



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNA**

**EFICACIA DEL EXTRACTO CÍTRICO ESTANDARIZADO  
DE SEMILLAS DE TORONJA (*Citrus maxima*)  
EN EL TRATAMIENTO DE DERMATOFITOSIS EN CABALLOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:  
D A V I D V A L L E J O B R A V O**

**ASESORES**

**MVZ. M en C. Cert. José Luis Velázquez Ramírez  
MVZ. Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares  
QFB. Dra. Carolina Segundo Zaragoza**



**MÉXICO D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres Gloria Bravo Morán y David Vallejo Quintero, a quienes el paso de los años los ha tenido atentos a sus tres hijos privándose de muchas cosas para ellos mismos, dando todo para que salgamos adelante y a quienes amo con todo mi corazón. Por confiar en mí y brindarme todo su cariño hasta en los momentos más difíciles de mi vida y siempre incitarme a ser mejor. Todo lo que les pueda dar a ustedes es poco.

A mis hermanitas Erika (Mi Pollito) y Evelyn (Mi Japonesita) que me han dado los ratos más alegres como familia. Las amo.

A mis dos papás académicos:

José Luis Velázquez: por dejarme ir como los papás a sus hijos cuando crecen y enseñarme que debo buscar mi propio camino. Pero sobre todo que haga con amor y dedicación lo que me gusta.

Roberto A. Cervantes Olivares: RACO como te decimos todos tus hijos de cariño. Quien supo darme otra visión de la vida y que me cuidó cuando lo necesité más. Tú eres de las personas que como dicen mis amigos, sabes tocar vidas. Te deseo lo mejor de la vida mi estimado mentor y ojalá nunca dejes de ser quien eres.

A mi mamá académica:

Carolina Segundo Zaragoza: Por darme el ejemplo de que podemos ir tan lejos como nosotros queramos a pesar de las dificultades del camino. Por regañarme cuando lo necesité, pero también acogerme y aconsejarme en los momentos indicados. Te quiero muchísimo y espero ya no hacerte enojar tanto.

Por último pero no menos importante, a mi pequeña CriCra que tuvo que esperar mucho a que llegara este momento y a quien amo con todo el corazón.

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea dar un agradecimiento a:

A mí familia que me aguantaron todo este tiempo, los amo a todos.

El Sr. Héctor Meneses de Laboratorios Double Oak Tree por su valiosa cooperación para llevar a cabo este proyecto.

A mí querido amigo y maestro Reyes, que siempre está dispuesto a ayudar a los desesperados como yo, que no sabemos nada de estadística y sin tu orientación e instrucción nos encontraríamos perdidos en los laberintos matemáticos. No me queda más que decirte gracias por todo.

A mis amigos Ceci, Andira y Chucho del laboratorio de micología de la FMVZ. Conocerlos me cambió la vida, los quiero mucho a los tres y solo puedo decir gracias por todas las molestias que les puede haberles ocasionado. En verdad me ayudaron mucho.

A mí querida amiga Lina, por todo el esfuerzo y dedicación brindada para que terminara a tiempo mi trabajo. Siempre me has acompañado en los peores momentos.

A Angélica quien también contribuyó a que pudiera sacar adelante mis problemas con eso de la computación. Gracias de todo corazón.

A mis tres asesores Caro, RACO y José Luis. Por la paciencia que me tuvieron. En verdad se los agradezco mucho.

A mis queridos amigos Templos, Chente, Christian y Héctor que me ayudaron a sacar adelante este proyecto de tesis en su parte experimental y con quienes me he divertido mucho.

A todos y cada uno de mis maestros, quienes tocaron de una manera especial mi vida y me encaminaron a ser una persona de bien, siento que nunca acabaría de nombrarlos a cada uno.

A mi facultad y a las personas que ahí laboran, por todo el apoyo que me fue brindado durante toda la carrera.

<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b>	
	<b>PAGINA</b>
1. Resumen	<b>1</b>
2. Introducción	<b>2</b>
3. Hipótesis	<b>11</b>
4. Objetivo	<b>11</b>
5. Material y métodos	<b>11</b>
5.1 Área de estudio	<b>11</b>
5.2 Criterios de inclusión de los animales	<b>11</b>
5.3 Procesamiento de la muestras	<b>12</b>
5.4 Identificación	<b>13</b>
5.5 Tratamientos	<b>13</b>
5.6 Análisis estadístico	<b>13</b>
6. Resultados	<b>13</b>
7. Discusión	<b>22</b>
8. Conclusiones	<b>24</b>
9. Bibliografía	<b>25</b>
10. Apéndice I. Hoja de trabajo	<b>32</b>
11. Apéndice II. Medios, técnicas y procedimientos	<b>33</b>

<b>ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS</b>	
	<b>PAGINA</b>
Cuadro 1. Características distinguibles de los tres géneros más importantes de dermatofitos.	<b>5</b>
Cuadro 2. Caballos con dermatofitosis tratados con extracto cítrico	<b>15</b>
Cuadro 3. Caballos con dermatofitosis tratados con agua	<b>16</b>
Cuadro 4. Resultados del ANOVA aplicado para el tamaño de lesión	<b>17</b>
Cuadro 5. Resultados del ANOVA aplicado para el número de lesiones	<b>17</b>
Figura 1. Efecto del tratamiento en el tamaño de lesión.	<b>18</b>
Figura 2. Efecto del tratamiento en el número de lesiones.	<b>19</b>
Figura 3. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región de la cabeza.	<b>19</b>
Figura 4. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región del cuello.	<b>20</b>
Figura 5. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en los miembros torácicos.	<b>20</b>
Figura 6. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región de tronco.	<b>21</b>
Figura 7. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en los miembros pélvicos.	<b>21</b>

## 1. RESUMEN

**VALLEJO BRAVO DAVID.** Eficacia del extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja (*Citrus maxima*) en el tratamiento de dermatofitosis en caballos (bajo la dirección de: MVZ. M en C. Cert. José Luis Velázquez Ramírez, MVZ. Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares y la QFB. Dra. Carolina Segundo Zaragoza)

La dermatofitosis es una enfermedad de la piel que afecta a caballos de todas las edades, raza o sexo. Al ser una zoonosis, los animales afectados deben recibir tratamiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de una solución de extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja *Citrus maxima* (ECST) en el tratamiento de este padecimiento. Para ello se emplearon 2 grupos de 10 caballos que padecían la enfermedad. Ambos grupos fueron muestreados antes y después del tratamiento empleando la técnica de Mackenzie (cepillado profuso del pelo en las zonas afectadas). A las muestras se les practicó observación directa con KOH al 10% y aislamiento en medios específicos como son: agar micobiótico adicionado con cloranfenicol, ciclohexamida y ácido nicotínico según el caso. A un grupo se le aplicó ECST y al otro agua cada 24h durante 10 días. También se cuantificó el número y tamaño de las lesiones antes y después del tratamiento. Los datos fueron procesados utilizando el programa estadístico SAS, aplicando un análisis de varianza con medidas repetidas a través de modelos mixtos para el tamaño y número de las lesiones. El grupo tratado con ECST obtuvo más casos positivos después del tratamiento que el control con agua. Los resultados estadísticos mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en el tamaño y número de lesiones de ambos grupos, ya que el valor de P fue  $\geq$  a 0.05. Demostrando que no se eliminó el hongo y por tanto el tratamiento bajo estas condiciones no fue eficiente.

## 2. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo ya que representa aproximadamente el 15% del peso corporal <sup>1</sup>. Además de ayudar en el diagnóstico de numerosas enfermedades del organismo, cumple con funciones importantes como son: a) representar una barrera física química y biológica contra la invasión de microorganismos, b) proteger al individuo ante acciones mecánicas, químicas, térmicas y osmóticas del medio, c) actuar como órgano sensitivo para la percepción de presión, vibración, calor, frío y dolor, d) colaborar en la regulación térmica y el mantenimiento del equilibrio hídrico, así como en la secreción y absorción de diferentes sustancias, e) facilitar la transformación de los estadios previos de la vitamina D a su formas activas, f) ayudar al individuo en situaciones de estrés, sirviendo como reservorio de grasa, electrolitos, agua, carbohidratos y proteínas en el tejido subcutáneo, g) permitir la comunicación entre individuos aportando datos sobre su estado emocional (a través de mímicas o reflejos vasculares) o sexual (con la producción de gran cantidad de ferohormonas en sus anexos) <sup>1-3</sup>.

A pesar de ser un órgano muy eficiente, la piel puede llegar a ser infectada con hongos, bacterias y virus, e irritada por químicos u otra clase de sustancias que entran en contacto con ella <sup>1, 4, 5</sup>, por éste motivo las lesiones en piel son una parte importante y habitual de la consulta en la práctica médica tanto humana como veterinaria <sup>6,7</sup>.

En la práctica veterinaria las afecciones dermatológicas en equinos son frecuentes e importantes, ya que después de los perros y gatos, los caballos son los animales que presentan con mayor frecuencia éste tipo de problemas. En general la naturaleza y la frecuencia de las dermatosis equinas son similares en todo el mundo <sup>8,9</sup>.

Un estudio realizado por la British Equine Veterinary Association entre 1962 y 1963 reveló que el 2% del total de casos atendidos por los miembros de la asociación se debió a un padecimiento cutáneo <sup>10</sup>. Otro estudio realizado por la Asociación Americana de Veterinarios de Equinos efectuado en 1989 reveló que las afecciones cutáneas ocupaban el cuarto lugar entre los problemas médicos más frecuentes después del síndrome abdominal agudo, enfermedades virales del aparato respiratorio y la endometritis <sup>11</sup>.

En una serie de foros veterinarios realizados en 1975, 1981 y 1986, cuyo objetivo era abordar los problemas dermatológicos que afectan a los equinos, señalaron que entre las enfermedades dermatológicas equinas más comunes se encuentran la dermatofitosis, dermatofilosis, fotodermatitis, reacciones de hipersensibilidad a insectos, oncocercosis, los granulomas eosinofílicos, papilomas, sarcoides y la urticaria<sup>12-14</sup>. Aunado a lo anterior un estudio retrospectivo realizado en la Universidad de Cornell durante un período de 21 años (1979-2000) mostró que la segunda dermatosis equina más frecuente es la dermatofitosis<sup>15</sup>. El primer reporte de dermatofitosis en caballos fue realizado formalmente por Seddon en 1943 durante la segunda guerra mundial<sup>16</sup>.

La dermatofitosis se define como una enfermedad micótica de la piel y sus anexos causada por un grupo de hongos denominados dermatofitos, los cuales afectan a especies como el ser humano, caballos, perros, gatos, bovinos, ovejas, cabras, cerdos, roedores, conejos y aves, entre otros<sup>17-27</sup>.

