



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Evaluación del efecto terapéutico del propóleo mexicano en pacientes caninos con
otitis externa causada por *Malassezia pachydermatis***

Que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta
Lesly Shantal Ramírez Velázquez.

Asesora
M en C Nelly Tovar Betancourt

Coasesor
Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2021





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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los siguientes departamentos:

Laboratorio 6 de servicio para análisis de propóleos, 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 bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM bajo la responsabilidad del MVZ Marco Mendoza.

Fundación Manuel Rozada Cuellar A.C.

Además de haber contado con el respaldo de los siguientes proyectos **UNAM, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) PAPIT IT 200915, PAPIT IN 223719, PIAPI 2011 y PIAPI 1809**

ÍNDICE GENERAL	Página.
1. Resumen	6
2. Introducción	7
2.1 Propóleo	9
2.1.1 Antecedentes históricos	11
2.1.2 Antecedentes del uso de propóleo en caninos	12
2.1.3 Usos del propóleo en la actualidad	12
2.1.4 Uso del propóleo en la colmena	13
2.1.5 Propiedades biológicas	14
2.1.6 Mecanismos de acción del propóleo	14
2.1.7 Composición química	15
2.1.8 Preparación de extractos de propóleo	18
2.2 Otitis canina	19
2.2.1 Definición	19
2.2.2 Clasificación	19
2.2.3 Etiología y Patogénesis	20
2.2.4 Signos clínicos	25
2.2.5 Diagnóstico	26
2.2.6 Tratamiento convencional	31
2.3 <i>Malassezia pachydermatis</i>	34
3. Justificación	37
4. Hipótesis	38
5. Objetivos	39
6. Diseño experimental y metodología	40
7. Resultados	45
8. Discusión	54
9. Conclusiones	56
10. Bibliografía	57

ÍNDICE DE TABLAS

Página.

Tabla 1. Constituyentes del propóleo	16
Tabla 2. Causas primarias de otitis externa	22
Tabla 3. Causas secundarias de otitis canina	23
Tabla 4. Factores perpetuantes	23
Tabla 5. Factores predisponentes de otitis externa	24
Tabla 6. Técnicas de diagnóstico.	28
Determinación del estadio de la enfermedad	
Tabla 7. Formulaciones comerciales tópicas	33
Tabla 8. Pruebas para identificación de <i>M.p.</i> del grupo experimental	45
Tabla 9. Pruebas para identificación de <i>M.p.</i> del grupo control	45
Tabla 10. Evaluación del grado de lesión, en el grupo experimental	46
Tabla 11. Evaluación del grado de lesión, en el grupo control	47
Tabla 12. Promedio de los grados de lesión, por día por grupo	49
Tabla 13 A. Evidencia fotográfica, de la evolución de un canino con otitis externa tratado con tratamiento convencional	51
Tabla 13 B. Evidencia fotográfica , de la evolución de un canino con otitis externa tratado con E.E.P.	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página.
Gráfica 1. Promedio del grado de lesión por día, de cada grupo.	48

ÍNDICE DE IMÁGENES

	Página
Imagen 1. Rejilla plástica para recolección de propóleo	10
Imagen 2. Malla plástica para recolección de propóleo	10
Imagen 3. Toma de muestras óticas por hisopado	41
Imagen 4. Goteros con E.E.P., para tratamiento del grupo experimental	41
Imagen 5. Goteros de producto comercial, para tratamiento del grupo control	41
Imagen 6. Aplicación de tratamiento	42
Imagen 7. Procedimiento para toma y manejo de muestras óticas, en ambos grupos	43
Imagen 8. Metodología del tratamiento para ambos grupos	44

1. Resumen.

En el presente trabajo se utilizó extracto etanólico de propóleo mexicano (E..E.P.), de abejas *Apis mellifera*, para dar tratamiento a tres caninos con signología clínica de otitis externa (O.E.). La severidad de cada caso fue evaluada clínicamente, asignando un valor del cero al tres, según los signos de prurito, inflamación y secreción presente en el canal auditivo de cada oído, esto en base a un estudio realizado por Lozina (2010). Se realizó un muestreo por hisopado de cada oído de estos caninos, y cada muestra obtenida se cultivó en agar dextrosa Sabouraud (SDA), agar Dixon modificado (aDm) y agar urea, además se realizó la tinción de Gram y prueba de catalasa; y con base a estas pruebas se pudo constatar la presencia de la levadura *Malassezia pachydermatis* (*M.p.*) que es el microorganismo de interés en este estudio. Los pacientes fueron tratados durante 15 días consecutivos, realizando limpiezas óticas para remover con gasas el exceso de cerumen que se llegara a presentar, posteriormente se colocaron dos gotas de un preparado ótico de propóleo al 10% en cada oído (E.E.P.), la aplicación de tratamiento se repitió tres veces al día. A lo largo del tratamiento se tomaron fotografías de los oídos de cada paciente, para documentar la evolución de cada caso. Los tres pacientes tratados, tuvieron una recuperación exitosa al término del tratamiento y no se reportaron reincidencias en los cuatro meses posteriores. Paralelo a estos casos se manejó un grupo control de tres pacientes más, con la misma afección ótica, que de igual manera se calificó individualmente cada oído, para establecer con una escala numérica, su grado de lesión En estos casos la forma de comprobar que *M.p.* era la causante de la afección fué igual que para el grupo problema y se les trató con un producto comercial en gotas cuya fórmula es: dexametasona 1 mg, gentamicina base 3 mg, ketoconazol 10 mg y lidocaína 10 mg. Para su uso se siguieron las indicaciones dadas por el fabricante de este fármaco, aplicando una gota en cada oído tres veces durante 15 días. El grupo control, también mostró resultados favorables al tratamiento, teniendo una recuperación total al término de este.

2. Introducción

La otitis canina (O.C.) es una enfermedad de etiología multifactorial, y es el término médico para denominar a la inflamación del canal auditivo, que generalmente es de presentación aguda, aunque también puede llegar a ser de carácter crónico. Puede localizarse en la porción del oído interno, medio o externo (Hernández R., 2009) en este caso estudiaremos la presentación de O.E. causada por *M.p.* que es el organismo predominante en un 50 a 83% de los casos, presentándose sola o en asociación con otros agentes infecciosos, como *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus sp.* hemolítico β , *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* que son microorganismos típicamente relacionados con O.E. (Chan W., *et al.* 2018) *M.p.* ha sido reconocida como parte de la microbiota comensal de la piel y membranas mucosas de animales, sin embargo, al igual que otros agentes microbianos, ha sido implicada en procesos de enfermedad, cuando el incremento de su desarrollo ha sido favorecido por factores exógenos (condiciones ambientales) o endógenos (integridad de la piel, condiciones inmunológicas) del hospedero (Villapulido A., *et al.* 2014). *M.p.* juega el papel de agente perpetuante de la infección con estrecha relación con agentes bacterianos, donde los tratamientos con antibióticos suelen generar resistencias medicamentosas, y también con agentes parasitarios (Sánchez R., *et al.* 2011)

El diagnóstico de *M.p.* en O.E. se puede realizar mediante citología con tinción de Wright, Giemsa y Gram, para buscar la presencia de estas estructuras levaduriformes cuyo conteo ≥ 5 células por campo microscópico (40x) es considerada un indicador de patología, mientras la presencia de una menor cantidad de levaduras indica microbiota comensal.

En este trabajo se utilizó la tinción de Gram, además se realizó el cultivo de *M.p.* en SDA y aDm para complementar el diagnóstico y hacerlo más certero, la identificación del agente etiológico por cultivo confirma la sospecha clínica y permite el éxito terapéutico (Villapulido A., *et al.* 2014)

Siendo *M.p.* el agente de interés en este trabajo, se debe considerar que las micosis en general representan un reto clínico para establecer tratamientos efectivos, ya que los fármacos antimicóticos comerciales, son pocos en relación con los antibióticos disponibles, y de costos elevados, así es que se presenta la necesidad de introducir propuestas de tratamiento alternas, como lo son los productos elaborados a base de propóleo (Tovar N., 2016) Las propiedades antimicrobianas y antimicóticas del propóleo han sido probadas frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* y en hongos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Catalán E., 2019)

Se tiene conocimiento de que el empleo del propóleo en diversas afecciones data de miles de años. Actualmente el propóleo ha despertado un gran interés en científicos de todo el mundo, porque ha demostrado una potente actividad biológica, desde el punto de vista terapéutico e incluso nutricional. Y se han comprobado sus diferentes acciones farmacológicas, tales como: acción bactericida, antiviral, antimicótica, anestésica local, analgésica, inmunoestimulante antioxidante, cicatrizante, regeneradora de tejidos, anticaries dentarias, antiinflamatoria, antitrombótica, antiulceroso. Basados en este argumento se considera la utilización de este producto como un tratamiento efectivo en el tratamiento de diferentes enfermedades y padecimientos (Padrón A., 2019)

2.1 Propóleo.

El término propóleo proviene del griego pro: delante o en defensa de y polis: ciudad; es decir delante de la ciudad o de la colmena (Hernández, R., 2009)

El propóleo es una mezcla compleja de resinas, bálsamos aromáticos, ceras, aceites y polen, producida por las abejas al coleccionar sustancias de la vegetación circundante a la colmena, como diversas especies de árboles, arbustos y algunas plantas herbáceas; por lo que su composición química y propiedades físicas varían en la proporción de sus componentes (Rodríguez B., 2019).

Las abejas coleccionan con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas de brotes y peciolos de hojas, una vez en la colmena, las mezclan con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo (Hernández, R., 2009) Este proceso de recolección comienza cuando la abeja recolectora desprende el propóleo del brote valiéndose de sus mandíbulas y ayudándose de su primer par de patas. Cuando el tiempo es frío y la resina se encuentra más dura, el insecto ablanda la sustancia con saliva. A continuación, tritura la porción extraída y ayudándose de las patas del segundo par la transfiere a la cesta de la pata posterior del mismo lado. Esta operación la realiza sucesivamente hasta llenar la cesta de la otra pata. Una vez finalizado, la abeja recolectora se dirige a la colmena y pasa su carga a las receptoras, encargadas de aplicarla en las grietas y orificios de la colmena, o en mallas recolectoras de propóleo, colocadas por el apicultor (Noriega S., 2014) Esta resina presenta una coloración de verde pardo a castaño oscuro, casi negro, de sabor amargo o picante según su origen botánico (Catalán E., 2019)

La producción anual del propóleo va de los 10-300g/colmena según la variedad de abeja, el clima, la flora, el método de recolección y las necesidades de la colmena (Hernández, R., 2009)

Anteriormente el propóleo se obtenía usando una espátula de metal para raspar el propóleo depositado sobre los cabezales de los marcos y bordes de las colmenas. Aunque con esta técnica se tiene una menor higiene, ya que pueden aparecer trozos de madera, metales pesados y alterar la composición final, modificando así su calidad. La recolección del propóleo mediante rejilla o malla (tela mosquitera o plástica.) asegura una mayor pureza del producto. Esta nueva técnica implica la colocación de una rejilla a modo de tapa, en la parte superior de los cajones, con el fin de despertar el instinto de las abejas obreras, logrando que cubran de propóleo los agujeros de las diferentes mallas. Estos agujeros pueden ser de cualquier formato, pero, no deben superar los 4 mm de diámetro a fin de no sobrepasar la anchura de una abeja obrera, y evitar convertirlos en lugar de paso en vez de una zona de deposición.

