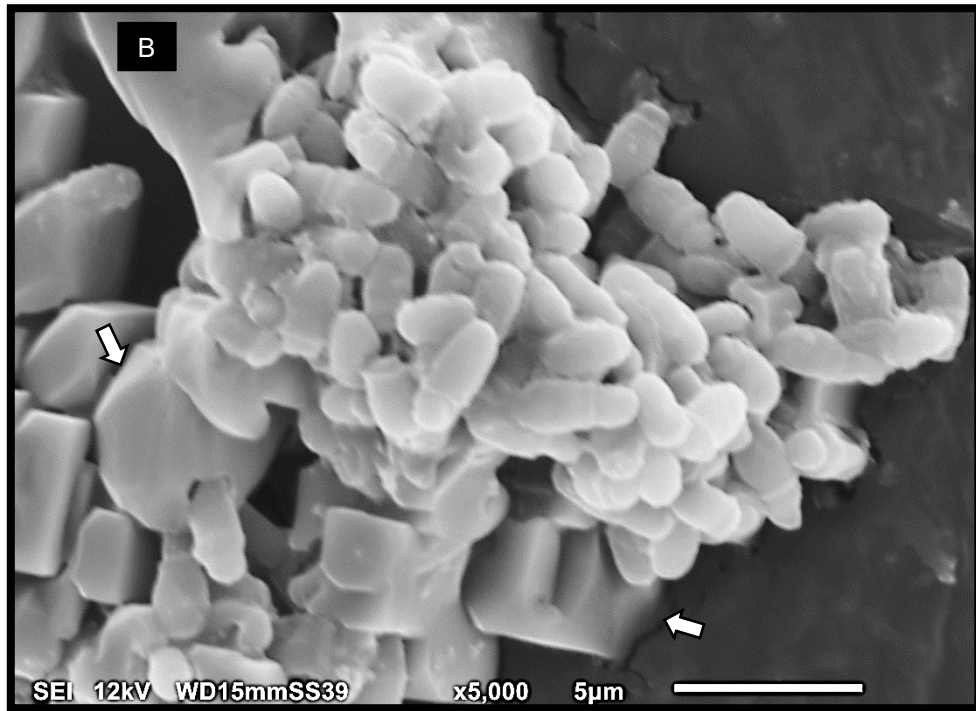


Fig. 20 B Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* cepa ATCC 14522 sin tratamiento de propóleo. (A-B) Se observan cúmulos de levaduras con cuerpos cilíndricos y ovales, superficies celulares lisas e íntegras (1500x y 5000x respectivamente). En la figura (B) se observó la presencia de biofilm (flecha)

Al recibir el tratamiento con propóleo las levaduras cambiaron su morfología, se observaron de aspecto grumos y con pérdida de continuidad en la superficie celular. También se observaron diferentes estadios de destrucción celular (figura 21 A-B).

Algunas levaduras en las que la ruptura no es franca se apreció invaginación de la superficie celular (figura 22 A-B)

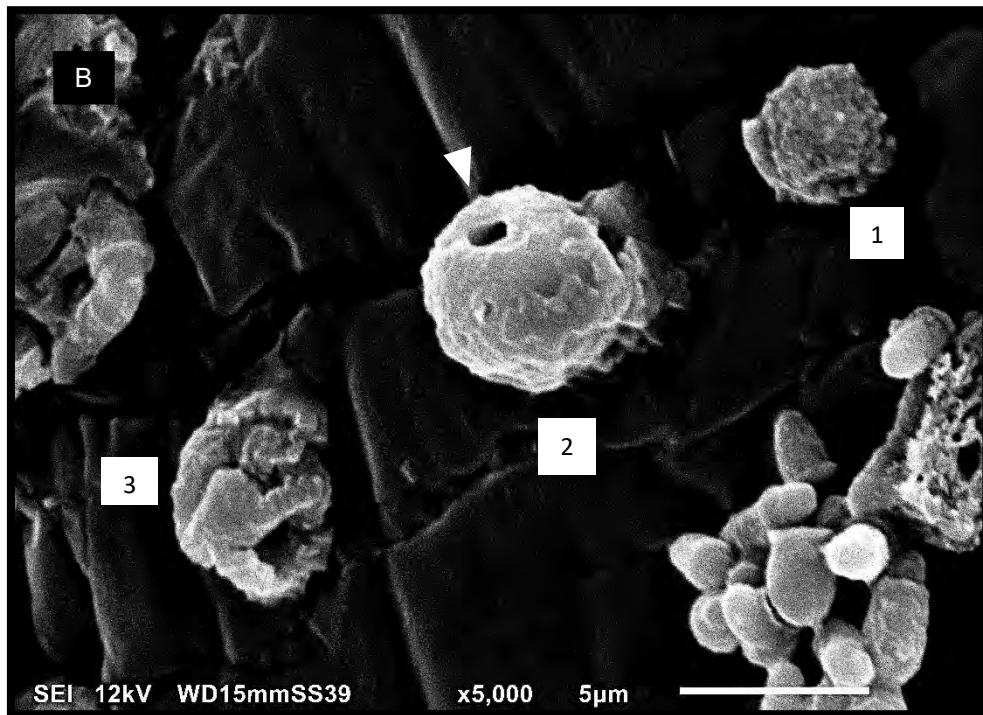
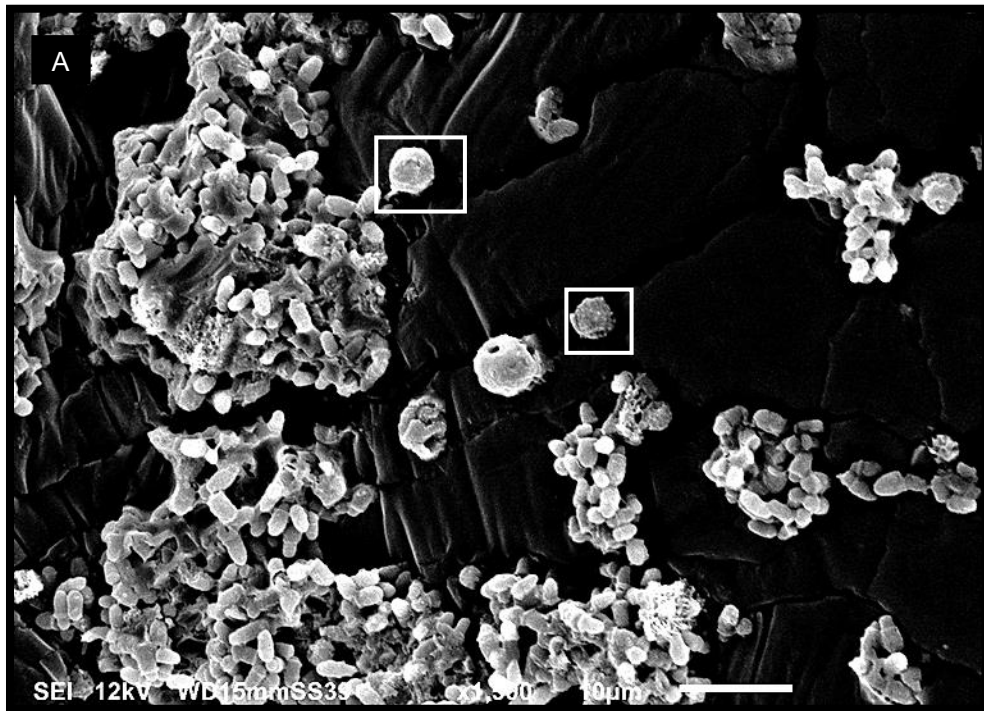


