



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE
Microsporium canis”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

PERLA ALEJANDRA ESTRADA GARCÍA

ASESOR: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

COASESOR: Dra. Amparo Londoño Orozco.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

"EVALUACIÓN in vitro DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE *Microsporium canis*"

Que presenta la pasante: **Perla Alejandra Estrada García**

Con número de cuenta: **40601956-3** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 5 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------------|-------------------------------------|--------------|
| PRESIDENTE | Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez | |
| VOCAL | MVZ. Silviano Trejo Nuñez | |
| SECRETARIO | MC. Enrique Flores Gasca | |
| 1er SUPLENTE | MC. Javier Froylan Lazcano Reyes | |
| 2do SUPLENTE | MVZ. Edna Martínez Aguilera | |

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 223811-3 Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

AGRADECIMIENTOS

A ti querida Universidad, por darme la oportunidad de ser parte de ti, de brindarme conocimiento y oportunidades a manos llenas.

A mis Asesores: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez y Dra. Amparo Londoño Orozco, gracias por la oportunidad que me dieron de trabajar con ustedes, gracias por la confianza que depositaron en mi, gracias por su paciencia y apoyo en esta etapa de transición de estudiante a profesionista, gracias por compartir su conocimiento y su tiempo para la elaboración de este trabajo. Mi admiración y respeto es para ustedes porque antes que ser excelentes académicos, son excelentes seres humanos.

Al laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM por la donación de la cepa de *Microsporum canis* utilizada en este trabajo.

A la M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández y al MVZ Marco Mendoza Saavedra, por su amistad y apoyo en la elaboración del presente trabajo.

A mis profesores, por compartir su conocimiento.

Dedicado a:

A ti mi querido Señor, ¿Qué puedo hacer o decir que sea suficiente para agradecer todo lo que has hecho en mi vida? Nunca olvidaré de donde me rescataste y hasta donde me has traído, sabiendo que todo lo que soy y lo que tengo es por tu gracia. Siempre me has amado, siempre has estado conmigo, siempre me has ayudado y sustentado, gracias Papito.

A ti Mami por sacrificar tu vida y dar todo tu esfuerzo por brindarnos todo lo necesario para hacer de nosotros personas de bien, por hacerte cargo de nuestra vida con sabiduría y entereza a pesar de la adversidad. Mi más profundo agradecimiento, amor, respeto y admiración son para ti. Te amo mi querida mujer virtuosa, cuando sea grande quiero ser como tú. (Proverbios 31:10-31)

A ti Papá, con tu ejemplo me has enseñado el valor del trabajo, la responsabilidad y el compromiso. Gracias por tu presencia y apoyo en estos momentos tan especiales. Te amo y te admiro Papi, Dios te bendiga grandemente. (Proverbios 22:6)

A ti Rex, espero ser un buen ejemplo para ti en todos los aspectos de la vida, o al menos que aprendas de mi lo que no se debe de hacer, gracias por tu apoyo, Te amo. (Proverbios 17:17)

A la familia Pineda Estrada por su apoyo incondicional, gracias de todo corazón, los quiero mucho mucho.

A ti mi Cris, por ser mi compañero de carrera y de vida, por tu apoyo y amor sincero, por tomar mi mano cuando ya no podía más y animarme cuando ya no quería seguir, sin ti hubiese sido doblemente difícil llegar hasta aquí. Doy gracias a Dios por la gran bendición que ha sido el tenerte en mi vida, mi admiración y respeto son para ti. TE AMOOO!! (Eclesiastés 4:9-12)

A la familia López Zamora por el apoyo, cariño y atenciones que han tenido para conmigo, de todo corazón muchísimas gracias.

A la MVZ Dipl. Blanca Portillo y al M. en C. Ernesto Lobato, gracias por compartir sus conocimientos conmigo, por ayudarme cuando lo he necesitado y por ser mis Médicos Veterinarios de cabecera.

A mis queridos compañeros cuadrúpedos: Ary y Tongo, por su amor y fidelidad, por desvelarse conmigo haciendo tareas y estudiando, además de ser mis conejillos de indias. Son una gran bendición para mí.

A todos mis familiares y amigos que me apoyaron y que por cuestión de espacio no está su nombre en esta pequeña lista, muchas gracias, cada uno de ustedes sabe en qué manera contribuyó para que éste logro fuera posible.



ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN | |
| 1. La piel..... | 2 |
| 1.1 Funciones de la piel | 2 |
| 1.2 Estructura de la piel | 2 |
| 1.2.1 Epidermis..... | 3 |
| 1.2.2 Dermis..... | 4 |
| 1.2.3 Hipodermis..... | 4 |
| 1.2.4 Anexos de la piel..... | 4 |
| 2. Dermatofitosis..... | 8 |
| 2.1 Definición..... | 8 |
| 2.2 Etiología..... | 8 |
| 2.3 Clasificación de los dermatofitos..... | 8 |
| 3. Dermatofitosis por <i>Microsporum canis</i> | 8 |
| 3.1 Características de <i>Microsporum canis</i> | 8 |
| 3.2 Epidemiología..... | 11 |
| 3.3 Factores predisponentes..... | 12 |
| 3.4 Patogenia..... | 13 |
| 3.5 Cuadro clínico..... | 13 |
| 3.6 Diagnóstico..... | 16 |
| 3.7 Diagnóstico diferencial..... | 18 |
| 3.8 Tratamiento..... | 18 |
| 3.8.1 Efectos adversos de los antifúngicos utilizados en el tratamiento de dermatofitosis..... | 21 |
| 3.9 Prevención..... | 22 |
| 4. Propóleo..... | 23 |
| 4.1 Generalidades..... | 23 |
| 4.2 Antecedentes históricos..... | 24 |
| 4.3 Composición química..... | 25 |
| 4.4 Propiedades terapéuticas..... | 27 |
| 4.5 Actividad antimicrobiana..... | 27 |
| 4.6 Usos del propóleo en medicina veterinaria..... | 29 |
| 4.7 Propóleos Mexicanos..... | 29 |
| 4.7.1 Propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM)..... | 30 |
| OBJETIVOS..... | 31 |
| HIPÓTESIS..... | 32 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 34 |
| RESULTADOS..... | 37 |
| DISCUSIÓN..... | 52 |
| CONCLUSIONES..... | 55 |
| RECOMENDACIONES..... | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS:

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1.- Estructura de la piel..... | 3 |
| Figura 2.- Ciclo de crecimiento del pelo..... | 5 |
| Figura 3.- Cultivo de <i>M. canis</i> en agar Borelli..... | 10 |
| Figura 4.- <i>M. canis</i> , tinción de azul de algodón 40x..... | 10 |
| Figura 5.- Dos presentaciones de Tiña de la cabeza de tipo Microspórico..... | 12 |
| Figura 6.- Infección por <i>M. canis</i> en un gato..... | 14 |
| Figura 7.- Lesión por <i>M. canis</i> en la pata de un gato..... | 14 |
| Figura 8.- Infección por <i>M. canis</i> en una perra de tres meses..... | 15 |
| Figura 9.- Vacuna inactivada de <i>M. canis</i> | 22 |
| Figura10.- Propóleo en trozos, recolectado en la FESC..... | 24 |
| Figura11.- Control de etanol, prueba de inhibición de crecimiento radial..... | 37 |
| Figura12.- Controles de ketoconazol y clotrimazol, prueba de inhibición del crecimiento radial..... | 38 |
| Figura13.- Medias lunas formadas por la inhibición del propóleo, prueba de inhibición del crecimiento radial..... | 39 |
| Figura14.- Placa de 24 pozos a los 7 días de incubación..... | 40 |
| Figura15.- Control de <i>M. canis</i> en comparación con <i>M. canis</i> tratado con EEP Azul de algodón 40x..... | 46 |
| Figura16.- Control de <i>M. canis</i> en comparación con <i>M. canis</i> tratado con EEP Azul de algodón 40x..... | 46 |
| Figura17.- Alteraciones en los macroconidios de <i>M. canis</i> tratado con EEP Azul de algodón 40x..... | 47 |
| Figura18.- Control de <i>M. canis</i> y <i>M. canis</i> tratado con EEP a las 30 horas, blanco de calcoflúor 40x..... | 48 |
| Figura19.- <i>M. canis</i> tratado con EEP a diversas concentraciones a las 30 horas de incubación..... | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla 1.- Principales componentes químicos del propóleo..... | 26 |
| Tabla 2.- Diámetro de las colonias de <i>M. canis</i> y porcentaje de inhibición del crecimiento..... | 41 |
| Tabla 3.- Promedio del diámetro de macroconidios de <i>M. canis</i> en μm | 43 |
| Tabla 4.- Alteraciones de los macroconidios de <i>M. canis</i> tratado con EEP... | 45 |
| Tabla 5.- Mediciones del diámetro de las colonias de <i>M. canis</i> en la determinación de la CFM..... | 51 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS:

| | Página |
|---|---------------|
| Gráfica 1.- Reducción del crecimiento de <i>M. canis</i> , prueba de dilución en placa de 24 pozos..... | 42 |
| Gráfica 2.- Comparación del diámetro de los macroconidios entre <i>M. canis</i> , control y tratado con EEP..... | 44 |

RESUMEN

De todas las patologías que se presentan en los perros y gatos, las de la piel son las más frecuentes, es por esto que los desórdenes dermatológicos constituyen una de las principales causas de consulta en la clínica de pequeños animales. Las dermatofitosis o “tiñas” son infecciones cutáneas superficiales en humanos y animales causadas por dermatofitos.

En el presente trabajo se evaluó la eficacia antimicótica del propóleo contra *Microsporum canis* con la finalidad de proporcionar las bases para elaborar una nueva alternativa terapéutica a base de propóleo que sea efectiva, con menor número de contraindicaciones y efectos colaterales que se presentan con los fármacos de uso convencional.