En la imagen 1 se muestra una rejilla plástica y la imagen 2 una malla plástica, para recolección de propóleo:



Imagen 1. Rejilla plástica para recolección de propóleo. (Fuente: campogalego.es)



Imagen 2 Malla plástica para recolección de propóleo. (Fuente: campogalego.es)

Las mallas una vez recolectadas se introducen en un congelador. Este paso ayudará a la liberación del producto. Posteriormente, se introducen en un balde de agua para separar las posibles impurezas (ceras, astillas y abejas muertas) del propóleo en sí. Una vez hecho esto, se seca a temperatura ambiente para retirar la humedad adquirida durante el lavado y se almacena en recipientes de vidrio o en papel aluminio (Noriega v., 2014)

2.1.1 Antecedentes históricos.

La referencia más antigua que tenemos del uso de los propóleos data del antiguo Egipto, cerca de hace 600 años a.C., donde era bien conocido por los sacerdotes, los cuales observaron su capacidad de evitar la descomposición de los cadáveres, utilizados en las técnicas de embalsamamiento (Padrón A., 2019)

Aristóteles ya hablaba del propóleo y lo consideraba como “remedio para infecciones de piel, llagas y supuraciones”. Galeno en el siglo II, menciona al propóleo en sus trabajos, así como el filósofo Persa Avicena. Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles; los franceses en el siglo XVII y XIX para el tratamiento de llagas. También se empleó en África del sur en la guerra de los Boers en el año 1900 para tratar heridas infectadas, como cicatrizantes, así como para desinfectar las manos e instrumentos quirúrgicos (Hernández, R., 2009). Se reportó que esta sustancia salvó la vida a numerosos soldados, ya que en aquel entonces se desconocían los antibióticos, y con el empleo del propóleo colocado directamente en las heridas muchos se salvaron de la gangrena (Padrón A., 2019)

Desde 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el desarrollo de medicinas alternativas y terapias naturales con eficiencia científicamente demostrada en los servicios nacionales de salud en cada país (OMS, OPS. Estrategia de la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud, sobre Medicina Natural y Tradicional, 2002- 2005) (Padrón, A., *et. al.*, 2019)

2.1.2 Antecedentes del uso de propóleo en caninos.

El propóleo se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades bacterianas, virales y fúngicas, entre otras, debido a la presencia de compuestos flavonoides, ésteres de ácido caféico y diterpénicos (Huerta, 2019). En los casos de O.C. Se ha observado que *M.p.* es la levadura patógena más comúnmente aislada y con la aplicación tópica de extracto etanólico de propóleo se han obtenido resultados favorables. El efecto antimicótico del propóleo ha sido comprobado por Tovar, 2016; mediante microscopía electrónica de barrido observó que el propóleo mexicano a una concentración de 25mg/ml produce cambios en la pared celular, ruptura de membrana y alteraciones en la división celular de la levadura.

Por otro lado, Hee Young Chee, 2002 empleo propóleo coreano a una concentración de 1 a 64 mg/ml contra *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* y mediante microscopía electrónica de barrido evidenció la actividad antifúngica del propóleo observando la ruptura en la superficie celular externa de *Cryptococcus neoformans*

Finalmente, Gómez, 2018 evaluó la actividad antimicótica de un propóleo mexicano, sobre la estructura celular de *candida albicans*, realizó microscopía electrónica de barrido y observó que el propóleo produce pérdida de continuidad en la pared celular de la levadura.

2.1.3 Usos del propóleo en la actualidad.

Actualmente el propóleo ha despertado un gran interés en científicos de todo el mundo, ya que ha demostrado una potente actividad biológica, desde el punto de vista terapéutico y nutricional. Igualmente se ha podido descubrir que el propóleo combate algunos tipos de bacterias, hongos y levaduras, por ello resulta un aliado contra afecciones como la otitis, faringitis, sinusitis, infecciones urinarias y

periodontitis; al poseer una actividad contra radicales libres, inhibe procesos oxidativos (Padrón, A., *et. al.*,2019)

En Medicina Veterinaria se ha ido diversificando y aumentando el uso del propóleo, por ejemplo en ganado lechero, se ha utilizado como linimento para controlar las mastitis, en explotaciones porcícolas se ha empleado como profiláctico en enfermedades respiratorias y gastrointestinales, también se ha utilizado como estimulante para el crecimiento de corderos, cerdos, becerros y en la carpa común. Además de ser utilizado como profiláctico para contrarrestar la fiebre tifoidea en patos, sanar heridas y como anestésico local en cirugías (Fernández I., 2019)

2.1.4 Uso del propóleo en la colmena.

Las abejas utilizan el propóleo en la colmena con múltiples fines, entre los que se encuentran: cerrar grietas para evitar las corrientes de aire o el frío, lo que mantiene la termorregulación interna; reducir al mínimo las vías de acceso para evitar la entrada de insectos y momificar los organismos vivos que se introducen en la colmena, que debido a su tamaño no pueden ser expulsados, como el gusano de cera, las hormigas, algún diminuto roedor, reptiles y mariposas (Noriega v., 2014)

La barrera formada por el propóleo ayuda mantener la temperatura interna de la colmena a 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 (Tovar, N. 2016)

2.1.5 Propiedades biológicas.

Se han demostrado importantes propiedades biológicas del propóleo como agente bactericida, antiparasitario, fungicida, inmunomodulador, antioxidante y antiviral (Gonzales M., *et al.* 2017)

Ya que la evidencia científica ha demostrado todas estas propiedades del propóleo, este se convierte en un producto de interés para diferentes industrias, como farmacéutica, cosmética, alimenticia y el sector agrícola. Las industrias farmacéuticas tienen mayor interés, ya que buscan nuevas actividades para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas provocadas por la multiresistencia de los microorganismos frente a los antibióticos o antifúngicos convencionales (Rodríguez B., 2019)

En cuanto a sus efectos fungicidas el propóleo ha demostrado que puede dañar varias cepas de hongos, como *Candida spp.* gracias a la presencia de flavonoides. El propóleo es el producto apícola con mayor actividad antifúngica según pruebas realizadas con 40 cepas de levaduras de *Candida albicans* donde se inhibió su crecimiento (Noriega, S., 2014) Los flavonoides presentes en el propóleo, poseen capacidades antioxidantes, ya que son capaces de eliminar los radicales libres y proteger la membrana celular contra la peroxidación lipídica. Otros de los principales componentes del propóleo es el ester fenil ácido cafeico, el cual bloquea la producción de radicales libres (Catalán, E., 2019)

2.1.6 Mecanismos de acción del propóleo.

En un estudio, realizado por Youn Chee, (2002) citado en Tovar, N., (2016) se demostró la actividad fungicida del propóleo contra *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* a la microscopía electrónica de barrido la morfología celular de *C. neoformans* fue afectada por el tratamiento con propóleo, observándose ruptura

de la superficie celular del hongo, este mismo hallazgo fue observado por Tovar, N., (2016) al confrontar a un propóleo mexicano contra *M.p.*

En otro estudio realizado por Londoño, (2010), se estudió por medio de la microscopía óptica, el daño celular que causa el Extracto etanólico de propóleo (E.E.P.) en cepas de *Candida albicans* se inhibió la formación de tubo germinativo y se provocó la deformación de algunas levaduras. Al observar micrografías electrónicas de transmisión de secciones ultrafinas de *Candida albicans* ATCC 10232, se identificó la formación de gránulos de almacenamiento además de la alteración y ruptura de las estructuras de la cubierta externa de la levadura lo que sugiere que el debilita a la célula fúngica alterando la membrana celular y/o la pared celular (Gómez, R., 2017)

Otra virtud del propóleo es su capacidad de distribuirse a través de la sangre y la linfa a todo el organismo. Y su actividad antimicrobiana se atribuye principalmente a los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina Silva 2016 citado en Gómez, R., (2017)

2.1.7 Composición química.

Este producto resinoso es producido por abejas a partir de diversas partes de plantas como brotes, botones florales, corteza y exudados resinosos. Estos productos son biotransformados por la adición de cera y por acción de la enzima 1,3-glicosidasa, producida en las glándulas salivales de abejas. La composición exacta del propóleo puro varía de acuerdo con la región, planta proveedora de resina y especie de abeja recolectora, reflejando la diversidad de actividades biológicas que este producto presenta (Alves E., *et al.* 2010)

La composición química del propóleo es compleja y determinará su calidad, por lo tanto, puede ser difícil comparar muestras de diferente origen mediante una norma generalizada. En particular, la composición del propóleo depende de la flora circundante al sitio de recolección, y para su evaluación lo adecuado sería

determinar la fuente vegetal próxima de la colmena para correlacionar los componentes activos presentes en sus resinas y estimar la proporción de estos en el propóleo (Vilorias J., *et al.* 2012)

En general los propóleos en bruto se componen de (tabla 1):

Constituyentes del propóleo.	
Elementos	Proporción
Resinas	50-55%
Ceras	30-40%
Aceites esenciales o volátiles	5-10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

Tabla 1 Constituyentes del propóleo. Fuente: Noriega, S., *et al.* 2014

Las ceras presentes en el propóleo no tienen actividad terapéutica probada, y constituyen alrededor del 30-40% del total de la muestra. El resto corresponde a la parte biológicamente activa. Entre los componentes orgánicos y minerales se encuentran los flavonoides (flavonas, flavonoles y flavononas), compuestos fenólicos, aldehídos aromáticos alifáticos, compuestos terpénicos, ácidos grasos, aminoácidos (arginina, prolina), vitaminas (vitamina A y vitaminas del grupo B) y oligoelementos (cobalto, cobre, hierro, magnesio, selenio, zinc) se ha logrado identificar hasta 200 componentes diferentes. A muchos de ellos se les atribuyen importantes acciones farmacológicas (Vilorias J., *et al.* 2012).

Se sabe que los compuestos fenólicos representan más de 50% del peso total en una muestra y son los responsables de conferir gran parte de la actividad biológica que posee (Tovar, N., 2016)

Fenoles y flavonoides:

Algunas plantas relacionadas con la actividad de *Apis mellifera* desarrollan rutas metabólicas a través de las cuales sintetizan y utilizan compuestos fenólicos, para combatir daños químicos, para atacar microorganismos patógenos bacterianos y fúngicos, brindan soporte mecánico en la atracción de los polinizadores y dispersadores de frutos, entre sus funciones más importantes. Estos son compuestos orgánicos aromáticos, productos secundarios al metabolismo de las plantas, y se conocen más de diez mil compuestos. Pasan al reino animal por la ingesta de plantas que los contienen (Gómez R., 2017)

Cuando se presentan algunas de las amenazas, antes mencionadas, para las plantas, estas comienzan 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 (Tovar N., 2016)

Los fenoles están compuestos con un grupo $-OH$ unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico), los cuales se consideran como metabolitos secundarios a las plantas, por no contener otro grupo funcional. Flavonoides es el término genérico con que se identifica a una serie de estos metabolitos secundarios a las plantas. Sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA (Catalán, E., 2019)

Los flavonoides junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres son denominados “compuestos fenólicos” ya que contienen un grupo fenol, químicamente están formados por una estructura básica de dos 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 oxidrilo, metilos, azúcares. generando de esta manera diferentes tipos de flavonoides como : flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Tovar N., 2016)

En el propóleo, los flavonoides son el grupo bioactivo más importante en cuanto a propiedades medicinales, en especial los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina (Gómez R., 2017)

El uso de los flavonoides contra infecciones fúngicas o bacterianas tiene como objetivo matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas (Tovar, N., 2016)

Un estudio enfocado en establecer estándares de calidad para el propóleo, realizado por Noriega, S., *et al.* (2014), menciona que los fenoles y flavonoides representan un índice inequívoco de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estas fracciones mayor será la pureza y calidad del propóleo. Se espera que contengan un porcentaje mayor a 10% de compuestos fenólicos.

