



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO EN
BACTERIAS Y LEVADURAS CAUSANTES DE OTITIS
CANINA.**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

T E S I S



QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

RUBÉN HERNÁNDEZ HUERTA

**ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
MVZ. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2009.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis:
"Efecto inhibitorio del extracto de propolis en bacterias
y levaduras causantes de otitis externa".

que presenta el pasante: RODÉN HERNÁNDEZ SUETA
con número de cuenta: 40407332-9 para obtener el título de:
Químico Especialista en Microbiología

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Agosto de 2005

PRESIDENTE MVL. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q. Mario A. Morales Delgado

SECRETARIO QFB. Brígida del Carmen Camacho Encalque

PRIMER SUPLENTE QFT. Ma. Guadalupe Katsumi Castro

SEGUNDO SUPLENTE Dra. Alma Lucila Núñez del Arco

AGRADECIMIENTOS

Gracias

A mis asesores:

Gerardo Cruz Jiménez y José Antonio Licea Vega

Mis más sinceros agradecimientos, por su valioso tiempo, apoyo, sus enseñanzas y sobre todo por brindarme la oportunidad de ser parte de su Laboratorio, muchísimas gracias por todo, los admiro y respeto.

Al jurado:

*Mario Arturo, Brígida del Carmen, María
Guadalupe y Alma Lucila*

Gracias profesores del jurado por sus observaciones y puntos de vista que me ayudaron a mejorar este trabajo, se que son expertos en su materia y sobre todo personas muy valiosas y admirables.

Principalmente GRACIAS A DIOS que me ha dado la vida, tener unos padres, unos hermanos, unos amigos y unos maestros; gracias por darme todo lo que necesito para ser feliz, ya que algunas veces no nos damos cuenta de lo que tenemos, siempre estaré agradecido por todo lo que me has dado.

Unas manos con que trabajar

Unas piernas con que caminar

Unos ojos para poder ver

Un cerebro con que pensar

Y un corazón para amar... ¡Gracias Dios mío!

DEDICATORIAS

Con cariño

A mis padres:

Jaime Hernández Aldana

Delfina Huerta García

Este esfuerzo realizado es parte de ustedes, por haberme apoyado en todo incondicionalmente; papá esto es tuyo aunque no ya no estés presente, siempre te llevo en mente y en mi corazón donde quiera que te encuentres, a ti mamá que eres la mejor mamá del mundo, por apoyarme en todo... Los quiero, adoro y amo muchísimo.

A mis hermanos:

Ángel, Ene, Carmen y Elvira

Este trabajo se los dedico también a ustedes, que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, siempre he recibido su apoyo en todo, los quiero mucho.

A mis amigos:

Ivonne y Julia

A ti Ivonne aunque ya no estemos juntos, eres y serás por siempre parte de mi vida y por supuesto tú eres parte de lo que hoy termine pues tú iniciaste este logro, te quiero mucho... Y a ti Julia que llegaste justo en el momento, gracias por todo, por soportarme y apoyarme incondicionalmente.

INDICE

	pagina
1. INTRODUCCION	1
1.1 Otitis canina.....	1
1.2 Clasificación.....	1
1.2.1 Otitis externa.....	2
1.2.1.1 Fisiopatología.....	3
1.2.1.2 Etiología.....	3
1.2.1.1 Factores primarios.....	3
1.2.1.2 Factores predisponentes.....	5
1.2.1.3 Factores perpetuantes.....	5
1.2.1.3 Signos clínicos.....	8
1.2.1.4 Diagnostico.....	8
1.2.2 Otitis media.....	8
1.2.2.1 Etlopatogenia.....	9
1.2.3 Otitis Interna.....	9
1.3 Tratamiento.....	10
1.4 Ototoxicidad.....	11
1.5 Propóleo.....	12
1.5.1 Antecedentes.....	12
1.5.2 Origen.....	12
1.5.3 Composición.....	13
1.5.4 Propiedades farmacológicas.....	14
1.5.5 Mecanismo de acción.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 General.....	17
4.2 Particular.....	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Diagrama general de trabajo.....	18
5.2 Material, equipo, medios y reactivos.....	19
5.3 Obtención del propóleo.....	21
5.4 Extracción del propóleo.....	21
5.5 Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras.....	22
5.7 Prueba cualitativa extracto-bacteria.....	23
5.8 Prueba cuantitativa extracto-bacteria.....	24
5.9 Prueba de MTT.....	26

5.10 Ensayo bactericida-bacteriostático.....	26
6. RESULTADOS	27
6.1 Aislamiento de bacterias y levaduras.....	27
6.2 Extracto de propóleo.....	28
6.3 Prueba cualitativa extracto bacteria.....	29
6.4 Prueba cuantitativa.....	33
6.5 Efecto bactericida-bacteriostático.....	35
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	43
9. APÉNDICE	44
9.1 Preparación de reactivos.....	44
10. ANEXO	45
10.1 Propiedades del DMSO y MTT.....	45
11. REFERENCIAS	46

INDICE DE IMÁGENES

	Página
1. Perro sano.....	2
2. Otitis externa crónica.....	3
3. Tratamiento con soluciones óticas.....	11
4. Recolección de polen y otras sustancias por <i>Apis Mellifera</i>	12
5. <i>Apis mellifera</i> , secretando propóleo.....	12
6. Propóleo crudo.....	13
7. Compuestos fenólicos de acción farmacológica en el propóleo.....	13
8. Extracto etanólico de propóleo.....	21
9. Prueba de esterilidad del extracto de propóleo.....	28
10. Inhibición de crecimiento de <i>Malassezia pachydermatis</i> a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.....	29
11. Inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones del extracto propóleo.....	29
12. Inhibición de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de extracto de propóleo.....	30
13. Inhibición de crecimiento para <i>Staphylococcus epidermidis</i> a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.....	30
14. Inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones del extracto propóleo.....	31
15. Inhibición de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.....	31
16. Inhibición de crecimiento de <i>Proteus mirabilis</i> a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.....	32
17. Ensayo en microplaca extracto-bacteria. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Candida albicans</i>	33
18. Ensayo en microplaca extracto-bacteria. <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
19. Ensayo bactericida-bacteriostático de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
20. Ensayo bactericida-bacteriostático <i>Staphylococcus epidermidis</i>	35
21. Ensayo bactericida-bacteriostático <i>Escherichia coli</i>	36
22. Ensayo bactericida-bacteriostático <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
23. Ensayo bactericida-bacteriostático <i>Malassezia pachydermatis</i>	37
24. Ensayo bactericida-bacteriostático <i>Candida albicans</i>	37

INDICE DE TABLAS

	Página
1. Microorganismos aislados del canal auditivo externo de perros con otitis externa y en perros sanos.....	6
2. Identificación de bacterias Gram positivas.....	22
3. Identificación de bacterias Gram negativas.....	22
4. Identificación de levaduras.....	22
5. Ensayo en microplaca.....	24
6. Concentración de la solución de extracto.....	28
7. Concentraciones inhibitorias de crecimiento de extracto de propóleo sobre bacterias y/o levaduras.....	32
8. Lectura visual de la microplaca (extracto-bacterias y/o levaduras).....	34
9. CMI del extracto de propóleo para bacterias y levaduras.....	34

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Diluciones del extracto de propóleo.....	23
2. Diluciones para la microplaca.....	25

INDICE DE GRAFICOS

	Página
1. Porcentaje de aislamiento de bacterias y levaduras de casos clínicos de otitis canina.....	27

ABREVIATURAS

CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CMI's	Concentraciones Mínimas Inhibitorias
EP	Extracto de Propóleo
OE	Otitis Externa
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril.
DMSO	Dimetil Sulfoxido
NaCl	Cloruro de Sodio.
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Millilitros
µl	Microlitros
S	Sensibilidad
RM	Rojo de Metilo
VP	Voges-Proskauer
A	Agar
ATCC	American Type Culture Collection

RESUMEN

Una de las investigaciones importantes de interés económico y de salud pública para la industria farmacéutica en el área veterinaria, es el desarrollo de nuevos antibióticos y antifúngicos de gran espectro, además de que no generen resistencia, en padecimientos de animales domésticos cuya importancia radica en la interacción mascota-hombre, el cuidado y protección tanto del animal como el propietario. Es por ello que se generó una gran expectativa de buscar un tratamiento alternativo a base de productos obtenidos de la naturaleza en cuadros de otitis canina causados por bacterias y/o levaduras.

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y de consistencia balsámica, recogida de ciertas partes de los vegetales por las abejas *Apis mellifera* que las transportan al interior de la colmena modificándolas en parte con sus secreciones (ceras y secreciones salivares). Se compone de bioflavonoides y aceites esenciales; además de contener oligoelementos, vitaminas y aminoácidos.

Se preparó una solución hidroalcohólica de propóleo al 20 % y por medio de filtración con membranas de nitrocelulosa de 0.45 µg se realizó su esterilización, después se llevó a sequedad total, obteniendo un extracto seco total de propóleo estéril, se pesó 1 gramo disolviéndose en 10 ml de glicerina estéril. Obteniéndose una solución de extracto de propóleo con Calidad Microbiológica para lo cual se realizaron diluciones, teniendo concentraciones 100, 10, 1 y 0.1 mg/ml.

Se aislaron e identificaron 7 cepas de bacterias y levaduras de casos de otitis canina: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*.

Para evaluar el efecto inhibitorio del propóleo frente a los agentes infecciosos de otitis canina, se realizó una prueba cualitativa a las diferentes concentraciones de nuestro extracto, en placas de agar BHI con las bacterias y/o levaduras, evaluando así las propiedades antibacteriana y antimicótica frente a dichos microorganismos.

Para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, se realizó una prueba cuantitativa (Método Colorimétrico de Mosmann), para ello se preparó una solución a base de propóleo (1 gr de extracto de propóleo + 3 ml de DMSO y 7 ml de glicerina). Se procedió con el ensayo en microplaca (extracto-bacteria), efectuando una serie de diluciones de nuestro extracto y se incubó durante 24 horas. Seguido de la prueba con el reactivo MTT, la cual consiste en demostrar si hay bacterias viables mediante la enzima lactato deshidrogenasa o aspartato aminotransferasa, la cual reduce al compuesto, dando como producto de reacción el formazan

que es una sal insoluble en agua de color violeta. Lo que indica que el propóleo presenta propiedades antimicrobianas, inhibiendo el crecimiento de dichos microorganismos tratados. Para corroborar esta prueba se realizó un ensayo bactericida-bacteriostático en placas de agar BHI.

Los resultados obtenidos fueron favorables ya que se demostró que el extracto de propóleo tiene efecto al inhibir el crecimiento de las bacterias y/o levaduras de importancia en otitis canina y las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI's), en mg/ml son las siguientes: *Staphylococcus aureus* (6.25), *Staphylococcus epidermidis* (25), *Pseudomonas aeruginosa* (100), *Escherichia coli* (50), *Proteus mirabilis* (100), *Malassezia pachydermatis* (100) y *Candida albicans* (3.12).

El extracto de propóleo tuvo efecto inhibitorio "In vitro" sobre todas (100 %) las bacterias y levaduras, siendo una alternativa de tratamiento para la otitis canina.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Otitis canina

La otitis es el término médico para denominar la inflamación del canal auditivo, es un proceso infeccioso que evoluciona en el conducto auditivo, generalmente agudo, aunque puede llegar a ser crónico. Su localización puede ser el oído interno, medio o el externo. La otitis que se estudiará en este trabajo es de etiología bacteriana y micótica. La mayoría de estos microorganismos son habitantes normales del canal auditivo, sin embargo, su número se puede multiplicar, cambiando las condiciones del entorno del canal del oído y ocasionando problema.

Este padecimiento afecta a los caninos con frecuencia, aumentado su incidencia en las épocas húmedas, aunque también se puede presentar en las épocas secas, afectando a cualquier raza de perros convirtiéndose así, en una de las causas más importantes de visita a las clínicas veterinarias (Andrade, O., 2007).

1.2 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 puede presentarse afectando el oído externo, el oído medio o el oído interno. Según el área afectada, la inflamación se denominará otitis externa, otitis media y otitis interna (Lanz, O. *et al.*, 2004).

Existe una clasificación según agentes etiológicos de otitis canina; dentro de ésta se mencionan la otitis externa supurativa, la otitis externa micótica y la otitis externa parasitaria (Rosser, E., 2004).

La otitis supurativa o purulenta es aquella producida por agentes bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* entre otros; se caracteriza por presentar úlceras a nivel de la piel del conducto auditivo externo y todos los signos de otitis (Colombini, S. *et al.*, 2000).