Fig. 21 Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* cepa ATCC 14522 con tratamiento de propóleo. A) Se observan cambios en la morfología de la levadura, aquellas que se encuentran modificadas poseen una superficie celular de aspecto grumoso (recuadro) por el tratamiento con EEP a una concentración de 25 mg/ml. Las levaduras fueron incubadas en SDA durante 72 horas a 33°C (1500x). B) Se observan diferentes estadios (1, 2, 3) que evidencian el aumento de tamaño y ruptura de las levaduras debido al tratamiento con EEP (triángulo) 5000x.

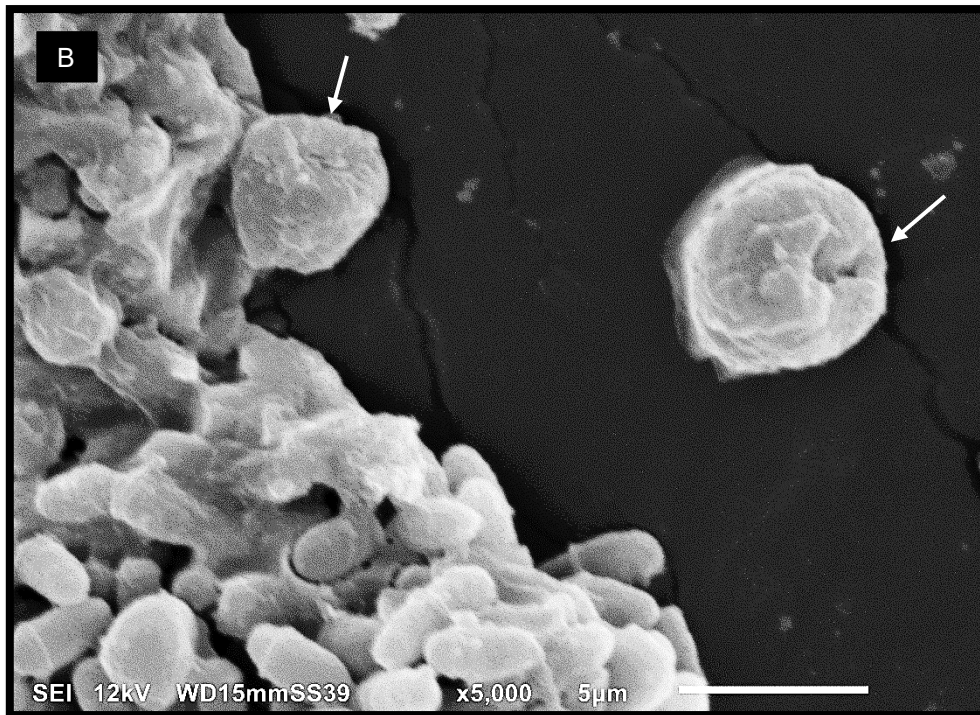
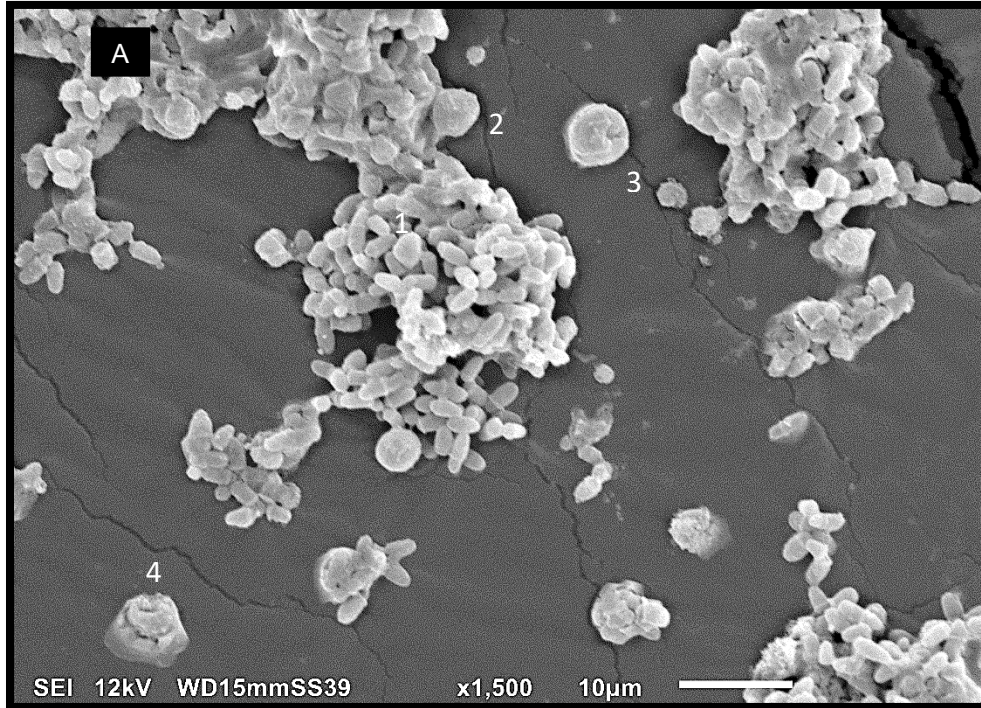


Fig. 22. Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* cepa ATCC 14522 con tratamiento de propóleo. A) Se observan estructuras esféricas en diversos estadios (1, 2, 3, 4) por el tratamiento con EEP a una concentración de 25 mg/ml durante 72 horas en SDA a 33°C (1500x). B) Estructuras esféricas con invaginación de la superficie celular y posible ruptura debido al tratamiento con EEP 5000x.