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos integrado por los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*<sup>19,25</sup>.

Algunas especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* son patógenas tanto para animales como humanos, mientras que el género *Epidermophyton* principalmente afecta a estos últimos<sup>28,29</sup>. Todos los dermatofitos fueron clasificados formalmente como miembros del *Phylum Deuteromycota (Fungi imperfecti)*, familia *Arthrodermatacea*. En su estado teleomorfo o estado perfecto, *Microsporum* y *Trichophyton* pertenecen al género *Arthroderma*, mientras que el estado perfecto de *Epidermophyton* aún se desconoce<sup>30,31</sup>.

Debido a su afinidad por un tipo de sustrato, los dermatofitos se clasifican como: zoofílicos (los dermatofitos que principalmente se encuentran en animales pero que pueden ser transmitidos a humanos), antropofílicos (los dermatofitos que se encuentran principalmente en humanos y que raramente pueden transmitirse a animales) y geofílicos (los dermatofitos que se encuentran principalmente en el suelo y que se asocian la descomposición de pelo, plumas, cascos, pezuñas y otros recursos de queratina; estos infectan tanto a animales como humanos).



Se sabe que casi todos los dermatofitos tienen como reservorio el suelo pero a pesar de esto, éste sistema de clasificación continua usándose para indicar la fuente de infección <sup>15,17</sup>.

El diagnóstico de este padecimiento comienza en el laboratorio con el examen directo bajo el microscopio de muestras de tejido córneo, piel o pelo, en preparaciones de hidróxido de potasio (KOH al 10%) <sup>17</sup>.

Para el cultivo de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* se emplean medios de cultivo selectivos como el agar Sabouraud con cloranfenicol y ciclohexamida o el Dermatophyte Test Medium. Cuando se sospecha de especies como *Trichophyton equinum*, debe adicionarse ácido nicotínico a los medios de cultivo ya que sin éste no podrá desarrollarse <sup>23,25</sup>.

Las colonias de *Microsporum* en agar Sabouraud suelen observarse de un color ante o pardo, y se vuelven algodonosas después de dos a cuatro semanas de cultivo, las de *Epidermophyton* se observan de un color verdoso amarillento que con el paso de los días se vuelve blanco, mientras que las de *Trichophyton* son muy variables, pueden ser lisas y polvorientas, de un color blanco que pasa al rosa, rojo o púrpura, así como del amarillo al pardo <sup>27</sup>.

En cuanto a su morfología todos los dermatofitos producen hifas septadas, a las que colectivamente se les llama micelio. Las unidades de reproducción asexual llamadas conidias se encuentran en el micelio aéreo; estas unidades pueden ser de dos tipos macroconidias cuando miden 100 µm de largo o microconidias cuando miden menos de 10 µm en cualquier dimensión <sup>15, 22</sup>. La forma, tamaño, estructura y arreglo de las conidias se emplea como un criterio de identificación, así también algunas estructuras que permiten identificar y clasificar a los dermatofitos, son la presencia de espirales, nódulos o clamidoconidias en las hifas. En el hospedador las estructuras que pueden observarse son delgados filamentos y arthroconidias (otro tipo de unidad reproductiva asexual) <sup>25,26</sup>.

Las características morfológicas distinguibles más importantes de los tres géneros de dermatofitos se enlistan en el cuadro 1:

**Cuadro 1. Características distinguibles de los tres géneros más importantes de dermatofitos.**

	<i>Microsporum</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>Epidermophyton</i>
<b>Macroconidia</b>	usualmente presente	variable; regularmente ausente	presente
<b>Paredes</b>	gruesa	delgada	gruesa
<b>Superficie</b>	rugosa	lisa	lisa
<b>Forma</b>	huso que da la apariencia de un puro	bastón delgado	bastón ancho
<b>Microconidia</b>	variable, regularmente ausente	usual	ausente

Tomado de: Veterinary microbiology and microbial diseases. Quinn PJ.. 1<sup>st</sup> ed. Great Britain: Blackwell Publishing, 2002.

Existen cerca de 38 especies de dermatofitos conocidas<sup>24</sup>, aquellas que afectan a los equinos se encuentran dentro de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, siendo las especies *Trichophyton equinum*, *Microsporum equinum* y *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum* las más comúnmente aisladas<sup>15, 24, 27-29</sup>. Su transmisión es mediante el contacto directo con pelos o escamas infectados o con elementos fungales presentes en el medio ambiente, sobre animales o fómites tales como cepillos, peines, rasuradoras, almohazas, sillas de montar, cama, mantas, clavos, materiales de vallado, vehículos de transporte y otros materiales asociados con el acicalamiento, movimiento y alojamiento de animales<sup>29-39</sup>. Estos microorganismos crecen solo en tejidos queratinizados como el pelo, cascos y la capa externa de la piel. Su crecimiento se ve inhibido al entrar en contacto con células vivas o áreas de inflamación severa. La alteración mecánica del estrato córneo parece ser un factor facilitador importante en la penetración de los folículos pilosos<sup>38-41</sup>. El período de incubación en los caballos, se estima entre 8 a 12 semanas<sup>42,43</sup>.

Los dermatofitos tienen la capacidad de producir enzimas proteolíticas como las elastasas, colagenasas y queratinasas, las cuales juegan un papel importante como factores de virulencia<sup>38</sup>. La colonización comienza cuando una conidia entra por un defecto en el estrato córneo, una vez que la germinación es disparada por estímulos químicos, el tubo germinal se desarrolla formando un micelio ramificado entre el epitelio cornificado y unas cuantas porciones del micelio se diferencian en artroconidias<sup>13, 24, 25, 38</sup>.

La invasión del pelo comienza con la germinación de una conidia cerca del orificio folicular; las hifas crecen dentro de la corteza del pelo y en la parte externa o interna se forman y acumulan artroconidias, a lo que se le conoce con el nombre de ectótrix y endótrix respectivamente<sup>18, 25</sup>.

Todos estos eventos evocan en el hospedador una respuesta fisiológica que da como resultado una hipertrofia del estrato córneo, con acelerada queratinización y exfoliación, convirtiéndose poco después en un área eritematosa alopecica con descamación y costras. El prurito así como el tamaño de las lesiones es variable<sup>34, 45-48</sup>. Ocasionalmente los dermatofitos que se encuentran en el centro de la lesión mueren, permitiendo que el área resuelva en la clásica lesión circular (“ringworm”)<sup>23-25, 38, 43, 47</sup>.

En los animales ésta presentación puede variar, los pelos afectados al ser frágiles se quiebran cerca de su base, dando a la lesión una apariencia de área rasurada, ésta pérdida de pelo no es permanente a menos que el folículo piloso haya sido destruido por la inflamación. También puede observarse cierto grado de foliculitis, pápulas o pústulas<sup>15, 25, 38</sup>.

En los equinos ya que la presentación regularmente es folicular, el signo clínico más consistente es la presencia de una o más áreas circulares de alopecia con descamación y encostramiento variable<sup>29</sup>. Las primeras lesiones pueden observarse como pelos erectos en áreas anulares de 5 a 20 mm de diámetro y el pelo se arranca con facilidad de las lesiones en el plazo de 4-6 días, las costras pueden ser delgadas a gruesas; las lesiones más antiguas presentan alopecia y descamación, posteriormente las lesiones se expanden hacia la periferia volviéndose coalescentes<sup>29, 38</sup>. Cualquier parte del cuerpo puede verse afectada en este padecimiento<sup>48, 49</sup>. El prurito es más notorio en los estadios iniciales de la infección y el grado de dolor es variable<sup>47</sup>.

Epidemiológicamente se ha observado que la enfermedad en los caballos de las regiones tropicales o subtropicales es más común cuando las poblaciones de insectos mordedores abundan ya que traumatizan la piel formando pequeñas soluciones de continuidad que le permiten o facilitan la entrada de microorganismos como hongos o bacterias<sup>37, 50-52</sup>. Aunado a esto, se ha observado que los brotes de esta enfermedad se presentan con mayor frecuencia con los caballos que se reúnen para fines de entrenamiento, carreras y reproducción debido a que el estrés al que están sujetos deprime sus defensas<sup>15, 50-52</sup>.

Para ésta enfermedad como para otras muchas, el diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología. Y su característica fundamental es la identificación del agente biológico<sup>53</sup>. Por ello deben considerarse diagnósticos diferenciales como la foliculitis estafilocócica, dermatofilosis, pénfigo foláceo y foliculitis eosinofílica. En casos de dermatosis, la anamnesis puede tener un valor limitado a menos que la exposición sea conocida, esto se debe a que la dermatofitosis presenta un cuadro clínico muy variable<sup>15, 47</sup>, por lo que debe buscarse evidencia de esta en otros animales o contactos humanos, principalmente cuando los caballos se mantienen en grupos (centros de exposición, criaderos y centros de carreras o entretenimiento entre otros)<sup>49, 54-56</sup>.

El examen físico de los animales de preferencia debe realizarse con luz diurna, de no ser así se recomienda el uso de la luz artificial de potencia lumínica adecuada que sea intensa, uniforme y sin cambios de color. La lámpara debe ser móvil para iluminar todas las áreas corporales. La combinación de lupa y luz provee amplificación del campo y buena iluminación<sup>15, 41, 43, 44</sup>.

Antes de concentrarse en las lesiones el clínico debe observar el animal desde una distancia de un par de metros para formarse una impresión general de las anomalías y observar los patrones de distribución<sup>41, 43, 51</sup>.

Después de haberse formado una impresión mediante la observación a distancia, la piel se debe examinar de cerca y palpar<sup>22, 27, 52, 53</sup>. Es importante examinar cada centímetro

de piel y las mucosas visibles, a continuación se deben de anotar las características morfológicas de las lesiones cutáneas, ya que en algunas ocasiones son las únicas guías cuando no pueden realizarse procedimientos de laboratorio o de éstos no se obtiene información útil <sup>27, 37, 57-59</sup>.

Una vez establecido el diagnóstico de la enfermedad, debe procederse al manejo de la misma a través de un tratamiento cuyos objetivos se enfoquen a elevar al máximo la capacidad de respuesta del paciente (inmunomoduladores), reducir el contagio a otros animales y personas, así como la contaminación del medio y acelerar la resolución de la infección <sup>36-39</sup>.

Otra característica del manejo clínico, es el tratamiento de todos los caballos en contacto con el infectado y la desinfección de su ambiente. Es aconsejable no montar, entrenar o hacer trabajar a éstos animales hasta que se recuperen, ya que el traumatismo continuo y el ejercicio pueden conducir a la formación de lesiones más numerosas y graves, dando como resultado un retraso en la recuperación, además de contribuir a la diseminación de esporas infectantes en el ambiente <sup>37, 39, 60</sup>.