Se determinó de manera cualitativa que el extracto etanólico de propóleo (EEP) causó inhibición del crecimiento sobre *Microsporum canis* por medio de la prueba de inhibición de crecimiento radial. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo sobre la cepa de *Microsporum canis* por el método de dilución en agar en placa de 24 pozos, siendo de 0.5 mg/ml. También se evaluó el daño celular de manera cualitativa y cuantitativa sobre la cepa de *Microsporum canis* producido por el extracto etanólico de propóleo mediante microscopía óptica y análisis de imagen, en la evaluación de tipo cualitativa se encontraron alteraciones de tipo morfológicas en las características del citoplasma de *M. canis* tratado con EEP a diferencia de *M. canis* sin tratamiento, en donde no se hallaron esas alteraciones. En referencia a la evaluación cuantitativa se comparó el diámetro de los macroconidios de *M. canis* tratados con EEP y los de *M. canis* del grupo control en donde no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Se determinó la concentración fungicida mínima (CFM) del EEP para *M. canis* siendo de 1.5 mg/ml a partir de las 5 horas de incubación así como también a una concentración de 0.5 mg/ml a partir de las 30 horas de incubación.

Estos resultados demuestran la existencia de un efecto fungicida del propóleo y proporcionan un panorama muy alentador para la realización de futuros estudios en relación al tratamiento con propóleo en casos de dermatofitosis animal y humana.

INTRODUCCIÓN

1. LA PIEL

La piel es el órgano más grande del organismo y realiza una gran variedad de funciones vitales para el mantenimiento de la homeostasis corporal,^{30,54} constituye la barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el medio ambiente.^{13,54} Al ser parte de un sistema, constituye un reflejo del funcionamiento de órganos internos y procesos patológicos.³³

1.1 Funciones de la piel

La piel desarrolla diversas funciones tales como: termorregulación, barrera envolvente (evitando la pérdida de agua y electrolitos), protección de órganos internos, da forma al cuerpo y permite movimiento al mismo, produce estructuras queratinizadas como pelo, uñas y el estrato córneo de la epidermis, funciona como reservorio (agua, electrolitos, vitaminas, grasas, carbohidratos, proteínas y otras sustancias), percepción sensorial, inmunorregulación, pigmentación: secreción y excreción de sustancias, producción de vitamina D y control hemodinámico.^{30,54}

El aspecto de la piel, su color, elasticidad, grosor, irrigación sanguínea, inervación y textura, dependen de diversos factores tales como: especie, raza, sexo, edad, región anatómica, nutrición y estado fisiológico, entre otros.³³ El pH de la superficie cutánea, en el perro y el gato es generalmente ácido (variando de 5.5 a 7.5).^{33,54}

1.2 Estructura de la piel

Anatómicamente la piel está formada por dos capas: la epidermis o capa externa y la dermis o capa interna, estos dos componentes son interdependientes. La hipodermis corresponde al tejido subcutáneo sobre el cual descansa la piel.^{19,33,54} La piel, el pelo y el tejido subcutáneo representan el 24% del peso corporal de un cachorro recién nacido y cuando el animal alcanza la madurez, estas estructuras constituyen sólo el 12% del peso corporal.¹³ (ver figura 1).

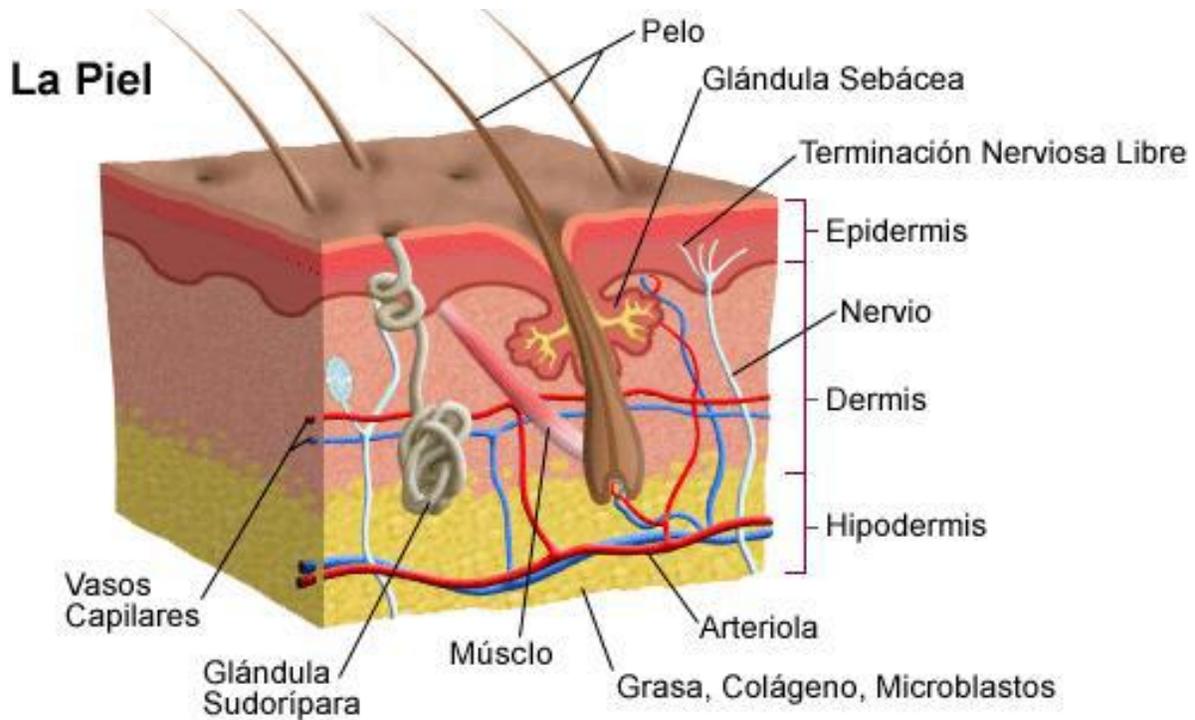


Figura 1: Estructura de la piel (Vera, 2009)

1.2.1 Epidermis

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado queratinizado que cubre todo el cuerpo y está unido a las mucosas que cubren las cavidades corporales. Su grosor varía de una zona a otra, oscilando entre 0.1 y 0.5 mm, se compone de cuatro capas que son, de profunda a superficial:

- Estrato basal.
- Estrato espinoso.
- Estrato granular.
- Estrato córneo.^{30,54}

Cada estrato se compone de una a varias células de grosor en función de la localización anatómica. Los queratinocitos son las principales células de la epidermis (85%), el resto son células dendríticas epidermales residentes: células de Langerhans (5-8%), melanocitos (5%) y células de Merkel (3-5%). Otras células como linfocitos, eosinófilos y neutrófilos pueden encontrarse en la epidermis pero no son células residentes.^{30,54}

1.2.2 Dermis

La dermis es el mayor componente estructural de la piel. Proporciona una matriz constituida por tejido conjuntivo para las estructuras de soporte y las secreciones que mantienen e interaccionan con la epidermis y sus anexos. En esta capa se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y receptores glándulas sudoríparas, sebáceas, y componentes celulares. Es una estructura termorreguladora y sensorial importante, que contribuye significativamente al almacenamiento del agua en el cuerpo. Los folículos pilosos también se encuentran en esta capa, los cuales son invaginaciones de la dermis.^{13,30}

a) Glándulas sebáceas

Las glándulas sebáceas son glándulas simples, alveolares con un conducto que se abre directamente a la superficie cutánea. Su densidad y tamaño depende del lugar anatómico donde se localicen, son más abundantes alrededor de las uniones mucocutáneas, espacios interdigitales, en el cuello, en el lomo, en la cola y en la barbilla. Están ausentes en el plano nasal y en las almohadillas plantares.³⁰

b) Glándulas sudoríparas

Las glándulas sudoríparas son glándulas tubulares simples y en espiral. En algunas especies, existen glándulas sudoríparas específicas que están implicadas en la producción de olor. El sudor protege la piel; mantiene su flexibilidad, y proporciona defensas antimicrobianas a través de la presencia de inmunoglobulinas, citoquinas, transferinas y cloruro de sodio. El sudor no juega un papel importante en la termorregulación en perros y gatos.³⁰

1.2.3 Hipodermis

La hipodermis, también conocida como subcutis, aponeurosis superficial o fascia superficial es la capa de tejido sobre la cual descansa la piel, a la cual une con las estructuras subyacentes del organismo, como músculos y huesos. Está constituida por tejido conectivo laxo, infiltrado con tejido adiposo.^{19,30,54} La grasa que se almacena en la hipodermis sirve como barrera térmica contra el frío, como depósito energético y soporte estructural. Las grandes masas de grasa que forman una almohadilla o cojín reciben el nombre de panículo adiposo. Estas masas se encuentran en los cojinetes plantares y en los cojinetes digitales, donde funcionan como amortiguadores.^{19,29,54}

1.2.4 Anexos de la piel

a) El pelo

Los pelos son hilos de queratina, elásticos, largos y finos.²⁹ Son integrantes específicos de la piel de los mamíferos y su función es proteger al individuo de diferentes maneras, proporciona una barrera física, microbiana y química y ayuda al camuflaje y a la señalización entre animales. La longitud y la densidad del pelo proporcionan aislamiento

térmico, mientras que el color y el brillo tienen un papel termorregulador. Los pelos táctiles especializados son capaces de percibir estímulos táctiles.³⁰

El pelo se forma a partir del folículo piloso en el ciclo del crecimiento del pelo. Este proceso tiene 3 etapas: anagén, catagén y telogén. La etapa llamada anagén, del ciclo folicular, corresponde al crecimiento activo del pelo y se divide en 6 estadios: Proanagén abarca del estadio 1 al 4, mesanagén estadio 5 y metanagén estadio 6. La etapa catagénica es la fase de transición entre las fases de crecimiento y de reposo. La etapa telogénica es la fase de reposo del folículo piloso.³⁰ (figura 2).