2.1.8 Preparación de extractos de propóleo.

Un ejemplo para la preparación de extracto etanólico de propóleo es el siguiente: Se usan alícuotas de 30 g de propóleo bruto a cada alícuota se le adicionan 100 ml de alcohol 70% siendo mantenidas en maceración, a 25°C, protegidas de la luz, por 14 días. Después de este periodo, las muestras se filtrarán con papel filtro cualitativo y se pueden almacenar en frascos de color ámbar o contenedores que eviten la explosión a la luz directa, a temperatura ambiente (Alves E., et al. 2010) Lozina (2010), recomienda mantener el propóleo en la oscuridad a 4°C hasta su uso, posteriormente el propóleo se molerá hasta quedar como un polvo fino, al que se le agregara etanol al 80% y debe ser agitado en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después de tres días, se mantiene congelado durante la noche a -20°C, y luego la mezcla se centrifuga para obtener el sobrenadante, esta mezcla debe pasar a través de papel filtro. Quedando un sobrenadante que se secura por evaporación y al vacío a 40°C. Finalmente, las gotas para los oídos se prepararon con 2,5% de E.E.P. en una mezcla de glicerina-propilenglicol.

2.2 Otitis canina.

2.2.1 Definición.

La otitis canina (O.C.) es una enfermedad inflamatoria que puede ser externa, media e interna. La O.E. es la más común y se presenta usualmente asociada a la otitis media (Sánchez R., *et al* 2011) donde se ven afectados el pabellón auricular, el conducto auditivo externo, y el tímpano; estas estructuras juntas conforman el oído externo y el oído medio; están revestidas por piel, por ende, la O.E. debe ser considerada como una patología dermatológica, debido a sus diversas etiologías y varios factores que la desencadenan es necesario un estudio exhaustivo para así determinar el origen de esta y brindar al animal el diagnóstico adecuado (Ycaza M., 2018)

2.2.2 Clasificación.

En general, la clasificación de las afecciones inflamatorias del oído, puede realizarse considerando una serie de factores; dentro de ellos se puede mencionar la ubicación de la inflamación, que pudiese presentarse afectando el oído externo, el oído medio o el oído interno. Según el área afectada, la inflamación se denominará O.E., otitis media y otitis interna (Hernández, R., 2009), según el tiempo de presentación se clasifica como una inflamación aguda o crónica (Tovar N., 2016) y existe una clasificación según agentes etiológicos de O.C.; dentro de esta se mencionan la O.E. de tipo bacteriano, la O.E. micótica y la otitis parasitaria (Hernández, R., 2009)

2.2.3 Etiología y Patogénesis.

La O.E. es una patología con etiología multifactorial originada por factores desencadenantes y mantenida por factores perpetuantes. A su vez, se han descrito todo un conjunto de factores predisponentes que proporcionan las condiciones necesarias para la proliferación microbiana. En numerosas ocasiones la O.E. Aparece como un signo más de un proceso dermatológico (alérgico, seborreico, entre otros) Los factores desencadenantes son los responsables del inicio de la inflamación del conducto auditivo externo. En perros se citan con más frecuencia las alergias, seguidas de lejos de los cuerpos extraños y parásitos *Otodectes cynotis*. Los factores perpetuantes son los que agravan la O.E. impidiendo su resolución. En los casos crónicos suele haber más de un factor, de manera que su identificación es necesaria para el correcto reconocimiento de la O.E. (López, J., *et al.* 2010)

Durante el curso de O.E. las reacciones hícticas del conducto auditivo externo varían de acuerdo con el microorganismo responsable, las características del exudado inflamatorio, las enzimas elaboradas y los efectos de otras enfermedades cutáneas subyacentes, como atopia, hipotiroidismo y seborrea. Debido a la estructura anatómica en “L” del conducto auditivo externo, las enzimas proteolíticas contenidas en los exudados se acumulan contra el tímpano (Gaviria, J., y Cruz, 2018)

Para su identificación existe el sistema de clasificación de enfermedades óticas, Causas Primarias y Secundarias de Inflamación, Factores Predisponentes y

Perpetuantes, conocido por sus siglas en inglés como PSPP System, donde se agrupan las causas y factores que desencadenan O.E., de la siguiente manera:

- Las causas primarias (Tabla 2) y causas secundarias (Tabla 3) son las enfermedades o agentes infecciosos que causan directamente inflamación y daño en el oído.
- Los factores perpetuantes (Tabla 4) y predisponentes (Tabla 5) son los agentes o elementos que contribuyen a mantener la enfermedad del oído. Estos factores no son causa de la enfermedad propiamente, pero pueden impedir la resolución de la enfermedad y también pueden conllevar a que sea una enfermedad recurrente. Ambas causas y factores contribuyen a la enfermedad del oído y ambos necesitan ser identificados y direccionados a resolver la enfermedad. (Harvey, R. *et al.*, 2014)

Dichos factores y causas se esquematizan en las tablas 2, 3, 4 y 5:

Causas primarias de otitis externa.	
Tipos	
Alergias. Autoinmunes.	Alimenticias, otitis atópica, alergias por contacto. Pénfigo ampolloso, epidermólisis bulbosa, lupus eritematoso, pénfigo foliáceo.
Ectoparásitos.	<i>Otodectes cynotis</i> , <i>Otobius megnini</i> , <i>Demodex spp.</i> , <i>Eutrombicula spp.</i>
Endocrinos.	Hiperadrenocorticismo, hipotiroidismo, tumor de células de Sertoli, anomalías en hormonas sexuales.
Desorden de epitelización.	Seborrea idiopática primaria, adenitis sebácea, dermatosis dependiente de zinc, dermatosis dependiente de vitamina A, otitis inflamatoria idiopática del Cocker Spaniel.
Cuerpos extraños.	Pelos, restos de hierbas, arena etc.
Desordenes glandulares.	Estados de hipersecreción, anomalías en las glándulas sebáceas.
Procesos inmunomediados.	Eritema multiforme, vasculitis, reacción a fármacos.
Micoorganismos.	<i>Aspergillus spp.</i>
Diversos.	Complejo granuloma eosinofílico, celulitis juvenil, otitis proliferativa perforante en cría de gato.
Viral.	Distemper.

Tabla 2. Causas primarias de O.E. *Otitis Externa. An Essential Guide to Diagnosis and Treatment.*
(Harvey, R. et al. 2014)

Causas secundarias de otitis canina	
Tipos	
Bacterias .	Cocos (<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i>) Bacilos (<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Corynebacteria spp.</i>)
Levaduras.	<i>Malassezia spp.</i> , <i>Candida spp.</i>
Reacciones medicamentosas.	Productos tópicos con contenido irritante (alcohol, p H bajo)
Sobrelimpieza.	Soluciones a base de agua causan maceración (agua, limpiadores a base de agua, antibióticos en soluciones acuosas), Limpieza en seco con Hisopos.

Tabla 3. Causas secundarias de O.C. *Otitis Externa, An Essential Guide to Diagnosis and Treatment.* (Harvey, R. et al., 2014)

Factores perpetuantes.	
Tipos	
Procesos patológicos dentro del canal auditivo.	Falla de migración epitelial, edema, cambios proliferativos, estenosis del canal, calcificación del tejido fibroso cartilaginoso.
Tímpano.	Acantosis, dilatación, ruptura, divertículos.
Tejido glandular.	Glándulas apocrinas bloqueadas o dilatadas, hiperplasia glandular.
Otitis media.	Material dentro del oído medio (tejido de granulación, infecciones, cuerpos extraños, secreción primaria de otitis media).

Tabla 4 Factores perpetuantes. *Otitis Externa, An Essential Guide to Diagnosis and Treatment.* (Harvey, R. et al., 2014)

Factores predisponentes de otitis externa.	
Tipos	
Conformación.	Canales auditivos con pelo, orejas pendulosas, canales auditivos estenóticos, crecimiento de pelo en la cara interna de la oreja.
Humedad excesiva.	Ambiente (calor y humedad altas), agua (inmersión del oído, mala higiene).
Enfermedades obstructivas del oído.	Neoplasias, pólipos, quistes.
Reacciones medicamentosas.	Lesiones por limpieza, uso excesivo de antibióticos.

Tabla 5. Factores predisponentes de Otitis Externa, An Essential Guide to Diagnosis and Treatment. (Harvey, R. *et al.*, 2014)

Dentro de las causas secundarias (Tabla 3), los principales agentes etiológicos que están presentes en la O.E. se encuentran: *M.p.* (54.2%), *Staphylococcus aureus* (43.8%), *Staphylococcus coagulasa* negativo (25.0%), *Pseudomonas aeruginosa* (20.8%), *Candida albicans.* (18.8%), *Proteus mirabilis* (16,7%), *Streptococcus spp.* (16.7%), *Enterococcus faecalis* (12.5%), *Escherichia coli* (12.5%), *Staphylococcus intermedius* (6.3%), *Klebsiella spp.* (4.2%) y *Candida glabrata* (2.1%). Esto lo demostró en un estudio realizado con 48 perros con signología de O.E. Lozina, L., *et. al.*, (2010)

Por otra parte Sánchez, R., (2011) menciona que se han logrado aislar bacterias en el 92% de muestras colectadas en perros con signos clínicos de otitis. Donde *Staphylococcus intermedius* es la bacteria encontrada con mayor frecuencia. Esta bacteria facilita el ingreso de otros microorganismos luego de evadir a la fagocitosis por medio de sus factores de virulencia. *Pseudomonas spp.* y *Proteus mirabilis* suelen presentarse en casos crónicos y son conocidas por su resistencia a diversos antibióticos.

En el 63.6% de casos clínicos se ha aislado un solo agente bacteriano, mientras que en casos con 2, 3 y 4 agentes etiológicos involucrados llegan a ser de 31.9, 4.2 y 0.2% respectivamente. Esto puede estar relacionado al curso de la

enfermedad y el momento de la toma de la muestra; además, es importante determinar las especies presentes en la infección ya que una infección polimicrobiana puede hacer el tratamiento más complejo.