Todo caso de dermatofitosis confirmada debe recibir tratamiento tópico <sup>36-38</sup>. Para ello existen cremas y soluciones que se aplican sobre las lesiones focales cada 12 h, aunque de estos productos ninguno presenta ventajas notorias sobre otro <sup>15</sup>. Para el caso de lesiones inflamatorias, la aplicación de un producto que contenga un glucocorticoide combinado con agentes antimicóticos podría acelerar la resolución de la enfermedad clínica. Mientras que en caballos con un compromiso cutáneo multifocal o generalizado se prefiere el empleo de baños con antimicóticos, ya que permiten tratar la superficie corporal completa, reduce la necesidad de friccionar el pelaje y el agente antimicótico se puede secar sobre la piel. En este caso los baños suelen aplicarse diariamente durante 5 a 7 días, posteriormente 1 o 2 veces por semana, empleándose enilconazol al 0.2% y cal sulfurada al 2% que son los agentes más eficaces <sup>61</sup>.

El uso de champús resulta ser menos adecuado, no obstante se ha informado que el uso de un champú con clorhexidina al 2% y miconazol al 2%, aplicado dos veces por semana condujo a la resolución de los signos clínicos en un plazo de 6 semanas <sup>61</sup>.

Las aplicaciones focales de agentes antimicóticos tópicos son eficaces para el tratamiento de las lesiones dermatofíticas localizadas, como ejemplos de éste tipo de agentes tenemos al yodo, hipoclorito de sodio, tolnaftato, naftenato de cobre, tiabendazol y ungüentos tales como ácido salicílico, benzóico y violeta de genciana, entre otros. Los cuales actúan desnaturalizando u oxidando enzimas y proteínas, alterando así su función<sup>15,37,45</sup>.

Para el tratamiento de la dermatofitosis en caballos se cuenta con otros agentes tales como los azoles,<sup>41, 61, 62</sup>. Como ejemplos se encuentran los imidazoles, clotrimazol al 1% y miconazol al 1 o 2%, cuya aplicación se recomiendan cada 12 h<sup>63</sup>.

Otro miembro de ésta familia es el tiabendazol al 4 % con dexametasona al 0.1%, que se recomiendan para el tratamiento de lesiones dermatofíticas muy inflamadas (queriones) con el mismo intervalo entre aplicaciones<sup>15</sup>.

La alilaminas, naftifina y la terbinafina (ambas al 1%) se unen al estrato córneo y penetran en los folículos pilosos, su período de aplicación es con intervalos de 12 h<sup>64</sup> y además de su efecto antimicótico, la naftifina también tiene un efecto antiinflamatorio, por lo que se recomienda para lesiones con ésta característica. De igual manera, la clorhexidina al 4% resultó ser eficiente con el mismo período de aplicación que los anteriores fármacos<sup>15</sup>.

Otro enjuague muy útil para el tratamiento de la dermatofitosis equina es la natamicina<sup>42</sup>, que se recomienda emplearla como una solución de 100 ppm cada cuatro días por cuatro a seis semanas<sup>42, 65</sup>. La desventaja es que es inactivada por la luz solar, por lo que se requiere tratar a los animales en lugares cerrados y solo se puede sacar al exterior a los animales durante la noche<sup>15</sup>.

El empleo de antimicóticos sistémicos es recomendable en los casos persistentes; de éstos la griseofulvina continúa siendo el antimicótico de elección. Cuando no es eficaz o se encuentra contraindicada, itraconazol puede ser una alternativa aceptable. Los nuevos antimicóticos, en especial los compuestos con triazol y las alilaminas, aún no han

demostrado ser superiores a la griseofulvina para su utilización sistémica, además tienen un costo elevado <sup>15, 23, 24, 38, 45</sup>.

Existen otros productos tales como: los yoduros, pero su manejo en la clínica diaria no es práctico y los efectos secundarios son considerables <sup>66-71</sup>.

Debido a que la mayor parte de fármacos de aplicación sistémica tienen un gran número de efectos secundarios en los pacientes <sup>66-76</sup> y el emplear ungüentos y pomadas para tratar un gran número de caballos con dermatofitosis representa un problema, la aplicación de soluciones resulta ser más conveniente, por su fácil manejo y costo <sup>66, 69</sup>.

Por tal motivo, en los últimos años se ha recurrido nuevamente a la medicina de tipo alternativo <sup>77,78</sup>, con la cual se ha podido tratar con éxito gran variedad de enfermedades, empleando para ello productos que no generen efectos secundarios y que en su mayoría tienen un bajo costo y fácil aplicación como lo es el extracto etanólico de semillas de toronja *Citrus paradisi*; una sustancia comercialmente disponible empleada para desinfectar superficies, así como objetos inanimados. Actualmente ha llamado la atención por su actividad antibacteriana comprobada *in vitro* <sup>79</sup>, así como por los testimonios médicos en medicina humana que aseguran que es un potente agente contra infecciones producidas por *Candida albicans* <sup>80</sup> y hasta de ser capaz de curar alteraciones dermatológicas tales como la dermatitis, verrugas y reacciones de hipersensibilidad a la hiedra venenosa, entre otras <sup>79-87</sup>.

Ya que las investigaciones sobre la composición química en este tipo de productos revelan la presencia de flavonoides bioactivos que tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales y antioxidantes <sup>79-87</sup> y al haber sido empleados tanto en humanos como caballos para el tratamiento de diferentes padecimientos, así como un ingrediente principal en cosméticos y suplementos dietéticos. Se consideró que el extracto cítrico de semillas de toronja (ECST) podía ser una opción *in vivo* para el tratamiento de la dermatofitosis en caballos, por su fácil manejo y modo de aplicación, comparado con las soluciones y pomadas que se emplean tradicionalmente en la clínica diaria.

### **3. Hipótesis**

El extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja (*Citrus maxima*) es eficaz en el tratamiento de dermatofitosis en caballos.

### **4. Objetivo**

Evaluar la eficacia de una solución elaborada a partir de extracto cítrico de semillas de toronja al 40% en el tratamiento de dermatofitosis en caballos.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Área de estudio**

El presente estudio se realizó en la unidad de Policía Metropolitana Montada del Gobierno del Distrito Federal, localizado en Av. Guelatao # 100 Col. Álvaro Obregón. Delegación Iztapalapa.

### **5.2 Criterios de inclusión de los animales**

A 30 caballos (sin distinción de raza, sexo o edad), sospechosos de padecer dermatofitosis, les fue practicado un examen clínico. Un grupo de 20 caballos cuyas características clínicas fueron compatibles con dermatofitosis y no presentaban otro padecimiento clínico que pudiera influir en los resultados del experimento, fue el empleado para llevar a cabo el presente estudio.

Los animales fueron alojados en un corral comunitario, donde su alimentación se basó en alfalfa achicalada, heno de avena y un alimento concentrado, permaneciendo sin cambio alguno durante toda la investigación. A los 20 caballos se les cuantificó el número y tamaño de lesiones (cm<sup>2</sup>), así como la distribución corporal por región anatómica (cabeza, cuello, tronco, extremidades torácicas y pelvianas); para ello se empleó un flexómetro. Los datos obtenidos fueron anotados en una hoja de trabajo que incluyó un esquema representando las diferentes regiones anatómicas (Apéndice I); realizándose una evaluación inicial antes del tratamiento y cuatro más una vez que concluyó este (los días 12, 19, 26 y 33 postratamiento).



### **3. Hipótesis**

El extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja (*Citrus maxima*) es eficaz en el tratamiento de dermatofitosis en caballos.

### **4. Objetivo**

Evaluar la eficacia de una solución elaborada a partir de extracto cítrico de semillas de toronja al 40% en el tratamiento de dermatofitosis en caballos.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Área de estudio**

El presente estudio se realizó en la unidad de Policía Metropolitana Montada del Gobierno del Distrito Federal, localizado en Av. Guelatao # 100 Col. Álvaro Obregón. Delegación Iztapalapa.

### **5.2 Criterios de inclusión de los animales**

A 30 caballos (sin distinción de raza, sexo o edad), sospechosos de padecer dermatofitosis, les fue practicado un examen clínico. Un grupo de 20 caballos cuyas características clínicas fueron compatibles con dermatofitosis y no presentaban otro padecimiento clínico que pudiera influir en los resultados del experimento, fue el empleado para llevar a cabo el presente estudio.

Los animales fueron alojados en un corral comunitario, donde su alimentación se basó en alfalfa achicalada, heno de avena y un alimento concentrado, permaneciendo sin cambio alguno durante toda la investigación. A los 20 caballos se les cuantificó el número y tamaño de lesiones (cm<sup>2</sup>), así como la distribución corporal por región anatómica (cabeza, cuello, tronco, extremidades torácicas y pelvianas); para ello se empleó un flexómetro. Los datos obtenidos fueron anotados en una hoja de trabajo que incluyó un esquema representando las diferentes regiones anatómicas (Apéndice I); realizándose una evaluación inicial antes del tratamiento y cuatro más una vez que concluyó este (los días 12, 19, 26 y 33 postratamiento).

### 5.3 Procesamiento de las muestras

Los caballos fueron muestreados de las zonas que presentaban lesiones clínicamente visibles en dos ocasiones, una antes de comenzar el tratamiento y la segunda, un día después de haber concluido este (día 11). Las muestras fueron tomadas de las partes del cuerpo que presentaron las siguientes características clínicas: lesiones circulares alopecias de 1 a 4 cm de diámetro (o más en los casos que fueron coalescentes), pelo que se rompe en la base de la lesión (dando la impresión de que ha sido rasurado) vesículas, pústulas, costras en el centro de la lesión (lo que le da una imagen polvosa) bordes realzados y eritematosos<sup>38, 88, 90</sup>.

Para el muestreo se empleó la técnica de Mackenzie<sup>90</sup>, la cual consiste en un cepillado profuso de la capa del animal utilizando un cepillo dental previamente desinfectado con hipoclorito de sodio; las muestras fueron colectadas en un sobre de papel que se rotuló con el número asignado al animal y posteriormente se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde más tarde fueron procesadas de la siguiente manera:

- a) Observación directa con hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Todos los pelos, raspados o escobillados obtenidos se examinaron en KOH al 10% bajo un cubreobjetos buscando la presencia de artroconidias o hifas (ver procedimiento en Apéndice II).
- b) Cultivo de la muestra.- El material de muestra se inoculó por puntos separados en cuatro medios de cultivo: medio *Trichophyton equinum* libre de vitaminas adicionado con ciclohexamida y cloranfenicol (TECC), agar micobiótico adicionado con ácido nicotínico elaborado por ingredientes (AMAN), agar micobiótico comercial adicionado con ácido nicotínico (AMACAN), agar micobiótico comercial (AMC) (ver Apéndice II). Estos medios fueron elegidos debido a que contienen sustancias capaces de inhibir hongos oportunistas cuyo crecimiento acelerado interfiere en el aislamiento de los dermatofitos<sup>91-94</sup>.