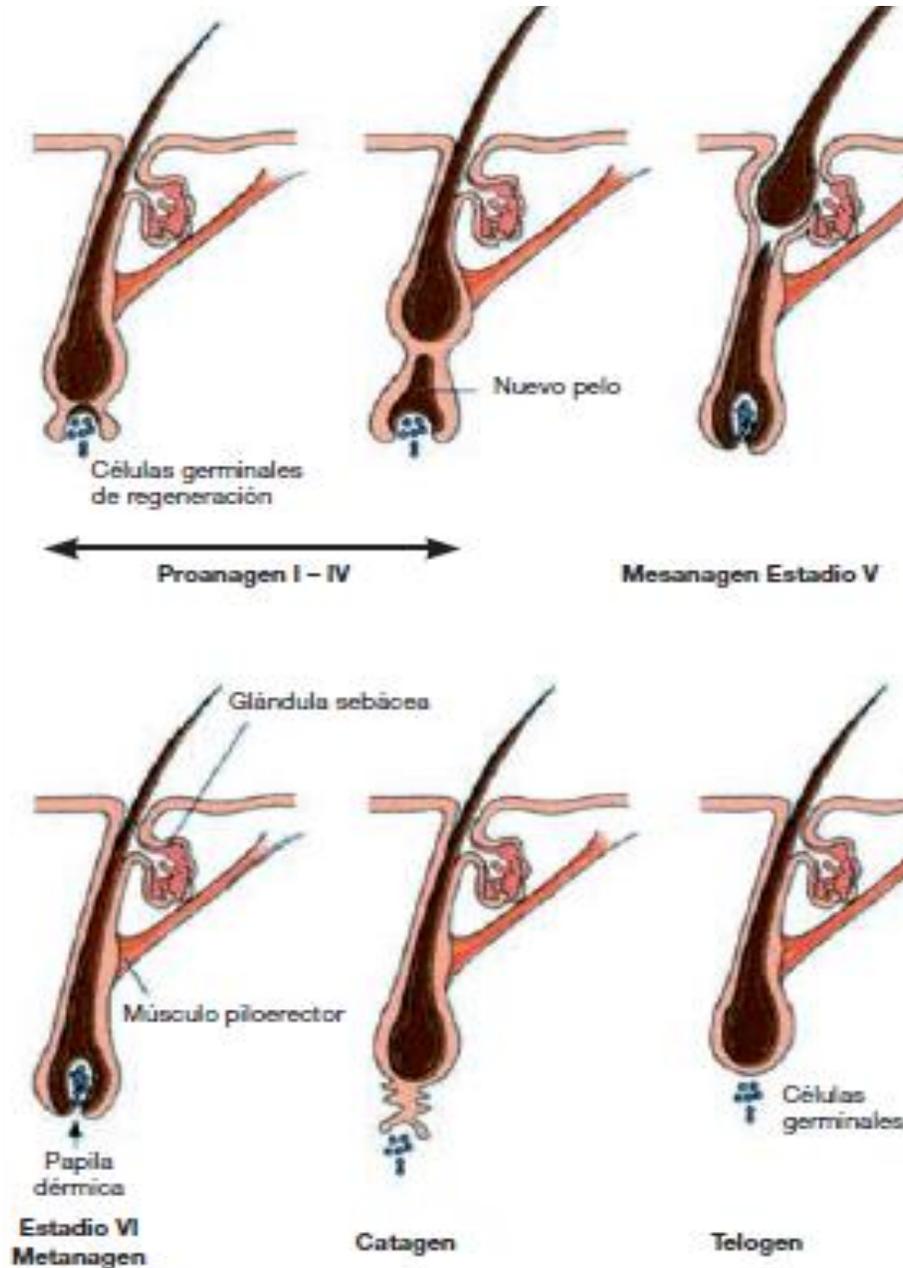


Figura 2: Ciclo del crecimiento del pelo (Lloyd y Patel, 2008)

El pelo en el gato y en el perro es reemplazado en picos que se dan en primavera y en otoño, el reemplazamiento está influenciado por factores, tales como el fotoperiodo, temperatura, estímulos hormonales, nutrición, estado de salud general y la genética entre otros.³⁰

Cada folículo primario está asociado a un músculo piloerector, una glándula sudorípara y una glándula sebácea que, juntos, forman la unidad pilosebácea. Los folículos agrupados, como los que se encuentran en el perro y en el gato, se refieren a folículos en los cuales un pelo primario está asociado a varios pequeños pelos secundarios, cada uno de ellos desembocando en la dermis por la misma apertura. La proporción y distribución entre los pelos primarios y los secundarios determina los diferentes tipos de capa que se encuentran en las distintas especies y razas. Los pelos conocidos como táctiles o bigotes, son los pelos rígidos que están asociados a un seno endotelial vascular y actúan como mecanorreceptores.³⁰

b) La uña

Esta es una estructura córnea que rodea la falange distal y sus orígenes como modificaciones locales de la piel están reflejados en su mantenimiento de las láminas de la epidermis, la dermis y el subcutis (si bien, posiblemente en una forma muy alterada).¹⁸

Las uñas sirven en primer lugar para proteger los tejidos subyacentes pero todos ellos se usan también con otras finalidades tales como arañar, escarbar o como arma de defensa y ataque.¹⁸

c) Glándulas Especiales

1.-Glándulas caudales o de la cola

Se encuentran grandes glándulas sebáceas y serosas en un área oval sobre la superficie dorsal de la cola de algunos carnívoros, la piel sobre éstas glándulas frecuentemente se distingue por su pelo más ralo y de color amarillento. Su actividad llega al máximo en la época de celo. En los gatos, a diferencia de los perros, ésta área se encuentra a nivel de la raíz de la cola.¹⁹

2.-Glándulas circumanales

Estas glándulas sebáceas están restringidas a la piel perianal de algunos carnívoros, incluidos los perros, en los que drenan glándulas sudoríparas especiales. Es probable que su secreción excite la atención particular que presentan a la región anal cuando los perros se encuentran. Se ha sugerido que algunas de estas glándulas tienen una función endócrina.¹⁹

3.- Glándulas de los sacos anales

Se encuentran glándulas sebáceas y serosas en las paredes de los sacos anales, que son bolsas cutáneas que se abren a ambos lados del ano de los carnívoros, la secreción que es particularmente hedionda y desagradable se lleva a cabo durante la defecación y aparentemente sirve como marcador.¹⁹

4.-Glándulas ceruminosas de la oreja

El conducto auditivo externo contiene glándulas sebáceas y glándulas ceruminosas. Las glándulas ceruminosas son simples glándulas tubulares en espiral que se asemejan a las glándulas sudoríparas, se localizan en la dermis profunda debajo de las glándulas sebáceas, aumentan en número en la parte proximal del conducto auditivo externo, y sus conductos desembocan en folículos del cabello o sobre la superficie del canal auditivo externo.¹²

El cerumen es una emulsión que recubre el conducto auditivo. Está compuesto de células escamosas epiteliales queratinizadas descamadas junto con las secreciones de las glándulas sebáceas y ceruminosas. Este material es de naturaleza ácida y por lo tanto, disminuye el pH del canal auditivo, creando un medio desfavorable para el crecimiento de los microorganismos. El número de glándulas sebáceas y glándulas ceruminosas varía con la raza. Las razas de pelo largo tienen más tejido glandular que las razas de pelo corto.¹²

Como ya hemos explicado, la piel no sólo es un órgano con sus propios patrones de reacción sino que también refleja el medio externo al que está expuesto, por tanto, en la piel se pueden localizar un sinnúmero de lesiones.

De todas las patologías que se presentan en los perros y gatos, las de la piel son las más frecuentes y a la vez las que el dueño descubre con mayor facilidad, es por esto que los desórdenes dermatológicos constituyen una de las principales causas de consulta en la clínica de pequeños animales.¹³

2. DERMATOFITOSIS

2.1 Definición

Las dermatofitosis o “tiñas” son infecciones cutáneas superficiales en humanos y animales causadas por hongos de los géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, los cuales invaden el estrato córneo de la piel y de otros tejidos queratinizados.^{9,13,17,35,36,41,47,48.}

2.2 Etiología

En los pequeños animales la dermatofitosis se debe generalmente a la infección por una de las siguientes especies de hongos: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Siendo las más comunes causadas por *M. canis*.¹⁵

2.3 Clasificación de los dermatofitos

Cada uno de los distintos dermatofitos son habitantes naturales en distintos medios, por tanto una manera de clasificarles es acuerdo con su hábitat pudiendo ser:

- Zoofílicos: aquellos que se encuentran principalmente en animales, pero que pueden ser transmisibles a otros animales y al humano (*Microsporum canis*, *M. nanum*, *M. gallinae*, *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*, *T. equinum* y *T. verrucosum*).
- Antropofílicos: que se encuentran principalmente en humanos y son transmitidos a otros humanos y muy rara vez a animales (*Microsporum audouinii*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var *interdigitale*, *T. violaceum*, *T. concentricum* y *E. floccosum*).
- Geofílicos: aquellos dermatofitos que se encuentran principalmente en el suelo y de esa fuente se infectan animales y humanos (*Microsporum gypseum* y *T. terrestre*)⁷

3. DERMATOFITOSIS CAUSADA POR *Microsporum canis*

3.1 Características de *Microsporum canis*

Microsporum canis (del griego *mikrós*-pequeño y *sporós*-semilla o espora y del latín *canis*-perro) es un hongo filamentoso del tipo zoofílico, se dice ha evolucionado gradualmente a través del tiempo por cambios en su nicho ecológico ya que en un principio su hábitat fue el suelo y después pasó a los animales domésticos y de ahí al hombre,³⁶ pertenece al Phylum: Ascomycota Clase: Euascomycetes Orden: Onygenales Familia: Arthrodermataceae.^{7,43}

La descripción del género *Microsporum* inició en 1843 cuando Gruby identificó *M. audouinii*. Años después, en 1902 Bodin describió *M. canis*, el cual ha recibido desde entonces varios sinónimos como *M. felinum*, *M. equinum*, *M. lanosum*, *M. pseudolanosum* y *M. obesum*.³⁶

Se han descrito tres subespecies *M. canis*. En 1954 Dimenna y Marples describieron la primera como *M. canis* var. *distortum* y en 1968 Rivalier y Badillet describieron *M. canis* var. *pulverulentum*. Algunos autores mencionan a *M. canis* var. *obesum* como otra subespecie, sin embargo no existe bibliografía que apoye su existencia.³⁶