Las micrografías electrónicas de barrido de *Malassezia pachydermatis* de la cepa de campo sin tratamiento muestran semejanza de morfología, de agrupación y de estados de desarrollo con la cepa ATCC 14522 (figura 23 A-B)

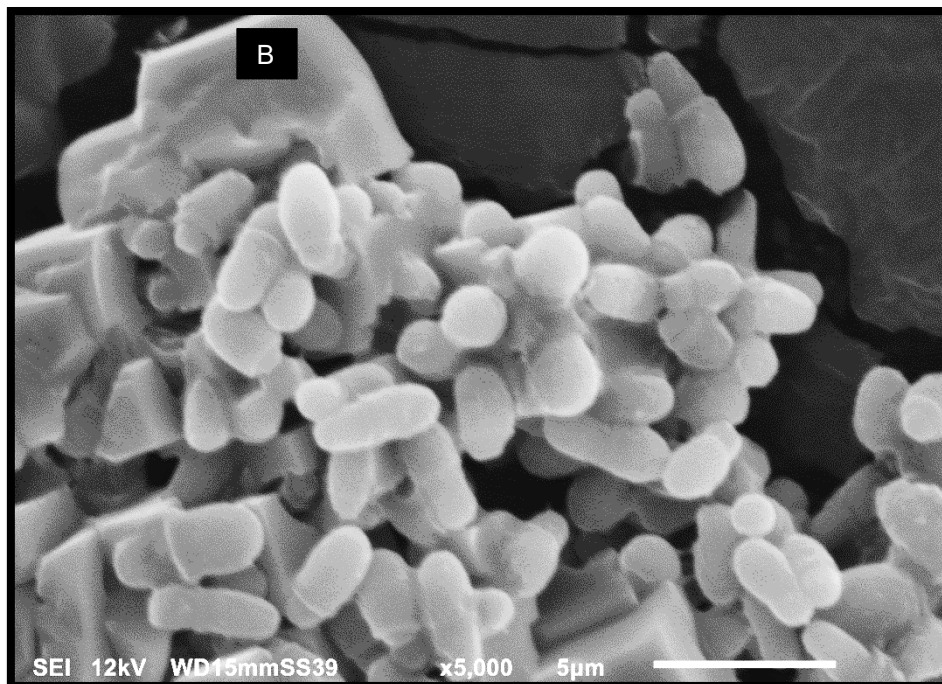
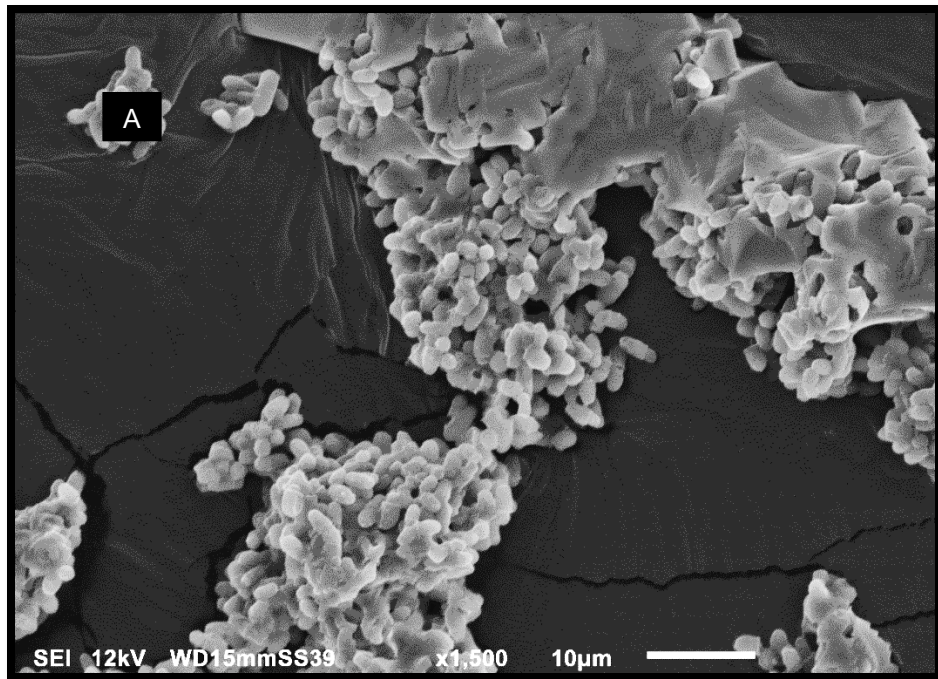


Fig. 23 Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* sin tratamiento de propóleo aislada del caso clínico No. 9. A-B) Se observan cúmulos de levaduras enteras con morfología característica (1500x y 5000x respectivamente).

Al recibir el tratamiento con propóleo la cepa de campo, los cúmulos de levaduras disminuyeron y las pocas levaduras que se observaron tuvieron un cambio en su morfología, se apreció de aspecto grumoso la superficie celular y en aquellas de mayor diámetro se observó una gran cantidad de poros (figura 24 A-B y 25 A-B)