Las placas de cultivo ya inoculadas se incubaron a una temperatura de 25 a 30° C. Revisando las placas de cultivo 1 a 2 veces por semana durante cuatro semanas. Las colonias cuyas características morfológicas, textura y pigmento descritas para los dermatofitos, fueron sembradas en el mismo tipo de medio del que procedían por

la técnica de punto aislado y se incubaron nuevamente de 25 a 30° durante cuatro semanas más. Todas aquellas que no presentaron crecimiento o no reunían las características para ser un dermatofito fueron desechadas.

#### **5.4 Identificación**

- a) Tinción lactofenol azul de algodón.- una vez aislada la colonia, se examinaron al microscopio los micelios con el colorante lactofenol azul de algodón empleando el objetivo de 40X<sup>94</sup> (ver Apéndice II).
- b) Microcultivo.- De las colonias cuyas características fueron compatibles con un dermatofito, una vez aisladas en cultivo puro, se les realizó la técnica del microcultivo descrita por Ridell, sembrándose en el mismo tipo de medio del que procedían (ver Apéndice II)<sup>95</sup>.

Para la identificación y caracterización adecuada del género y especie de los dermatofitos aislados se emplearon los manuales de identificación de Rebell y Taplin<sup>27</sup> y de Mackenzie y Philpot<sup>96</sup>.

#### **5.5 Tratamientos**

Para los tratamientos se conformaron dos grupos al azar de 10 caballos cada uno. A un grupo se le aplicó en todas las lesiones, una solución elaborada a base de extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja al 40% (proporcionado por “Laboratorios Double Oak Tree México S.A. de C.V”), mientras que al segundo sólo agua. A ambos grupos se les realizó una aplicación cada 24 h por diez días, empleando para ello aspersores de tipo manual hechos de plástico.

#### **Análisis estadístico**

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos correspondientes a tamaño y distribución de lesiones se empleó el programa estadístico SAS<sup>97</sup>, aplicando un análisis de varianza con medidas repetidas a través de modelos mixtos.

## **6. RESULTADOS**

Los resultados del procesamiento de las muestras (observación directa, aislamiento e identificación), se encuentran en los cuadros 2 y 3. En ellos puede observarse solo en 3 casos se encontraron esporas en la observación directa con KOH al 10% y 9 aislamientos compatibles con hongos dermatofitos. De los cuales, 6 corresponden al grupo tratado con ECST (4 antes del tratamiento y 2 posterior a este) y 2 al grupo

la técnica de punto aislado y se incubaron nuevamente de 25 a 30° durante cuatro semanas más. Todas aquellas que no presentaron crecimiento o no reunían las características para ser un dermatofito fueron desechadas.

#### **5.4 Identificación**

- a) Tinción lactofenol azul de algodón.- una vez aislada la colonia, se examinaron al microscopio los micelios con el colorante lactofenol azul de algodón empleando el objetivo de 40X<sup>94</sup> (ver Apéndice II).
- b) Microcultivo.- De las colonias cuyas características fueron compatibles con un dermatofito, una vez aisladas en cultivo puro, se les realizó la técnica del microcultivo descrita por Ridell, sembrándose en el mismo tipo de medio del que procedían (ver Apéndice II)<sup>95</sup>.

Para la identificación y caracterización adecuada del género y especie de los dermatofitos aislados se emplearon los manuales de identificación de Rebell y Taplin<sup>27</sup> y de Mackenzie y Philpot<sup>96</sup>.

#### **5.5 Tratamientos**

Para los tratamientos se conformaron dos grupos al azar de 10 caballos cada uno. A un grupo se le aplicó en todas las lesiones, una solución elaborada a base de extracto cítrico estandarizado de semillas de toronja al 40% (proporcionado por “Laboratorios Double Oak Tree México S.A. de C.V”), mientras que al segundo sólo agua. A ambos grupos se les realizó una aplicación cada 24 h por diez días, empleando para ello aspersores de tipo manual hechos de plástico.

#### **Análisis estadístico**

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos correspondientes a tamaño y distribución de lesiones se empleó el programa estadístico SAS<sup>97</sup>, aplicando un análisis de varianza con medidas repetidas a través de modelos mixtos.

## **6. RESULTADOS**

Los resultados del procesamiento de las muestras (observación directa, aislamiento e identificación), se encuentran en los cuadros 2 y 3. En ellos puede observarse solo en 3 casos se encontraron esporas en la observación directa con KOH al 10% y 9 aislamientos compatibles con hongos dermatofitos. De los cuales, 6 corresponden al grupo tratado con ECST (4 antes del tratamiento y 2 posterior a este) y 2 al grupo

tratado con agua (1 antes y 1 después del tratamiento). Así también, puede apreciarse que todos los aislamientos positivos se desarrollaron solo en los medios de cultivo TECC y AMCAN.

De los dermatofitos aislados, 1 fue clasificado como *Trichophyton terrestre*, 2 como *Microsporum equinum*, 5 como *Trichophyton mentagrophytes* y 1 como *Trichophyton equinum*, lo cual constituye hasta donde es de nuestro conocimiento el primer reporte de su existencia en México, aunque se reconoce como el principal agente de la dermatofitosis equina en todo el mundo <sup>16, 36, 37, 41, 44</sup>.

**CUADRO 2.CABALLOS CON DERMATOFITOSIS TRATADOS CON  
EXTRACTO CÍTRICO**

ANTES DEL TRATAMIENTO						DESPUES DEL TRATAMIENTO				
TRATAMIENTO	†Prueba	*Medios de Cultivo				†Prueba	*Medios de Cultivo			
No. De Equino y Agente aislado (Tx. ECST)	KOH	TECC	AMAN	AMCAN	AMC	KOH	TECC	AMAN	AMCAN	AMC
1 <i>M. equinum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <i>T. mentagrophytes</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3 <i>T. equinum</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 <i>T. terrestre</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6 <i>T. mentagrophytes</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 <i>T. mentagrophytes</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

†KOH: Hidróxido de potasio, \*TECC: Medio *Trichophyton equinum* adicionado con ciclohexamida y cloranfenicol  
\*AMAN: Agar micobiótico adicionado con ácido nicotínico elaborado por ingredientes, \*AMCAN: Agar micobiótico comercial adicionado con ácido nicotínico, \*AMC: Agar micobiótico comercial, +: Positivo, -: Negativo.

**CUADRO 3. CABALLOS CON DERMATOFITOSIS TRATADOS CON AGUA**

ANTES DEL TRATAMIENTO						DESPUES DEL TRATAMIENTO				
TRATAMIENTO	†Prueba	*Medios de Cultivo				†Prueba	*Medios de Cultivo			
No. De Equino y Agente aislado (Tx. Agua)	KOH	TECC	AMAN	AMCAN	AMC	KOH	TECC	AMAN	AMCAN	AMC
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 <i>M. equinum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19 <i>T. mentagrophytes</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

†KOH: Hidróxido de potasio, \*TECC: Medio *Trichophyton equinum* adicionado con ciclohexamida y cloranfenicol

\*AMAN: Agar micobiótico adicionado con ácido nicotínico elaborado por ingredientes, \*AMCAN: Agar micobiótico comercial adicionado con ácido nicotínico, \*AMC: Agar micobiótico comercial, +: Positivo, -: Negativo.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) aplicado para medir el comportamiento del tamaño y número de lesiones a través del tiempo, pueden observarse en el cuadro 4 y 5. En ambos grupos, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las lesiones, mientras que para el número de lesiones se obtuvieron diferencias significativas en la evaluación del día 12 para ambos grupos y en el día 19 solo para el grupo tratado con extracto cítrico.

**Cuadro 4. Resultados del ANOVA aplicado para el tamaño de lesión.**

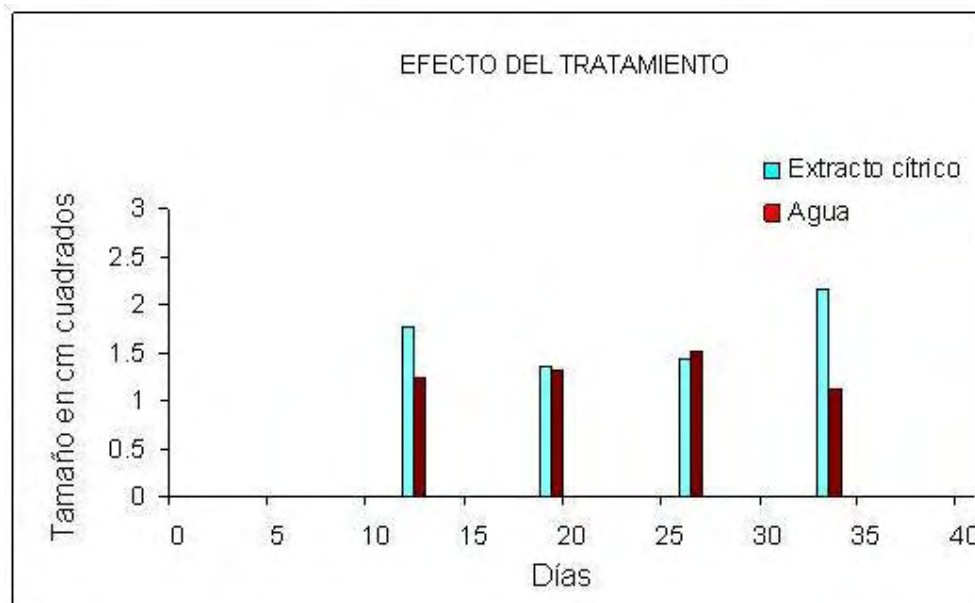
<b>Tratamiento</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>
<b>Día</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>Media estimada (cm2)</b>	<b>1.7</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.3</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>	<b>2.1</b>	<b>1.1</b>
<b>Significancia del valor de P ≤0.05</b>	<b>0.0572</b>	<b>0.1004</b>	<b>0.0672</b>	<b>0.0796</b>	<b>0.0780</b>	<b>0.0797</b>	<b>0.0616</b>	<b>0.1345</b>