2.2.4 Signos clínicos.

El prurito es el signo más frecuente, manifestándose con sacudidas constantes de la cabeza y el rascado de las orejas. En ocasiones se detecta un dolor manifiesto que acompaña al prurito. Si la afección es unilateral, el animal tiene tendencia a inclinar la cabeza hacia el lado afectado, pudiendo estar las orejas caídas lateralmente en razas de orejas erectas. Suele aparecer un aumento de la secreción, con acumulación de cerumen y exudados en la porción más externa del conducto, pudiendo apreciarse un sonido de chapoteo al palpar la base de la oreja. Las características del exudado pueden ofrecer una aproximación a la etiología:

- A. Las infecciones bacterianas presentan un exudado de color blanquecino-amarillento.
- B. En presencia de *M.p.* son de aspecto grasoso y color chocolate-pardo.
- C. La otitis por *Otodectes cynotis* cursa con una secreción con aspecto marrón-negrucoso y seca, recordando los posos del café.
- D. La hipersecreción ceruminosa es de color amarillento, seca y con olor a rancio. (López, J., *et al.* 2010)

Los casos relacionados con *M.p.* usualmente son de presentación bilateral y pruriginosa más que dolorosa. Las causas primarias subyacentes incluyen alergias, particularmente atopia y trastornos de la queratinización tanto primaria como secundaria. El daño a la membrana timpánica en los casos de presentación aguda es poco común. En el perro, el desorden de queratinización

secundario más común son las enfermedades endocrinas hipotiroidismo e hiperadrenocorticismo (Harvey, R. *et al.*, 2014)

2.2.5 Diagnóstico.

Gran parte del diagnóstico de las otitis es de tipo clínico, y se apoya en un examen citológico, mientras que para casos crónicos están indicadas las pruebas de laboratorio como el cultivo y la prueba de susceptibilidad bacteriana (Sánchez, R., *et al.*, 2011)

El cultivo puede ser considerado un recurso de segunda elección para el diagnóstico, dada su relativa insensibilidad, el cultivo de *M.p.* referirá un gasto y requiere tiempo, lo que puede sugerir en un costo innecesario y un retraso en el tratamiento en comparación con el examen citológico (Harvey, R. *et al.*, 2014)

El diagnóstico clínico requiere de la historia clínica y al examen físico en el cual se revisará la conformación del pabellón auricular y las posibles anormalidades y lesiones; también se recomienda realizar una revisión otoscópica en ambos oídos para descartar la presencia de cuerpos extraños, lesiones en la mucosa, el tipo de exudado presente, definir el grado de estenosis del canal auricular y se intenta ver el estado de la membrana timpánica.

En el caso de existir un exudado es imprescindible recoger una muestra para realizar un estudio citológico. La presencia de numerosas bacterias con ausencia de células inflamatorias solo indica la existencia de crecimiento bacteriano, pero no infección activa. Los cocos normalmente son *Staphylococcus spp*, mientras que los bacilos suelen ser *Pseudomonas aeruginosa* o *Proteus spp*, y las levaduras *M.p.* de las cuales se requiere un número mínimo de 5 a 10 levaduras por campo microscópico de inmersión para considerar que existe una infección o sobre crecimiento (López, J., *et al.* 2010)

Los exámenes de imagenología se consideran complementarios en el diagnóstico, y ante un paciente con O.E. crónica, “siempre” se indicarán ayudas diagnósticas de imagenología para descartar una otitis media, y también los rayos x hacen evidente el grado de hiperplasia y calcificación del conducto auditivo externo que caracteriza la O.E. crónica (Gaviria, J., *et al.* 2018)

La radiografía convencional permite la evaluación de los tejidos blandos del conducto auditivo externo, el hueso de las bullas timpánicas y la porción petrosa del temporal. Para su estudio se recomienda la realización de proyecciones laterales oblicuas, laterales, ventrodorsales simples y ventrodorsales con la boca abierta. La mayoría de los cambios radiológicos no son específicos, por lo que se deben interpretar los mismos en función de la historia clínica del animal y del examen físico.

Los signos radiográficos en casos de otitis media son : interior de la bulla timpánica ocupada por una densidad tipo tejido blando, así como esclerosis de su pared y de la porción petrosa temporal, proliferación de la porción petrosa del temporal y signos de otitis externa. Si la infección es muy severa se puede evidenciar lisis de la pared de la bulla. Cuando la bulla se ve afectada de manera crónica, el hueso prolifera y se remodela, pudiendo haber lisis del mismo. La tomografía se revela superior frente a la radiografía convencional en la evaluación de la bulla timpánica, apreciándose con mayor detalle su pared y contenido. En ocasiones las otitis medias están asociadas a otitis externa, que en su forma crónica puede dar lugar a calcificación al canal auditivo externo visibles mediante radiografía convencional.

En cuanto a la resonancia magnética, sus hallazgos en las otitis medias e internas permiten la localización de material isoíntenso e hipointenso. En lesiones crónicas se pueden observar bandas hipointensas en el interior de la bulla timpánica que representan tejido fibroso.

El empleo de la tomografía y la resonancia ha permitido aumentar la capacidad de detección de enfermedades del oído (Liste, F., 2010)

Considerando de manera inicial la historia clínica y los rasgos predisponentes de cada paciente en particular, el médico podrá hacer un diagnóstico clínico diferencial provisional, que será más específico una vez que se realice el examen físico. En este punto un conjunto de técnicas de diagnóstico pueden ser utilizadas para determinar el estado de avance de la otitis (Tabla 6):

Técnicas de diagnóstico. Determinación del estadio de la enfermedad.

- Examen visual y palpación de los cartílagos auriculares.
- Limpieza del canal auditivo para facilitar el examen del área más profunda hasta la membrana timpánica.
- Examen por otoscopio/video-otoscopio del conducto auditivo externo.
- Examen citológico de cerumen y exudado.
- Muestra para cultivo y prueba de sensibilidad del exudado.
- Exámenes de imagenología.
- Examen histopatológico.

Tabla 6. Técnicas de diagnóstico. Determinación del estadio de la enfermedad. *Otitis Externa, An Essential Guide to Diagnosis and Treatment.* (Harvey, R et al., 2014)

Será de utilidad estudiar los siguientes puntos al momento de tomar los datos en la reseña, tanto para diagnosticar O.E., como para realizar el diferencial de las posibles causas:

A. Raza:

Algunas razas, por ejemplo, Cocker Spaniel, están predispuestas a defectos en la queratinización, que pueden estar asociados con una O.E. ceruminosa. Las razas de perros reconocidas como particularmente propensas a otitis externa, incluyen Springer Spaniel, Caniches miniatura, Shar Pei y Pastor alemán. Por otro lado, es

probable que cualquier raza predispuesta a presentar atopia, se relacione con la manifestación de otitis bilateral.

En el caso de los perros con orejas pendulantes no están necesariamente predispuestos a la O.E., pero pueden ser más susceptibles a que una infección ótica de cualquier naturaleza progrese rápidamente.

Las razas que presentan pelo excesivo dentro de los canales auditivos, como caniches, pueden estar predispuestos a acumulaciones de cerumen y restos de materia orgánica e incluso cuerpos extraños, que pueden provocar O.E.

B. Edad:

Las neoplasias suelen estar mayormente relacionadas con animales gerontes; los animales jóvenes tienen cierta predisposición a la dermatofitosis; la incidencia máxima de O.E. ocurre en perros de 3 a 6 años; los cuerpos extraños en los oídos son inusuales en los animales jóvenes; las enfermedades subyacentes, como los defectos en la queratinización, atopia o alergia alimentaria, puede causar otitis unilateral o bilateral externa y puede ocurrir en animales jóvenes, particularmente en razas predispuestas.

C. Sexo

En general no hay predisposición sexual a la O.E., aunque un estudio encontró que las hembras eran más propensas que los machos a presentar otitis de patrón alérgico. El tumor de células de Sertoli puede estar asociado con un cerumen graso que se adhiere a la piel y cabello adyacentes al orificio del canal auditivo externo.

D. Manejo y estilo de vida:

Por otra parte, los puntos clave de la toma de historia clínica son:

- Identificar si hay o no evidencia de manejo o enfermedad subyacente que puede estar predisponiendo al animal a la O.E.

-La historia debe abarcar todos los aspectos del manejo y estilo de vida del perro en un intento de identificar la causa de la O.E.

- Dieta: para identificar deficiencias como zinc y ácidos grasos esenciales.
- Ingesta de agua: cualquier poliuria /polidipsia
- Vivienda: ¿perrera o bajo techo?
- Exposición a la luz solar: daño por radiación actínica.
- Ejercicio: la natación predispone a enfermedades del oído.
- Trabajo: (perros de trabajo predispuestos a cuerpos extraños).
- Manejo de aseo: lesiones provocadas con la rasuradora, al limpiar en el pabellón auricular, falta de limpieza profunda de los conductos auditivos, irritación ótica posterior al depilado capilar o contagio en las estéticas caninas
- Presencia de ectoparásitos (*O. cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *dermatofitosis*).

E. Evidencia de enfermedad subyacente:

- Episodios recurrentes de enfermedad del oído debe levantar la sospecha de una enfermedad subyacente, particularmente si es bilateral.
- El prurito facial, ótico y podal sugiere atopia.
- Eritema en el oído, la cara, el cuello y pliegues del tronco, pabellón auricular sugiere un defecto en la queratinización.
- Es más probable que un patrón estacional refleje atopia o exposición estacional a ectoparásitos como mosquitos, moscas, ácaros de la cosecha (*Neotrombicula spp.*), y pulgas de conejo (*S. cuniculi*).
- Las alergias alimentarias se asocia a menudo con O.E.
- Las endocrinopatías pueden estar asociadas con una O.E. ceruminosa.
- Otitis bilateral con aparición repentina de úlceras graves, quizás en asociación con otras enfermedades de la piel, o signos sistémicos deben levantar la sospecha de reacciones medicamentosas o enfermedades inmunomediadas.

F. Medicación:

Aplicación tópica de medicación ótica puede inducir un contacto irritante o dermatitis alérgica. El signo clínico que podría sugerir una otitis continua ante la aplicación repetida de un medicamento. La neomicina es el agente más citado en este respecto, aunque el propilenglicol también puede ser irritante (Harvey, R. *et al.*, 2014)

2.2.6 Tratamientos convencionales.

Existen una amplia gama de medicamentos antimicóticos disponibles en productos comerciales para tratar O.E. causada por *Malassezia pachydermatis*; la mayoría contienen antibióticos y glucocorticoides en combinación. Cuando está presente una infección por hongos que desencadena cambios crónicos en el oído, como un estrechamiento con hiperplasia glandular del canal auditivo, entonces se considera ventajoso si el fármaco de elección este combinado con un potente glucocorticoide tópico como la betametasona, aceponato de dexametasona, mometasona o hidrocortisona.

Entre los fármacos usados con más frecuencia encontramos:

1. Polienos.

La nistatina es un fármaco poliénico que actúa uniéndose a los esteroides en la membrana celular de los hongos, cambiando su permeabilidad, lo que conduce a la muerte del hongo por destrucción osmótica. La nistatina tiene actividad contra *Candida spp.* y *Malassezia spp.*

2. Azoles.

Todos los fármacos antimicóticos azólicos interrumpen la biosíntesis del ergosterol de la pared celular fúngica mediante la inhibición de la enzima P450. Además todos estos fármacos tienen una excelente actividad in vitro contra *M.p.*

3. Alaninas.

La terbinafina es el antimicótico disponible más ampliamente utilizado de esta clase; y tiene buena actividad contra varias especies de *Malassezia*.