Microscópicamente presenta macroconidios abundantes y grandes (35-110 x 12-25 μm)⁴³ sin embargo otros autores refieren que miden de 7-20 μm de ancho por 30-60 μm de largo,³⁶ fusiformes con doble pared gruesa (2 μm) y rugosa de extremos afilados con o sin equinulaciones, pluriseptados, (de 6 a 12 septos⁴³ aunque también se refiere que pueden llegar a ser hasta quince)³¹ con tabiques transversales que circunscriben amplias celdillas. Posee microconidios piriformes (1-2 μm) habitualmente escasos, en breves racimos o libres, que brotan lateralmente de la hifa. Se observan hifas en forma de raquetas, escasas espirales y clamidosporas e hifas pectinadas en los cultivos viejos.⁴³ Las colonias de *M. canis* se caracterizan por crecer rápidamente^{43,48} entre 7 y 14 días³⁶ a 25-30 °C⁴³ en agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos además, *M. canis* se distingue del resto de los *Microsporum* porque crecen en medio de cultivo de arroz, que estimula la producción de macroconidios.³⁶ Las colonias son planas, vellosas⁴⁸ o algodonosas con micelio blanco; este aspecto está determinado por la abundancia del mismo, poseen bordes desflecados. Con el tiempo, el centro de la colonia se torna pulverulento. El color del reverso varía con la edad del cultivo y va de blanco a café amarillento y el reverso es amarillo-naranja o amarillo-rojizo.^{7,11,36,41,43,48} (ver figuras 3 y 4).

Se ha observado que *M. canis* presenta gran pleomorfismo en los subcultivos.^{7,43} En lo que se refiere a la identificación, las características morfológicas de los cultivos de *M. canis* tienen altos porcentajes de concordancia (90%) con pruebas confirmatorias como lo son las de biología molecular.³⁶



Figura 3.- Cultivo de *M. canis*, agar Borelli (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Microbiología – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM)



Figura 4.- *M. canis*, tinción azul de algodón 40x (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Microbiología – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM)

3.2 Epidemiología

Microsporum canis tiene una distribución mundial,¹⁶ es un agente productor de tiña en humanos y animales puede ser también un colonizador del pelaje de los animales pero sin causar sintomatología.^{43,48} Se sabe que las dermatofitosis son mucho menos frecuentes en perros que en gatos.⁹ Diversos autores coinciden en que la especie de dermatofito más frecuentemente implicado en los casos de dermatofitosis en perros y gatos es *M. canis*, (aproximadamente entre el 85%¹⁵ y el 90%⁵¹ de las dermatofitosis son producidas por *M. canis*) y siendo menos frecuentes otras especies, entre las que destacan *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*.^{8,9,11,13,41}

Se han demostrado variaciones de la incidencia de la dermatofitosis en diferentes partes del mundo. En general, la incidencia en perros del hemisferio norte se puede resumir como sigue:¹⁵

- *M. canis* es más frecuente entre octubre y febrero y menos común entre marzo y septiembre.
- *M. gypseum* es común entre julio y noviembre y tiene baja incidencia entre diciembre y junio.
- *T. mentagrophytes* esté presente todo el año y tiene incidencia pico en noviembre y diciembre.

En general, la incidencia en gatos se resume a continuación¹⁵:

- *M. canis* tiene poca variación durante todo el año.
- *M. gypseum* y *T. mentagrophytes* son hallazgos raros en felinos, pero se puede observar un ligero incremento durante el verano y el otoño.

Se sabe que rara vez la dermatofitosis canina y felina se debe a infección simultánea con dos hongos diferentes.¹⁵

Las tiñas son importantes no sólo por el hecho de que afectan la piel en perros y gatos sino que también pueden ser transmitidas a otros animales y a los humanos siendo una zoonosis potencial.^{11,33,43} El gato se considera como el principal reservorio de *M. canis*.^{8,15,41} La dermatofitosis felina por tanto constituye la principal zoonosis de origen felino.⁵¹

Cuando se transmite al ser humano es una especie muy contagiosa que da lugar a brotes epidémicos familiares o escolares. Provoca *tinea capitis* (Tiña de la cabeza) y *tinea corporis* (tiña del cuerpo) principalmente en niños (ver figura 5). En México en niños de entre 6 y 11 años, *M. canis* ocasiona tiña de la cabeza en el 60-80%¹⁶ de los casos, donde el contacto con animales domésticos es la fuente de infección hasta en un 83%, de igual manera en adultos en México, *M. canis* ocupa el segundo lugar en frecuencia (25,4%) después de *T. rubrum* como causante de tiña del cuerpo. La incidencia de onicomycosis y tiña de los pies por *M. canis* es sólo de un 3%.^{43,48} En los pacientes con SIDA las lesiones pueden ser extensas, mientras que puede ser invasor de la dermis en personas en tratamiento inmunosupresor.⁴³



Figura 5: Presentaciones clínicas de tiña producida por *M. canis* Figura A: Tiña de cabeza de tipo inflamatorio o querion. Figura B: tiña seca de la cabeza característica del género *Microsporum*. (Bonifaz, 2010)

3.3 Factores predisponentes

Estos factores predisponentes incluyen factores tanto del hospedador como del entorno. Los perros y gatos pueden sufrir de tiña a cualquier edad. Los animales jóvenes, ancianos e inmunocomprometidos son más susceptibles a la infección. Los gatos con virus de inmunodeficiencia felina (FIV) o leucemia viral felina (FeLV) y los animales que reciben quimioterapia pueden tener alto riesgo, también los que se encuentran en estados de estrés, por ejemplo durante la gestación o lactación, la susceptibilidad genética también puede ser un factor predisponente importante especialmente en los gatos de raza Persa⁴¹ e Himalaya³³ y en los perros de raza Yorkshire terrier.⁸ Otros factores de riesgo incluyen, mal nutrición, sobrepoblación animal y la falta de un periodo adecuado de cuarentena para los animales infectados.¹¹ Se cree que la eliminación mecánica de las esporas mediante el acicalamiento de los gatos puede proporcionar una defensa natural contra la infección y que en general en los animales de pelo largo o enredado es difícil esta eliminación por medio del acicalamiento.^{8,41}

Por otro lado, a nivel ambiental, la temperatura y la humedad son factores predisponentes importantes que explican la elevada incidencia de esta enfermedad en las zonas geográficas donde el clima favorece el crecimiento fúngico. Las esporas presentes en el entorno pueden ser una fuente constante de infección, ya que permanecen viables durante años bajo condiciones naturales y desempeñan una función importante en la diseminación de la infección.⁴¹

3.4 Patogenia

Los dermatofitos son patógenos primarios que invaden el tejido queratinizado como el pelo, el estrato córneo de la piel y las uñas. Las infecciones por dermatofitos se adquieren por contacto con artrosporas procedentes de fómites, tierra infectada y animales infectados. El primer paso en el proceso de la infección es la adherencia de las artrosporas al estrato córneo. El segundo paso es la germinación de la espora y la producción de hifas, que secretan queratinasa e invaden el estrato córneo y los tallos de pelo en la fase anagén.^{15,33,35,41} El pelo que está en un estadio de reposo no es invadido ya que se necesitan nutrientes esenciales para el crecimiento fúngico y en este estadio no están presentes ó su producción es muy pobre.¹¹

La dermatofitosis es una enfermedad contagiosa, la infección puede darse entre especies por contacto directo como indirecto si las condiciones predisponentes son favorables.⁴¹

3.5 Cuadro Clínico

Los signos clínicos de las dermatofitosis son muy variables,⁹ es importante señalar que el cuadro clínico de los perros son diferentes de las de los gatos clínicamente hablando. Se sabe que en los perros las tiñas producen lesiones mientras que en los gatos los signos clínicos no son siempre evidentes. En gatos, es posible cultivar dermatofitos en animales clínicamente sanos que actúan sólo como acarreadores de conidios sin estar infectados.¹¹

La dermatofitosis felina puede presentarse no sólo con distintas lesiones, sino también con distintas patrones de reacción. La alopecia puede ser circunscrita, difusa o con zonas de descamación, hiperpigmentación, eritema y formación de comedones, y pústulas foliculares que pueden observarse en la cabeza o extremidades, en ocasiones el pelo de los bordes de las lesiones pueden estar rotos^{9,33,41} y puede haber o no prurito.³³ (ver figuras 6 y 7).



Figura 6: Infección por *M. canis*, causando un patrón difuso de alopecia y descamación en el dorso de un gato (Harvey, 2001)



Figura 7: Lesión causada por *M. canis* que produce alopecia y descamación focalizada en la pata de un gato (Harvey, 2001)

En los perros, los signos clínicos aunque son variables se asocian principalmente a la pérdida de pelo. Las lesiones pueden distribuirse de forma localizada o difusa. Pueden observarse zonas circulares de alopecia, descamación, eritema hiperpigmentación, costras y/o pápulas en la cabeza y extremidades. Generalmente las lesiones están bien delimitadas en los perros se observa una lesión denominada como querion (lesión blanda localizada de tipo inflamatorio proliferativa y eritematosa). Normalmente hay un borde bien demarcado entre la piel afectada y la piel sana.⁴¹ (ver figura 8).