**Cuadro 5. Resultados del ANOVA aplicado para el número de lesiones.**

<b>Tratamiento</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>	<b>ECST</b>	<b>Agua</b>
<b>Día</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>Media estimada (cm2)</b>	<b>4.7</b>	<b>3.6</b>	<b>4.2</b>	<b>2.5</b>	<b>2.9</b>	<b>2.1</b>	<b>2.0</b>	<b>2.1</b>
<b>Significancia del valor de P ≤0.05</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0601</b>	<b>0.0055</b>	<b>0.0143</b>	<b>0.0170</b>

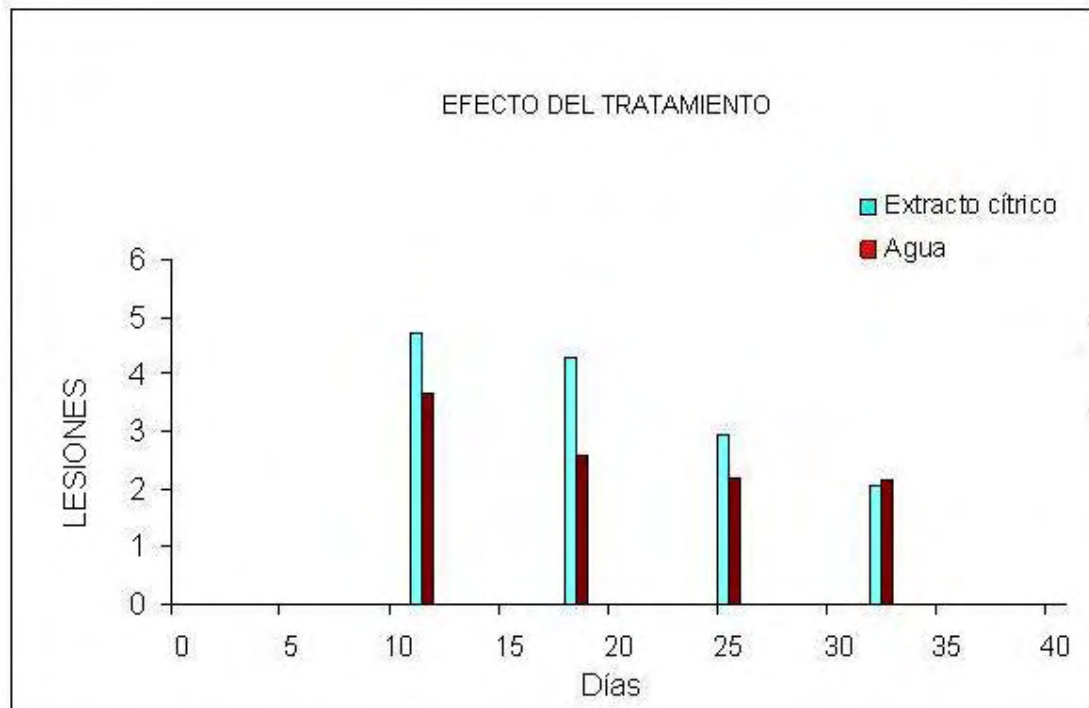


La Figura 1 representa el efecto de los tratamientos en el tamaño de las lesiones. En ésta puede observarse una disminución paulatina en el tamaño de las lesiones hasta el día 19, pero en el día 33, el tamaño de las lesiones aumentó considerablemente en el grupo tratado con extracto cítrico en comparación con el grupo control (tratado con agua).

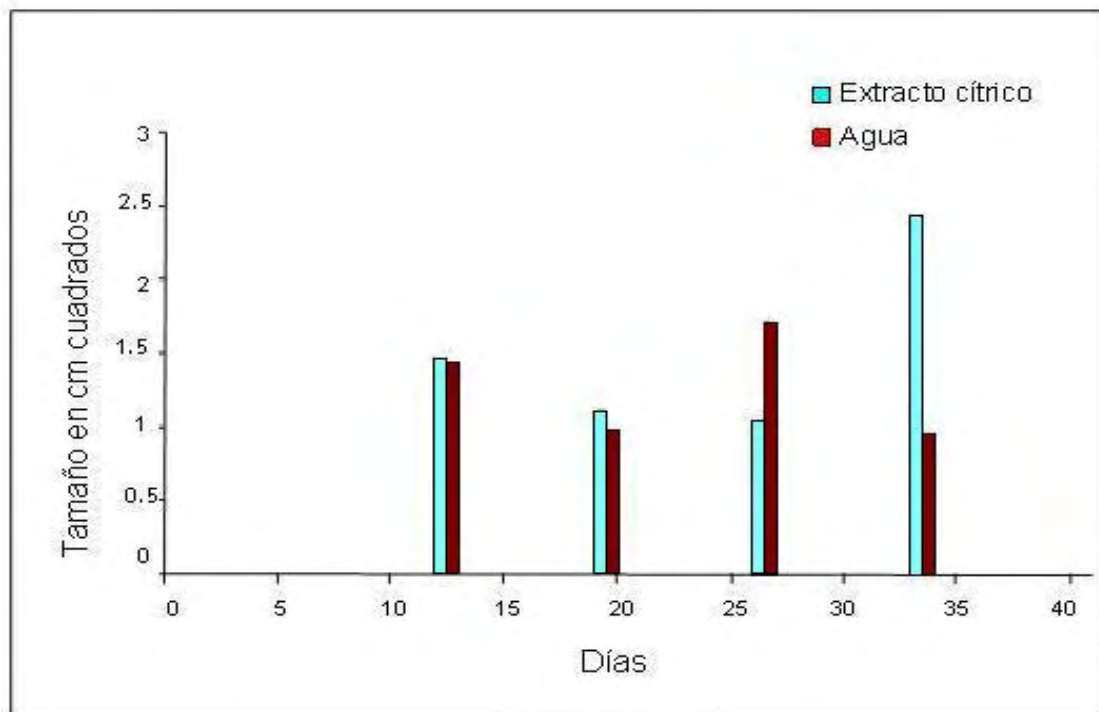


**Figura 1. Efecto del tratamiento en el tamaño de lesión.**

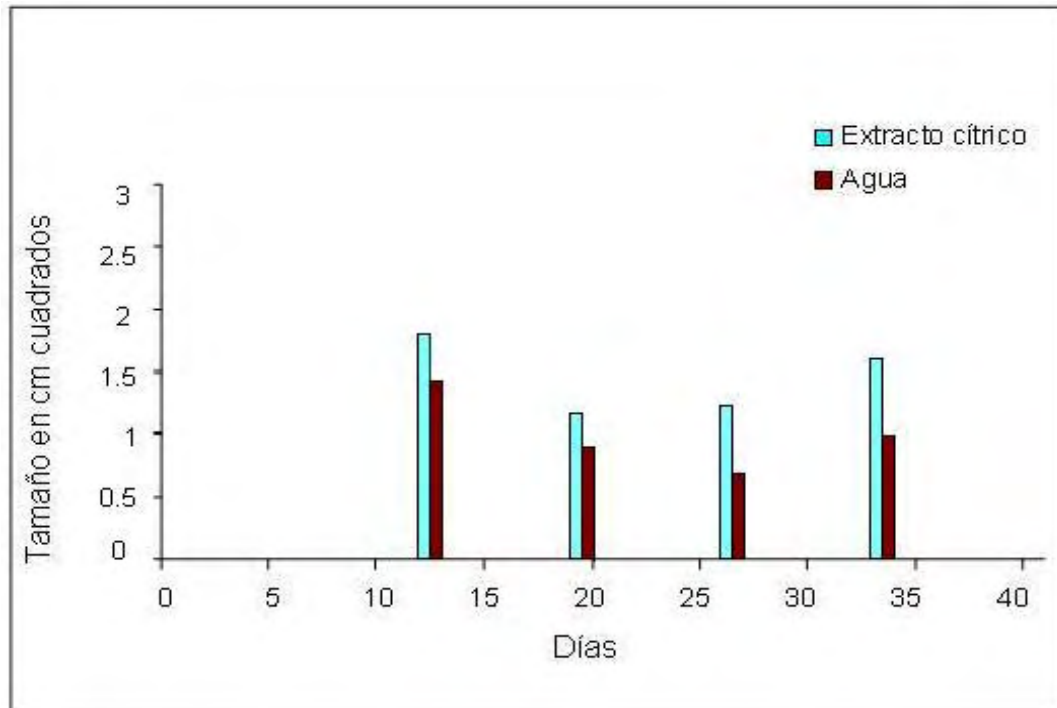
En la Figura 2 (correspondiente al efecto de los tratamientos en el número de lesiones), puede observarse que ambos tratamientos presentan un comportamiento muy similar, y solo se obtiene una pequeña disminución en el número de lesiones correspondientes al tratamiento con extracto cítrico en el día 33 post tratamiento. Mientras que en el las Figuras 3, 4, 5, 6 y 7, se encuentra representado el efecto de ambos tratamientos en el tamaño de lesión por región anatómica (cabeza, cuello, miembros torácicos, tronco y miembros pélvicos correspondientemente), en las que se puede apreciar que solo en la región del tronco se obtuvo una disminución en el tamaño de las lesiones con el extracto cítrico; mientras que en el resto de las regiones anatómicas no se observaron diferencias significativas.



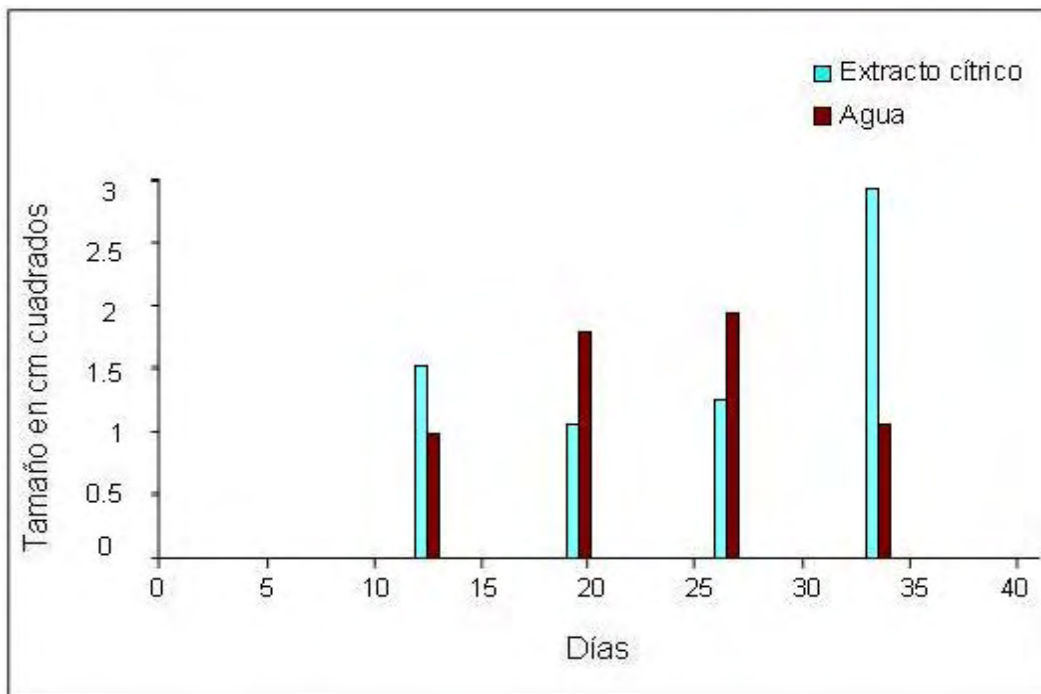
**Figura 2. Efecto del tratamiento en el número de lesiones.**