La otitis micótica, también denominada otomicosis, como su nombre lo indica es producida por hongos; dentro de éstos, el principal agente es *Malassezia pachydermatis*. En general estas afecciones se caracterizan por la presencia de cerumen de coloración café oscuro, con un olor muy particular, rancio, característico de los hongos (Foster, A. *et al.*, 1998, Masuda A., *et al.*, 2000).



La otitis parasitaria, es producida por el ácaro *Otodectes cynotis*. La vía de transmisión es por contacto directo, siendo posible encontrar esta afección acompañada tanto de bacterias como de hongos.

Existe una cuarta clasificación según el agente causal de inflamación, denominada otitis externa hiperplásica, provocada como consecuencia de una irritación prolongada del conducto auditivo externo producto de otitis no tratadas, manipulación, frotamientos, entre otros. Se produce una hipertrofia y endurecimiento de la piel, lo cual lleva a un estrechamiento y/o bloqueo del conducto por hiperplasia del tejido. Se produce obstrucción de la salida de cerumen, mala oxigenación del conducto, entre otros (Oathold, W. *et al.*, 2005).

1.2.1 Otitis externa

La otitis externa es una inflamación del conducto auditivo externo que se caracteriza por eritema, aumento de la descarga o descamación del epitelio acompañada de dolor y/o irritación. Es una afección frecuente en el perro, que representa entre el 5 y el 20 % de los motivos de consulta y cuya etiología es multifactorial (Carlotti, D. *et al.*, 1998).

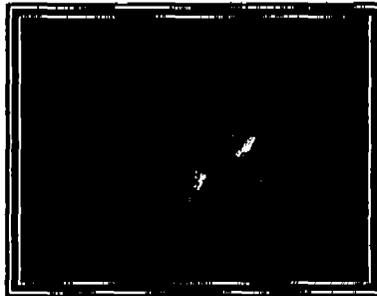


Imagen 1. Perro sano

La otitis externa es la afección más común de las tres y es como consecuencia de ésta y de su cronicidad, que generalmente se producen las otras dos. El signo clínico característico de la otitis externa y media es similar, generalmente denominado otorrea, con presencia de variados signos de disconformidad, además de la posible ruptura de la membrana timpánica en cuadros de cronicidad avanzada que traerán consigo el compromiso del oído medio (August, J., 1988).



1.2.1.1 Fisiopatología

La inflamación dentro del conducto auditivo externo por cualquier etiología redonda en alteraciones del canal, en ocasiones haciéndose crónica, las glándulas se agrandan (hiperplasia) y producen un exceso de cerumen. Se produce un engrosamiento epidérmico y dérmico (fibrosis) los pliegues del canal engrosados reducen de manera efectiva el diámetro de aquel que llega a estenosis por completo. La calcificación del cartilago auricular es un evento terminal la inflamación crónica (Sumano, L. *et al.*, 1997).

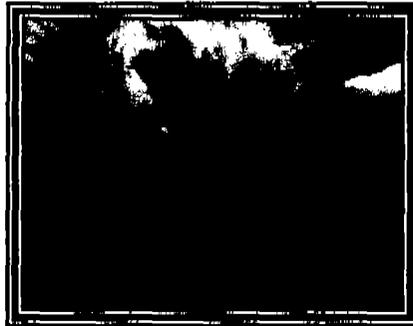


Imagen 2. Otitis externa crónica

1.2.1.2 Etiología

Muchos son los factores que contribuyen al desarrollo de OE. Llamaremos primarios a aquellos específicos que inducen en forma directa a la OE; predisponentes a aquellos que colocan al paciente en riesgo de padecer la enfermedad y perpetuantes a aquellos que impiden la resolución del problema (Díaz, M. *et al.*, 2005).

1.2.1.2.1 Factores primarios

Dentro de los factores primarios de otitis, principalmente externa, que corresponden a aquellos capaces de iniciar inflamación a partir de oídos normales se encuentran:

- Sensibilidad alimentaria, dermatitis atópica: Los cuadros de otitis externa se presentan afectando a perros con dermatitis atópica y/o sensibilidad alimentaria en un 50 a 80% (Rosser, E., 1993). Pacientes con otitis externa alérgica frecuentemente presentan sacudimiento de cabeza y prurito en la zona. La forma de presentación más común de estos cuadros de otitis es la bilateral (Carlotti, D., 1997; Huang y Huang, 1999).



- **Hipersensibilidad por contacto y reacciones irritantes:** En general los cuadros de hipersensibilidad por contacto se presentan en pacientes en que se utilizan determinados productos óticos como Neomicina o Propilenglicol. Es muy difícil diferenciar hipersensibilidad de una reacción irritante, una vez producido el cuadro inflamatorio (Baksi, S. *et al.*, 2004).
- **Reacciones a medicamentos:** Provocadas por aplicación de medicamentos vía sistémica. Se produce una exacerbación aguda de exudados, erosión, engrosamiento epidérmico y en algunos casos, necrosis (Morris, D., 2004).
- **Cuerpos extraños:** Espigas, pastos, polvo entre otros, podrían causar irritaciones significativas dentro del oído. Incluso estos elementos, podrían migrar hacia la zona timpánica y causar un cuadro de otitis media (Angus, J., 2004).
- **Inflamación idiopática / otitis hiperplástica en Cocker Spaniel:** Este cuadro afecta solamente a los oídos. Una hipersensibilidad local probablemente debida a algún componente del cerumen, es la hipótesis que se mantiene en relación a la presentación de este cuadro (Rosychuk, R., 1994; Angus, J., 2004).
- **Ectoparásitos:** *Otodectes cynotis* causa entre el 5% y el 10% de otitis en perros. En general se encuentran infestaciones en perros menores de un año. La hipersensibilidad variable a la picadura del ácaro causa la inflamación que acompaña a la infestación. Algunos animales tienen ácaros pero se mantienen asintomáticos (Alden, P., 1998).
- **Trastornos de la queratinización de glándulas sebáceas:** El hipotiroidismo, hiperestrogenismo, adenitis sebácea y seborreas idiopáticas (por ejemplo en perros Cocker Spaniel) pueden asociarse con inflamación ótica leve, posiblemente como resultado de la acumulación de ácidos grasos anormales. Los animales afectados casi siempre tienen un compromiso cutáneo significativo más generalizado (Alden, P., 1998).
- **Otros factores primarios:** Enfermedades autoinmunes que incluyen cuadros como pénfigo y lupus eritematoso pueden causar inflamación. Estos pacientes presentan lesiones cutáneas que involucran otras áreas del cuerpo, lo cual facilita su diagnóstico (Angus, J., 2004).



1.2.1.2.2 Factores predisponentes

Se conocen como factores predisponentes a aquellos responsables de hacer de un oído un órgano susceptible de sufrir inflamaciones originadas de elementos denominados factores primarios, que por sí solos no serían causales de otitis

- **Temperatura y humedad:** Aumentos en la temperatura ambiental, humedad, lluvia y la práctica de la natación, han demostrado tener directa relación con la incidencia de otitis externa. Alzas en la temperatura y humedad dentro del oído predispondrá a cuadros de otitis a través de la alteración de las barreras normales funcionales de la epidermis de la zona (Huang y Huang, 1999).
- **Predisposición anatómica:** Se ha demostrado que existen numerosas predisposiciones anatómicas a otitis externa. Orejas pendulosas, quizás debido al pobre grado de aireación, con aumento de la humedad y de la temperatura, presentan cuadros de otitis externa con mayor facilidad (Hayes H. *et al.*, 1987). Razas como Cocker Spaniel, Springer Spaniel, Labrador Retriever, conocidas por su predisposición a la presentación de otitis externa, presentan un aumento en el tejido glandular ceruminoso (Carlottl, D., 1997).

1.2.1.2.3 Factores perpetuantes

- **Colonización e infección bacteriana micótica:** Entre los factores perpetuantes, que no inducen la aparición de la otitis, pero que impiden su curación, podemos nombrar a bacterias y levaduras. Las primeras se encuentran en pequeña cantidad colonizando de manera normal, los conductos auditivos de los perros; en presencia de una otitis externa, las bacterias oportunistas proliferarán provocando cambios patológicos ocasionando una respuesta inflamatoria, aun cuando el factor primario original ya no esté presente o activo (Aiden, P., 1998).

Diferentes estudios reportan el aislamiento e identificación de microorganismos causantes de la otitis canina entre los que se encuentran con mayor frecuencia en dicho padecimiento son: *Pseudomonas aeruginosa* (22.22 %), *Proteus mirabilis* (13.89 %), *Staphylococcus aureus* (12.50 %), *Staphylococcus epidermidis* (8.33 %), *Escherichia coli* (5.56 %) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (5.56 %). Por medio de la evaluación citológica se evidenció que *Malassezia pachydermatis* se encontró presente en un 89,80 % de los casos estudiados (Fernández, G. *et al.*, 2006).



Tabla 1. Microorganismos aislados del canal auditivo externo de perros con otitis externa y en perros sanos.

Bacteria	Perros con otitis	Perros sanos
	N / %	N / %
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 / 2.77	-
<i>Bacillus cepaceae</i>	1 / 1.39	-
<i>Bacillus cereus</i>	3 / 4.17	1 / 8.33
<i>Bacillus spp.</i>	0	2 / 16.67
<i>Bacillus subtilis</i>	1 / 1.39	-
<i>Citrobacter diversus</i>	1 / 1.39	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2 / 2.77	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1 / 1.39	-
<i>Enterobacter spp.</i>	1 / 1.39	-
<i>Escherichia coli</i>	4 / 5.56	1 / 8.33
<i>Klebsiella ozanaeae</i>	3 / 4.17	1 / 8.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 / 22.22	1 / 8.33
<i>Proteus mirabilis</i>	10 / 13.89	-
<i>Proteus vulgaris</i>	1 / 1.39	1 / 8.33
<i>Pseudomonas cepacea</i>	1 / 1.39	-
<i>Sarcina spp.</i>	1 / 1.39	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 / 12.50	1 / 8.33
<i>Staphylococcus β-hemolítico</i>	2 / 2.77	-
<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	4 / 5.56	2 / 16.67
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6 / 8.33	2 / 16.67
<i>Staphylococcus α-hemolítico</i>	1 / 1.39	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1 / 1.39	-
<i>Streptococcus viridans</i>	1 / 1.39	-

Tomado Fernández, G. *et al.*, 2006.

N: numero de muestras

Las bacterias que con mayor frecuencia se aíslan de casos de otitis canina crónica son *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus epidermidis* lo cual coinciden diferentes autores (Cartotti, D., 1991; Grono, L. R. *et al.*, 1969; Mckeever, P. *et al.*, 1999; Scott, D., 1980).



Los productos metabólicos, toxinas, enzimas y ácidos grasos liberados por bacterias y hongos durante su crecimiento pueden potenciar la gravedad de la inflamación. Estos factores pueden causar irritación de las glándulas que secretan cerumen, aumentando su producción y disminuyendo la ventilación del oído, creando condiciones favorables para la proliferación de los microorganismos (Wayne, R., 2005).

Las levaduras contribuyen con frecuencia a la aparición de otitis externas. La presencia de otro germen y una disminución de las defensas en el organismo, harán que estos microorganismos proliferen y empeoren la otitis. La levadura presente en éste tipo de infecciones del oído se conoce con el nombre de *Malassezia pachydermatis* y en menor medida *Candida albicans* (Kujumgiev, A. et al., 1999).

Malassezia se considera un agente oportunista que prolifera en oídos inflamados, se demostrado que causan inflamación, tal vez es la por interacción de los metabolitos de lípidos-*Malassezia* (por ejemplo, formación de peróxidos) y reacciones del tipo I a la levadura o a sus metabolitos (Alden, P., 1998)

- Otitis media: Este cuadro mantiene la presencia de una otitis externa mediante su actividad como reservorio de bacterias, levaduras y otros elementos (Gotthelf, L., 2004).
- Tratamientos erróneos, sobredosificación y subdosificación: Oídos sobretratados permanecerán inflamados aún cuando la infección presente se haya resuelto. El mantener el oído demasiado lubricado también contribuye a la mantención del problema. El uso inadecuado de una serie de productos óticos podría aumentar el riesgo a presentar resistencia por parte de los agentes causales para tratamientos posteriores (Morris, R., 2004).
- Cambios proliferativos: La hiperqueratosis epidérmica, acantosis, fibrosis dérmica, edema e hiperplasia y dilatación de glándulas apocrinas producen engrosamiento cutáneo que se manifiesta con pliegues. También pueden desarrollar pólipos y nódulos piogranulomatosos fibrosos reactivos. Estas alteraciones generan un microambiente que puede fomentar la residencia de bacterias, levaduras y componentes del cerumen potencialmente irritantes (Alden, P., 1998; Angus, J., 2004).