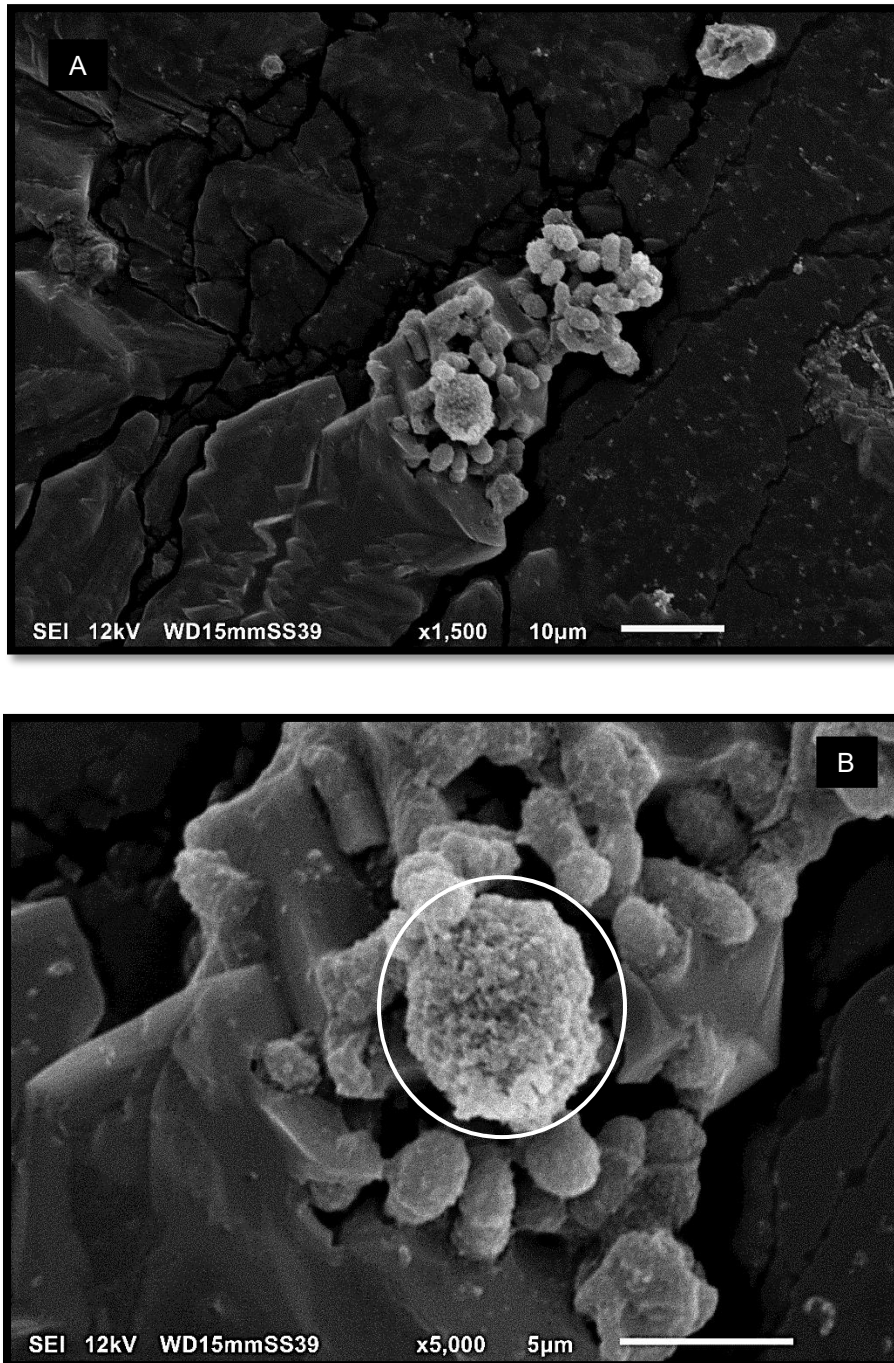


Fig. 24 Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* cepa de campo con tratamiento de propóleo a una concentración de 25 mg/ml e incubadas en SDA durante 72 horas a 33°C (1500x). A) Se observa una considerable disminución en el número de levaduras además un cambio en la morfología y células con superficie grumosa (1500x). B) Levadura esférica con presencia de poros en la superficie (círculo) (5000x).

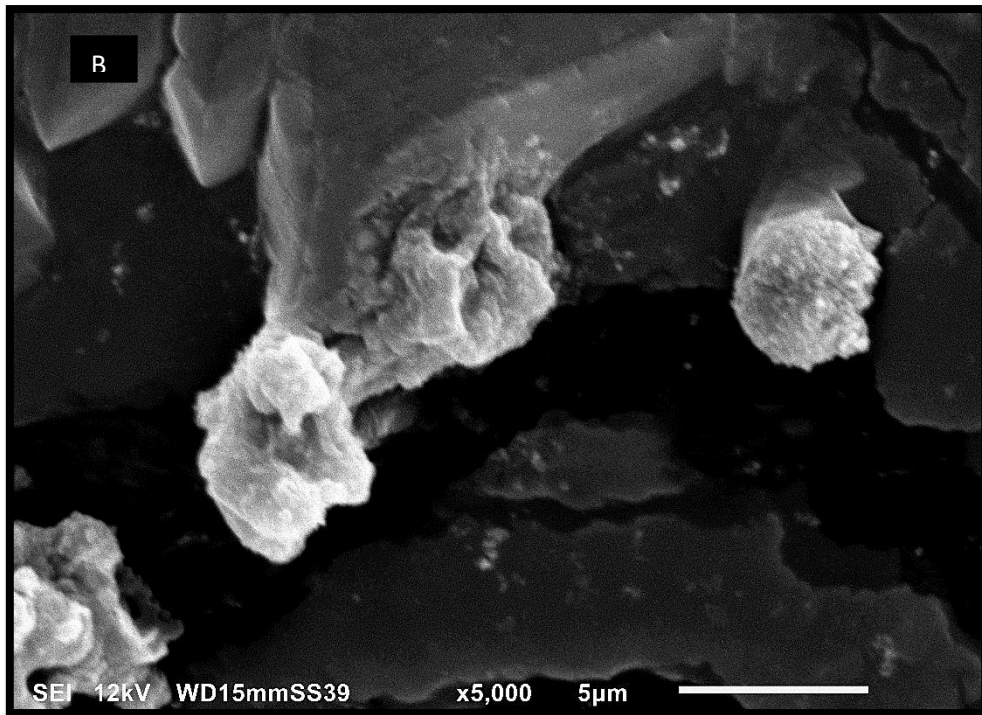
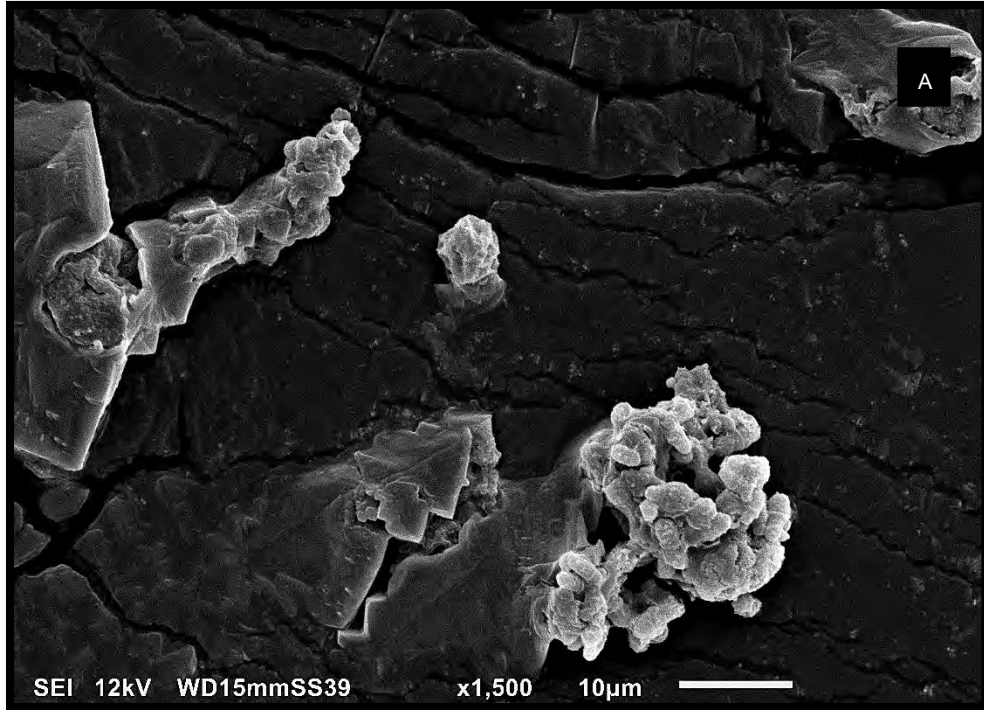


Fig. 25 Microscopía electrónica de barrido de *Malassezia pachydermatis* aislada del pabellón auricular de un perro con otitis severa tratada con 25 mg/ml de propóleo durante 72 horas a 33°C. A) Células fúngicas con la morfología alterada y una disminución en la cantidad de levaduras en el campo (1500x). B) Detalle de los diferentes estadios de destrucción celular (5000x)

# ***DISCUSIÓN***



El objetivo general de este trabajo fue evaluar la actividad antimicótica del propóleo de FES Cuautitlán sobre *Malassezia pachydermatis* y observar los cambios morfológicos producidos en la levadura.