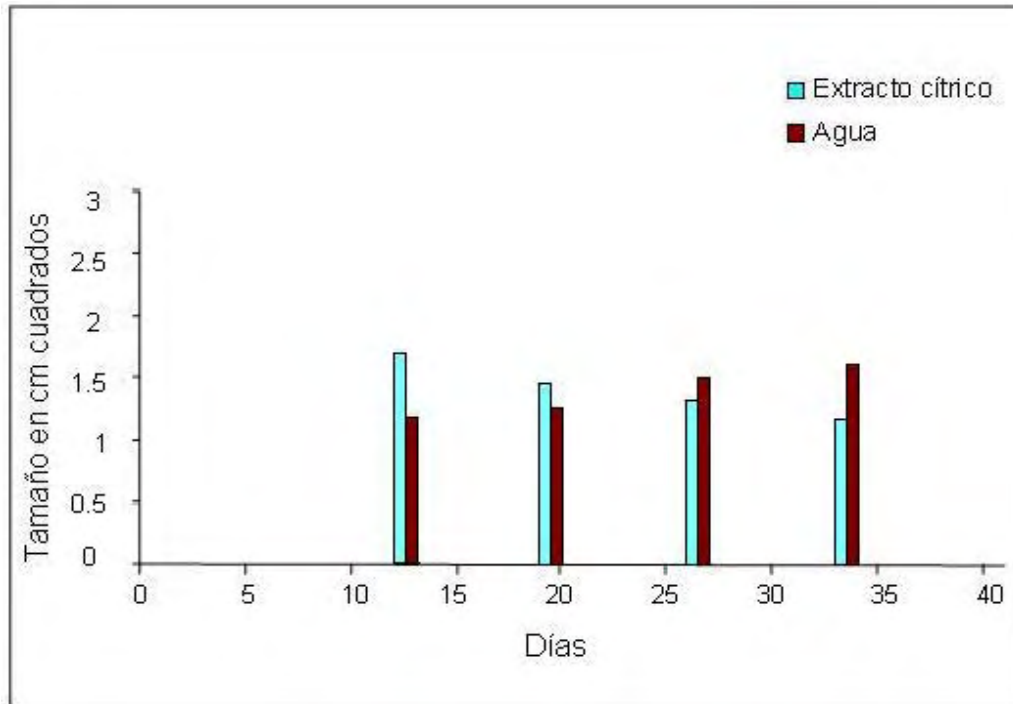
**Figura 3. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región de la cabeza.**



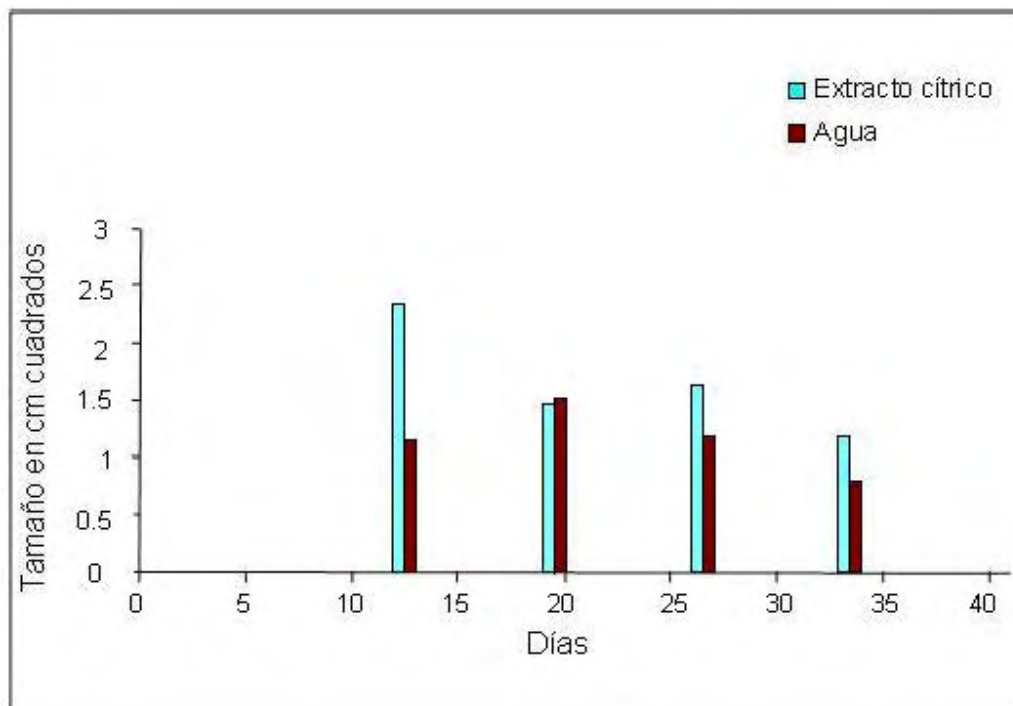
**Figura 4. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región del cuello.**



**Figura 5. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en los miembros torácicos.**



**Figura 6. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en la región de tronco.**



**Figura 7. Efecto de tratamiento sobre el tamaño de lesión en los miembros pélvicos.**

## 7. DISCUSIÓN

En este caso, los resultados de la aplicación tópica por diez días del extracto cítrico de semillas de toronja en lesiones de caballos con dermatofitosis, mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas comparado con un tratamiento a base de agua.

Éste suceso pudo deberse a diferentes razones, entre las que destacan, un mayor tamaño de lesión en el grupo tratado con extracto cítrico desde el comienzo del experimento (ver Fig. 1), así como a la falta de homogeneidad en el número y tamaño de las lesiones que presentaron los caballos sujetos al tratamiento. Al presentar diferentes estadios de la enfermedad, y en algunos casos hasta cronicidad de la misma, existe una alta probabilidad de que los pelos y folículos a la periferia de la lesión tratada, se encontraran infectados y estos nunca tuvieron contacto suficiente con el medicamento al ser tratadas solo las lesiones clínicamente visibles. Dando como resultado un aumento en el tamaño de las lesiones registradas en los días 19, 26 y 33 post tratamiento, en ambos casos. Este efecto puede observarse en la evaluación general (Fig.1) y en las regiones de la cabeza (Fig.3), cuello (Fig.4), miembros torácicos (Fig.5) y miembros pélvicos (Fig.7); pero no así en la región del tronco (Fig.7). Por tanto el mayor tamaño de las lesiones pudo haber influenciado los resultados estadísticos obtenidos.

Lo anterior, supone, que las superficies planas que anatómicamente presenta la región del tronco en el caballo, permitieron una mayor permanencia del medicamento en contacto con la zona afectada y una difusión por capilaridad a la periferia de las lesiones, mientras que en el resto de las zonas anatómicas era más sencillo que el medicamento escurriera y se desperdiciara.

Por otra parte, el número de lesiones registradas en los días 19 y 26 postratamiento, demuestran que los caballos tratados con extracto cítrico tuvieron una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo tratado con agua (que solo lo presentó en el día 19) (ver cuadro.3). Lo que sugiere que el extracto cítrico funcionó inicialmente.

En la Fig.2 se aprecia un descenso gradual del número de lesiones los días 12, 19 y 26 postratamiento en ambos grupos; pero en el día 33 postratamiento el extracto cítrico

muestra ser más eficiente que el agua. Aunque el efecto no es lo suficientemente marcado para cobrar significancia estadística. Por lo tanto la diferencia que ocurre entre el día 19 y 33 sugiere que el efecto benéfico del medicamento fue disminuyendo paulatinamente a través del tiempo, por lo que es necesario aumentar el número de aplicaciones y el tiempo de tratamiento, para evitar que el efecto terapéutico del medicamento se detenga abruptamente.

En el aislamiento comparativo realizado el día 11 postratamiento tampoco se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos. Esto pudo deberse a diversas situaciones tales como: un inadecuado muestreo del animal, ya que al emplear la técnica de Makenzie <sup>96</sup> para el muestreo, las lesiones no se desinfectaron con alcohol etílico al 70% (Técnica de Chesbrough <sup>98</sup>) y la cantidad de microorganismos contaminantes pudo ser mucho mayor.

Otro factor, es la posible siembra deficiente del medio de cultivo, ya que en algunas ocasiones las esporas viables no llegan a tener contacto con el medio por lo que nunca se desarrollan. Así como el hecho de que la muestra tomada no haya sido suficiente para lograr un aislamiento debido a que no hay forma de saber si los pelos y escamas que se colectaron contenían esporas viables. Cabe mencionar que, en el presente estudio existieron algunos casos en que en el primoaislamiento se observaron microorganismos indeseables, tales como *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. o *Cephalosporium* sp., estos se encontraban contenidos en la muestra y contaminaron algunas cajas de cultivo.

Aún así, se obtuvieron aislamientos positivos a dermatofitos en el 65% de los sujetos de experimentación, resultando significativo según lo descrito por Pascoe (1979) <sup>48</sup> y Velez (1989) <sup>99</sup> quienes consideraron como suficiente un 31% y 43% correspondientemente.

Por último en comparación con los estudios realizados por Oldenkamp en 1979 <sup>41</sup> y Pascoe (1984) <sup>44</sup> el muestreo sugerido a los 30 o 45 días post tratamiento para conocer si la infección se eliminó en su totalidad, no pudo realizarse debido a que los equinos tuvieron que regresar a su labor como caballos policías en diferentes demarcaciones por lo que fue imposible muestrearlos nuevamente para corroborar su evolución. Hecho que hubiera contribuido a una mejor evaluación de este proyecto.