(Harvey, R. *et al.*, 2014)

La terapia tópica es una buena elección puesto que se alcanzan altas concentraciones de los medicamentos con los menores efectos sistémicos, mientras que la terapia sistémica puede ser de utilidad en tratamientos prolongados. Debido a la amplia gama de tratamientos óticos que se encuentran en el mercado, se debe seleccionar la terapia más adecuada, específica y simple y evitar que la infección se extienda al oído medio e interno. Cuando se ha determinado que la infección ótica está dada por diferentes agentes etiológicos, incluidas bacterias, las quinolonas, cefalosporinas, aminoglucósidos y penicilinas combinadas entre sí, en diferentes esquemas, son los fármacos con mayor eficacia (Sánchez, R., *et al.*, 2011)

La siguiente tabla (7) muestra algunas de las formulaciones que se utilizan comúnmente en los productos comerciales de distintas farmacéuticas para tratar O.C.

Formulaciones comerciales tópicas.					
Farmacéutica/ Presentación		Antibiótico	Antimicótico	Desinflamatorio	Anestésico
Virbac	Gotas c.b.p. 1ml	-Gentamicina (sulfato) 1505 UI	-Miconazol (nitrato) 15.1 mg	-Aceponato de hidrocortisona 1.11 mg	-----
Holland	Gotas c.b.p. 1ml	-Enrofloxacina 5mg -Sulfadiazina de plata 10 mg	-Tiabendazol 40mg	-Dexametasona 1mg	-----
	Pomada c.b.p. 100g	-Neomicina -Bacitracina 1g	-Clotrimazol 1g	-Dexametasona 1mg	-Benzocaína 1g
Biochem	Gotas c.b.p.1ml	-Enrofloxacina 5mg	-Clotrimazol 2mg	-Dexametasona 1mg	-----
Chinoín	Gotas c.b.p. 1ml	-----	-----	-Acetónido de Fluocinolona 0.1mg	-----
Phets Farma	Gotas c.b.p. 1mg	-Gentamicina 3 mg	-Ketoconazol 10mg	-Dexametasona 1mg	-Lidocaína 10 mg
Halvet	Gotas c.b.p 1mg	-Gentamicina 3 mg	-Ketoconazol 10mg	-Dexametasona 1mg	-Lidocaína 10 mg
CPMax	Gotas c.b.p. 1ml	-Bacitracina 500UI -Neomicina 3.5mg	-Clotrimazol 1mg	-Dexametasona 0.5mg	-----

Tabla 7. Formulaciones comerciales tópicas.

Fuente: sitios web oficiales: Virbac, Holland, Chinoín, Biochem, Halvet, Pets Farma y CPMax

En los casos de O.E. relacionada con *M.p.* las terapias antifúngicas usualmente resultan ser curativas, pero en los casos donde hay reincidencia, se deberá identificar bien la causa primaria (Harvey, R. *et al.*, 2014)

La ablación de canal auditivo con osteotomía lateral de la bulla timpánica está indicada no solo cuando se diagnostica otitis media, sino también en pacientes con otitis externa crónica e hiperplasia irreversible del canal horizontal (terminal), neoplasias del canal, colesteatoma aural, fallo de intervenciones quirúrgicas previas como remoción del canal vertical y resección del tramo lateral del canal vertical. Conviene mencionar que el manejo de otitis externa crónica con otras técnicas como la resección del canal vertical o la remoción del área lateral del canal vertical, suelen fracasar y que es mucho más efectiva la resección completa del conducto auditivo con osteotomía de la bulla. La resección del canal auditivo con osteotomía de la bulla timpánica se plantea como un tratamiento radical y efectivo. Los pacientes que padecen otitis externa crónica terminal, con o sin otitis media, son candidatos para la resección completa del canal auditivo con osteotomía de la bulla timpánica como tratamiento de elección frente a la terapia conservadora (Gaviria, J., *et al.* 2018)

2.3 *Malassezia pachydermatis.*

Malassezia spp. es un hongo dimórfico no lipofílico que forma parte de la microbiota cutánea de los perros. *M.p.* Fue aislada por primera vez en 1925 por Weidman.

El diagnóstico de laboratorio se determina mediante citología, se obtienen muestras para teñir con Gram y observar en el objetivo 40x, se consideran positivos los casos donde se observe blastoconideo compatibles con la morfología

de *Malassezia spp*, en el caso de *M.p.* su estructura es conocida coloquialmente como “suela de zapato”.

Cada estructura encontrada puede ser cuantificada de la siguiente manera: escasas (una a cuatro levaduras por campo), moderadas (5 a 10 levaduras por campo) y abundantes (más de 10 levaduras por campo) (Douriet-Marín FA, *et. al.* 2016)

Malassezia spp., son un grupo de levaduras de las cuales se han reconocido 14 especies: *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. cuniculi sp. nov*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. equina* que han sido identificadas por morfología, perfil metabólico y pruebas moleculares (Pulido, A. *et., al.* 2014)

La mayoría de especies de *Malassezia spp*, requieren de ácidos grasos de cadena media y larga como fuente de carbono para su desarrollo *in vitro*, por lo que son llamadas levaduras lipofílicas, *M.p.* es la única no lipofílica. El crecimiento colonial es lento y los aislamientos son de difícil conservación. Cuando son crecidas en agar Dixon modificado, las colonias generalmente son blancas o amarillentas, de superficie lisa o rugosa, de bordes continuos o lobulados, de aspecto cremoso brillante o mate; la consistencia es suave y miden de 3 a 5 mm de diámetro. Microscópicamente las levaduras son globosas, ovoides o cilíndricas, de pared gruesa, constituida por varias capas; los blastoconidios, de base ancha, se forman por un mecanismo simpodial, dejando una cicatriz en el sitio polar de gemación de la célula madre (Cruz, R., *et al.* 2015)

M.p. habita normalmente en la piel del perro en zonas como: las almohadillas plantares, mentón, axilas, oídos, inglés, aunque puede hallarse distribuida en todo el cuerpo, naturalmente son escasas en cantidad debido a que la flora equilibrada de la piel controla su proliferación. Cuando ocurre un desequilibrio de las defensas propias de la piel, *Malassezia pachydermatis* empieza a proliferar de forma

descontrolada ocasionando una hipersensibilidad e inflamación en el oído dando lugar a una otitis (Ycaza, M. 2018)

Aunque *M.p.* se considera parte de la microbiota en el oído canino, su potencial de manifestarse como un patógeno oportunista, hace que la presencia de esta levadura deba interpretarse con cautela. Antes de decidir el estado de la enfermedad, deben buscarse pruebas de un mayor número de levaduras que se consideren patógenas (arbitrariamente más de 5 a 10 por campo de gran aumento) y una reacción inflamatoria asociada a signos clínicos consistentes. *Malassezia pachydermatis* tiene forma de matraz o cacahuete, mientras que la levadura de *Candida* es redonda en apariencia, aunque esta distinción no siempre es fácil de hacer. *M.p.* se considerará como un agente secundario en casos donde se relaciona con reacciones alérgicas y/o defectos en la queratinización (Harvey, R. et al., 2014)

Al realizar cultivos de pacientes con O.E. se ha observado que *M.p.* es la levadura patógena más comúnmente aislada, *Candida spp* es solo en ocasiones aislada de exudados de perros con O.E., *M.p.* Se ha encontrado asociada a *Staphylococcus aureus*, lo que confirma una simbiosis entre estos dos microorganismos (Tovar, N. 2016)

M.p. es el organismo predominante en 50 - 83% de los casos, presentándose solo o en asociación con otros agentes infecciosos. *M.p.*, se ha reconocido como comensal de la piel y en las mucosas de humanos y animales, sin embargo, se ha implicado en procesos de enfermedades que van desde infecciones superficiales a procesos sistémicos, que son favorecidos por factores exógenos del huésped (ambientales condiciones como humedad, temperatura) o endógenas (lesiones en la piel, aumento de humedad, inmunosupresión) (Pulido, A. et., al. 2014)

3. Justificación

Dada la importancia que tiene *M.p.* en el curso de la otitis y la repercusión en la recidiva del padecimiento, es importante contar con un tratamiento efectivo. Los estudios *in vitro* respaldan la idea del desarrollo de una investigación *in vivo* donde se demuestre la actividad antimicótica del propóleo y con ello proponer un prototipo de gotas óticas como tratamiento alternativo de O.E.

El propóleo no genera resistencias medicamentosas, ni se han reportado contraindicaciones en su uso, como en algunos tratamientos convencionales contra O.E. Finalmente, el utilizar un producto apícola, sugiere ganancias al sector.

4.Hipótesis.

El efecto antifúngico del propóleo contra levaduras se ha demostrado en diversos ensayos *in vitro*, entonces, al hacer una evaluación *in vivo* de su efecto terapéutico en pacientes con O.E. causada por *M.p.* se espera la recuperación de los mismos.

5. Objetivos.

- 1) Evidenciar la presencia de *M.p.* en exudados de oídos caninos con sintomatología de otitis.
- 2) Evaluar el efecto terapéutico del extracto etanólico de propóleo mexicano mediante la preparación de unas gotas óticas que se utilizarán en el tratamiento de la O.C.
- 3) Realizar un análisis de imagen comparativo de los oídos antes y después del tratamiento.

6. Diseño experimental y metodología.

Se seleccionó un grupo de 6 caninos que manifestaban signos de O.E., y fueron evaluados clínicamente de manera individual, en base a los criterios considerados en el estudio de Lozina (2010), donde consideró los signos clínicos manifiestos de inflamación, prurito y exudado presente en el canal auditivo externo. A estos signos les otorgó un puntaje en una escala del cero al tres según su intensidad, indicando que 0= ninguno, 1= leve, 2= moderado y 3= grave (Tabla 9). La puntuación obtenida por cada oído se sumó, siendo 9 la calificación máxima que se pudo obtener en los casos más severos. Esta calificación expresa la gravedad de cada oído tratado.

Valor asignado	Grados de lesión.
0	Ninguna.
1	Leve
2	Moderado
3	Severo

Tabla 7. Valores de puntuación para los grados de lesión.

Posteriormente se tomaron muestras por hisopado de cada oído afectado (imagen 3) y se realizaron frotis para teñir con Gram y confirmar la presencia de la levadura al microscopio, una vez confirmado se hicieron cultivos en agar dixon modificado (aDm) incubando a 33°C durante 72 h, las colonias crecidas se sembraron en agar dextrosa Sabouraud (SDA) a 33°C durante 72h, estas colonias se sometieron a la prueba de catalasa y agar urea; con este proceso se pudo determinar la presencia de *M.p.* en cada muestra.



Imagen 3. Toma de muestras óticas por hisopado.

Una vez que se identificó esta levadura, se separó a los pacientes en dos grupos, tres caninos en el grupo experimental recibieron tratamiento con E.E.P. (imagen 4), por otra parte los tres caninos restantes conformaron el grupo control, quienes recibieron tratamiento comercial de gotas óticas (imagen 5), que contenía 1 mg de dexametasona, 3 mg de gentamicina, 10 mg de ketoconazol y 10 mg de lidocaína.