1.2.1.3 Signos clínicos

Los signos clínicos asociados con la otitis externa incluyen grados variables de sacudidas cefálicas, prurito, dolor, olor y exudación. Muchos de los signos de la otitis media también ocurren con la otitis externa. La irritación causada por estos cambios se manifiesta por sacudidas de la cabeza, manoseo y frotación del oído afectado. Algunos animales pueden presentar indicios de dolor cuando son acariciados sobre el lado afectado, incluso sin modificaciones óticas externas evidentes (Ettinger, S. *et al.*, 2002).

1.2.1.4 Diagnóstico clínico

Con el examen otoscópico se pueden observar cuerpos extraños, neoplasias y pólipos, si es necesario se toman muestras para la biopsia. Si el tímpano está roto se pueden obtener muestras para el cultivo de aerobios, hongos y levaduras directamente desde el oído medio para la identificación y antibiograma. Un frotis del exudado se puede teñir con azul de metileno o colorante de Wright y examinar por levaduras y hongos tales como *Malassezia*, *Candida* y *Aspergillus* (Alden, P., 1998).

En general la consulta al veterinario se debe a que la mascota se rasca el oído, tiene el pabellón auricular edematoso, existe presencia de secreciones provenientes del área afectada, sacude la cabeza o que a la manipulación de las orejas pareciera presentar dolor.

1.2.2 Otitis media

La otitis media se define como el proceso flogístico del oído medio. El oído medio consiste en la cavidad timpánica, sus contenidos, y los tubos auditivos. Con mayor frecuencia, la otitis media es una secuela de la otitis externa. En un estudio, el 16% de los casos de otitis externa tuvo otitis media concurrente. La incidencia de la otitis media puede llegar hasta el 50% de los casos de otitis externa crónica (Ettinger, S. *et al.*, 2002).

Las afecciones del oído medio, se presentan más frecuentemente en aquellos pacientes con un cuadro de otorrea ya en curso. Si bien una otitis media causada por infección ascendente vía tubo de Eustaquio es posible, la mayoría de los cuadros ocurren como una extensión de una afección ótica externa, en la cual la membrana timpánica podría hallarse perforada. Esta perforación comúnmente se presenta en la mitad de la membrana, y para su adecuada cicatrización se requiere ausencia total de infección (Gotthelf, L., 2004).



1.2.2.1 Etiopatogenia

La causa más común de la otitis media es la infección bacteriana. Los patógenos frecuentes cultivados a partir del oído medio incluyen: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. (Ettinger, S. *et al.*, 2002). Las bacterias son los agentes causales primarios en la otitis media, pero otros agentes como las levaduras *Malassezia*, *Candida* y *Aspergillus* también deben ser considerados. En los casos unilaterales debe excluirse la presencia de cuerpos extraños, trauma con hemorragia intratimpánica y tumores (polipos, fibromas, carcinomas de células escamosas y tumores óseos primarios) (Ettinger, S. *et al.*, 2002).

La inflamación del oído medio puede comenzar mediante tres rutas: En la primera, la inflamación puede proceder a través de la membrana timpánica. En estos casos, una infección ótica externa primaria progresa a la otitis media secundaria. La segunda ruta se establece mediante el tubo de Eustaquio. La incidencia de infección por esta vía es mucho menor en los animales que en el hombre. La tercera ruta es la sanguínea; los patógenos transportados por la sangre invaden el oído medio (Ettinger, S. *et al.*, 2002).

Diferentes autores mencionan que la otitis media canina es fundamentalmente secundaria a la otitis externa y que muchos casos son pasados por alto a causa de una exploración poco ambiciosa cuando la otitis externa es evidente (Ettinger, S. *et al.*, 2002).

1.2.3 Otitis interna

La otitis interna suele deberse a la progresión de una infección o neoplasia relacionada con la otitis media. En algunos casos, la inflamación puede ser la respuesta a procesos flogísticos/neoplásicos en el oído medio adyacente (Aiden, P., 1998).

Los signos clínicos de la otitis interna incluyen: ataxia asimétrica (caldas), inclinación cefálica, por lo usual, hacia el lado de la lesión. Puede haber parálisis del nervio facial o síndrome de Homer. Los signos de paresia o deficiencia propioceptiva asociada con inclinación de la cabeza por lo general indican enfermedad vestibular central. La enfermedad vestibular bilateral no ocasiona inclinación cefálica. El animal caminará en forma agazapada (Aiden, P., 1998).

La otitis interna es bastante poco común en el perro y cuando se presenta generalmente es consecuencia de una otitis media. Puede llegar a ser causal de presentación de cuadros de sordera adquirida, bastante extraños en el perro (Gothelf, L., 2004).



1.3 Tratamiento

La terapia para la otitis canina involucra diferentes medicamentos, siendo generalmente prolongada y de elevado costo, lo que implica la discontinuidad del tratamiento y como consecuencia la persistencia de la patología o la recidiva de la misma. El tratamiento local con soluciones tópicas adecuadas para cada caso, se debe basar inicialmente en los resultados del examen clínico general, la otoscopia y el examen citológico de los exudados (cultivo bacteriano, micótico y antibiograma).

El antibiótico se administra localmente, de forma que se facilite su penetración en la cavidad del oído medio. Para las infecciones con *Proteus* o *Pseudomonas* que son bacterias resistentes a diversos fármacos una buena elección es el Cloramfenicol y la Gentamicina. También se administran medicaciones locales o bien antisépticos diluidos para irrigar el conducto auditivo y así limpiarlo. Este régimen debe continuarse por lo menos de siete a diez días. Si no existe mejoría de los signos clínicos, está indicada la irrigación del oído medio (White, P., 1999). Los antiinflamatorios orales en la otitis, pueden mejorar y facilitar el tratamiento junto con limpieza local constantemente, además de un aseo completo de la mascota.

La inclinación de la cabeza es frecuentemente el último signo que desaparece y puede permanecer durante semanas, aunque en otros aspectos el perro sea completamente normal. Si persiste la inclinación de la cabeza y han desaparecido los otros signos de enfermedad, la Prednisolona oral puede acelerar su resolución (White, P., 1999).

Para casos de otitis externa donde existe presencia de levaduras, debe tratarse con diversos preparados que contienen uno o varios antibióticos, algún antiinflamatorio y en muchos casos antifúngico. En el 90% de los casos, el perro se cura. El resto recidivan, transformándose en otitis crónica, muy difícil de solucionar y con una participación importante de levaduras en solitario o en colaboración con bacterias, con resistencia a antifúngicos y antibióticos respectivamente.



Imagen 3. Tratamiento con soluciones óticas



1.4 Ototoxicidad

Los fármacos ototóxicos afectan la cóclea, el vestíbulo y los canales semicirculares con posteriores efectos sobre la audición, función vestibular o ambos. Los agentes tóxicos alcanzan el oído interno mediante la aplicación local o por ruta hematógena. El desarrollo de la ototoxicidad tópica en general requiere un tímpano perforado y depósitos de material dentro del oído medio. Puede haber daño selectivo de la cóclea, aparato vestibular o ambos. El daño puede residir en las células pilosas, estría vascular, órgano de Corti, neuroepitelio del aparato vestibular o neuronas asociadas (Aiden, P., 1998).

Dentro de lo que cabe podemos mencionar algunos fármacos y sustancias ototóxicas:

- Antibióticos aminoglucósidos: Amikamicina, Kanamicina, Estreptomycin, Neomicina, Gentamicina, Eritromicina, Polimixina, Minociclina, Vancomicina y Cloramfenicol.
- Diuréticos del asa: Furosemida, Bumetanida y Ácido etacrínico.
- Antisépticos: Clorhexidina, Etanol, Yodo (yodóforos), Cloruro de benzalconio, Cloruro de benzetonio y Cetrimida).
- Otras sustancias: Propilenglicol, Cisplatino, Cloruro de Estaño Trimetil y Bromuro de Estaño Trietil, Quinina, Plomo, Mercurio, Arsénico, Salicilatos y Detergentes.



1.5 Propóleo

1.5.1 Antecedentes

Distintos productos derivados de la apicultura se utilizan desde tiempos inmemorables, para tratar diferentes dolencias; en el papiro de Ebers ya se hacía referencia a las acciones del propóleo. El término propóleo proviene del griego pro: delante o en defensa de y polis: ciudad; delante de la ciudad. es decir, de la colmena (Bedascarrasbure, E. *et al.*, 2003).

Aristóteles ya hablaba de propóleo y lo consideró como "remedio para infección de piel, llagas y supuraciones". Galeno en el siglo II, menciona el propóleo en sus trabajos así como el filósofo Persa Avicena. Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y los franceses en los siglos XVII y XIX para el tratamiento de llagas. Pero se empleó en África del Sur en la guerra de los Boers en el año de 1900 para tratar heridas infectadas, como cicatrizante, así como para desinfectar las manos e instrumentos quirúrgicos.

1.5.2 Origen

Las abejas (*Apis mellifera*) recogen con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales y, una vez en la colmena, las mezclan con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo. La producción anual de esta resina (10–300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el método de recolección. Utilizan el propóleo para recubrir todas las grietas y aberturas de la colmena. Además de cumplir esta función, el propóleo evita contaminaciones debido a que posee acciones fungicida y antibiótica (Cafarchia, C. *et al.*, 1999).



Imagen 4. Recolecta de polen y otras sustancias por *Apis mellifera*.

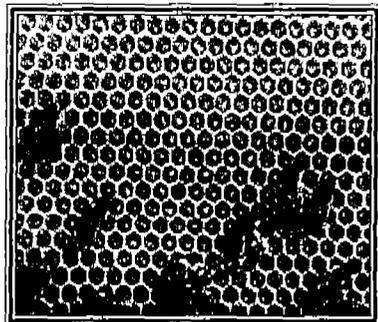


Imagen 5. *Apis mellifera*, secretando propóleo.



Su color es variable de negro-café hasta amarillo dependiendo del origen (ver Imagen 6), su olor también difiere, la mayoría de los casos es agradable y otros recuerdan a su origen vegetal, además poseen un olor predominante a cera (Clare, E. *et al.*, 1997).

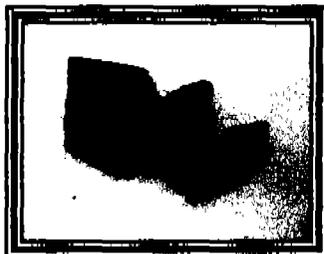


Imagen 6. Propóleo crudo

1.5.3 Composición

Es rico en bioflavonoides y aceites esenciales; además de contener oligoelementos, vitaminas y aminoácidos. Es muy variable su composición dependiendo de la flora y el clima del lugar. Se han encontrado 250 elementos constitutivos y unos 50 principios biológicamente activos, lo que explica su gran cantidad de propiedades. De los cuales un 50 % son compuestos fenólicos a los que se les atribuye acción farmacológica; entre los fenoles identificados se encuentran: flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavononas); ácidos aromáticos y sus ésteres (ácido cafeico, cinámico, ácido ferulico y otros); ácidos orgánicos (ácido benzoico, ácido galico); aldehídos aromáticos (vainillina e isovainillina); cumarinas (ácido cumarínico, esculetol y escopoletol); vitaminas (provitamina A y vitamina B3) y microelementos (aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, zinc, entre otros (Clare, E. *et al.*, 1997).

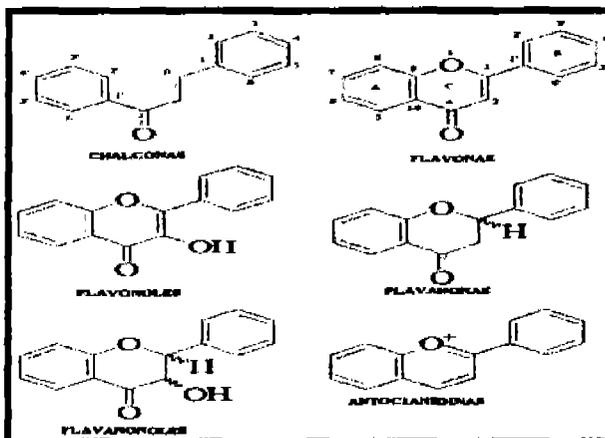


Imagen 7. Compuestos fenólicos de acción farmacológica encontrados en el propóleo.