Se realizó un análisis químico del propóleo y con él se demostró la presencia de compuestos que le confieren actividad biológica y farmacológica (figura 26), como la pinocembrina y el ácido benzoico entre otros (en orden de abundancia) que le aportan actividad antimicótica; así como la 2-heptadecanona, el oleato de etilo y el ácido palmítico que actúan como antiinflamatorios, por otro lado el ácido esteárico aunado a los dos primeros antiinflamatorios son compuestos que aceleran la cicatrización. Estos datos concuerdan con lo reportado por Gutiérrez (2011) y Rodríguez (2015), es importante recordar que los compuestos químicos que conforman al propóleo actúan de manera sinérgica [16,43].

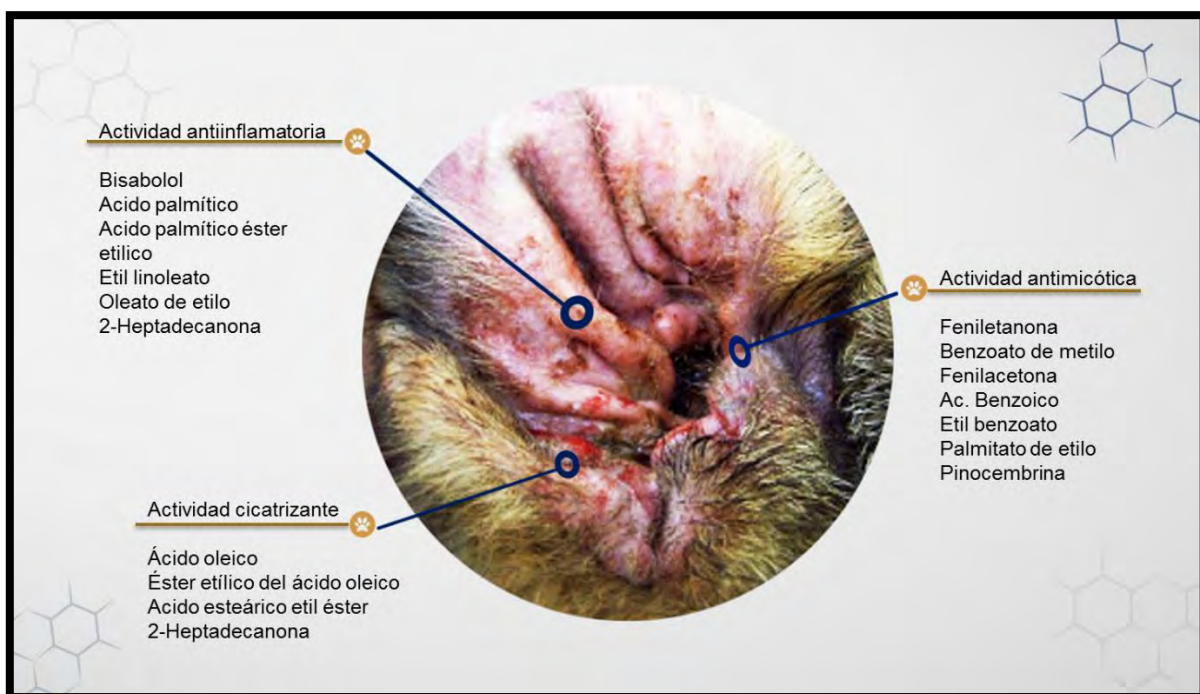


Figura 26 Posible actividad biológica del propóleo mexicano de FES Cuautitlán (en base a su composición química) que permite la recuperación clínica de pacientes con otitis canina

Existen pocos reportes sobre el efecto antimicótico sobre *Malassezia pachydermatis*. Lozina (2006) demostró la susceptibilidad *in vitro* de la levadura aún a concentraciones muy bajas lo que significa un alto contenido de principios activos responsables de la acción farmacológica. De manera similar Cardoso (2010), evaluó el efecto bactericida y antifúngico del propóleo de Brasil, reportó que el propóleo tuvo efecto antimicrobiano *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis* y *Staphylococcus coagulasa* + (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius*), estos microorganismos están presentes en la otitis canina de manera sinérgica, por lo tanto el propóleo sería una excelente alternativa de tratamiento en esta patología. Ambos autores observaron crecimiento microbiano en todos sus controles alcohólicos, del mismo modo en el presente trabajo los discos impregnados con alcohol y DMSO utilizados en la prueba de inhibición de crecimiento radial no produjeron halos de inhibición.

En el mismo estudio Lozina reportó una CIM para el propóleo argentino de 0.30 mg/ml y Cardoso reportó una CIM de 0.26 mg/ml para el propóleo brasileño, en comparación con el presente estudio el promedio de la CIM para las 10 cepas evaluadas fue de 0.25 mg/ml, lo anterior demuestra que el propóleo mexicano, específicamente el de FESC Cuautitlán tiene la misma calidad que los otros dos propóleos sudamericanos, considerando que el propóleo de Brasil es uno de los mejores del mundo.

En el estudio de Lozina (2006) sugiere que el efecto del propóleo argentino sobre las cepas de *Malassezia pachydermatis* estudiadas fue tanto fungistático como fungicida. De acuerdo a nuestros resultados con las cepas y el propóleo empleado el efecto que se observó fue fungicida. Es importante señalar que la prueba de CIM y CFM debe realizarse en tubo ya que es difícil realizar la lectura en microplacas con lector de ELISA, dado que el efecto inhibitorio no puede ser evaluado en la placa por la turbidez que provoca el propóleo.

En el presente trabajo se comprobó que todas las cepas de *Malassezia pachydermatis* expresaron sensibilidad al propóleo de FES Cuautitlán. Al evaluar los halos de inhibición de todas las concentraciones de propóleo se observó semejanza con los producidos por los antimicóticos que alteran la membrana celular (Polienos-Nistatina y Azoles-Clotrimazol). Sin embargo nunca superaron el diámetro de los halos de inhibición producidos por Ketoconazol, éste fue el antimicótico al que las levaduras fueron más sensibles. Es sabido que Ketoconazol es el antimicótico más utilizado en la formulación de medicamentos para el tratamiento de la otitis canina y a pesar de que el efecto de propóleo no lo superó si se considera éste como una alternativa de tratamiento en pacientes con una alta recidiva de la patología, sobre todo cuando se está en espera de resultados de laboratorio (cultivo con antibiograma o antifungigrama) para elegir el antibiótico o antimicótico de elección ya que el propóleo ofrece importantes beneficios en la terapéutica de la enfermedad por ser antiinflamatorio, antifúngico y cicatrizante dados por los componentes químicos que posee.