Figura 8: Infección por *M. canis*, en una perra de tres meses de edad (Delgadillo, 2006)

3.6 Diagnóstico

Antes de utilizar cualquier prueba diagnóstica, es de suma importancia aproximar el diagnóstico mediante una correcta y detallada anamnesis acompañada de la exploración clínica.³⁹ El diagnóstico de laboratorio, en lo que a dermatofitosis se refiere, es muy sencillo y se realiza por medio de exámenes directos que nos revelan la presencia de estructuras fúngicas y los cultivos son confirmatorios.⁷

a) Exámenes directos

Dentro de la clasificación de los exámenes directos encontramos los exámenes de pelo (tricografía) y/ o escamas por medio de la observación directa con hidróxido de potasio (KOH) al 10 ó 20%. Esta prueba consiste en colocar la muestra en un portaobjetos y colocar sobre ésta una gota de KOH la cual actúa como solución aclarante. Se dejar reposar la muestra de 15 a 20 minutos y finalmente se observa al microscopio. Los pelos infectados se ven parasitados por esporas y en ocasiones por algunos filamentos. La infección del pelo por *M. canis* se clasifica dentro del grupo ectotrix del tipo microspórico esto es, que se observan numerosos microconidios de 2 a 6 μm de diámetro fuera del pelo^{7,41}. En el caso de las escamas, al observarlas podemos encontrar filamentos largos y delgados.^{7,11} Con esta prueba se pueden observar las estructuras fúngicas antes mencionadas, pero nunca macroconidios cuya visualización es imprescindible para la identificación del dermatofito, éstos sólo se observan mediante el examen microscópico del cultivo una vez haya esporulado. Es difícil observar las artrosporas e hifas en el examen directo, no sólo porque se necesita mucha práctica para ello, sino también porque no todos los pelos del animal se encuentran infectados, incluso la observación directa de una muestra adecuada lleva a muchos errores de diagnóstico por lo que no se aconseja como único método diagnóstico.³⁹

b) Cultivos

Los medios rutinarios para el primoaislamiento de los dermatofitos son: agar dextrosa Sabouraud⁵ y agar Sabouraud más antibióticos (que ayuden a prevenir el sobrecrecimiento de hongos saprobios o bacterias), las colonias se desarrollan en un tiempo promedio de 10 a 15 días, incubadas a una temperatura de 25 a 28 °C, también se recomienda usar otros medios como extracto de levadura y papa dextrosa agar.^{7,11,36} Sin embargo, se conocen otros medios que son específicos para inducir la esporulación y poner en evidencia la producción de pigmento y de esta manera facilitar la identificación de la especie, como el medio de cultivo de arroz³⁶ y el agar Borelli (también llamado Lactrimel)⁵

Existe un medio para dermatofitos llamado DTM (dermatophyte test medium) que está formado de una base de dextrosa, fitona y antibióticos (ciclohexamida, gentamicina y cloranfenicol) más un indicador de pH llamado rojo fenol; se trata de un medio selectivo para dermatofitos; sin embargo las características macro y microscópicas de las colonias así como los pigmentos no se detectan bien por lo que sólo se recomienda para uso en el consultorio debido a que el crecimiento del dermatofito hace virar el indicador amarillo a rojo con una precisión del 90 a 95%.^{7,11} El mayor inconveniente del DTM es que algunos hongos saprobios pueden virar el medio a rojo, y en ocasiones se dan casos de colonias de

M. canis que no producen el cambio de color. La confirmación del diagnóstico se realiza mediante la identificación microscópica de los macroconidios del hongo a partir de la colonia obtenida en el cultivo.³⁹

El cultivo tiene valor epidemiológico y confirma con certeza el diagnóstico de dermatofitosis. La identificación de la especie es en ocasiones determinante en la elección del tratamiento antifúngico.¹⁷

c) Lámpara de Wood

La lámpara de Wood es un recurso que se puede utilizar para el diagnóstico en el consultorio. El fundamento de esta prueba es que las hifas de algunas especies del género *Microsporum* producen un metabolito llamado pteridina, y es secretada cuando el hongo está en crecimiento, ésta sustancia absorbe la luz ultravioleta y emite fluorescencia visible.^{7,9} Existe el inconveniente de que no todos los agentes productores de tiña producen fluorescencia, sólo los que son ectotrix como *M. canis*, por lo tanto el examen directo y los cultivos son los que confirman el diagnóstico.⁷

Es importante señalar que esta prueba con frecuencia puede conducir a errores diagnósticos, pudiendo dar falsos positivos ya que la suciedad y la descamación de la piel y ciertos medicamentos tópicos puede producir fluorescencia, y falsos negativos, si la infección está ocasionada por otras especies de dermatofitos que no tengan la característica de producir fluorescencia.^{7,11,39} Sólo debe ser considerada sospechosa la fluorescencia de color verde y que aparece en la zona medial de los pelos. Siempre se debe confirmar el diagnóstico realizando cultivos a partir de la zona en la que se observa la fluorescencia.³⁸

Los datos que arrojó el estudio realizado por Betancourt y colaboradores en el año 2009 muestran que sólo en uno de cada cinco gatos con *M. canis* se observó fluorescencia con la lámpara de Wood, de manera que podemos concluir que esta prueba no es suficiente para dar un diagnóstico definitivo.⁵

d) Examen histopatológico

En muestras de tejidos provenientes de lesiones leves solo se observa hiperqueratosis. Cuando la lesión es grave se puede observar las siguientes alteraciones:¹³

- Hipertrofia de la epidermis
- Infiltrado linfocitario en la dermis
- Destrucción de folículos pilosos
- Reacción granulomatosa

En ocasiones, el diagnóstico histopatológico de la dermatofitosis es difícil, ya que los cambios morfológicos son mínimos, y el único hallazgo es al engrosamiento del estrato córneo (hiperqueratosis). En estos casos se deben realizar tinciones especiales para detectar

las estructuras fúngicas, tales como la de ácido peryódico de Schiff (PAS) o la de Grocott-Gomori.¹³

Podemos concluir que el diagnóstico micológico no sólo ayuda a la aplicación de una correcta terapia sino que permite una aproximación a la situación socio-cultural de la población afectada y a las medidas profilácticas, con base a las especies aisladas.⁴⁷

3.7 Diagnóstico diferencial

Debido a la variabilidad de los signos clínicos, los diagnósticos diferenciales posibles incluyen varias enfermedades. Deben considerarse alteraciones que provoquen encostramiento, descamación y alopecia, como: foliculitis bacteriana, furunculosis, estados de hipersensibilidad, demodicosis, enfermedades encostrantes autoinmunes, distrofia/displasia folicular y pustulosis eosinofílica estéril (enfermedad de Ofugi). Los principales diagnósticos diferenciales son los siguientes.¹⁵

Para la dermatofitosis producida por *M. canis* en el gato debe hacerse el diagnóstico diferencial con queiletielosis y demodicosis. Para el caso del perro el diagnóstico diferencial será con pioderma superficial, demodicosis y pénfigo foliáceo.^{15,41}

3.8 Tratamiento

Actualmente se mantiene el protocolo terapéutico clásico, el cual incluye la combinación de tratamiento tópico y sistémico en el paciente, así como la eliminación del material contaminado del ambiente, aunque se ha incrementado el conocimiento sobre la efectividad de los métodos empleados. La terapia tópica sirve para eliminar el material infectivo y prevenir su diseminación al ambiente; la sistémica acorta el tiempo de infección en el animal; y el control ambiental tiene por objeto prevenir que la infección recurra y evitar que se contagie a otros animales o personas.⁴⁶

a) Tratamiento sistémico

La griseofulvina sigue siendo el antifúngico de elección en el tratamiento sistémico de la dermatofitosis del perro y el gato,^{8,46} aunque se ha introducido para ciertos casos el uso de azoles, como el ketoconazol^{8,9,41} e itraconazol^{8,41} y la terbinafina que es un antifúngico perteneciente al grupo de las alilaminas.⁴¹ El ketoconazol sólo se debe usar en las escasas dermatofitosis debidas a *Trichophyton mentagrophytes* que a su vez sean resistentes a la griseofulvina, no recomendándose en los procesos causados por *Microsporium canis*, debido a la frecuente resistencia del mismo.⁴⁶

En los casos de tiñas por *M. canis* resistentes a la griseofulvina se recomienda la administración de itraconazol,⁴⁶ el cual ofrece la ventaja de presentar menos efectos secundarios no deseados, siendo tan efectivo o mejor que el ketoconazol.^{11,41}

Algunos autores sugieren combinar la griseofulvina con un tratamiento tópico, generalmente con enilconazol,⁸ otros recomiendan la combinación de ketoconazol por vía sistémica y enilconazol tópico.⁹ Para cualquiera de los casos debe considerarse que *Microsporium canis* responde mal al tratamiento con azoles.⁴⁷

En resumen, el manejo de la enfermedad sólo por vía sistémica con griseofulvina o itraconazol suele ser efectivo aunque, como se ha mencionado anteriormente, la combinación de un tratamiento tópico adecuado puede disminuir el tiempo de curación.⁴¹ Por otro lado, la sola aplicación de antifúngicos tópicos suele ser ineficaz^{8,9,11,46} y puede predisponer a infecciones crónicas y recurrentes.⁴⁶

b) Tratamiento tópico

El tratamiento tópico debe abarcar toda la superficie de la piel, no es recomendable tratar sólo las lesiones localizadas ya que el fármaco aplicado en las mismas no tienen ningún efecto en hifas o esporas que puedan estar presentes en cualquier otra parte del cuerpo del animal en las que no haya lesiones.^{8,9,46} Se admite que el mejor producto tópico en dermatofitosis canina es el enilconazol; en gatos también es efectivo pero se citan casos de toxicidad, posiblemente por ingesta debida al acicalado; esta toxicidad no es predecible, incluso se ha documentado un caso mortal.⁴⁶ Para una mejor aplicación del tratamiento tópico, así como para disminuir la carga de esporas sobre el animal y reducir la contaminación del entorno, se recomienda cortar el pelo sin llegar a rasurarlo, ya que los pequeños traumatismos en la piel debidos al rasurado favorecen la diseminación de la infección.^{41,46} Se sugiere dar baños de enilconazol al 0.2%⁴¹ realizándose dos veces por semana.⁹ También se puede bañar al animal con gluconato de clorexhidina al 1%⁹ aunque ésta parece menos efectiva que el enilconazol.⁴⁶

Parece ser que la eficacia del uso de antifúngicos tópicos depende de su combinación a fármacos sistémicos. Así, la sola aplicación de clorhexidina durante 18 semanas, sin tratamiento sistémico en un estudio realizado, no modificó la evolución de la enfermedad en gatos, respecto de los controles no tratados tópicamente, sin embargo, el baño semanal con un shampoo a base de clorhexidina y miconazol consiguió disminuir el tiempo de curación en gatos con dermatofitosis que también recibían griseofulvina.⁴⁶