Imagen 4. Gotero con EEP, para tratamiento de grupo experimental.



Imagen 5. Gotero con producto comercial, para tratamiento de grupo control.

La aplicación del tratamiento (imagen 6) en ambos grupos se realizó posterior a una limpieza ótica con gasas limpias para remover el exceso de exudado, se colocaban dos gotas en cada oído de los preparados óticos (propóleo y producto comercial respectivamente) y se distribuían los productos en el conducto auditivo por medio de un masaje manual, esto tres veces por día, durante 15 días consecutivos. Con las primeras limpiezas se fue retirando el exceso de exudado, tratando que al aplicar el tratamiento el oído se encontrará lo más limpio posible, mientras que el exudado fue disminuyendo en cada caso, las limpiezas fueron menos exhaustivas, únicamente se retiraba el exudado que se llegó a presentar. A lo largo de los tratamientos se tomaron fotografías de los oídos, para tener un registro de los resultados.



Imagen 6. Aplicación de tratamiento.

El proceso para la obtención y manejo de muestras , tanto para el grupo control como para el experimental, se esquematiza en el siguiente diagrama (Imagen 7.):

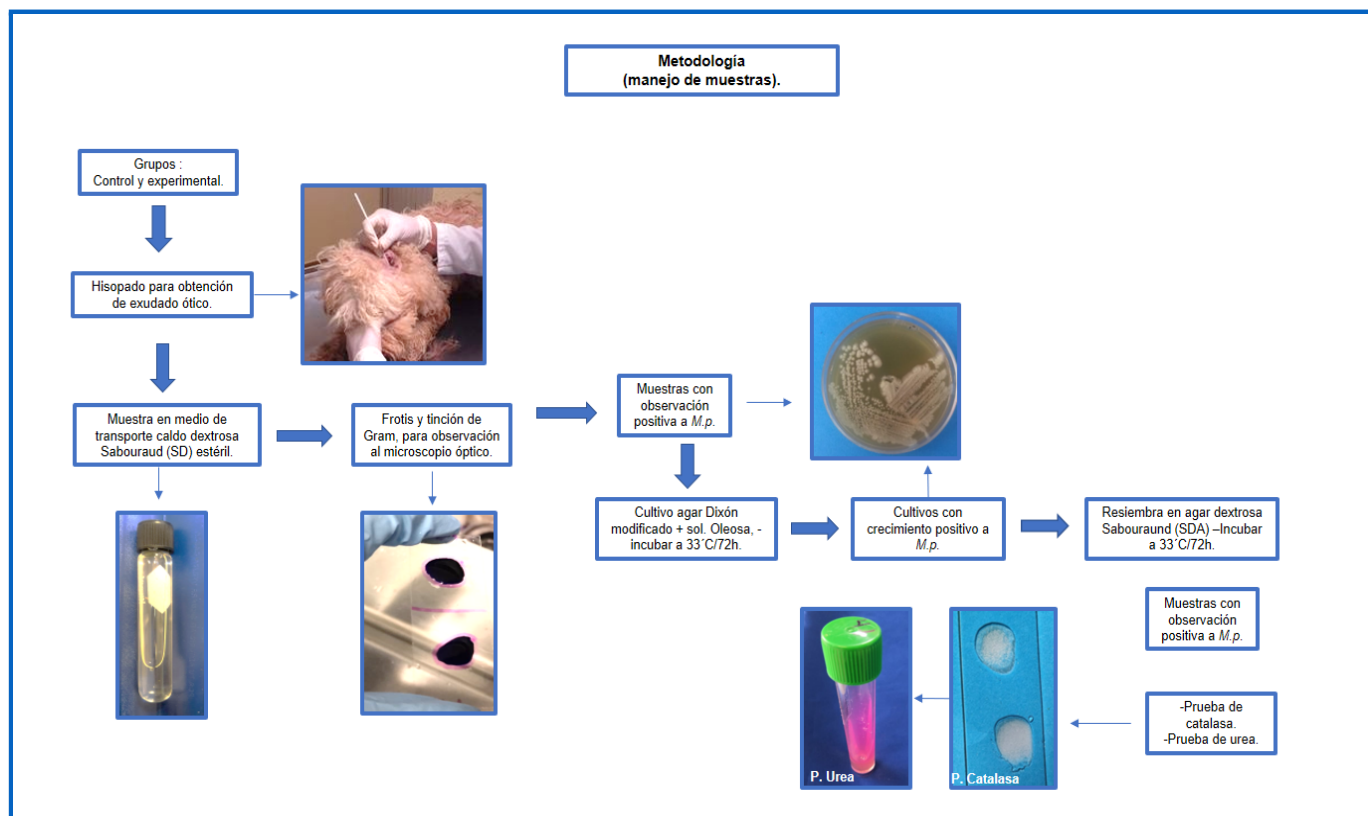


Imagen 7. Procedimiento para toma y manejo de muestras óticas, en ambos grupos.

Los tratamientos para el grupo control y grupo experimental, se administraron de la siguiente manera, explicada en el diagrama (Imagen 8.):

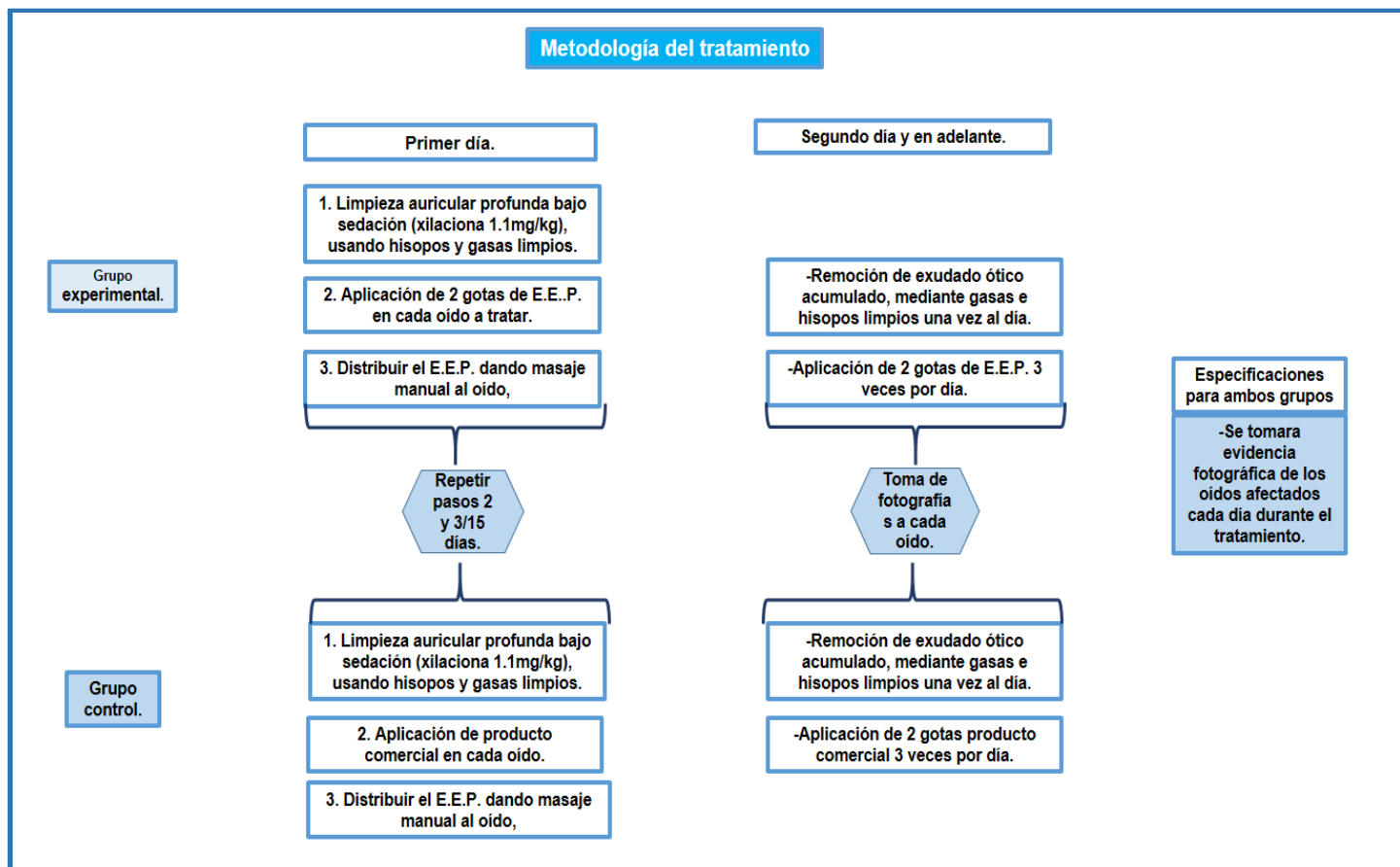


Imagen 8. Metodología del tratamiento para ambos grupos.

7. Resultados.

Caracterización de las muestras de los grupos experimental y control.

En las tablas 7 y 8 se muestran los resultados de las pruebas químicas de urea y catalasa, además de la tinción de Gram donde se observaron blastoconideos al microscopio óptico (estructuras con forma de suela de zapato) lo que confirma la presencia de *M.p.* En la prueba de urea, en todos los casos, el agar viro a color rosa posterior a la siembra, y, por último, en la prueba de catalasa las muestras positivas generaron efervescencia al entrar en contacto con peróxido de hidrógeno. En los casos 1.1 y 3.1 del grupo control la reacción fue de +/-, esta reacción se continúa considerando propia por la presencia de *M.p.* (Tabla 8 y 9).

Grupo tratado con propóleo mexicano				
Pruebas				
Casos	Urea	Catalasa	Tinción de Gram	Identificación
1D	+	+	+	<i>M.p.</i>
1I	+	+	+	<i>M.p.</i>
2D	+	+	+	<i>M.p.</i>
2I	+	+	+	<i>M.p.</i>
3D	+	+	+	<i>M.p.</i>
3I	+	+	+	<i>M.p.</i>

Tabla 8. pruebas para identificación de *M.p.* del grupo experimental.

Grupo tratado con producto comercial				
Pruebas				
Casos	Urea	Catalasa	Tinción de Gram	Identificación
1D	+	+/-	+	<i>M.p.</i>
1I	+	+	+	<i>M.p.</i>
2D	+	+	+	<i>M.p.</i>
2I	+	+	+	<i>M.p.</i>
3D	+	+/-	+	<i>M.p.</i>
3I	+	+	+	<i>M.p.</i>

Tabla 9. Pruebas para identificación de *M.p.* del grupo control.

Tablas 8 y 9: Prueba de urea (+) el agar vira a tonalidad rosa he indica la hidrólisis de la urea por *M.p.*, Prueba de catalasa (+) *M.p.* libera oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno, tinción Gram, al microscopio óptico se observan blastoconideos basófilos con forma de suela de zapato (+). Los pacientes fueron identificados con los números 1, 2 y 3 en ambos grupos, y diferenciando cada oído como derecho (D) e izquierdo (I).

Clasificación clínica de otitis externas.