1.5.4 Propiedades farmacológicas

Dentro de las propiedades que se han demostrado del propóleo se encuentran: antimicrobiana, antiinflamatoria, hepatoprotectiva, antioxidativa, estimulante del sistema inmune, anticariogénico, anticarcinogénico, antiulceroso, antitumoral, inmunomodulador, antifúngico, antiviral, antilavario, analgésico, preservador, antialérgico, vasodilatador, agregante plaquetario, protector de circulación, permeabilidad y fragilidad capilar, regulador y estimulante tiroideo (Bankova, V., 2000; Metzner, J. *et al.*, 1979; Bankova, V. *et al.*, 1995; Hegazi, A. *et al.*, 2000; Ivanovska, N. *et al.*, 1995; Burdock, G. *et al.*, 1998; Hausteen, B., 2002; Duarte, S. *et al.*, 2003; Han, S. *et al.*, 1995).

1.5.5 Mecanismo de acción.

La actividad antimicrobiana del propóleo se le atribuye a sus constituyentes: ácidos aromáticos, compuestos fenólicos, ésteres, especialmente los flavonoides, puede ser debido al sinergismo entre sus componentes (Cowan, M., 1999, Hausteen, B., 2002).

El mecanismo natural del propóleo sobre la fisiología de los microorganismos *B. subtilis*, *E. coli*, *R. sphaeroideis*, presenta un efecto bactericida debido a la presencia de muchas sustancias activas. El efecto bactericida es efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. El propóleo y sus componentes cinámicos y flavonoides aportan la energía de transferencia de la membrana citoplasmática e inhiben la motilidad de la bacteria (Mirzoeva, O. *et al.*, 1997).

Por métodos colorimétricos y microscopía electrónica se ha investigado el posible mecanismo de acción antibacterial del propóleo llevado a cabo en *Streptococcus agalactiae*. Se demostró que el propóleo inhibe el crecimiento de la bacteria; evitando la división de la célula, por consiguiente la formación de *Streptococcus* pseudo multicelulares, además desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando una bacteriólisis parcial e inhibe la síntesis de proteínas (Takaisi-Kikuni, N. *et al.*, 1994).

En la actualidad el propóleo ha tenido una gran importancia en la medicina popular, en particular se ha estudiado el efecto sobre los patógenos orales causantes de infecciones y se han sugerido estas investigaciones para evaluarse clínicamente. También se ha demostrado que el propóleo tiene acción inhibitoria sobre los factores de virulencia semejantes a la actividad de la lipasa y la coagulasa de *Staphylococcus aureus*. Además hay una interacción negativa con la adhesión a células y el biofilm formado por este organismo. Así como el *Streptococcus mutans* donde el propóleo inhibe la formación y el desarrollo del biofilm. (Scazzocchio, F. *et al.*, 2006).



2. JUSTIFICACIÓN

Dada la complejidad clínica de la otitis, los médicos veterinarios están obligados a utilizar una amplia variedad de medicamentos por tiempo prolongado y con gran costo, lo que conlleva a una discontinuidad de la terapia provocando que los microorganismos desarrollen defensas para una resistencia antibiótica o antimicótica y como consecuencia que persista la inflamación e infección.

De ahí surge la gran expectativa de realizar esta experimentación a base de extractos naturales, ya que investigaciones con muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos han demostrado actividades antibacterianas (sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngicas (*Cándida albicans*) y antivirales (*Avian in-fluenza virus*). (Kujumgiev, A. *et al.*, 1999), es por ello que se busca una alternativa de tratamiento en el caso de otitis canina, que no favorezca la generación de resistencia y que no sea tóxico tanto para el epitelio como para el conducto auditivo.



3. HIPÓTESIS

Si el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de propóleo se evalúa en bacterias y levaduras causantes de otitis canina y presenta actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*, se utilizará como una alternativa de tratamiento a dicho padecimiento canino.



4. OBJETIVOS

4.1 General

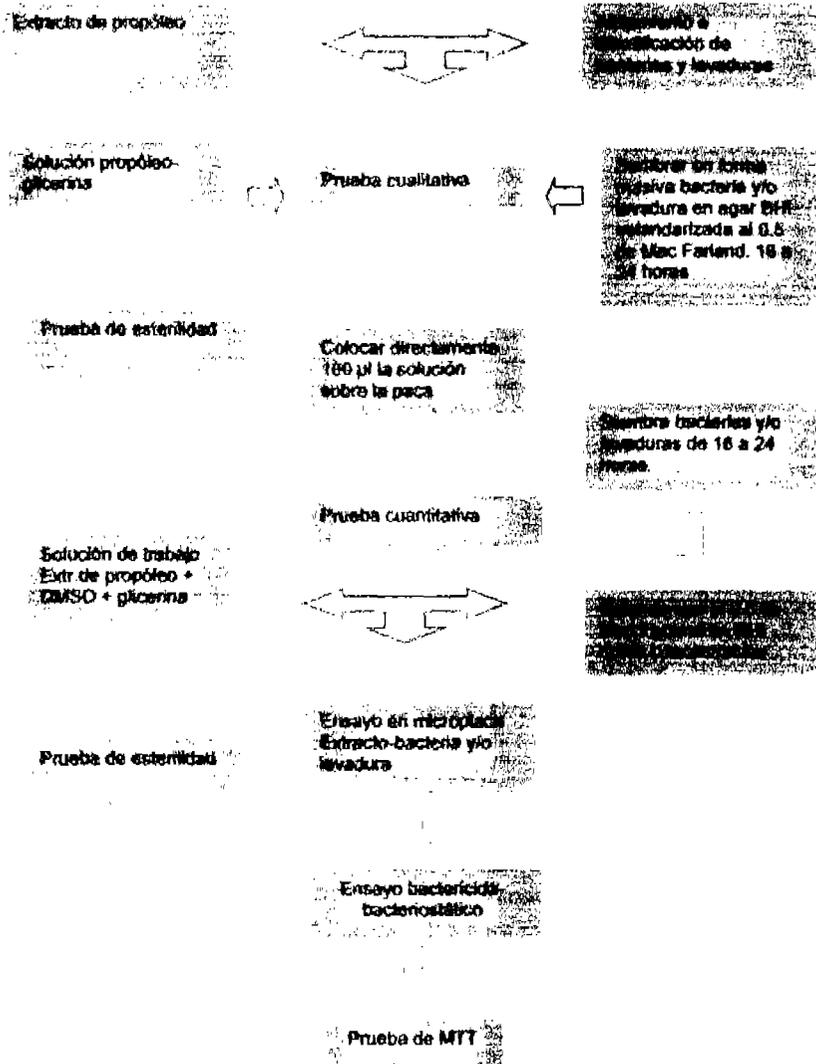
- Determinar el efecto del extracto de propóleo en bacterias y levaduras de importancia en otitis canina, utilizando el método de Mosmann, para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

4.2 Particulares

- Obtener un extracto seco total de propóleo estéril para preparar una solución de trabajo de concentración conocida.
- Aislar e identificar bacterias y levaduras a partir de muestras óticas caninas, mediante medios selectivos y pruebas bioquímicas primarias y secundarias.
- Realizar una prueba cualitativa extracto-bacteria a diferentes concentraciones de extracto de propóleo, para predecir las propiedades antimicrobianas y antimicóticas.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de propóleo por la prueba de MTT sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*.
- Evaluar las propiedades bactericidas y bacteriostáticas del extracto de propóleo realizando una prueba de crecimiento en placa, para corroborar resultados del ensayo en microplaca.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama General de Trabajo





5.2 Material, equipo, medios y reactivos.

Material

- Vaso de precipitados de 1000 ml
- Probeta graduada de 500 ml
- Matraz erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml
- Varilla de vidrio
- Embudo
- Cajas petri de vidrio estériles
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Frascos ámbar de 100 ml y 20 ml
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 ml
- Micropipeta de 10, 20, 50 y 100 μ l (Oxford)
- Termómetro
- Mechero bunsen
- Soporte universal
- Filtro de bala
- Espátula
- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Puntas para micropipetas
- Papel filtro Whatman
- Membrana Millipore de 0.45

Equipo

- Autoclave All American Modelo 1925X.
- Estufa bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- Refrigerador IEM.
- Balanza granataria (Ohaus)
- Agitador Vortex Genie 2 Scientific Industries Modelo G560.
- Centrifuga Dynac
- Bomba de vacío Hoffmann Plinther Modelo 0210
- Homo Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate
- Microscopio óptico Olympus Modelo CHS



Material biológico

Bacterias y levaduras aisladas de casos de otitis canina, proporcionada de clínicas veterinarias

- *Malassezia pachydermatis*
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus aureus*

Reactivos

- Etanol al 96%
- Agua destilada
- Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey)
- Dimetil sulfoxido
- MTT SIGMA M-2128
- Tíen de tinción: Cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina
- Peroxido de hidrogeno

Medios de cultivo

- Agar sangre(Diagnóstica MERCK)
- Agar SM(Diagnóstica MERCK)
- Agar Mac Conkey(Diagnóstica MERCK)
- Agar EMB(Diagnóstica MERCK)
- Agar BHI (Diagnóstica MERCK)
- Agar BHI(Diagnóstica MERCK)
- Agar Verde brillante
- Medio SIM. (BIOXON)
- Medio Citratos. (DIBICO)
- Caldo Urea. (BIOXON)
- Caldo MR-VP. (DIBICO)
- Caldo BHI a doble concentración. (Diagnóstica MERCK)
- Oxidasa
- Agar Dextrosa Sabouraud (Bioxon)



5.3 Obtención del propóleo

Se compró en un local de Herbolaria "LAS PLANTAS MEDICINALES DE AMERICA, S.A DE C. V". La dirección es: Guatemala No. 10 locales 12 y 13 Pasaje Catedral, Delegación Cuauhtémoc C.P. 06020 México, D. F.

5.4 Extracción de propóleo

Se pesaron 40 gramos de propóleo, el cual fue cortado en trozos pequeños. Se colocó en un matraz erlenmeyer, adicionando 800 ml de etanol al 76 % (grado reactivo), con un tiempo de agitación constante aproximadamente por 2 horas y una temperatura no mayor a 50° C. Se controló la temperatura y la exposición a la luz solar, ya que como sabemos algunos componentes reaccionan o se degradan fácilmente con los factores antes mencionados.

Después se filtró con papel Whatman (para eliminar todas las impurezas de tamaño considerable) y con membrana de 0.45 μm se hizo pasar el extracto utilizando presión positiva; el filtrado se obtuvo en una botella ámbar aun en condiciones no estériles. Para obtener un extracto libre de cualquier contaminación se filtró la tintura madre en una membrana estéril de nitrocelulosa de 0.45 μm .

El extracto etanólico de propóleos se vació en un cristizador manejando condiciones estériles, llevando a sequedad total por medio de rotavapor y horno a una temperatura no mayor de 50° C durante una semana, eliminando el disolvente.

La materia seca, se recolectó con ayuda de una espátula y se colocó en un frasco ámbar, todo en condiciones de esterilidad determinado el rendimiento.

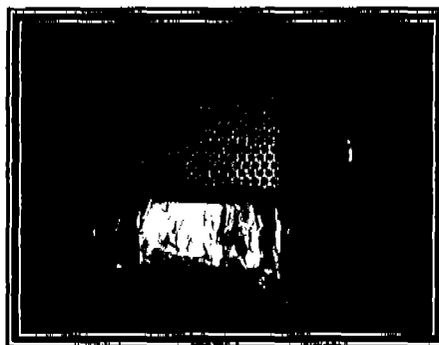


Imagen 8. Extracto etanólico de propóleo



5.5 Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras.

Se aislaron e identificaron bacterias y levaduras de muestras óticas (hisopos), las cuales se obtuvieron de clínicas veterinarias de casos de otitis canina y correspondieron: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*. Tabla No. 2, 3 y 4.