## 8. CONCLUSIONES

- La aplicación tópica por 10 días de una solución al 40% de extracto cítrico de semillas de toronja (ECST) *Citrus máxima* en las lesiones de caballos con dermatofitosis no tuvo efectos significativos bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el presente estudio.
- La solución a base del ECST demostró eliminar solo parcialmente a los hongos causantes de la dermatofitosis en caballos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Geneser F. Histología. 2<sup>nd</sup> ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1993.
2. American Osteopathic College of Dermatology. org [home page on the internet ]. AOCD.; 2007 [update 2006 May4: cited 2007 Aug 7]. Available from: <http://www.aocd.org/skin/>
3. The Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI).org[home page on the internet ]. INC.; 2007 [update 2007 Jan 14: cited 2007 Apr 6]. Available from: <http://resources.schoolscience.co.uk/ABPI/new/resources/skin/skin4.asp>
4. Tizard IR. Inmunología veterinaria. 6<sup>th</sup> ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
5. Abbas AK, Lichtman HA, Pober SJ. Inmunología celular y molecular. 4<sup>th</sup> ed. España: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
6. Lowinger M, Gezuele E, Da rosa D, Ballesté R, Calegari L. Micosis Superficiales. Enfermedades infecciosas. Montevideo: Oficina del Libro – AEM: 1998; 133-146.
7. Martínez R, Torres R. Dermatofitos o tiñas. Ed. Doyma. Barcelona. 1987. pp. 34-55.
8. Hutchins DR. Skin Diseases of the cattle and horses in New South Wales. N Z Vet J 1960; 8:85.
9. Thomselt LR. Skin diseases of the horses . In pract. 1979;1: 16.
10. Hopes R. Skin diseases in horses. Vet Dermatol News. 1976; 1: 4.
11. Traub-Dargatz JL: Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. J Am Vet Med Assoc. 1991;198:1745.
12. Panel Report: Skin conditions in horses. Mod Vet Pract. 1975; 56:363.
13. Panel Report: Dermatologic problems in horses. Mod Vet Pract.1981;62:75.
14. Panel Report: Skin diseases in horses. Mod Vet Pract.1986;67:43.
15. Scott DW, Miller WH. Dermatología Equina. 1<sup>st</sup> ed. Argentina: SAUNDERS, 2004.
16. Pascoe RR. Studies on the prevalence of ringworm among horses in racing and breeding stable. Australian Vet. J. 1976; 52: 419-421.
17. Allejo L. Natural history of dermatophytes and related fungi. Mycopathol Mycol Appl 1974; 53: 93-110.



18. Segundo ZC, Martínez A, Arenas R, Fernández R, Cervantes RA. Dermatomicosis por *Microsporium canis* en humanos y animales. Rev Iberoam Micol 2004; 21:39-41.
19. Beneke SE, Rogers AL. Medical mycology and human mycoses. 1<sup>st</sup> ed. Star Publishing Company, 1996.
20. Pal M. Dermatophytosis in goat and its handler due to *Microsporium canis*. Indian J. of Anim. Scie. 2001; 71(2):138-140.
21. Dvorak J, Otcenasek M. Geophilic, zoophilic and antropophilic dermatophytes. Mycopathol Mycol Appl 1964; 23: 294-6.
22. Biberstein EL. Dermatophytes. In: Hirsh DC, Chung ZY. Veterinary microbiology. U.S.A.: Blackwell Science, 2001: 214-219.
23. Quinn PJ. Veterinary microbiology and microbial diseases. 1<sup>st</sup> ed. Great Britain: Blackwell Publishing, 2002.
24. The Center for Food Security and Public Health College of veterinary Medicine Iowa University, and Institute for International Cooperation in Animal Biologies [home page on the internet ]. Ames Iowa: CFSPH.; 2007 [update 2005 May 1: cited 2007 Sep 20]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu>
25. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Micro Reviews 1995;40: 240-259.
26. Cabañes FJ, Abarca ML, Bragulat MR. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. Micopathologia 1997; 137: 107-113.
27. Rebell G, Taplin D. Dermatophytes their recognition and identification. 1<sup>st</sup> ed. USA: University of Miami Press, 1979.
28. Cutsem VJ, Rochette F. Mycoses in domestic animals. 1<sup>st</sup> ed. USA: Janssen research foundation, 1991.
29. Chatterjee A. Skin Infections in domestic animals. 1<sup>st</sup> ed. Calcuta: Motri Publication, 1988.
30. Carmichael JW, Padhye AA. The genus *Arthroderma* Berkeley Canadian J. Bot. 1971; 9: 1525–1540.
31. AnaissieEJ, Mahmoud G, Kieren MPG, Pappas PG, Rinaldi MG, Sobel JD, Walsh TJ. Doctor Fungus. Fungus mycosis study group. [home page on the internet].USA. 2008. [update 2007 Apr 1: cited 2008 May 26]. Available from: <http://www.doctorfungus.org/imageban/help.htm>

32. Jungerman PF, Schwartzman RM. Veterinary medical mycology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1972.
33. Kral F, Schwartzman RM. Veterinary and comparative dermatology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1964.
34. Mc Mullen WC. The skin. In: Mansman RA. Equine Medicine surgery. 3<sup>rd</sup> ed. Santa Barbara: American veterinary publications, 1982: 789.
35. Moriello KA. Diseases of the skin. In: Reed SM, Bayly WM. Equine internal medicine. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB SAUNDERS, 1998: 513.
36. Pascoe RR, Knottenbelt DC. Manual of equine dermatology. 1<sup>st</sup> ed. Hong Kong: W. B. SAUNDERS, 1999.
37. Scott DW. Large animal dermatology. 1<sup>st</sup> ed. USA: W. B. SAUNDERS, 1988.
38. Williams MA, Angrano DW. Diseases of the skin. In: Kobluk CN. The horse diseases and clinical management. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: W. B. SAUNDERS, 1995: 541.
39. Friedberg IM. Dermatology in general medicine. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill book, 1998.
40. Scott DW. Muller and Kirk`s Small animal dermatology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB SAUNDERS, 1995: 541.
41. Oldenkam EP. Treatment of ringworm in horses with natamycin. Equine vet. J. 1979; 11 (1): 36-38.
42. Muller HG, Kirk WR, Scott WD. Animal Dermatology. Dermatomycoses. 3<sup>th</sup> ed. USA: SAUNDERS, 1983.
43. Kral F, Novak JB. Veterinary dermatology. 1<sup>st</sup> ed. USA: J.B. LIPPINCOTT COMPANY, 1967.
44. Pascoe RR. Experimental medication of equine ringworm due to *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum*. Australian. Vet. J. 1984; 61:(7) 231-235.
45. Ainsworth GC, Austwick PKC. Fungal diseases of animals. 2<sup>nd</sup> ed. England: CAB, 1973.
46. Higgins AJ, Wright IM. The equine manual. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: SAUNDERS, 1999.
47. García ME, Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. Rev Iberoam Micol 2001; 17: S2-S7.

48. Pascoe RR. The epidemiology of the ringworm in racehorses caused by *Trichophyton equinum* var *Autotrophicum*. Australian. Vet. J. 1979; 55: 403-407.
49. Pascoe RR. Equine dermatoses. University of Sydney post-graduate Foundation in veterinary science. Veterinary review; 1974: 14.
50. Pascoe RR. Equine dermatoses . University of Sydney post-graduate Foundation in veterinary science. Veterinary review; 1981: 22.
51. Pepin GA, Austwick PKC. Skin diseases mycological origin. Vet Rec. 1968; 72: 208.
52. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19:25-29.
53. Connel MD; Pascoe RR. Recognition of *Trichophyton equinum* var. *equinum* infection of horses. Australian. Vet. J. 1984; 61(3):94.
54. Moreti A. Epidemiological aspects of dermatophyte in infection in horses and catle. J Vet Med B 1998; 45: 205.
55. Pier A, Hughes J. *Keratinomyces ajelloi* from skin lesions of a horse. J Vet Med Assoc 1961; 138: 84.
56. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology.1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992.
57. Aho R. Studies on fungal flora in hair suspected of dermatophytosis. Acta Patho Microbiol Scand 1980, 88: 79.
58. Bibel DJ, Smiljanie RJ. Interactions of *Trichophyton mentagrophytes* and *microcococi* in skin culture. J Invest Dermatol 1979; 72:133.
59. Pascoe RR. Studies on the prevalence of ringworm among horses in racing and breeding stables. Aust Vet J. 1976; 52:419.
60. Paterson S. Dermatophytosis in 25 horses- a protocol of treatmen using topical therapy. Equine Vet Educ 1976; 9:171.
61. Gupta AK. Antifungal agents. Part I J Am Acad Dermatol 1994; 30: 677.
62. Allison N, Gills JP. Enteric pythiosis in a horse. J Am Vet Med Assoc 1990; 196:462.
63. Austin RJ. Disseminated mycosis in a horse. Can Vet J 1976; 17:86.
64. Zukerman L. An outbreak of ringworm (trichophytosis) in horses accompanied by human infection. Israel J Vet Med 1992; 47: 34.