A manera de resumen podemos decir que el tratamiento, tópico y sistémico, debe continuar unas semanas después de la curación de las lesiones, de preferencia hasta la obtención de cultivos fúngicos negativos,¹⁵ es decir hasta la cura micológica y no sólo hasta la cura clínica.⁴¹

c) Tratamiento de los animales en contacto con animales enfermos

Esta es otra etapa del tratamiento que no debe omitirse, ya que ciertos animales pueden albergar de forma pasiva esporas de dermatofitos y dar origen a una recontaminación del animal enfermo. Si éstos animales presentan un cultivo positivo, se deben considerarse infectados y deben ser tratados igual que al animal enfermo; si el cultivo es negativo, deben ser separados del animal infectado y ser tratados sólo tópicamente, por ejemplo con baños de clorhexidina.¹⁵

d) Desinfección del ambiente

En los casos de dermatofitosis, la contaminación del ambiente con estructuras fúngicas juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad,³⁶ es por esta razón que la disminución de material infectado es un factor importante en el tratamiento, impidiendo así las recontaminaciones, ya que se ha demostrado que las esporas de *M. canis* persisten en el entorno hasta 18 meses.^{15,41}

La desinfección del ambiente se ha realizando tradicionalmente con productos que, a pesar de considerarse fungicidas, no son eficaces del todo ya que dentro de los pelos o escamas infectadas por *M. canis* que se encuentran en el ambiente hay estructuras fúngicas, las cuales no tienen contacto directo con los desinfectantes.⁴⁶ Se podría resumir que, en la práctica, sólo son efectivos el hipoclorito de sodio (diluido al 1/10), los aerosoles de enilconazol, las soluciones esterilizantes para instrumentos médicos (a base de glutaraldehído o de dióxido de cloro estabilizado) y un desinfectante comercial (Virkon S®) para uso en locales donde residen animales de compañía.^{41,46}

Adicionalmente se recomienda confinar al animal infectado en un cuarto de servicio o en una zona que pueda descontaminarse fácilmente todos los días, se sugiere aspirar las alfombras y muebles tapizados (debe desinfectarse el recipiente para el polvo) así como desinfectar los utensilios de acicalamiento con hipoclorito de sodio (diluido al 1:10 en agua)⁴¹

La descontaminación del entorno debe continuar hasta que se obtengan dos o tres cultivos micológicos negativos del animal afectado. No deben introducirse nuevos animales en la casa hasta no terminar con el tratamiento.⁴¹

3.8.1 Efectos adversos de los antifúngicos utilizados en el tratamiento de la dermatofitosis

Un factor a considerar al elegir el antifúngico a utilizar, debe ser el de los efectos adversos y contraindicaciones de dichos fármacos, en el caso de la griseofulvina, debido a sus efectos tóxicos en gatos^{11,41} debe reservarse contra infecciones graves en que no exista otra alternativa, debido a que su efecto es impredecible. Al parecer, los efectos tóxicos en gatos se deben a la susceptibilidad individual más que a la dosis. No se recomienda para el tratamiento de infecciones menores, que puedan ser autolimitantes, y que respondan a un tratamiento local.⁵¹ La griseofulvina es teratógena^{11,41,51} en humanos y animales. De manera general no debe administrarse en animales gestantes de ninguna especie. En referencia a los gatos, en especial cuando se administra en el primer tercio de la gestación; entre los efectos de esta índole están malformaciones del cerebro y de los huesos, espina bifida, anoftalmía y atresia anal. En gatos adultos se asocia la presentación de anemia con dosis altas. Otros signos de toxicosis en gatos son anorexia, vómito, ataxia, anemia, leucopenia, depresión, prurito, ictericia y pirexia. Algunos de estos signos son reversibles, en tratamientos prolongados. Se pueden presentar trastornos gastrointestinales como diarrea, meteorismo, náusea y vómito. En ocasiones ocurren algunas modificaciones de la conducta, efectos leves sobre SNC, fatiga, mareo y fotosensibilidad.⁵¹ Puede causar supresión de la médula ósea que produce anemia^{11,41}, y pancitopenia¹¹ Especialmente en gatos que tienen virus de inmunodeficiencia felina (FIV)⁴¹ Es importante señalar que neutropenia es la causa más común de muerte en gatos.¹¹

También se le ha intentado relacionar con algunos casos de oligospermia después de su uso a largo plazo, pero esto requiere demostración experimental.⁵¹

El ketoconazol puede producir daño hepático,¹¹ está contraindicado en pacientes con insuficiencia hepática o trombocitopenia; es teratógeno y embriotóxico en ratas. Los efectos adversos más comunes son anorexia, vómito y diarrea. Se informa que puede producir hepatotoxicosis e incremento en las enzimas hepáticas, disminuye la síntesis de hormonas esteroideas (testosterona y cortisol).^{11,41,51} Hay aumento en las concentraciones de progesterona en perros; esto no se encontró en gatos. Se ha observado inapetencia, prurito, alopecia y aclaramiento del pelo.⁵¹

Suministrando itraconazol en gatos se observan efectos a nivel gastrointestinal (anorexia, pérdida de peso y vómito),⁴¹ los cuales se deben a sobredosis; éste es menos tóxico que el ketoconazol administrando la misma dosis. En perros, el efecto adverso más significativo es la hepatotoxicosis. El daño hepático se determina al incrementarse la actividad de enzimas hepáticas. También puede provocar anorexia. Algunos perros desarrollan úlceras en la piel, vasculitis y edema cuando se administra la dosis más alta. En animales de laboratorio, se ha observado que produce fetotoxicosis y teratogenicidad, además de que llega a leche materna, por lo que se recomienda no administrarlo en animales gestantes.^{41,51}

En referencia al miconazol, sabemos que tiene la desventaja de que el vehículo que se requiere para su inyección intravenosa es tóxico, por lo que se limitó su uso a la administración local.⁵¹

De igual manera el clotrimazol se ha reservado su uso para administración tópica. Puede ocasionar irritación local, ardor, eritema, edema, vesicación, descamación y prurito.⁵¹

3.9 Prevención

Las medidas preventivas estrictas son importantes, en especial cuando hay un miembro de la familia inmunocomprometido. Estas medidas consisten en la limpieza del entorno y el control en las mascotas. En criaderos o casa con varios animales se deben realizar cultivos con el cepillado de McKenzie a los animales nuevos sobre todo si son gatos y mantenerlos en cuarentena hasta determinar su estado, y mientras tanto bañarlos semanalmente.^{9,15}

a) Vacunación

La búsqueda de una vacuna eficaz para la prevención de la dermatofitosis en perros y gatos producida por *M. canis* sigue siendo un tema de investigación.¹⁵ En Estados Unidos⁸ y en algunos países europeos se ha autorizado una vacuna muerta para *M. canis*, no previene la infección, pero se ha demostrado que disminuye la gravedad de las lesiones tras la infección por *M. canis*. Si la vacuna se utiliza posterior a la infección, acelera la resolución de las lesiones pero no la curación micológica. Esta vacuna puede tener alguna utilidad en los criaderos de gatos^{41,46} No hay información acerca de la comercialización de esta vacuna en México. (ver figura 9)



Figura 9: Vacuna inactivada contra *Microsporum canis*. Biocan® M Plus. Laboratorios Bioveta, a. s.

4. EL PROPÓLEO

4.1 Generalidades

El término propóleo o própolis deriva del griego: "*pro*" que significa en defensa de; y "*polis*" que significa ciudad (o colmena)⁴² haciendo referencia al uso que le dan las abejas al colocarlo en los accesos de la colmena.²⁵

El propóleo es el nombre genérico que se le da a la resina cética, 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,²⁵ disminuyendo así la entrada del viento, lluvia y frío, también lo emplean para reducir el tamaño de la entrada a la colmena, para cerrar grietas o para embalsamar pequeños animales muertos dentro de la misma, los cuales las abejas no pueden sacar debido a su tamaño y peso.^{23,45,49} El própolis es también responsable de la sanidad de los panales, en especial contra microorganismos.²⁵ Geoprópolis es el equivalente del propóleos de abeja melífera, producido por himenópteros (Himenóptera: Meliponinae) el cual contiene materiales arcillosos del suelo.⁴² (Ver figura 1)

Las abejas son los intermediarios entre las plantas y los propóleos.³⁸ Su recolección responde a un patrón de forrajeo, donde las abejas pecoreadoras extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y del primer par de patas que poseen, durante este proceso la secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permite el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras. Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, dejando que las abejas propolizadoras, tomen algunas partículas de la sustancia, para comprimirla, agregarle cera y proceder al propolizado.^{25,45} Las abejas son indispensables para la formación de los propóleos, ya que algunos compuestos químicos de origen vegetal son modificados químicamente por las enzimas presentes en su saliva.³⁸

Los propóleos son una mezcla diversa de compuestos químicos que le confieren una consistencia resinosa, aromática y pegajosa. Su color es variable, verde, amarillo-verdoso, rojo o café oscuro, dependiendo de sus constituyentes y su madurez. Es insoluble en agua y soluble en alcohol. A temperaturas de congelación se cristaliza como un caramelo y a temperaturas altas toma una consistencia chiclosa.³⁸



Figura 10: Propóleo en trozos, recolectado del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