Una vez que se evaluó el canal auditivo de cada paciente, con base en la escala tomada del estudio de Lozina (2010), se obtuvieron los puntajes según el nivel de lesión individual y se organizaron en tablas. (Tablas 10 y 11)

		Grupo experimental.			
		Día de tratamiento.			
Paciente	Casos	0	7	15	Promedio de grado por caso
1E	1 D	8	6	0	4.7
	1 I	6	4	0	3.3
2E	2 D	8	3	0	3.7
	2 I	8	5	0	4.3
3E	3 D	5	3	0	2.7
	3 I	6	3	0	3.0
Promedio de grado por día		6.8	4.0	0.0	Experimental (E) Derecha (D) Izquierda(I)

Tabla 10. Evaluación del grado de lesión, en el grupo experimental.

		Grupo control.			
		Día de tratamiento.			
Paciente	Casos	0	7	15	Promedio de grado por caso
1C	1D	7	2	0	3.0
	1I	6	8	0	4.7
2C	2D	9	6	0	5.0
	2I	9	7	0	5.3
3C	3D	9	5	0	4.7
	3I	6	8	0	4.7
Promedio de grado por día		7.7	6.0	0.0	Control (C) Derecha (D) Izquierda (I)

Tabla 11. Evaluación del grado de lesión, en el grupo control.

En las tablas 10 y 11, se muestra el puntaje de la evaluación en tres días diferentes: **Día 0**; se enlista la puntuación obtenida antes del tratamiento, además en este día se inicia el tratamiento.

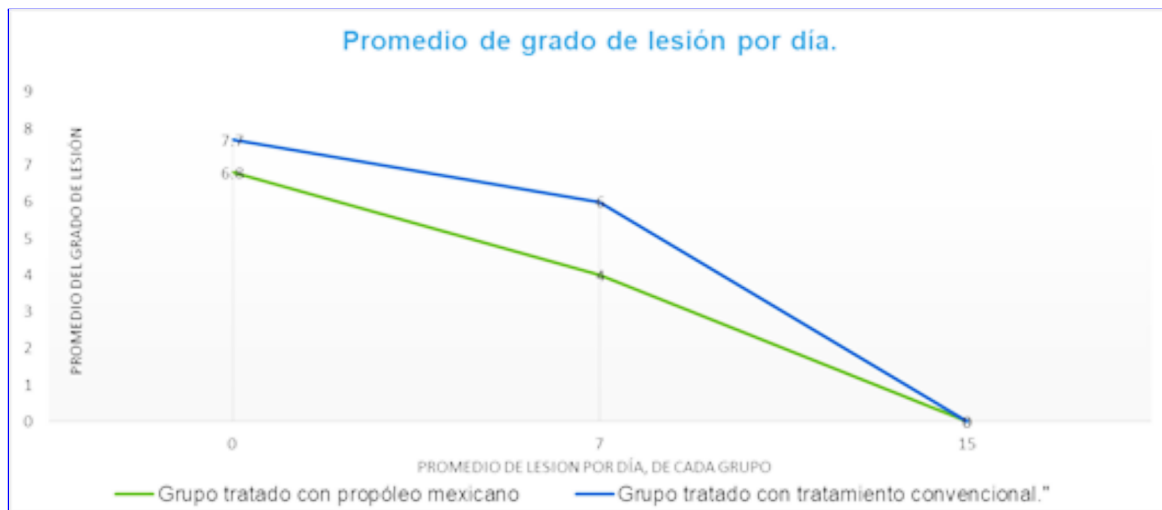
Día 7; se observa tanto en el grupo experimental como en el control una disminución en los grados de lesión, el grupo experimental mostró una mejora del 50% en sus lesiones y en el grupo control la mejoría fue menos marcada.

Día 15; todos los casos llegaron al término del tratamiento en este día, con una calificación de 0, es decir que tanto el grupo experimental como el control no muestran grados de lesión que indiquen la presencia de O.E.

Cabe aclarar que, al observar los datos expresados en promedios, se destaca la severidad en cada caso tanto al finalizar el tratamiento como por día de evaluación en cada grupo, de esta manera los casos más severos fueron el paciente 1, del grupo experimental, éste en el oído derecho inició con una calificación de 8 y al

finalizar el ensayo respondió al tratamiento obteniendo una calificación de 0 y un promedio en la severidad de las lesiones de 4.7, en el grupo control el paciente 2, en el oído derecho inició obteniendo una calificación de 9 y de igual manera finalizó respondiendo al tratamiento, con un promedio de severidad de 5.0.

La gráfica 1, muestra los resultados comparativos entre el grupo experimental tratado con el preparado ótico de propóleo al 10% y el grupo control tratado con el tratamiento convencional (10mg ketoconazol, lidocaina 10mg, 1mg dexametasona y 3mg gentamicina) .



Grafica 1 Promedio del grado de lesión por día, de cada grupo.

Día 0; indica el inicio del tratamiento y la puntuación inicial de los grados de lesión, siendo el grupo control el más severo en lesiones con un promedio de 7.7 y el grupo experimental con 6.8.

Día 7; a la mitad del tratamiento el grupo experimental tratado con propóleo destaca en la mejoría de las lesiones, bajando a un promedio de 4, mientras que el grupo control llega al promedio de 6.

Día 15; es el día en que finaliza el tratamiento y ambos grupos obtienen una calificación de 0 que indica la recuperación total de la O.E.

En la tabla 12, se muestra de manera comparativa la respuesta entre el grupo control y el experimental, debido a que todos los individuos que pertenecen al ensayo comparten signología de O.E. se decidió agrupar los promedios de los grados de lesión por día de cada grupo. Los números indican que, al inicio del tratamiento, el grupo control presentaba un promedio de lesión más alto (7.7) en comparación con el grupo experimental (6.8), en el día 7 ambos mostraron una disminución en el grado de lesión, sin embargo, el grupo experimental fue el que mejor respuesta manifestó al tratamiento tópico con propóleo, por último, en el día 15 ambos lograron restaurar la salud del conducto auditivo externo.

Tabla comparativa de los grados de lesión por grupo.			
Día	0	7	15
Grupo experimental	6.8	4	0
Grupo control	7.7	6	0

Tabla 12. Promedio de los grados de lesión, por día por grupo.

Evidencia fotográfica En la tabla 13, se agrupa la evidencia fotográfica recopilada a lo largo del tratamiento, de cada oído tratado, en ambos grupos, experimental y control. Mostrando el avance en los días 0, 7 y 15.

Otitis externa con tratamiento convencional

El individuo que representa al tratamiento convencional mostró signos de otitis externa en ambas orejas, es por ello que en la siguiente composición de imágenes se muestra la evolución de ambas orejas al ser tratadas con la solución comercial de uso tópico para problemas de otitis externa antes descrita; el diagnóstico del individuo se confirmó con las técnicas de laboratorio anteriormente mencionadas. en el día uno al tomar la evidencia fotografica se observa un alto grado de lesion, inflamacion, hipersecrecion de cerumen de color cafe oscuro acompañado de mal olor. Para el día siete que representa la mitad del periodo que duró el tratamiento, la mejoría que se observa es sutil en cuanto a la presencia de hipersecreción de cerumen, la imagen muestra mejoría en el grado de inflamación. El día 15 se da el término del tratamiento convencional para el individuo, se observa una nula presencia de cerumen, inflamación, prurito y mal olor; el estado de mejoría llevó a la conclusión de terminar el tratamiento pues no se observan signos de recidiva.

OTITIS EXTERNA CON TRATAMIENTO CONVENCIONAL

Oreja derecha

Oreja izquierda

Día 1



Día 7



Día 15



Tabla 13 A. Evidencia fotográfica de la evolución de un canino con otitis externa tratado con tratamiento convencional.

Otitis externa tratada con extracto etanólico de propóleo

En las siguientes imágenes se muestran las orejas del individuo modelo con otitis externa y al cual se decidió instaurar un tratamiento tópico alternativo a base de propóleo (Tabla 13B).

La evidencia fotografica muestra en el día uno diferentes grados de lesion en la piel que recubre al oído externo (oreja izquierda, flecha roja), asi como la presencia de hipersecrecion de cerumen de color cafe oscuro acompañado de inflamacion, mal olor y severo prurito, esto es mas evidente en la oreja derecha. En el día siete ambas orejas muestran mejoría e incluso en la oreja derecha la presencia de cerumen es casi nula y la pérdida de continuidad en la piel se resolvió (flecha roja). Para el día 15 ambas orejas muestran mejoría significativa pues no hay evidencia de hipersecreción de cerumen ni inflamación, sin embargo, el prurito recidivo aunado a un ligero mal olor por ello antes de una recidiva franca el tratamiento se prolongó cinco días para completar 20 días, al término de este periodo la recuperación fue total.

OTITIS CON TRATAMIENTO DE PROPÓLEO

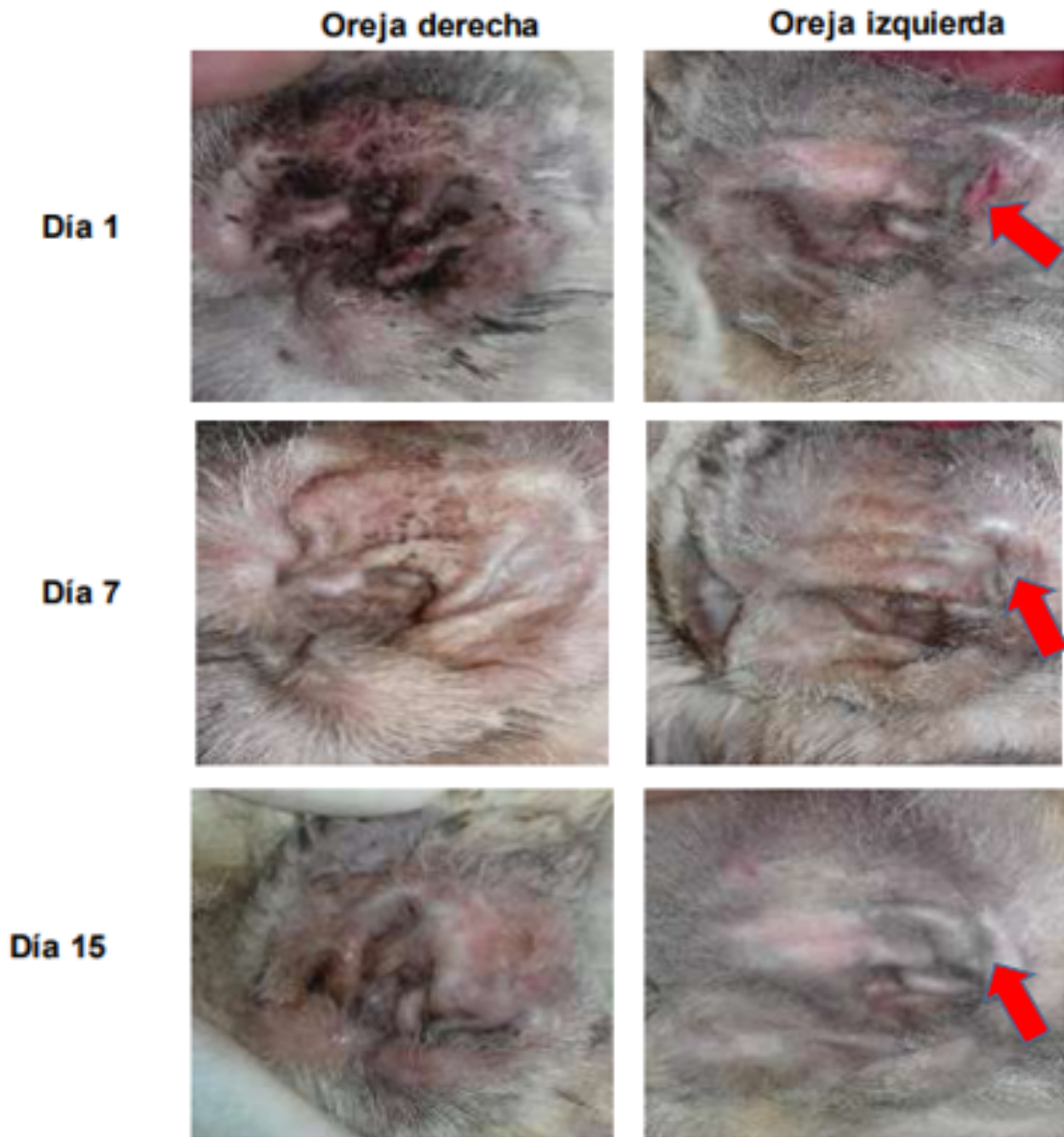


Tabla 13 B. Evidencia fotográfica de la evolución de un canino con otitis externa tratado con E.E.P.