Tabla 2. Identificación de bacterias Gram positivas

Bacteria	Morfología	Catalasa	Coagulasa	Novobiocina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos en racimos	+	+	*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos en racimos	+	-	S

Tabla 3. Identificación de bacterias Gram negativas

Bacteria	Morfología	Motilidad	Catalasa	Oxidasa	Indol	VP	RM	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos	+	+	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos	+	+	+	*	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>		+	*	+	-	+	+	+

Tabla 4. Identificación de levaduras

Levadura	Gram	Catalasa	Urea	Tubo germinativo	Agar selectivo
<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	+ débil	-	-	Dextrosa + Sabouraud + Aceite de oliva
<i>Candida albicans</i>	+	*	*	+	Nickerson

+ Prueba positiva

S Sensibilidad

- Prueba negativa

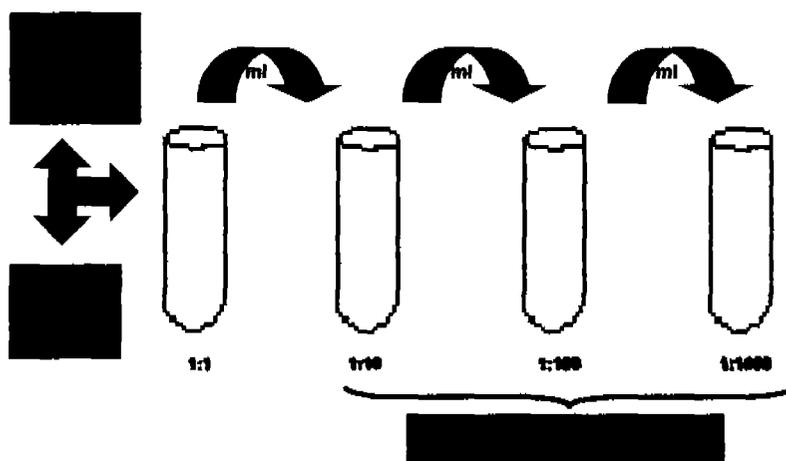
* No se realizó

5.6 Prueba cualitativa extracto-bacteria

Para realizar esta prueba se preparó una solución de extracto a diferentes concentraciones y fue de la siguiente manera:

Se pesó 1 gramo de extracto de propóleo estéril y se disolvió en 10 ml de glicerina estéril, se calentó ligeramente para disolver, después se procedió a realizar diluciones para tener soluciones a diferentes concentraciones (ver figura 1).

Figura 1. Diluciones del extracto de propóleo



Se realizó una prueba de esterilidad en agar BHI para cada una de las diluciones del extracto de propóleo.

Las cepas a utilizar se activaron en agar BHI 24 horas antes, incubándose a 37° C y se estandarizaron al 0.5 de Mac Farland en tubos con caldo BHI estéril.

Se hizo un sembrado masivo en placas de agar BHI para cada bacteria y/o levadura previamente estandarizadas y se incubó por 10 minutos en la estufa a 37° C.

Se colocó directamente 100 μ l de cada dilución del extracto de propóleo en su respectivo cuadrante (1 - 2 - 3 - 4) sobre la placa e incubamos las placas a 37° C por 24 horas.

**5.7 Prueba cuantitativa extracto-bacteria (Método Colorimétrico de Mosmann)**

Se pesó 1 gramo de propóleo, se disolvió con 3 ml de DMSO y se llevó a un volumen total de 10 ml con glicerina estéril, lo cuál se mantuvo en refrigeración a 4°C y se colocó en un frasco ámbar estéril (solución de trabajo). Concentración = 100 mg/ml

Se realizó una prueba de esterilidad a la solución de extracto de propóleo. Se tomo una asada

En una caja de agar BHI se sembró a la bacteria y/o levadura en forma de dilución americana incubándose a 37° C durante 24 horas. Se procedió a preparar una suspensión con bacteria y/o levadura en caldo BHI a doble concentración, igualando al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.

Se procede a realizar el ensayo en la microplaca: la tabla 5 representa una microplaca la cual cuenta con 96 pozos con columnas del 1 al 12 y las filas de la A a la H, corresponden dos filas para una misma bacteria y/o levadura. La columna 10 y 11 corresponden a un control positivo y uno negativo respectivamente y la columna 12 al blanco.

De la columna 2 a la 9 se realizaron diluciones de nuestro extracto como se muestra en la figura 2, quedando así un volumen total de cada pozo de la microplaca de 200 µl

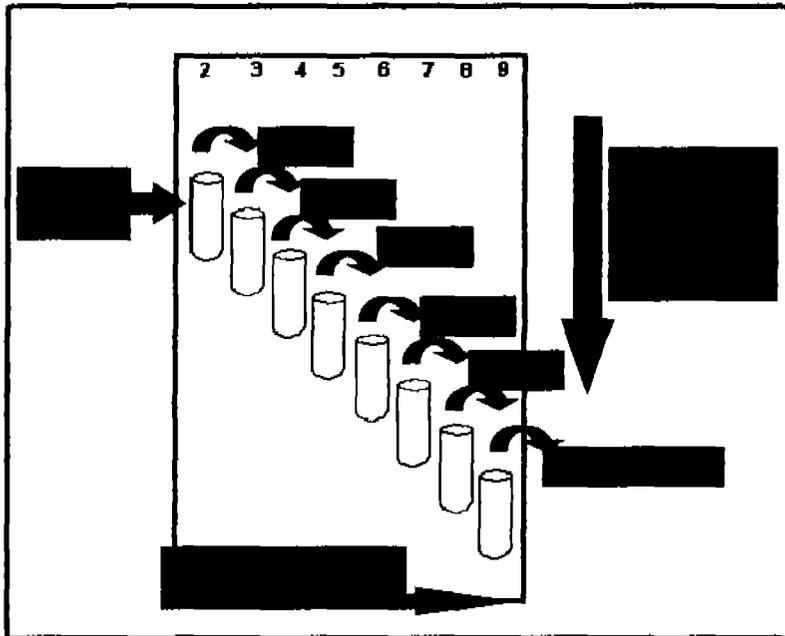
Tabla 5. Ensayo en microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
										Control +	Control -	Blanco
A												
B	100µl									100 µl SSF +		
C	EP+ 100 µl de									100 µl de BHI	100 µl	100 µl
D	BHI a doble									doble	SSF +	EP + 100
E	concentración									concentración.	100 µl	µl
F	con bacteria o									con bacteria o	de Caldo	de Caldo
G	levadura									levadura a	BHI sin	BHI sin
H	estandarizada									probar	bacteria	bacteria
	0.5 Mac									estandarizada		
	Farland									0.5 Mac		
										Farland		

(Mosmann, T. *et al.*, 1983; Denis, G. *et al* 1986).

En el siguiente esquema se representa las diluciones que se hicieron del pozo 2 al 9, esto para cada fila, ya que como se mencionó anteriormente se utilizaron dos filas para cada bacteria y/o levadura.

Figura 2. Diluciones para la microplaca



Diluciones 2= 1:2, 3= 1:4, 4= 1:8, 5= 1:16, 6= 1:32, 7= 1:64, 8= 1:128, 9= 1:256.

Se incuba la microplaca a 37° C de 18 a 24 horas. Después del tiempo de incubación se observa la microplaca, se realiza una lectura visual. Se debe de observar total transparencia y ausencia de turbidez en la columna del control negativo y blanco, mientras que en la columna que corresponde al control positivo debe de presentar turbidez.

Se comparan los pozos problema con los controles y el blanco y se determina si presentan turbidez o no. Si existe la presencia de turbidez y entre mas se asemejen al Control Positivo indican un crecimiento de la bacteria por lo cual el crecimiento de esta no se inhibe por el extracto que se esta probando. Los pozos que no presentan turbidez y entre más se asemejen al control negativo indican que no existe un crecimiento de la bacteria, por lo cual el extracto si presenta un efecto inhibitorio del crecimiento del microorganismo.

Nota: Se realiza la estandarización al 0.5 de Mac Farland hasta que se tenga las diluciones en microplaca.



5.8 Prueba de MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazollo)

Esta técnica permite observar y determinar fácilmente que pozos de la microplaca presentan crecimiento y en que pozos este se ha inhibido por acción del extracto. Se realizó adicionando a todos los pozos de la microplaca 5 µl de reactivo bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazollo (MTT) el cual presenta un color amarillo. Se incubó durante 15 a 30 minutos. Si no hay presencia de bacterias viables en el pozo el MTT permanecerá de color amarillo, mientras que si hay bacterias viables el MTT va a virar a color violeta/morado y así determinar la CMI, cuyo fundamento se basa en la reducción de la sal de tetrazolium (MTT) por medio de la enzima lactato deshidrogenasa o aspartato aminotransferasa, dando como producto de reacción el formazan que es una sal insoluble en agua de color violeta, cuyo cambio nos permite determinar la presencia de células vivas, con lo cual se dice que el extracto a probar esta inhibiendo o no su crecimiento, dando así sus propiedades antimicrobianas o antifúngicas de nuestro extracto..

5.9 Ensayo bactericida-bacteriostático

Después del tiempo de incubación de las microplacas y antes de agregar el reactivo de MTT, se tomó una asada de muestra de cada pozo y se sembró en una caja de agar BHI, incubándose durante 24 horas a 37° C.

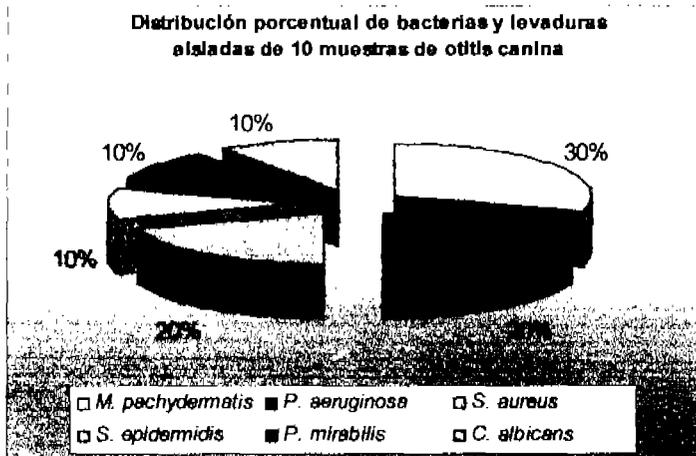


6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de bacterias y levaduras

Se recolectaron 10 muestras provenientes de exudados de perros con otitis externa, diferentes grupos de bacterias y levaduras se aislaron e identificaron en el Laboratorio de Microbiología, presentándose con mayor frecuencia *Malassezia pachydermatis* (3 / 30 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2 / 20 %), *Proteus mirabilis* (1 / 10 %), *Staphylococcus aureus* (2 / 20 %), *Staphylococcus epidermidis* (1 / 10 %), *Escherichia coli* (1 / 10 %) y *Candida albicans* (1 / 10 %) (Ver grafica 1).

Grafica 1. Porcentaje de aislamiento de bacterias y levaduras de casos clínicos de otitis canina.





6.2 Extracto propóleo

Se obtuvo un extracto de propóleo con calidad microbiológica (libre de cualquier contaminación por hongos o bacterias), con un rendimiento de 11.5 gramos/800ml.

Se preparó una solución del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

Tabla 5. Concentración de la solución de extracto

Tubo	Dilución	Concentración (mg/ml)
1	1:1	100
2	1:10	10
3	1:100	1
4	1:1000	0.1

Para cada solución de extracto de propóleo se le realizó una prueba de esterilidad en una placa de agar BHI, no hubo ningún tipo de crecimiento microbiano (ver imagen 9).

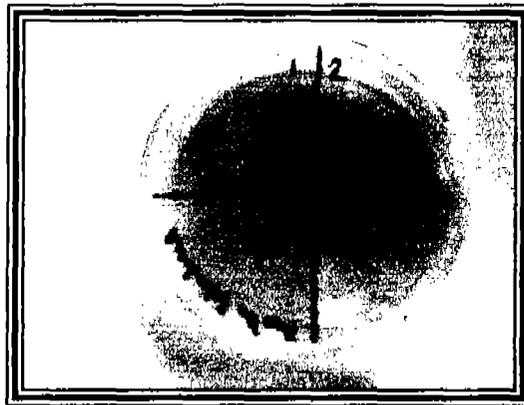


Imagen 9. Prueba de esterilidad del extracto de propóleo a las diferentes concentraciones.



6.3 Prueba cualitativa extracto-bacteria

En la prueba cualitativa se evaluó la susceptibilidad de las 7 cepas incluyendo bacterias y levaduras aisladas de casos de otitis canina, todas (100%) presentaron sensibilidad al extracto de propóleo a las diferentes concentraciones.

Para *Malassezia pachydermatis* nótese inhibición de crecimiento de dicha levadura a la concentración de 100 y 10 mg/ml (cuadrante 1 y 2 respectivamente), y para la concentraciones de 1 y 0.1 mg/ml (cuadrante 3 y 4 respectivamente) no hubo efecto inhibitorio (ver Imagen 10).



Imagen 10. Inhibición de crecimiento de *Malassezia pachydermatis* a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.