4.2 Antecedentes Históricos

El propóleo, desde tiempos remotos, es conocido y empleado por sus propiedades terapéuticas. Diversas culturas los han utilizado en su medicina folklórica para el tratamiento de diversos padecimientos desde tiempos inmemoriales. Entre sus aplicaciones medicinales se encuentra la de curar y prevenir diversas infecciones.³⁸ La referencia más antigua data del antiguo Egipto, sus sacerdotes usaban el propóleo para embalsamar a los faraones, cuyas momias se conservan hasta nuestros días.^{14,45,49} En el papiro de Ebers (escrito aproximadamente en el 1700 a.C.), se mencionan la cera y el propóleo (cera negra) como medicamentos. En la Biblia se hace referencia al propóleo, en el libro de Génesis, los profetas hebreos lo mencionan como bálsamo de Galaad o Judea, o simplemente le llaman resina para uso médico (tsori), y se hace referencia a que era un importante producto en el comercio de los antiguos reinos de Judá e Israel. Aristóteles, Plinio y Avicena han citado en sus escritos sus cualidades curativas y cicatrizantes en heridas,^{45,49} También hay registro de que Hipócrates (460-377 a.C.) prescribía su uso para ayudar a curar las úlceras.^{14,38} Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y en el continente europeo fue utilizado por los franceses en los siglos XIV y XVIII para el tratamiento de llagas.^{45,49} En la Edad Media, el conocimiento popular los recomendaba en enjuagues bucales para curar infecciones localizadas.³⁸ Su máximo empleo se dio durante la guerra de los Boers, en África del sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. Su uso fue intensificado durante la Segunda Guerra Mundial por la ex-URSS para el tratamiento de heridas.^{14,45} y en pleno siglo XXI, ante la falta de acceso a la medicina moderna, algunas culturas de Europa Oriental mantienen el uso de propóleos para aliviar la gastritis, faringitis, infecciones en heridas y en quemaduras.³⁸

4.3 Composición química

En las últimas tres décadas un gran interés ha surgido en relación a la composición química y actividades terapéuticas del propóleo por lo que ha sido objeto de numerosos estudios químicos y farmacológicos.³⁸

La composición química de los propóleos es compleja y depende de varios factores como son: la región geográfica, el clima, el relieve, la vegetación natural y las cuencas hidrográficas entre otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas.²⁵ algunos ejemplos de éstas fuentes vegetales son: el pino, abeto, sauce, abedul, varias especies de álamo, fresno, roble, entre muchos otros que encuentren cerca de sus colmenas.⁴⁵ Es por esto que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición.²⁵

Entre estos componentes encontramos ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales, aminoácidos y azúcares. El propóleo es rico en elementos inorgánicos, algunos de ellos involucrados en los sistemas enzimáticos fundamentales, podrían estar asociados con sus actividades biológicas. Llama la atención la prevalencia de flavonoides como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al éter bencil del éster fenetil de ácido caféico entre otros compuestos y derivados del ácido cinámico, a los cuales se asocia la actividad biológica del propolis.^{4,14,21,23,34,45,49} En la siguiente tabla se muestran los componentes más significativos del propóleo. (Tabla 1)

| Componentes | Ejemplos |
|----------------------|--|
| Ácidos orgánicos | Como el ácido benzóico, C_6H_5-COOH gálico. $C_7H_6O_5$ |
| Ácidos fenólicos | Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$, cinámico $C_{11}H_{13}NO_2S_2$, pumarínico, insofenilico y fenilico. |
| Aldehídos aromáticos | Vainillina $C_8H_8O_3$, isovainillina $C_8H_8O_3$. |
| Cumarinas | Esculetol $C_9H_6O_4$, escopuletol. |
| Flavonoides | Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$, galangin $C_{15}H_{10}O_5$, pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$ |
| Flavonas | Acacetina $C_{16}H_{12}O_5$, cresina amarilla, pectolinaringenina $C_{17}H_{14}O_6$, tectocrisina $C_{16}H_{12}O_4$. |
| Flavonoles | Izalqinina, kaempférido $C_{16}H_{12}O_6$, quercetina $C_{15}H_{10}O_7$, remnocitrina. |
| Flavononas | Pinostrobina $C_{16}H_{14}O_4$, sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$. |
| Flavononoles | Pinobanksina, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente las galangina $C_{15}H_{10}O_5$) |
| Minerales | Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc. |
| Vitaminas | Provitamina A y vitamina B3 |

Tabla 1.- Principales componentes químicos del propóleo (Gutiérrez, 2011)

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de la calidad de éste, así como de las proporciones de los elementos que lo constituyen y no sólo de una sustancia en particular,^{25,28} estos componentes se relacionan directamente con su origen geográfico.²⁵

Los compuestos identificados en propóleos de colmenas ubicadas en emplazamientos cercanos entre sí no difieren significativamente, aunque desde el punto de vista cuantitativo pueden ser variables. Ello implica que los propóleos deban ser estudiados y normatizados en función de la zona geográfica de ubicación de las colmenas.³⁴

4.4 Propiedades terapéuticas

El propóleo ha sido utilizado especialmente por sus propiedades antimicrobianas, aunque éste posee otras cualidades terapéuticas. Está documentada la actividad del propóleo contra bacterias, hongos, protozoarios, virus y parásitos, así como actividad cicatrizante y regeneradora de tejidos, antiinflamatoria, antioxidante, analgésica, hepatoprotectora, inmunomodulador, antitumoral, citostática, hepato y cardioprotector entre otras.^{14,22,23,27,44,49}

Es precisamente por estas propiedades que se ha motivado el uso terapéutico del propóleo en diversas ramas de la medicina como ginecología, odontología, dermatología, otorrinolaringología, oftalmología entre otras ramas de la medicina tanto humana como veterinaria.¹⁴

4.5 Actividad antimicrobiana

a) Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo.

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana del propóleo se da gracias al sinergismo de sus componentes y no de un sólo componente. Los flavonoides y los compuestos fenólicos se consideran como los principales componentes bioactivos de los propóleos. Los flavonoides: pinocembrina, galangina y pinobanksina se les atribuye la mayor actividad bacteriostática y bactericida.²⁵

El ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana. Así mismo se ha determinado que el propóleo desorganiza la membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma, provocando una bacteriólisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas.²⁵

En lo que se refiere a la galangina se sabe que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño causado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto por un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico. Se ha determinado que la quercetina inhibe la ADN girasa de manera parcial.²⁵

El propóleo es el producto de abeja con la mayor actividad antimicrobiana, la cual ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, se ha demostrado su actividad del propóleo en contra de los siguientes microorganismos:⁶

Bacterias Gram-positivas⁶

Bacillus cereus, *Bacillus mesentericus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacterium sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus: S. criticus*, *S. epidermis*, *S. faecalis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. viridians* y *S. sobrinus*.

Bacterias Gram negativas⁶

Branhamella catarrhalis, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella ozaemae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*: *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. exneri*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. paratyphi-A*, *S. paratyphi-B*, *S. typhi*, *Shigella*: *S. dysenteriae* y *S. sonnei*.

Hongos⁶

Aspergillus sp., *Candida*: *C. albicans*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium*: *M. audouinii*, *M. canis*, *M. distortum*, *M. gypseum*; *Phialophora jeanselmei*, *Saccharomyces sp.* *Trichophyton*: *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Trichosporon cutaneum*.

Virus⁶

Adenovirus, *Herpes simple*, *virus Influenza A y B*, *virus Newcastle*, *Polio virus*, *Rotavirus*; *Virus de Estomatitis Vesicular*, *Coronavirus*.

Parásitos⁶

Cholomonas paramecium, *Eimeria*: *E. magna*, *E. media*, *E. perforans*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*.

b) Efecto antimicótico del propóleo

Las propiedades antimicóticas del propóleos han sido estudiadas por numerosos investigadores, quienes aseveran que tal actividad depende tanto del origen del propóleo así como del solvente usado para su extracción.³⁴ Se han identificado compuestos como: pinocembrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina, mono y sesquiterpenos, los cuales son responsables de sus propiedades fungicidas.⁶

En un estudio realizado por la facultad de ciencias veterinarias en Argentina se llegó a la conclusión de que el extracto alcohólico de propóleos es capaz de inhibir el desarrollo de *M. pachydermatis*, (aislada de un caso clínico de otitis canina). Resta aún determinar, mediante técnicas microbiológicas, la concentración fungicida mínima, para así poder extrapolar estos valores a una forma farmacéutica aplicable en la terapéutica de otitis crónicas resistentes a otros tratamientos.³⁴

Otro estudio in vitro realizado recientemente en ese mismo país ha determinado la actividad antifúngica del propóleo contra diversos dermatofitos por medio de la técnica de microdilución. Los dermatofitos desafiados fueron fuertemente inhibidos por diferentes extractos de propóleo, donde las especies más susceptibles fueron: *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton rubrum*, obteniendo concentraciones Mínimas inhibitorias (MIC) que oscilaban entre 16 y 125 µg/ml. Los compuestos bioactivos principales fueron 2 ,4-dihidroxi-3 metoxycalcona 2 y 2 ' , 4'-dihidroxicalcona 3.¹

4.6 Usos del propóleo en medicina veterinaria

Diversos estudios se han realizado para conocer la actividad biológica del propóleo en animales, por ejemplo, propóleos de Turquía fueron probados en su capacidad para curar una infección ocular experimental en conejos. Las gotas oftálmicas de propóleos presentaron la misma eficiencia para curar la infección en comparación con el antibiótico ciprofloxacino. En Polonia, un bálsamo de propóleos fue superior para curar quemaduras experimentales en cerdos, en comparación con el antibacteriano sulfadiazina de plata.³⁸

Se han utilizado con éxito linimentos de propóleo en vacas con mastitis, en enfermedades ginecológicas se han aplicado bolos de propóleo obteniendo buenos resultados. Se ha utilizado como suplemento alimenticio y como profilaxis en las enfermedades gastrointestinales y respiratorias en cerdos y becerros débiles, alimentándolos con 0,5% de propóleos en la leche. Suplementando la alimentación de terneros con 5 ml de extracto etanólico al 20% se mejoró la ganancia de peso y hubo reducción de diarreas. A manera de profilaxis contra la fiebre paratifoidea de los patos mediante la alimentación con extracto acuoso de propóleos al 50%. Se logró la correcta cicatrización de heridas por medio de la aplicación de propóleo al 5%. Se ha utilizado como un anestésico local en cirugía: 1 a 10% de extracto etanólico de propóleo, también ha sido empleado a manera de estimulante para el crecimiento de los corderos, cerdos y terneros en países subdesarrollados, así como en el tratamiento de la fiebre aftosa en cerdos y vacas como también de la neumonía enzootica en cerdos.⁶ El propóleo es una alternativa también en el tratamiento de oftalmopatías en aves ornamentales siendo eficaz y sin efectos colaterales, de igual manera, en perros y gatos se ha empleado en el tratamiento de oftalmopatías, donde un 90% de los animales tratados con la suspensión oftálmica de propóleo respondieron positivamente en tan solo un tratamiento de 5 a 7 días; mientras que los animales que cursaban con cuadros crónicos requirieron un tratamiento de entre 10 y 15 días para mejorar²⁴ y en el tratamiento de otitis micóticas en perros por *M. pachydermatis* por medio del uso de gotas óticas a base de propóleos.³⁴