Este estudio contemplo la determinación de los cambios estructurales mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de la levadura al recibir el tratamiento con propóleo, es importante señalar que no se encontró en la literatura reportes que evidencien cambios estructurales. En este proyecto se observó que la forma clásica de *Malassezia pachydermatis* se alteró transformándose la levadura por el tratamiento de propóleo y adquirió una forma redonda; estadísticamente se demostró que hubo una alteración en la longitud del cuerpo de la levadura. Lo anterior demuestra que el propóleo produjo cambios en la estructura externa de la levadura, para tener una comprensión más detallada de los componentes celulares que son alterados se recomienda que esto sea evaluado mediante microscopía electrónica de transmisión.

Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido solo existen trabajos sobre *Malassezia pachydermatis* de casos clínicos que muestran a la levadura en su estado normal [45], en éste se muestran levaduras en diferentes estados de evolución, hay levaduras juveniles, maduras y en estado de gemación; morfológicamente se observan levaduras de forma ovoide a helicoidal (simulando la huella de un zapato). No se encontraron referencias bibliográficas de trabajos similares a éste en el uso de propóleo contra *Malassezia*.

Los cambios observados en la cepa de *Malassezia pachydermatis* ATCC 14522 fueron: transformación de la morfología clásica ovoide a una esférica, superficie celular de aspecto grumoso, invaginación, perforación de la envoltura celular y diferentes estadíos de destrucción celular.

Los observados en la cepa No. 9 de *Malassezia pachydermatis* de campo fueron: disminución en el número células fúngicas por campo, transformación de la morfología clásica ovoide a una esférica, superficie celular de aspecto grumoso, presencia de poros en la superficie celular diferentes estadíos de destrucción celular.

La diferencia significativa entre ambas cepas fue la presencia de las perforaciones observadas en la cepa de referencia ATCC, esto no se presentó en la de campo. En ambos tipos de cepas se observó una serie de estructuras de morfología variable que aparentemente sirven de soporte a las levaduras, que semeja una matriz extracelular (biofilm).

Luego del análisis químico del propóleo, se encontró de manera abundante la pinocembrina, el ácido benzoico y compuestos químicamente similares a él, estos son los responsables de la actividad antimicótica (cuadro 12).

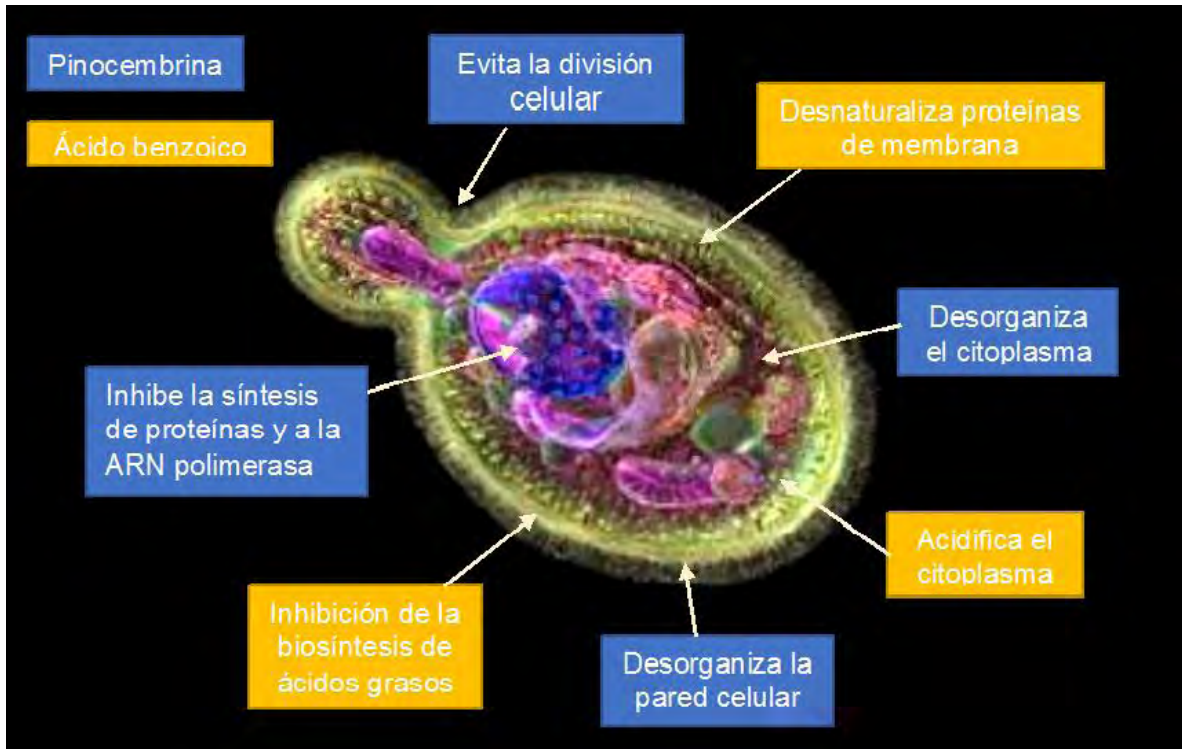
<i>Compuesto antimicótico</i>	<i>RT</i>	<i>% Area</i>
Acetofenona	9.174	0.11
Ácido benzoico, metil ester	9.688	1.17
Bencil metil cetona	10.351	1.53
Ácido benzoico	10.981	4.94
Ácido benzoico, etil ester	11.152	1.18
Ácido pentadecanoico, etil ester	21.103	1.12
Pinocembrina	29.800	6.60

*Cuadro 12 Compuestos de mayor abundancia en el EEP de FES Cuautitlán utilizado en este estudio*

De la pinocembrina se sabe que causa lisis parcial, previene la división celular al desorganizar el citoplasma y la pared celular además de inhibir la síntesis de proteínas y ARN polimerasa [51].

El ácido benzoico y sus derivados [13] tienen actividad antimicrobiana, actúan inactivando las enzimas productoras de energía, desnaturalizan las proteínas celulares lo que origina la ruptura de la membrana celular, acidifican el citoplasma e inhiben la biosíntesis de ácidos grasos; lo anterior explica el posible mecanismo de acción antimicótico del propóleo de FES Cuautitlán dado que los hallazgos en las micrografías de la microscopía electrónica de barrido evidencian la deformación, aumento de tamaño y perforaciones en la levadura (figura 27).

Hasta el momento no se ha encontrado reporte alguno sobre el daño estructural descrito en nuestra investigación, este proporciona una posible explicación del efecto de propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*.