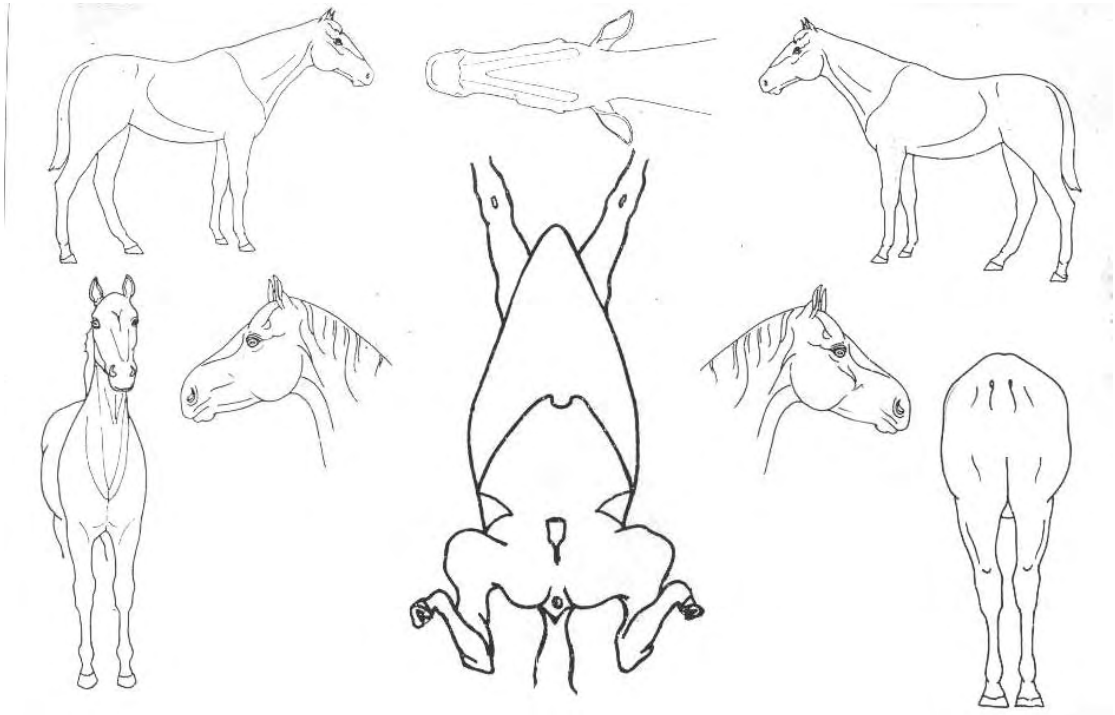
65. Beard LA. Principles of antimicrobial therapy. In: Reed SM, Bayly WM. Equine internal medicine. 1<sup>st</sup> ed. W. B. SAUNDERS, 1998: 157.
66. Hill PB. A review of systemic antifungal agents. *Vet Dermatol* 1995; 6:59.
67. Scher RK. Onychomycosis therapeutic update. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:21.
68. Prades M. Body fluid and endometrial concentrations of ketoconazol in mares after intravenous injection or repeated gavage. *Equine Vet J.* 1989; 21:211.
69. Sterling JB, Heymann WR. Potassium iodide in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 691.
70. Mallowney PC, Fadok VA. Dermatologic diseases of horses. Part III. Fungal skin diseases. *Comp Cont Educ.* 1984; 6:324.
71. Chaffin MK. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 201:310.
72. Worster AA. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 216:1975.
73. Mc Mullen WC. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1977; 170:1293.
74. Barnett JA. Yeasts. Characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
75. Chandra VK. Localized subcutaneous cryptococcal granuloma in a horse. *Equine Vet J.* 1992; 25:166.
76. Burkhart CG, Burkhart KM. Dermatophytosis in horses treated with terbinafine. *J Equine Vet Sci.* 1999; 19: 652.
77. Gomez SC. Medicina natural prontuario práctico en lecciones. 1<sup>a</sup> ed. México: Editorial época. 2000.
78. Cruz A. El libro naturista. 1<sup>a</sup> ed. México: Editores mexicanos unidos. 1997.
79. Hegggers JP, Cottingham J, Gusman J. Effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action an in vitro toxicity. *J Altern Complement Med* 2002; 8: 333-340.
80. Gordon J. M.D. Letter to the Editor of the Townsend Letter. Regarding use of GSE in Pediatric medicine. *GSE Report.* 1999;1 :7.
81. Schwabenthan S, Weigert V. The nature for your health. 1<sup>st</sup> ed. USA: P andJ. 1984.

82. Zdenka C, Sanda VK. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* 2004; 54: 243-250.
83. Ionescu G, Kiehl R, Wehmann-Kunz F, Williams Ch, Bauml L, Levine S. Oral citrus seed extract in atopic eczema; in vitro and in vivo studies on intestinal microflora. *J. Orth. Med.* 1990 (5):155-157.
84. Reagor L, Gusman J, McCoy L, Carino E, Heggors JP. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as antibacterial agent: I. An in vitro agar assay. *J Altern Complement Med* 2002; 8: 325-332.
85. Giamperi L, Fraternali D, Buchhini A, Ricci D. Antioxidant activity of *Citrus paradisi* seeds glyceric extract. *Fitoterapia* 2004; 75: 221-224.
86. Hairich J. Antimicrobial grape fruit extract. United States Patent No.5, 245,944,1995.
87. Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Zayachivska O, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik WW, Hahn EG. Grape fruit-seed extract attenuates ethanol-and stress-induce gastric lesions via activation of prostanglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J Gastroenterol.*2005; 11: 6450-6458.
88. Outerbridge AC, Ihrke JP. Folliculitis: Staphylococcal Pyoderma, Dermatophilosis, and Dermatophytosis. In: Robinson EN. *Current Therapy in Equine Medicine.* USA: SAUNDERS, 2003:199-201.
89. Carter GR. *Bacteriología y micología veterinaria.* 1<sup>st</sup> ed. México: Manual-Moderno, 1994.
90. Mackenzie DWR. "Hairbrush Diagnosis" in detection and eradication of non-fluorescent scalp ringworm. *Brit Med J*1963; 2:363-365.
91. Georg LK. Use of cicloheximide medium for isolation of dermatophytes from clinical lesions. *Arch Dermatol Syphyl* 1953; 63:355-361.
92. Mc Donough ES. Growth of dimorphic human pathogenic fungi on media containing cyclohexamide and chloramphenicol. *Mycopath Mycol Appl* 1960; 13:113-120.
93. Santamaria L, Escobar ML, Moncada LH. Evaluación de cuatro medios selectivos para aislamientos de hongos patógenos. *Acta Méd Col* 1986; 11:225-229.
94. Borelli D. Medios caseros para micología. *Arch Venez Med Trop Parasit Med* 1962; 4: 301-310.

95. Harris JL. Modified method for fungal slide culture. *J Clin Microbiol* 1986; 24:460-461.
96. Mackenzie DWR, Philpot CM. Isolation and identification of ringworm fungi. Public Health Laboratory Service. Monograph Series No 15. HM Stationary Office London, UK, 1981.
97. SAS Institute Inc. 2005. Guide for personal computers. Version 6.12. North Caroline, USA.
98. Chesbrough M. Medical Laboratory manual for tropical countries. Tropical health technology. Great Britain. Butterworth-Heinemann, 1992:371-385.E.
99. Velez H, Santamaría L, Montoya F. El medio Kaminski adicionado con nistatina para el aislamiento de dermatofitos y otros hongos patógenos. *IATREIA*. 1989; (2) 1: 45-49.

## 10. APÉNDICE I

### Hoja de Trabajo



IDENTIFICACIÓN	TRATAMIENTO	DÍA	REGIÓN	LESIÓN	TAMAÑO

:

## 11. APÉNDICE II

### A) Medios

Medio 1.- Medio *Trichophyton equinum* adicionado con ciclohexamida y cloranfenicol (TECC).

- Glucosa .....40g
- MgSO<sub>4</sub> .....0.1g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....1.8g
- Agar.....20g
- Cloranfenicol .....05g
- Ciclohexamida.....0.4g
- Agua destilada 1000 ml

Medio 2.- Agar micobiótico adicionado con ácido nicotínico elaborado por ingredientes (AMAN).

- Peptona ..... 10g
- Dextrosa..... 10g
- Agar.....15g
- Cloranfenicol.....500mg
- Ciclohexamida..... 0.4g
- Ácido nicotínico..... 1%
- Agua destilada 1000ml

Medio 3.- Agar micobiótico comercial adicionado con ácido nicotínico (AMACAN).

- Peptona.....10g
- Dextrosa..... 10g
- Ciclohexamida .....0.4g
- Cloranfenicol.....50g
- Agar micobiótico.....12.5 g
- Ácido nicotínico..... 1%
- Agua destilada 1000 ml.



Medio 4.- Agar micobiótico comercial (AMC).

- Peptona de soya.....10g
- Dextrosa.....10g
- Ciclohexamida..... 0.4g
- Cloranfenicol.....05 g
- Agar micobiótico.....12.5 g
- Agua destilada 1000 ml.

## **B) TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

**Examen de material clínico utilizando medios aclarantes (KOH AL 10%)**

**Reactivos:**

**Hidróxido de Potasio (KOH)            10g**

Agua destilada                            cbp 100ml

**Procedimiento:**

1. Adicione el hidróxido de potasio al agua destilada lentamente y en agitación.
2. Mezcle y agite hasta la completa disolución de los cristales

**Procedimiento del examen directo al microscopio:**

1. Frente al mechero y sobre un portaobjetos, se deposita una pequeña cantidad de pelos y/o escamas.
2. Se agregan 2 o 3 gotas de una solución de KOH al 10%.
3. Se deja en reposo la preparación de 10 a 15 minutos y se coloca un cubreobjetos.
4. Se observa al microscopio con el objetivo seco débil (10x) y posteriormente con el seco fuerte (40x) para la identificación de las estructuras (filamentos largos, cortos, ramificados, fragmentados y diámetro de tres micras, pueden ser más esporas que hifas que pueden estar en forma de ectótrix o endótrix es decir en la superficie o en el interior del pelo que se esté observando <sup>94</sup>.

## **Tinción Azul de Algodón Lactofenol o Azul de Anilina**

### **Componentes**

- Fenol .....20mg
- Acido láctico..... 20mg
- Glicerina .....40 mg
- Azul de Algodón..... 0.05 g
- Agua destilada.....20 ml

Se adiciona en el siguiente orden: acido láctico, glicerina y agua destilada, fenol, azul de algodón, todos los ingredientes se disuelven bien y por último se filtra y se conserva en un frasco oscuro.

### **Procedimiento**

1. Sobre un portaobjetos limpio colocar una gota de lactofenol azul de algodón.
2. Frente al mechero y con el asa en forma de L se toma una pequeña cantidad de la colonia y se coloca en la gota de lactofenol azul de algodón.
3. Se coloca un cubreobjetos sobre la preparación, la cual puede ser suavemente calentada.
4. Examinar al microscopio con el objetivo de 40X<sup>94</sup>.

### **Técnica de microcultivo de Ridell**

1. Se prepara una placa con 30 a 35 ml de agar Sabouraud
2. Se corta un bloque de aproximadamente 1cm utilizando material y técnicas asépticas.
3. Se transfiere el bloque de agar a la superficie del portaobjetos.
4. Se inoculan los cuatro lados del bloque de agar con el cultivo o cepa.
5. Se coloca un cubreobjetos utilizando unas pinzas previamente flameadas encima del bloque haciendo una ligera presión.
6. Se adiciona en el fondo de la caja, aproximadamente 10ml de agua destilada estéril o una solución de glicerina estéril teniendo cuidado de que el nivel del líquido no toque el portaobjetos.

7. Se incuba el microcultivo de 25 a 30° C hasta observar sobre el medio el desarrollo del micelio. Cuando el micelio toque tanto al porta como al cubreobjetos, puede realizarse su observación. Esto ocurre usualmente en una semana
8. Antes de observar, se retira el agua destilada con pipeta y se sustituye por formol al 10% (10ml). Se deja actuar por espacio de una a dos horas con el fin de inactivar al microcultivo.
9. Posteriormente se retira el bloque de agar con un bisturí previamente flameado y así se obtiene el hongo sobre el porta y el cubreobjetos.
10. Se agrega una a dos gotas del colorante azul de algodón lactofenol a un portaobjetos limpio y se coloca el cubreobjetos del microcultivo en el colorante. Por otro lado al portaobjetos del microcultivo se le agregan una o dos gotas del colorante y se coloca un cubreobjetos limpio. Para el examen microscópico, se observan las estructuras primero con 10X y después con 40X<sup>94</sup>.