En *Candida albicans* se observa inhibición de crecimiento a la concentración de 100, 10 y 1 mg/ml (cuadrante 1, 2 y 3 respectivamente), y para 0.1 mg/ml (cuadrante 4) no observa inhibición (ver imagen 11).

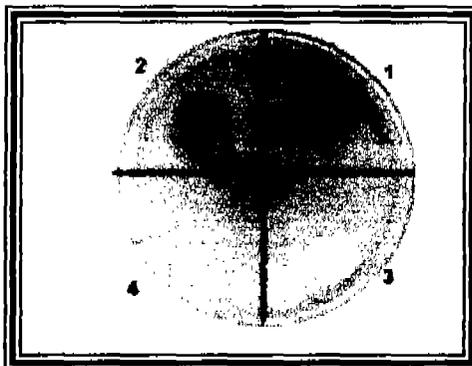


Imagen 11. Inhibición de crecimiento de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto propóleo.



Staphylococcus aureus se observa inhibición de crecimiento a la concentración de 100 y 10 mg/ml (cuadrantes 1 y 2 respectivamente) y para 1 y 0.1 mg/ml (cuadrante 3 y 4) no hay efecto inhibitorio (ver imagen 12).

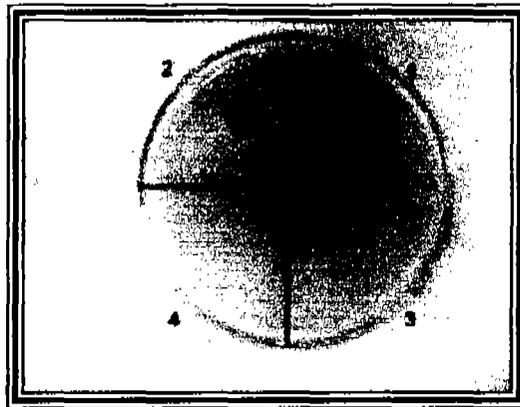


Imagen 12. Inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones de extracto de propóleo

Staphylococcus epidermidis se observa el efecto de inhibición a una concentración 100 mg/ml y 10 mg/ml (cuadrante 1 y 2), y para 1 y 0.1 mg/ml (cuadrante 3 y 4) no hay tal acción del propóleo (ver imagen 13).

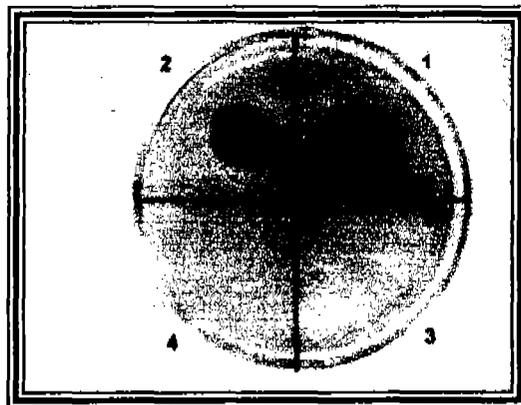


Imagen 13. Inhibición de crecimiento para *Staphylococcus epidermidis* a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.



En el caso de *Escherichia coli* la inhibición de crecimiento es mayor a una concentración de 100 mg/ml (cuadrante 1) que a 10 mg/ml (cuadrante 2) ya que observa ligeramente el efecto de inhibición. Para la concentración de 1 y 0.1 mg/ml (cuadrante 3 y 4) no hay efecto inhibitorio (ver imagen 14).

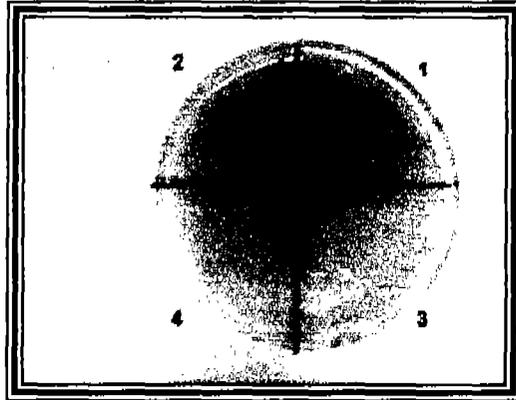


Imagen 14. Inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones del extracto propóleo.

Para *Pseudomonas aeruginosa* el halo de inhibición a una concentración de 100 mg/ml y menor a 10 mg/ml (cuadrante 1 y 2 respectivamente) y en la concentración de 1 y 0.1 mg/ml (cuadrante 3 y 4) no hay tal acción inhibitoria del propóleo (ver imagen 15).

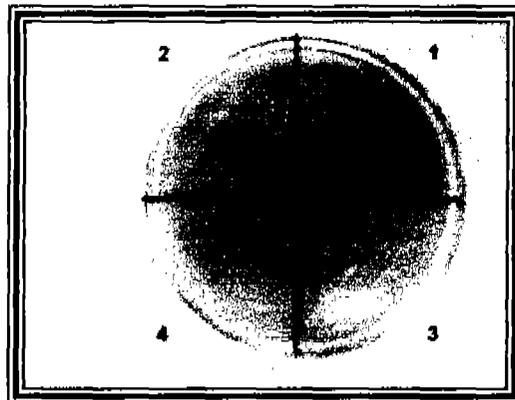


Imagen 15. Inhibición de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.



Por ultimo para *Proteus mirabilis* el efecto inhibitorio del extracto de propóleo se observa a la concentración de 100 mg/ml y muy ligeramente a 10 mg/ml (placa 1 y 2 respectivamente). Y no presenta efecto inhibitorio a una concentración de 1 y 0.1 mg/ml (placa 3 y 4) (ver imagen 16).

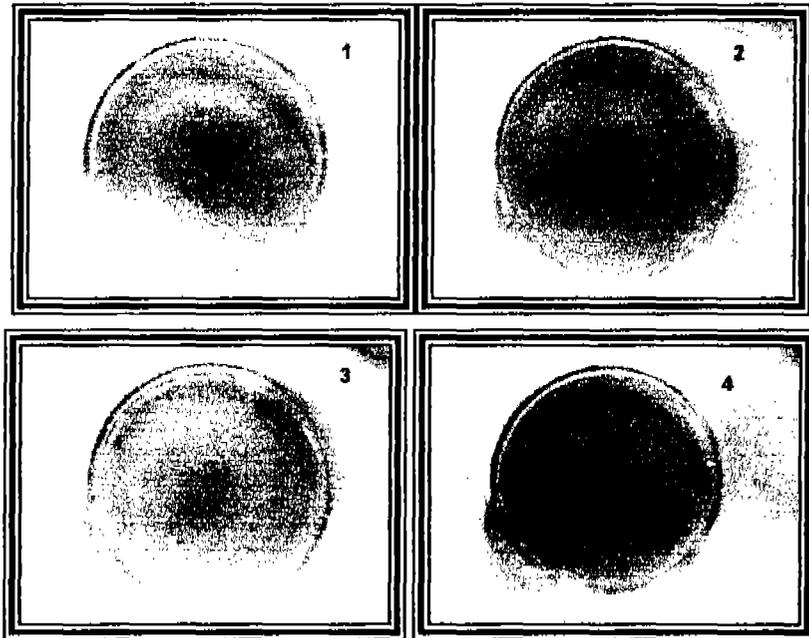


Imagen 16. Inhibición de crecimiento de *Proteus mirabilis* a diferentes concentraciones del extracto de propóleo.

Tabla 6. Concentraciones inhibitorias de crecimiento de extracto de propóleo sobre bacterias y/o levaduras.

Bacteria y/o levadura	Concentración mg/ml			
	100	10	1	0.1
<i>M. pachydermatis</i>	-	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	+/-	+	+
<i>P. mirabilis</i>	-	+/-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+/-	+	+

(-) Inhibición de crecimiento; (+) Hay crecimiento; (+/-) Ligero efecto inhibitorio



6.4 Prueba cuantitativa (técnica de Mosmann)

Se realizó el ensayo en microplaca extracto-bacteria por el Método de Mosmann, evidenciado dicha prueba con el reactivo de MTT, que en su forma reducida cambia de color morado púrpura, por acción de la enzima deshidrogenasa, la cual indica presencia de bacterias viables y al permanecer su color amarillo indica que no hay crecimiento de microorganismos, hay efecto inhibitorio de nuestro extracto (ver imagen 17).

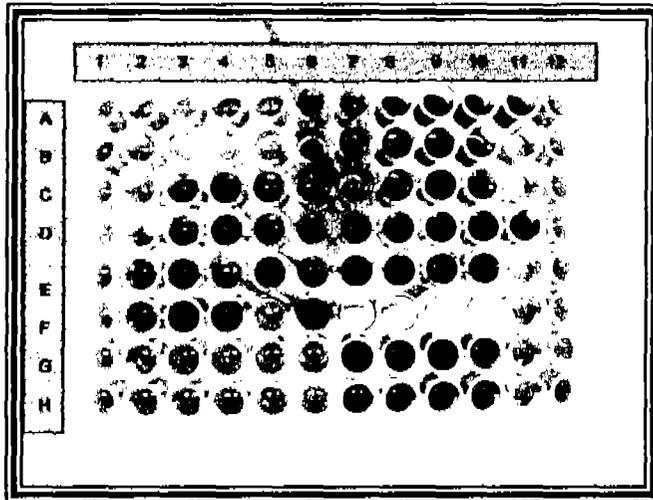


Imagen 17. Ensayo en microplaca extracto – bacteria. Inhibición de crecimiento (A-B) *Staphylococcus aureus*, (C-D) *Escherichia coli*, (E-F) *Proteus mirabilis*, (G-H), *Candida albicans*. (1-9) Diluciones del extracto de propóleo. (10) control positivo, (11) control negativo, (12) blanco.

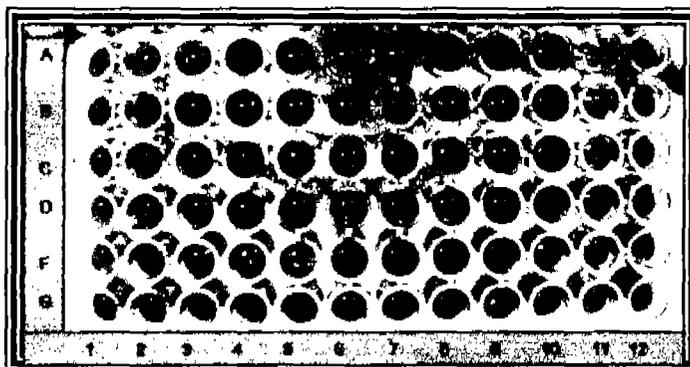


Imagen 18. Ensayo en microplaca extracto-bacteria. Inhibición de crecimiento. (A-B) *Staphylococcus epidermidis*, (C-D) *Malassezia pachydermatis*, (E-F) *Pseudomonas aeruginosa*. (1-9) Diluciones del extracto de propóleo. (10) control positivo, (11) control negativo, (12) blanco.



Una vez realizada una lectura visual del ensayo de la microplaca después de agregar el MTT determinamos las concentraciones mínimas inhibitorias de nuestro extracto (ver tabla 7).

Tabla 7. Lectura visual de la microplaca (extracto-bacterias y/o levaduras).

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C +	C -	B
	Concentración mg/ml											
Bacteria y/o levadura	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39			
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>M. pachydermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(-) No hubo crecimiento; (+) Hay crecimiento

Control positivo (C +): bacteria y/o levaduras en BHI + SSFE; Control negativo (C -): BHI sin bacteria y/o levadura + SSFE; Blanco (B): EP + BHI sin bacteria y/o levadura.

Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI's) del extracto de propóleo para bacterias y/o levaduras que manejamos en la microplaca (ver tabla 8).

Tabla 8. CMI del extracto de propóleo para bacterias y levaduras.

Clasificación	Microorganismo	CMI (mg/ml)
Levaduras	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100
	<i>Candida albicans</i>	3.12
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
Gram negativas	<i>Escherichia coli</i>	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
	<i>Proteus mirabilis</i>	100



6.5 Efecto bactericida-bacteriostático

Staphylococcus aureus. Del cuadrante 1-5 que corresponden a las concentraciones 100, 50, 25, 12.5 y CMI es 6.25 mg/ml en donde se observa el efecto bactericida (ver imagen 19).



Imagen 19. Ensayo bactericida bacteriostático de *Staphylococcus aureus*. 1, 2, 3, 4, ... diluciones del EP, 10: control positivo (SSF + bacteria en BHI), 11: control negativo (SSF + BHI), 12: blanco (EP + BHI).