EFFECTOS

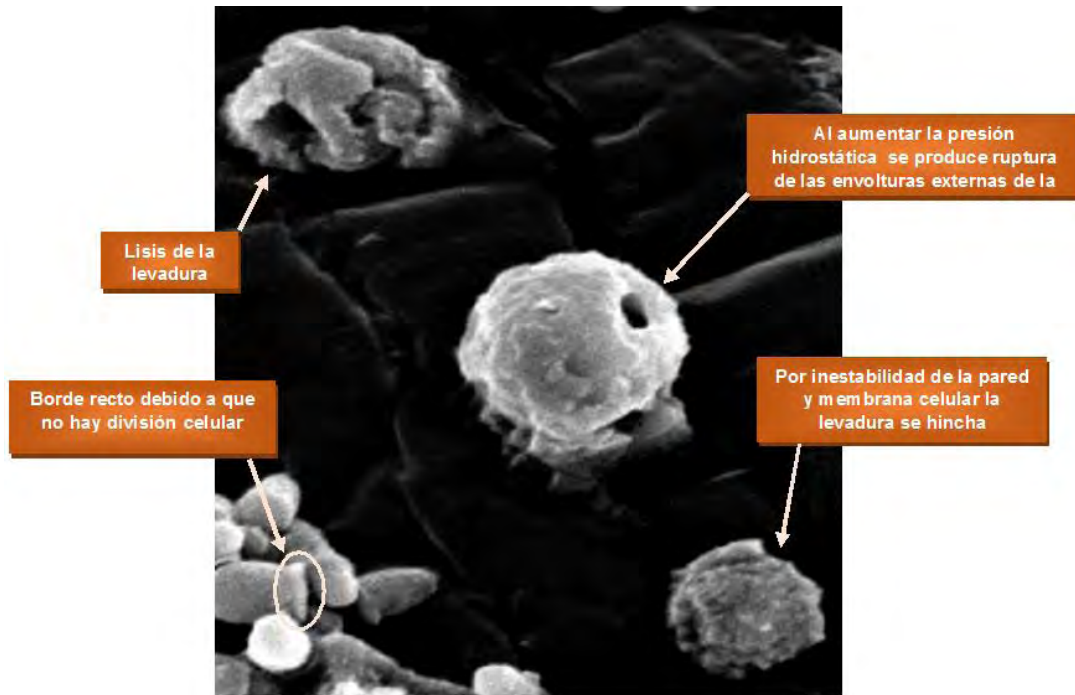


Figura 27 Propuesta del mecanismo de acción del efecto antimicrobico del propóleo de FES Cuautitlán sobre *Malassezia pachydermatis* tomando en consideración que pinocembrina, ácido benzoico y sus derivados fueron los compuestos de mayor abundancia en el análisis químico.

# ***CONCLUSIONES***

1. El propóleo mexicano tiene efecto *in vitro* sobre *Malassezia pachydermatis*.
  
2. Los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de propóleo evaluadas son semejantes a los producidos por Nistatina y Clotrimazol.
  
3. Propóleo a concentraciones de 25 mg/ml produce cambios en la morfología de la levadura, esto se comprobó mediante Microscopía óptica y de barrido.
  
4. El daño estructural observado en la Microscopia Electrónica de Barrido es semejante al descrito para los antimicóticos que dañan la pared y membrana celular del hongo, produciendo la muerte del mismo.
  
5. El propóleo mexicano puede ser útil como tratamiento alternativo de la otitis canina, teniendo como ventaja no ser tóxico para las células.
  
5. Los hallazgos fundamentan el desarrollo de una formulación tópica con propóleo mexicano como una alternativa en el tratamiento de la otitis canina, cuyos beneficios son: ser un producto natural con actividad antimicótica de baja toxicidad.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



1. Abdel-Fattah N. S., Nada OH (2007) Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 37, 691-710
2. Bankova V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of ethnopharmacology* 100,114-117, 2005.
3. Bankova V., Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*,2 (1): 29-32, 2005, 10.1093/ecam/neh059
4. Bassani-Silva S, Sforcin J. M., Amaral A. S., Gazpar Luiz F. J., Rocha Noeme S (2007) Propolis effect in vitro on canine Transmissible Venereal Tumor cells. *Revista Portuguesa de Viencias Veterinarias*, 102, 261-265
5. Bedascarrasbure E., Maldonado L., Alvarez A., Rodríguez E., Contenido de fenoles y flavonoides de propóleos argentinos, *Acta Farm. Bonaerense*, 23 (3): 369-72, 2004.
6. Bogdanov S., Propolis: Composition ,health, medicine: a review, *Bee product science*:1-22, 2016, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)
7. Cardoso R.L., Maboni F., Machado G., Hartz Alves S., Agueda Castagna de Vargas, Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis, *Veterinary microbiology* 142, 342-434, 2010.
8. Costa Cinegaglia N., Oliveira Bersano P.R., Mendes Araújo M.J.A., Cristiane Bufalo M., Sforcin J.M. (2013) Anticancer effects of geopropolis produced by sting less bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/737386>
9. Cruz Sánchez T. A., Estrada García P. A., López Zamora C. I., Autran Martínez M., Pérez Valencia V., Londoño Orozco A. (2014) Use of propolis for topical treatment of Dermatophytosis in dog. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 4, 239-245, <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2014.410028>
10. Dantas de Almeida L. de F., Wanderley Cavalcanti B. Y., Lira Junior B. R., Oliveira Lima E., Dias de Castro R. (2012) Efecto antimicótico de las tinturas a partir del propóleo y pomegranate contra las especies de *Candida*, *Revista Cubana de Estomatología*, 26, 99-106.
11. El Ashry E.S.H. Ahmad T.A. (2012) Review The use of propolis as vaccine adjuvant, *Vaccine*, 31, 31-39. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.095
12. Ferreira L. N., Fonseca F. P., Caetano de Castro C., Sica Siedler B., Silveira Munhoz L., D'Avila Vargas G., Fischer G., Oliveira Hubner S. (2012) Effect of the etanolic extract from green propolis on production of antibodies after immunization against canine parvovirus (CPV) and canine coronavirus (CCoV), *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 49, 116-122.
13. García Pina J., Aplicación de ácidos orgánicos como conservantes en productos cárnicos, *Chemital técnicas alimentarias*.
14. Giral T., Hugues B., Soto C. J. (2007) Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatias en animales afectivos, *Recvet*, II. <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n090907.html>
15. Gregori Valdes B. S., Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana Farm*, 2005, 39 (2).