8. Discusión.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto terapéutico *in vivo* del E.E.P. mexicano, en pacientes caninos con signología de O.E. causada por la levadura *M.p.*

Los pacientes se mantuvieron en observación diaria y se recaudó evidencia fotográfica a lo largo del tratamiento, quedando de manifiesto el efecto curativo del uso de gotas óticas del E.E.P. mexicano, gracias a su actividad antiinflamatoria, cicatrizante y antimicótica.

Estas propiedades se han demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro* previos. En el estudio realizado por Tovar (2016) demostró la presencia de pinocembrina y ácido benzoico, que aportan actividad antimicótica; la 2- heptadecanona, el oleato de etilo y el ácido palmítico que actúan como antiinflamatorios y aceleran la cicatrización; son compuestos que constituyen al propóleo y que le confieren actividad biológica y farmacológica favorables para la curación de casos de O.E., dicha actividad antimicótica del propóleo, también se observó por medio de microscopia electrónica de barrido, en un estudio realizado por Youn Chee, 2002, determinando que la morfología de *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* se veía afectada al romperse la superficie celular de estos hongos. En el caso del presente estudio, este efecto antimicótico también quedó demostrado, al administrar tratamiento ótico con E.E.P. mexicano, a los pacientes con afección de O.E., quienes, tras quince días de tratamiento, se recuperaron.

Al realizar la toma de muestras óticas por hisopado, de estos pacientes, se demostró la presencia de *M.p.* en el 100% de estas, a diferencia de Lozina que en 2010 realizó un ensayo con 48 perros a los cuales únicamente el 54.2% se les aisló *M.p.* En este mismo estudio Lozina evaluó los efectos terapéuticos de un preparado ótico a base de propóleo argentino, este mostró actividad antifúngica en el 71% de los casos tratados, mientras que en el presente ensayo todos los casos tratados durante 15 días tuvieron una recuperación del 100%.

Por otro lado, Harvey, R. y S., Paterson, (2014) mencionan, que los fármacos convencionales en el tratamiento de otitis pueden producir efectos de ototoxicidad, inflamación local, O.M., daño vestibular y coclear y resistencias medicamentosas en contraste con el uso terapéutico del propóleo donde no se reportó a ninguno de los individuos de este proyecto con efectos colaterales durante y después del tratamiento.

La presentación tópica del E.E.P. que se utilizó, mostró una alta adherencia a la superficie ótica de los pacientes tratados, dando la ventaja de mantener una exposición prolongada del producto en las áreas lesionadas. Como lo menciona Sánchez, R. (2011), la terapia tópica alcanza altas concentraciones del producto con los menores efectos sistémicos.

Durante las aplicaciones de E.E.P., a los pacientes tratados, se observó que había una alta adherencia a la superficie otica.

9. Conclusiones.

- Se aisló *M.p.* de cada paciente, quedando así demostrado que es un agente de alta incidencia en los casos de O.E. canina.
- La evidencia fotográfica fue de gran utilidad para notar de manera gráfica los avances en la curación de cada caso.
- El tratamiento con propóleo mexicano, fue eficiente para la curación de todos los casos tratados y no manifestó ningún efecto colateral con su uso.
- El plazo promedio, para obtener resultados con el tratamiento de propóleo, es a partir del séptimo día, siendo lo ideal un tratamiento por 15 días para evitar la recidiva.
- La principal ventaja del uso de propóleo como tratamiento de O.C., es que no ocasiona resistencias medicamentosas, y posee un efecto antimicótico.
- La densidad propia de E.E.P. Brindó una mejor adherencia y distribución a la superficie del conducto auditivo, en comparación con el producto comercial utilizado, lo que resulta en mayor permanencia del producto sobre las lesiones óticas.

10. Bibliografía.

1. Búrquez, M., Cruz, T., Soto, C., Carrillo, I., Fonseca, s., (2017) "In vitro activity of propolis on domestic animal viruses: a review" *Biological Science Collection* [En línea] Tomo 42, N.º 5, (May 2017): 272-276
<https://searchproquestcom.pbidi.unam.mx:2443/biologicalscience1/docview/1955965398/fulltextPDF/B509E06E2F2F43FAPQ/2?accountid=14598>
2. Catalán, E., (2019). *Evaluación de la actividad antifúngica del propóleo del estado de Morelos contra diversas especies del género Candida*. Tesis de licenciatura. Estado de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2019/octubre/0796309/Index.html>
3. Douriet-Marín FA, y Padilla M. (2016) *Identificación Morfológica, frecuencia y características de Malassezia spp en pacientes con psoriasis en placa y sujetos sanos*. Rev. Mex. Dermatología. Mayo Vol. 60 N.3 219-228. [En línea], disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2016/rmd163d.pdf>
4. Fernández, I., (2019) *Efecto inmuno modulador del propóleo en una bacterina contra Pasteurella multocida en conejos*. Tesis de maestría. Estado de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2019/junio/0790135/Index.html>
5. Ferreira, S., Guzmán, D., Figueroa, J., Tello, J., de Oliveira, D., (2010) "caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de apis mellifera L. (hymenoptera: apidae) de la región andina colombiana" in *Acta Biológica Colombiana* [En línea] 16(1):175 - 184 ·
<file:///C:/Users/sam.s/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/PRBSJD46/out.pdf>

6. Gaviria, J., y Cruz, (2018) *Otitis media en el perro: diagnóstico, tratamiento quirúrgico y posibles complicaciones*. Rev. Mes. Vet Zoot. Vol. 65 N.2 [En línea] disponible en:

file:///C:/Users/sam.s/Documents/TESIS/otitis%20media,%20dx,%20tx%20quirurgico%20y%20posibles%20complicaciones,%20rev%20med%20art.pdf

7. Gómez R., (2017) "Evaluación del daño estructural sobre *Candida Albicans* producido por propóleo mexicano mediante Microscopia Electrónica de Barrido" Tesis de licenciatura. Estado de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México.

8. Harvey, R. y S., Paterson, (2014) *Otitis Externa, An Essential Guide to Diagnosis and Treatment*. Edición a cargo de CRC Press Taylor & Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Ratón, FL 33487-274

9. Hernández, R., (2009) *Efecto inhibitorio del extracto de propóleo en bacterias y levaduras causantes de otitis canina*. Tesis de licenciatura. Estado de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://132.248.9.195/ptd2010/febrero/0654558/Index.html>

10. Liste, B., (2010) "Atlas veterinario de diagnóstico por imagen" 1er ed. España: Servet.

11. Lozina, L., Peichoto, M., Acosta, O. y Granero G. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. Lat. Am. J. Pharm., 29, 2010, p.102-10.

file:///C:/Users/sam.s/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/IE/P3Z0UEGJ/LAJOP_29_1_1_14_HCS252CF34.pdf

12. Lozina, L.A., Peichoto, M. E., Boehringer, S.I., Koscinczuk, P., Granero, G. E. and Acosta, O. C., (2010) Efficacy of Argentine Propolis Formulation for Topical Treatment of Canine Otitis Extern. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 1359-1366
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000600010&lng=en&tlng=en [fecha de consulta: 07/05/2020

13. Noriega, S., Ed. Martin, E., (2014) “El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica” curso de adaptación al grado. Cantabria, España. Departamento de Enfermería E.U.E. Casa de salud Valdecilla, Universidad de Cantabria.
https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/Noriega_Salmon.pdf

14. Padrón, A., Augusto, A., Domínguez, N., Díaz, R., Llera, E. Editor, Padrón, A. 2019” El propóleo una alternativa de todos los tiempos “*Research gate* [en línea] UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS PINAR DEL RÍO. disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/330289548_El_propoleo_una_alternativa_de_todos_los_tiempos

15. Pulido, A., Castañeda, R., Linares, L., Mercado, M., (2014) “Concordance between otic cytology and culture in diagnosis of external otitis canine by *Malassezia spp*” *Rev.MVZ Córdoba* [En línea] vol. 3 núm. 20, 2015, :4720-4725 pp.
www.scielo.org.co/pdf/mvz/v20n3/v20n3a06.pdf

16. Rejas, J., Goicoa, A., Payo, P., Balazs, V., Universidad de León. (2010) “Otitis externa” *Manual de dermatología de animales de compañía*. [En línea]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/manualdedermatologia/home/otitis-externa>

17. Rodríguez B., (2019) "*Potencialización antimicrobiana de dos propóleos mexicanos para su aplicación en casos de medicina veterinaria*" Tesis de doctorado. Estado de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0793056/Index.html>

18. Sánchez, R., Calle, S., Falcón N., Pinto, C., (2011) "Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica" en revista *Rev. Inv. Vet Perú* [en línea] vol. 2 revista 22. Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 4 Dirección actual: Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v22n2/a13v22n2.pdf>

19. Tovar N., (2016) "*Evaluación antimicótica in vitro del propóleo mexicano sobre malassezia pachydermatis*" Tesis de maestría, México, departamento de microbiología y parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

20. Viloria, b., Gil, h., Durango, I., García c., (2012) "Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia)" *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 10 No. 1 Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Productos Naturales.* Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n1/v10n1a10.pdf>

21. Ycaza, M., (2018) “Prevalencia de *Otodectes cynotis* en *Canis lupus familiaris*” Tesis de licenciatura. Guayaquil, Ecuador. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo.

<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/10322/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-39.pdf>

22. Yee, W., Khazandi, M., Hickey, E., Page, S., Trott D., Hill, P., (2018) “Actividad antimicrobiana in vitro de siete adyuvantes contra patógenos comunes asociados con otitis externa canina” *Veterinary Dermatology* [En línea] vol. 30 núm. 2 Bordeaux, France, Edited by Sheila M.F. Torres <https://onlinelibrary-wiley.com.pbidi.unam.mx/2443/doi/full/10.1111/vde.12712?sid=EBSCO%3Acmedm>