Staphylococcus epidermidis. Se observa la acción bactericida a una concentración de 100, 50 y 25 mg/ml (cuadrante 1, 2 y 3 respectivamente), solo que en la segunda corrida dicho efecto se observa en los dos primeros cuadrantes (ver imagen 20).

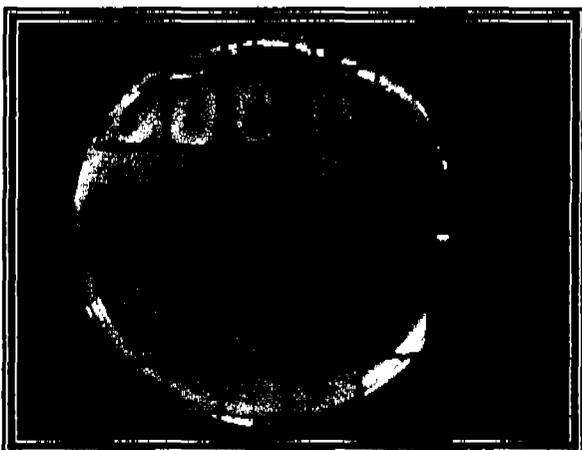


Imagen 20. Ensayo bactericida bacteriostático *Staphylococcus epidermidis*. 1, 2, 3, 4, ... diluciones del EP, 10: control positivo (SSF + bacteria en BHI), 11: control negativo (SSF + BHI), 12: blanco (EP + BHI).



7. DISCUSIÓN

La otitis es una enfermedad de etiología multifactorial que comúnmente afecta a caninos. Representa una patología compleja que se asocia a infecciones causadas por bacterias y levaduras y que muchas veces no corresponden a los tratamientos, debido a la diversidad de microorganismos que pueden proliferar en el conducto auditivo, muchos de ellos presentan una complejidad en la elección del antibiótico o antifúngico específico (Andrade, O. A. (2007).

La terapia para la otitis canina involucra a la polifarmacia, siendo generalmente prolongada y de elevado costo, lo que implica la discontinuidad del tratamiento y como consecuencia la resistencia de la patología o la recidiva de la misma. Cabe mencionar que los antibióticos de mayor uso por los médicos veterinarios son Ciprofloxacina, Ampicilina, Sulfametoxazol-trimetoprima, Cloramfenicol, Furazolidona, Cefotaxime y Gentamicina (Lozina, L. *et al.*, 2005).

Dado que mucha de la terapia a base de los antibióticos antes mencionados resulta ineficiente, surge la necesidad de formular presentaciones que no favorezcan la resistencia al igual que no sean tóxicos para el conducto auditivo del animal, realizando investigaciones en diferentes partes del mundo, buscando alternativas de tratamiento efectivas y económicas con productos naturales. De ahí nuestro objetivo principal del presente trabajo que es evaluar el efecto inhibitorio del extracto de propóleo en bacterias y levaduras causantes de otitis canina, cuyo fin es ofrecer una alternativa a futuro de tratamiento, con opción de proponer una forma farmacéutica, para dicho padecimiento.

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Este producto es ampliamente utilizado por sus variadas actividades biológicas, entre las cuales se pueden mencionar la antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana y antifúngica (Lozina, L. *et al.*, 2005).

Se lograron aislar bacterias Gram positivas, negativas y levaduras de casos de otitis canina, los porcentajes de aislamiento concuerdan con diferentes estudios, *Malassezia pachydermatis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con mayor frecuencia y menor *Proteus mirabilis* y *Candida albicans* (Andrade, O., 2007; Fernández, G. *et al.*, 2006; Lozina, L. *et al.*, 2005). Cabe mencionar que en estos trabajos el tamaño de muestras es mayor a la investigación realizada por nosotros.



Revisando publicaciones donde se evalúa el efecto de propóleo nos dimos a la tarea de realizar una prueba cualitativa extracto-bacteria/levadura en placa de agar BHI, para ello empezamos preparando una solución a base de glicerina, en la cual se observó dificultad al pipetear y al colocar sobre la superficie del agar, esto lo consideramos a que la glicerina es un material muy denso. Por lo que en la prueba cuantitativa utilizamos un disolvente orgánico, disolvimos el propóleo en 3 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO) y se llevó a un volumen total de 10 ml con glicerina estéril, esto para facilitar las diluciones en la microplaca.

En la prueba cualitativa vimos un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, ya que pudimos detectar que la inhibición del propóleo es más eficiente sobre levaduras y bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas. Esto lo consideramos a que la composición bioquímica de la pared celular debe estar influyendo en el mecanismo de acción de propóleo. Se podría comprobar en un trabajo a futuro por medio de la Microscopía Electrónica de Transmisión, tinción de azul de toluidina, tinción con bromuro de etidio, metodología que desarrollo Martínez C. para evidenciar el daño celular del propóleo, lo que nos pudiera ayudar a determinar el mecanismo de acción.

En el caso para *Proteus mirabilis* tuvimos a bien modificar la prueba comparada con el resto de las bacterias y levaduras ya que se podría tener resultados falsos-positivos, esto debido a que dicha bacteria invade toda la placa (efecto swarming), al igual que para el ensayo bactericida - bacteriostático no se realizó, debido a que se necesitaría una caja de agar por cada cuadrante.

En esta prueba cualitativa observamos que las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*) utilizadas en este estudio, con la concentración de 10 mg/ml hay una ligera inhibición de crecimiento comparadas con el resto de bacterias y levaduras, por lo que estaríamos hablando de un efecto bacteriostático para dichos microorganismos a dicha concentración. En *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Malassezia pachydermatis* el efecto inhibitorio del propóleo se nota a 100 y 10 mg/ml y para *Candida albicans* dicho efecto se presenta hasta la concentración de 1 mg/ml.

Con base en los resultados obtenidos de la prueba cualitativa se observó que todas las bacterias y levaduras tratadas con el extracto de propóleo, presentaron sensibilidad. Por lo que para la prueba cuantitativa la concentración inicial y de donde se partió para las diluciones de la microplaca fue de 100 mg/ml.

En artículos revisados se menciona la actividad antibacteriana y antifúngica del propóleo, en casos de otitis canina se utiliza al propóleo con etanol (a diferentes grados), así como lo mencionan otros artículos (Bombarda, F., 2007; Alentar, S. *et al.*, 2007; Li-Chang Lu *et al.*,



2005; Enzo, A. *et al.*, 2007). En nuestro caso solo se extrae con etanol y se evapora en una estufa a 50 ° C para eliminarlo, debido a que el etanol es un antiséptico que puede influir en el efecto del propóleo sobre bacterias y levaduras en otitis canina, además a que este disolvente puede presentar algún daño e irritabilidad al oído del animal, puesto que el objetivo de nuestro trabajo de investigación como se menciona anteriormente es ofrecer una alternativa de tratamiento.

Se han realizado diferentes estudios previos sobre el efecto de propóleo, en bacterias y levaduras de casos de otitis, utilizando técnicas como: difusión en agar (método Kirby Bauer) esta técnica se utiliza para evaluar la sensibilidad a antibióticos, dilución en agar o dilución en Caldo evaluándose el halo de inhibición y turbidez al igual que se han probado propóleos de diferentes orígenes, donde la composición del propóleos varía de acuerdo a la vegetación que pueda encontrarse en cada región específica. Sin embargo, han demostrado efectos similares antimicrobianos, antifúngicos y antivirales, lo que hace pensar que la acción biológica del propóleos no se debe a uno de sus componentes en particular como único elemento responsable de las acciones estudiadas, lo que sugiere un sinergismo entre los constituyentes (Bosio, K., 2000).

En el trabajo realizado por Kujumgjev, A. *et al.*, 1999 se ha evaluó el efecto del extracto etanólico de propóleo en bacterias causantes de otitis canina, utilizando propilenglicol y su acción sinérgica con antibióticos. Sin embargo, en los resultados sobre algunas bacterias el efecto es mayor, no así en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, quienes son más resistentes. Es por ello que nosotros preparamos una solución de propóleo glicerina.

Para la prueba cuantitativa, se utilizó la técnica de microdilución en placa, ya que alguna de las ventajas es utilizar volúmenes pequeños de reactivos de un modo simple, aunque en el aspecto económico, el costo es elevado en la compra de microplaca, pero también cabe mencionar que éste método nos proporciona resultados cuantitativos y cualitativos más confiables.

En experimentaciones previas, utilizan la técnica de Mosmann ya que es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de las células viables para transformar la sal MTT tetrazolium a MTT formazan (Denis G. *et al.*, 1986), por medio de esta se ha determinado el efecto citotóxico de algunos extractos sobre líneas celulares (Bolaños U. *et al.*, 2007) o las CMI sobre bacterias como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus grupo A*, *Escherichia coli* entre otras, obteniendo resultados importantes. Apoyándonos en este fundamento y sabiendo que las bacterias producen este tipo de enzimas, necesarias para generar ATP, donde la reacción es simple y por lo tanto el MTT (oxidado) de color amarillo



pasa a la forma MTT formazan (reducido) originando un precipitado púrpura, optamos por usar dicho procedimiento.

Se han reportado Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI's) del propóleo: Martínez U. C, 2008, en *Candida albicans* ATCC 10231 de 0.6 mg/ml y un efecto bactericida de 0.8 mg/ml a partir de la 5ª hora mediante una curva de crecimiento; Barrios C. G., 2008 reporta MIC's para *Staphylococcus aureus* 6.25 mg/ml, *Streptococcus agalactiae* 50 mg/ml, *Staphylococcus epidermidis* 25 mg/ml, *Pseudomonas putida* 12.5 mg/ml, *Escherichia coli* 6.25 mg/ml; Ling Chang Lu *et al.*, 2007 para *Staphylococcus aureus* de 3.75 µg/µl a 60 µg/µl; y Lozina, L. *et al.*, 2005, en *Malassezia pachydermatis* 0.30 mg/ml.

Nosotros logramos determinar las CMI para bacterias y levaduras aisladas de casos de otitis canina: *Staphylococcus aureus* 6.25, *Staphylococcus epidermidis* 25, *Pseudomonas aeruginosa* 100, *Escherichia coli* 50, *Proteus mirabilis* 100, *Malassezia pachydermatis* 100 y *Candida albicans* 3.12 mg/ml.

Como podemos observar las concentraciones son muy parecidas para *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* excepto para *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Lo consideramos debido a la diferencia en los disolventes, origen del propóleo, además cabe señalar que las bacterias que se utilizan en estudios previos son de una colección ATCC y en nuestra Investigación son aislamientos de casos clínicos de otitis canina.

En la prueba cualitativa no se determinaron CMI, solo se evaluó el efecto inhibitorio del extracto, ya que como vemos las concentraciones inhibitorias son ligeramente menores a las obtenidas en la técnica de Mosmann a excepción de *Staphylococcus aureus*, por lo que pudiera uno pensar que la solución del extracto con DMSO que se trabajó en la microplaca estuviera influyendo en los resultados obtenidos, aunque nosotros no realizamos una prueba sobre el efecto del DMSO, en una Investigación previa realizado por Cortés, J. A., 2008, en nuestro laboratorio se reportó que este reactivo no influye en la actividad de propóleo.

Con lo que respecta al ensayo bactericida-bacteriostático del extracto de propóleo se observa un efecto bactericida para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y levaduras (*Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*) a diferentes concentraciones y un efecto bacteriostático en bacterias Gram negativas.

Con base a los resultados obtenidos "in vitro" se demuestra y confirma que todas las bacterias y levaduras que manejamos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Malassezia pachydermatis* y



Candida albicans, presentaron sensibilidad al extracto de propóleo a diferentes concentraciones. Por lo que podemos decir que la solución de propóleo-glicerina a la concentración preparada es una alternativa para pacientes con otitis, ya sea, que se encuentre el microorganismo solo o combinadas bacterias y/o levaduras, ya que todas (100%) presentan inhibición de crecimiento a una concentración de 100 mg/ml, lo que prevé a no utilizar antibióticos específicos, como es el caso para *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* que son bacterias muy complicadas de tratar ya que son muy reincidentes y generan resistencia bacteriana por lo que hay que elegir el antibiótico correcto.

Además de las propiedades antimicóticas y antimicrobianas del propóleo, tiene propiedades antiinflamatorias, antialérgicas lo que podría ayudar al alivio de los síntomas y la mejora del cuadro clínico del animal.

La expectativa de nuestro trabajo de investigación fue evaluar el efecto inhibitorio del propóleo en microorganismos patógenos causantes de otitis canina, aunado a proponer una forma farmacéutica (solución ótica) para dicho padecimiento, la cual se ha estado aplicando a pacientes con otitis canina y lesiones externas, obteniendo resultados favorables.