16. Gutierrez Hernández E., Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aislada de conejos , UNAM, Tesis de grado maestría, 2011.
17. Hee Youn Chee, *In vitro* evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, *Microbiology*, 30 (2): 93-95, 2002.
18. Ilewicz L, Luciak M, Skrobidurska D, Scheller S, Stojko A (1979) The effect of ethanol propolis extracts on the dental pulp in dogs, *Czas Stomatol*, 32, 321-9
19. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013) Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013 (2013), 11.doi: 10.1155/2013/964149
20. Lodoño Orozco A., Penieres Carrillo J.G., García Tovar C. G., Carrillo Miranda L., Quintero Mora Ma. L., García Vázquez S.E., Mendoza Saavedra M.A., Cruz Sánchez T.A., Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México, *Tecnología en marcha*, Vol. 21-1, Enero-Marzo 2008, p. 49-55.
21. Lodoño Orozco A., Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto mexicano de propóleo y de tres plantas que la *Apis mellifera* usa para su producción, Tesis de doctorado, 2010.
22. Lozina L. A., Peichoto M. E., Boehringer S. I., Koscinczuk P., granero G.E., Acosta O.C., Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.6, p.1359-1366, 2010.
23. Lozina L., Boehringer S. I., D'Aquino M., Acosta O., Eficacia del propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de distintas técnicas *in vitro*, *Acta Farm. Bonaerense* 25 (4):560-3,2006.
24. Lozina L.A., Peichoto M. E., Acosta O. C., Granero G. E., Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de 15 propóleos Argentinos, *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1):102-10. 2010.
25. Lucas T. G., Da Silva A.S., Machado G., Dalla Rosa L., Dorneles F, Gressler T L., Oliveira M. S., Zanette R.A., Agueda de Vargas C.P., Monteiro S. G. (2012) Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. *Research in Veterinary Science* 2012, 93, 1314–1317. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.02.007
26. Machicote Goth G. Otitis: una revisión actualizada (I Parte). *Allerderm revista de dermatología veterinaria*. N°14 Febrero 2005, pp 14 – 173.
27. Machicote Goth G. Otitis: una revisión actualizada (II Parte). *Allerderm revista de dermatología veterinaria*. N°15 Mayo 2005, pp 8 – 10.
28. Manrique J.A., Producción de propóleo, FONAIAP Divulga, No. 66, 2000.
29. Mayta Tovalino F., Sacsquispe Contreras S. (2010) Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATTC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Heredianan*, 20, 19-24
30. Medleau L., Hnilica K. A., *Small Animal Dermatology A color Atlas and Therapeutic Guide*. Second Edition, Second edition, Saunders Elsevier, 2006.

31. Mello Andre M., The effect of Brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*, Pharmacology on line, 3: 352-358, 2006.
32. Mendoza Cadena T. J., Determinación etiológica de la otitis en pacientes caninos utilizando como métodos diagnósticos la videoscopia, citología y cultivo en el Hospital Veterinaria All Pets de la ciudad de Quito.2011
33. Monteescu Cristina, Sayuu Vasilica, Pabel Crenguta, Radoi Ion, Sapcaliu Agripina, Cauia Eliza, Siceanu Adrian, (2011) Apiphytotherapeutic product used for nutritional therapy in dogs with liver disease. Economics, Management, and Financial Markets, 1175-1178.
34. Peña R. C., Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos, Ciencia e investigación agraria, 35 (1):17-26, 2008.
35. Pérez Castellano Ma. T., Antifúngicos dosis veterinarias para *Candidas* y *Malassezia*, Tesis 2011.
36. Perry Glenn (2006) The Veterinary Use of Water Preparation of Propolis. *ApiMedica*
37. Pieri F. A., Falci A. P., Bourguignon E., Scatamburlo Moreira M. A. (2012) Periodontal disease in dogs, A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine, 119-136. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
38. Plascencia Villa G., Curso de métodos Espectrometría de masas, Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM, 2003.
39. Premoli G., Laguado P., Díaz N., Romero C., Villarreal J., Gonzalez A., Acta odontológica venezolana, vol. 48 (2), 2010.
40. Principal J., Barrios C., Tahís Pacheco N., Corrales F., Moreno F. (2005) Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. Gaceta de Ciencias Veterinarias, 11, 31-36
41. Quintero Mora M. L., Hernández Hernández F., Luna Martínez M, Rodríguez Rodríguez J. I., Londoño Orozco A., Carrillo Miranda L., Soto Zárate C. I., García Tovar C. G., Cruz Sánchez T., Efecto del extracto Etanólico de Propóleo (EEP) sobre la expresión diferencial de los genes ADH1 y PIK1 de *C. albicans*, 17° Congreso internacional de Actualización Apícola, México 2010.
42. Rengifo Penadillos R.A., Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos, 1(2):51-56,2013.
43. Rodríguez Pérez B., Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria, UNAM, Tesis de grado maestría, 2015.
44. Salamanca Grosso G., Correa Carvajal I. L., Principal J., Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos, Zootecnia tropical, 25 (2): 95-102,2007.
45. Satish K., Scanning electron microscopic, International Journal of Agricultura Science and Veterinaria Medicine, 2 (3): 128-131, 2014.
46. Stangaciu S., Composición y propiedades del propóleo, Apiacta XXXII, 71-77, 1998.
47. Takaisi-Kikuni, Schilcher Heinz, Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance, Planta Medica, 60: 222-227, 1994.

48. Torres E, Arenas R, Atoche-Diéguez., Infecciones causadas por el género *Malassezia*. *Med Cutan Iber Lat Am*; 36(6):265-284., 2008.
49. Tovar Betancourt N., García contreras L., Cruz Sánchez T., Propolis in dogs: Clinical experiences and perspectives (A brief review), *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 11-17, 2015.
50. Trejo BAM, Propiedades fungicidas del propóleo de diferentes zonas de Jalisco. Universidad de Guadalajara. Tesis de licenciatura, 1995
51. Vargas Sánchez R.D., Torrescano Urrutia G.R., Mendoza Wilson A.M., Vallejo Galland B., Acedo Félix E., Sánchez Escalante J.J., Peñalba Garmendia M.C., Sánchez Escalante A., Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos, *Revista de ciencias biológicas y de la salud*, XVI (1):32-37, 2014.

## ***ANEXO 1***

### Publicación

Tovar Betancourt N., García Contreras L., Cruz Sánchez T., Propolis in dogs: **Clinical experiences and perspectives (A brief review)**, Open Journal of Veterinary Medicine, 5, 11-17, 2015.

## **ANEXO 2**

### Medio de Dixon

❖ Extracto de malta (Oxoid o DIBICO)	36 g
❖ Bilis de buey deshidratada (DIBICO:3001-C)	20 g
❖ Agar (BD 214010)	12 g
❖ Peptona micológica (Oxoid:LP0040)	6 g
❖ Tween 40 (SIGMA)	1 ml
❖ Glicerol (JT Baker P-1504)	2 ml
❖ Ac. Oleico (JT Baker)	2 ml
❖ Dermasel selective supplement SR 0075E	
❖ Agua destilada	1000 ml

En caso de preparar un litro de medio agregar las cantidades señaladas, en caso de que se requiera una menor cantidad se deberán hacer los cálculos correspondientes.

Una vez que se incorporaron todos los elementos, se debe clarificar el medio y posteriormente se debe esterilizar a 121°C 15 lbs.15'.

Se debe dejar enfriar para poder agregar los antibióticos (Dermasel) y la bilis de buey, evitando que se coagule el medio. Posteriormente se sirve en las cajas de Petri y por último se realiza prueba de esterilización a 37°C durante 24 horas.

En caso de preparar el caldo debe ser omitido el agar.