También debemos mencionar que es difícil la obtención de propóleo así como la adulteración, es por ello que el costo de esta resina es muy elevado, pero el rendimiento es muy bueno, lo que representa ventajas para la posible elaboración de una forma farmacéutica.



8. CONCLUSIONES

- Se cumplieron satisfactoriamente los objetivos aunado a los resultados obtenidos que nos muestran que el extracto de propóleo tiene efecto bactericida y fungicida.
- Obtuvimos un extracto seco total de propóleo con calidad microbiológica (sin contaminación microbiana).
- Se evaluó el efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre bacterias y levaduras (*Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), mediante una prueba cualitativa extracto-bacteria
- Determinamos las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de propóleo para bacterias y levaduras antes mencionadas (100, 3.12, 100, 100, 50, 6.25 y 25 mg/ml respectivamente) por el Método Colorimétrico de Mosmann.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, proponemos preparar la solución de extracto de propóleo a una concentración de 1g / 100 ml, como una posible alternativa de tratamiento en otitis canina.



9. APENDICE

9.1 Preparación de reactivos

MTT

Disolver 5 mg/ml de MTT en RPMI-1640 sin rojo de fenol.

Filtrar con membrana de 0.22 μm .

Guardar a una temperatura de 4° C, hasta su uso (Denis, G. *et al.*, 1986).

SSF estéril

Por cada 100 ml de agua destilada agregar 850 mg de NaCl.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras de presión de vapor durante 15 minutos (Koch, A.L. 1994).



10. ANEXO

10.1 Propiedades del DMSO y MTT

DMSO (Dimetil sulfóxido)

Es un líquido orgánico altamente polar y miscible. Es básicamente inodoro y tiene un bajo nivel de toxicidad. El DMSO es un solvente aprotico bipolar y tiene un punto de ebullición relativamente alto.

El DMSO es un disolvente único versátil, tiene una constante dieléctrica alta (491) pero no forma enlace de hidrogeno en estado puro. Es un disolvente poderoso para iones inorgánicos y compuestos orgánicos.

El DMSO penetra fácilmente la piel, usado para promover la absorción epidérmica de fármacos; sin embargo, el DMSO puede causar la absorción de suciedad y veneno (65).

MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)

Es un colorante amarillo soluble en agua derivado de sales de tetrazolio, el cual es reducido por las células vivas a un producto formazan azul insoluble en soluciones acuosas. La cantidad de formazan generado es directamente proporcional al número de células viables (Kelen, M. *et al.*, 2008). Las células en fase de crecimiento exponencial son expuestas a las sustancias que se desean evaluar y se dejan crecer por dos o tres ciclos con el propósito de distinguir entre las células que permanecen viables y son capaces de proliferar (66).



11. REFERENCIAS

1. Aiden, P. (1998). The Role of Pseudomonas in Canine Ear Disease. Compendium on continuing education for the Practicing Veterinarian. (US). 8(8):1-35p.
2. Alencar, S. A.; Oldoni T. C.; Castro, M. L.; Costa-Neto C. M.; Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. Journal of Ethnopharmacology. 113: 278-283.
3. Andrade, O. A. (2007). Sensibilidad a la gentamicina por los microorganismos productores de otitis bacteriana en caninos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
4. Angus, J. (2004). Otic cytology in health and disease. Veterinarian Clinic North American Small Animal Practical. 34: 411-424.
5. August, J. (1988). Otitis externa. A disease of multifactorial etiology. Veterinarian Clinic North American Small Animal Practical. 18: 731-742.
6. Baksi, S.; Jana, P.; Chakrabarth, A. (2004). Bacterial otitis externa in dogs and its treatment. Indian Veterinarian Journal. 81: 1402-1403.
7. Bankova, V.; Cristov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M. C.; Popov, S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian Propolis. Z. Naturforsch. 50:167-172.
8. Bankova, V. (2000). Determining quality in propolis samples. Journal American Aphiter. 7; 2: 24-23.
9. Bedascarrasbure, E.; Maldonado, I.; Álvarez, A.; Rodríguez, E. (2003). Contenidos de Propóleos Argentinos. Boletín Apícola. Trimestral N° 24: pp. 7-10.
10. Bolaños, U. y Yañez, L. (2007). Efecto promotor en líneas celulares (BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD) por extractos de *Caléndula officinalis*. pp. 25.
11. Bombarda, de A. F.; Aparecido, T. S.; Brando, G. R. (2007). Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens; 104: 709-716.



12. Bosio, K.; Avanzini, C.; Davolio, A.; Ozino, O. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 31: 234-256.
13. Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicology*; 36: 347-363.
14. Cafarchia, C.; Laurentis, N.; Millillo, M. A.; Losacco, V.; Pucchi, V. (1999). Antifungal activity of Apulia region propolis. 41: 587-590.
15. Carlotti, D. (1991). Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *Journal Small Animal Practical*. 32: 394-400.
16. Carlotti, D. (1997). Otitis externa in the dog. Aetiology and clinical findings; literature review and retrospective study of 752 cases. *Practical Medical Animal Compendium* 32, 243-257.
17. Carlotti, D. y Tailliev, R. (1998). Otitis Externa en caninos; etiología y clínica. *Ciencia Veterinaria – animales domésticos*. pp. 25-30.
18. Ciane, E. (1997). The past and present importance of bee products to man. *Bee of products: properties, applications, and apitherapy* plenum press. New York pp.1-114.
19. Colombini, S.; Merchant, S.; Hosgood, G. (2000). Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. *Veterinarian Dermatology*. 11: 235-239.
20. Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Review*. 12(4): 564-582.
21. Denis, G.; Nicole, T. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods*. 94: 57-63.
22. Díaz, M. y Anet, R. (2005). *Otitis Media*. 5 ed. Argentina, Inter-Médica, pp. 233-256.
23. Duarte, S.; KooH, W. H.; Hayclbara, M. F.; Cury, J. A.; Ikegaky, M.; Park, Y. K.; Rosalen, D. L. (2003). Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological Pharmaceutical Bulletin*; 26: 527-531.



24. Efecto del extracto de *Caléndula officinalis* (mercadela) y *Ammphlpterygium Adstringens* (cuachalalate) en cultivos celulares evidenciado por el Método Colorimétrico de Mosmann. (2006). Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, volumen 6, Suplemento Sociedad Española de Fitoterapia, pp. 109.
25. Enzo, A.; Tosi, E. R.; Ortega, M. E.; Cazzoli A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104: 1025-1029.
26. Ettinger, S. y Feldman, E. (2002). Tratado de medicina interna veterinaria. Trad. R.A. Taibo. 5 ed. Argentina, Inter-Médica. pp.1180.
27. Fernandez, G.; Barboza, G.; Villalobos, A.; Parra, O.; Finol, G.; Ramirez, R. A. (2006). Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en 53 perros enfermos de otitis canina. *Revista Científica. Universidad del Zulia Maracaibo Venezuela*. pp. 23-30.
28. Foster, A. y Deboer, D. (1998). The role of *Pseudomonas* in canine ear disease. *Compend Cont Ed*. 20: 909-918.
29. Gotthelf, L. (2001). Examen del conducto auditivo externo. *Enfermedades del oído en animales de compañía Intermédica Buenos Aires*. pp. 26-44.
30. Gotthelf, L. (2004). Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Veterinarian Clinic North American Small Animal Practcal*. 34: 469-487.
31. Grono, L. R. (1969). Observations on the incidence of Otitis externa in the dog. *Aust. Veterinarian Journal*. 45 (9): 417-419.
32. Grono, L. R.; Frost, A. J. (1969). Otitis externa in the dog. The microbiology of the normal and affected external ear canal. *Journal Veterinarian Aust*. 45 (9): 420-422.
33. Han, S. K.; Park, H. K. (1995). A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP protein change of meat products. *Korean Journal of Animal Science*. 37: 551-557.
34. Hausteen, B., (2002). The Biochemistry and medical Significance of the flavonoids. *Pharmacology and therapeutic*. 96: 67-202.



35. Hayes, H.; Picle, L.; Wilson, G. (1987). Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa. *Research Veterinary Science*. 42: 294-298.
36. Hegazi, A. G.; Abd, E. I.; Hady, F. K.; Abd, F. A. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch*. 55:70-75.
37. Huang, H. Y Huang H. (1999). Effects of ear type, sex, age, body weight, and climate on temperatures in the external acoustic meatus of dogs. *American Journal Veterinarian Research*. 60: 1173-176.
38. Ivanovska, N. D.; Dimov V. B.; Bankova V. S.; Popov, S. S. (1995). Immunodulatory action of propolis. IV. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. *Journal Ethopharmacology*. 47: 145-147.
39. Kelen, M. y Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora, *Bioresource Technology*. 99: 4096-4104.
40. Koch, A. L. (1994). Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. . In P. Gerhardt ed. pp. 255
41. Koneman, E. W. (1999) Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas.
42. Kujumgiev, A.; Bankova, V.; Popov, S. (1993). Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie* 48: 785-786.
43. Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethopharmacology*. 64: 235-240.
44. Lanz, O. y Wood, B. (2004). Surgery of the ear and pinna. *Veterinarian Clinic North American Small Animal Practical*. 34: 567-599.
45. Li-Chang, L.; Yue-Wen, C.; Cheng-Chun, C. (2005) Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of food Microbiology*. 102; 213-220.



46. Lozina, L.; Boehringer, S. A.; Koscińczuk, P.; Acosta de Pérez, O. C. (2006). Resultados preliminares para determinar la eficacia terapéutica de gotas óticas con propóleos en el tratamiento de otitis externas en caninos. Universidad Nacional del Nordeste.
47. Lozina, L.; Acosta de Pérez, O.; Boehringer, S.; Teibler, P. (2005). Acción del propóleos sobre una levadura (*Malassezia pachydermatis*) aislada a partir de otitis canina. Revista Veterinaria. 16: 32-35.
48. Lozina, L.; Ramirez, G.; Acosta de Pérez, O. (2008). Actividad y sinergismo de propóleos y antibióticos sobre bacterias aisladas de otitis canina: estudios preliminares Universidad Nacional del Nordeste.
49. Masuda, A.; Sukegawa, T.; Mizumoto, N.; Tani, H.; Miyamoto, T.; Saclá, K. y Baba, E. (2000). Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. Journal Veterinarian Medical Science. 62: 1177-1182.
50. Mckeever, P. J. (1999). Otitis Externa en Locke P. H., Harvey R.G., Mason I.S. Eds. Manual de Dermatología en pequeñas especies. Madrid. Harcourt: pp. 147-158.
51. Metzner, J.; Bekemeier, H.; Paintz, M.; Schedewind, E. (1979). On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. Pharmazie. 34: 97-102.
52. Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N.; Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, microbiology research. September; 152(3): 239-246.
53. Morris, D. (2004). Medical therapy of otitis externa and otitis media. Veterinarian Clinician North American Small Animal Practical. 34: 541-555.
54. Mosmann, T. *et al.* (1983). Journal Immunology Methods. (65)1: 55-63.
55. Osthold, W.; Beck, J.; Stechmann, K.; Hofmann, T. (2005). Ear cytology in small animal practice – adspection, parasitologic and cytologic aspects. pp. 86, 390.
56. Rosser, E. (1993). Diagnosis of food allergy in dogs. Journal American Veterinarian Medical Association. 203, 259.



57. Rosser, E. (2004). Causes of otitis externa. *Veterinarian Clinic North American Small Animal Practical*. 34: 459-468.
58. Rosychuk, R. (1994). Management of otitis externa. *Veterinarian Clinic North American Small Animal Practical*. 24: 921-952.
59. Scazzocchio, F. D.; Auria F. D.; Alessandrini, D.; Pantanella F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiology Research*; 101: 327-333.
60. Scott, D. W. (1980). External ears disorders. *Journal American Animal Association*. 16: 426-433.
61. Sumano, H. S. y Ocampo, L. (1997). *Farmacología Veterinaria*. 2 ed. México, Editorials McGraw-Hill/Interamericana, pp. 690.
62. Takaisi-Kikuni, N. B. y Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta medicinal*; 60(3): 222-227.
63. Wayne, D. V. (2005). Tratamiento de la otitis aguda. *Revista digital*.
64. White, P. (1999). Medical Management of Chronic Otitis in Dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*; (US) 8(21):1-28.
65. http://www.gaylordchemical.com/bulletins/Bulletin101B_spanish/bulletin101b_spanish.pdf
66. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012107932007000100002&script=sci_artesxt