4.7.- Propóleos Mexicanos

A diferencia de otros países como, Argentina, Brasil, Honduras, China y Turquía entre muchos otros, en México no se han estudiado a profundidad el origen botánico o químico de nuestros propóleos.²⁵

El objetivo de este trabajo no es profundizar en las características de cada uno de los propóleos mexicanos, sin embargo vale la pena mencionar que recientemente se han analizado distintos propóleos provenientes de diversos estados de la república, para llevar a cabo su caracterización y la evaluación de su actividad biológica, entre ellos están los de Sonora,⁵³ Distrito federal,⁵⁷ Estado de México,²⁵ Jalisco,² Campeche,⁵² Guanajuato,²⁰ y de San Luis Potosí.¹⁰

4.7.1 Propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

La FES-C Campus 4 está localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli perteneciente al Estado de México, latitud: 19° 40' 50'' N, longitud: 99° 12' 25'' O, altitud: 2,260 msnm. Entre la flora predominante se encuentran: ahíles, jacarandas, álamos blancos, colorines, fresnos, eucaliptos, encinos, pirules, capulines, sauces y ahuehuetes, entre otros.²⁵

Gutiérrez en el año 2011 analizó una muestra de propóleo proveniente de los apiarios de la facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, (FES-C) recolectado en el otoño del año 2009. De acuerdo al análisis químico realizado por medio de cromatografía de gases, se contabilizaron 33 compuestos, correspondiendo el 3.293% a flavonoides totales, siendo detectadas la naringenina en un 1.006% y pinocembrina 2.290%. La mayoría de los compuestos de ésta muestra fueron de tipo terpénico.²⁵

Es importante señalar que el número de componentes de un propóleo no necesariamente es significativo de su actividad antimicrobiana, sino que la naturaleza química de los componentes así como la concentración de ellos en cada muestra es la que le confiere dicha propiedad.²⁵

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la actividad *in vitro* del propóleo de la FES-C contra una cepa de *Microsporum canis*.

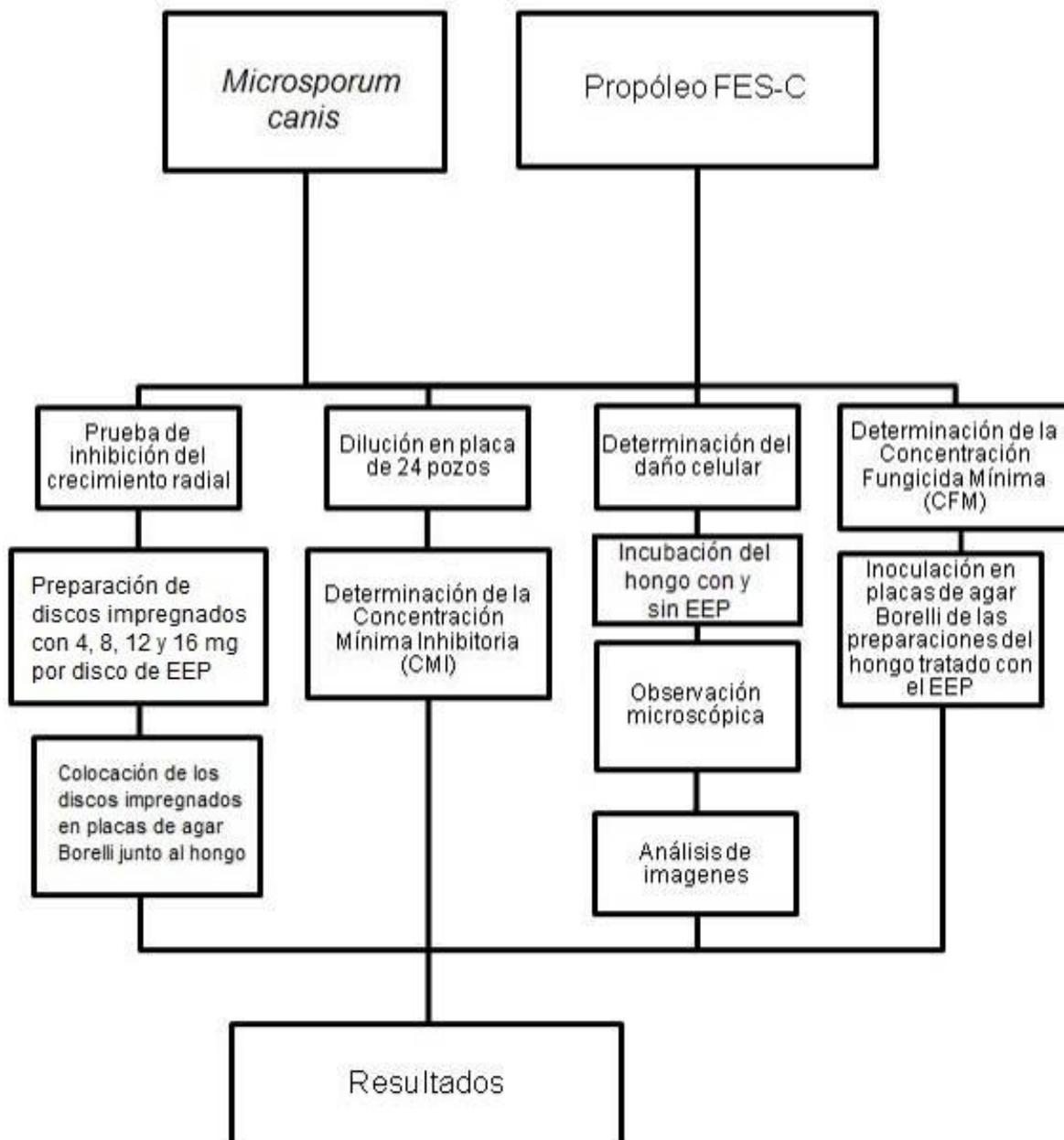
OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar cualitativamente la inhibición causada por el propóleo sobre *Microsporum canis* con la prueba de inhibición del crecimiento radial.
- 2) Obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo sobre la cepa del hongo por el método de dilución en placa de 24 pozos.
- 3) Evaluar el daño celular sobre el dermatofito causado por el extracto etanólico de propóleo (EEP) mediante microscopia óptica y análisis de imágenes.
- 4) Obtener la concentración fungicida mínima (CFM) del propóleo para *M. canis*

HIPÓTESIS.

El extracto etanólico de propóleo (EEP) de la FES Cuautitlán tiene actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos, por lo tanto deberá inhibir el crecimiento de *Microsporium canis*.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Propóleo: Para la elaboración del extracto etanólico de propóleo (EEP) se empleó propóleo bruto o en greña (tal cual se obtiene de la colmena) proveniente del apiario de la FES Cuautitlán UNAM, recolectado en el mes de octubre del 2011. Posterior a esto se procedió a retirarle las impurezas, tales como trozos de madera, abejas, piedras y trozos de cera y se cortó en pequeños trozos. Se pesaron 100 g y se depositaron en un frasco de vidrio ámbar, se le agregaron 300 ml de alcohol absoluto. Se mantuvo en maceración durante 10 días con agitación frecuente.

Cuando concluyó el periodo de maceración, se procedió a decantar y posteriormente a filtrar mediante el uso de papel filtro, el extracto obtenido se destiló con un rotovapor (Büchi R-205 B-490) con unas constantes de 85 revoluciones de rotación, una temperatura del vapor de 27°C y con una temperatura del baño de 55°C obteniendo así el extracto etanólico de propóleo (EEP).

Por último, el extracto etanólico se llevó a sequedad por evaporación en campana de vacío por un periodo de 24 horas días, se pesó, se envasó en un frasco ámbar de vidrio y se almacenó a temperatura ambiente protegido de la luz hasta su utilización.

Microorganismos: Se empleó una cepa de *Microsporium canis* donada por el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

1.-Prueba de inhibición de crecimiento radial (Modificado de Ye, 1999 y Wang y Bun, 2002)

Se sembró *Microsporium canis* en placas de agar Borelli y se incubó a 28° C durante 15 días hasta que se apreció el desarrollo de la colonia en la superficie del agar.

Se cortaron discos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5, se esterilizaron en autoclave. Posteriormente se prepararon 2 soluciones stock, una de 120 mg/300 µl y otra de 360 mg/300 µl utilizando etanol al 70% como solvente, de las cuales se tomó la cantidad equivalente a las concentraciones de 4, 8, 12, 16 mg respectivamente y después se impregnaron varios discos con cada una de las concentraciones antes mencionadas, y a manera de control se impregnaron discos con 10 µl etanol al 70% ya que fue el solvente utilizado para la solución stock.

De ese cultivo maduro se tomó un inóculo de 5 mm de diámetro y se colocó en el centro de una caja de Petri (100 x 15 mm) con 20 ml de agar Borelli. Posteriormente se colocaron alrededor del inóculo a una distancia de 1.5 cm del límite micelial, los discos impregnados con el extracto etanólico de propóleo a concentraciones de 4, 8, 12 y 16 mg, así como discos de ketoconazol (BIORAD62866, 50 µg) y clotrimazol (BIORAD62816, 50 µg) y los de etanol al 70% como controles.

Se incubaron las placas durante 15 días a 25° C hasta que la superficie del agar estuvo cubierto por el micelio y se observaron zonas de inhibición con forma de medias lunas.

2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por medio del método de dilución en agar en placa de 24 pozos (Londoño, 2010)

En esta prueba se desafiaron las siguientes concentraciones de propóleo: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.50, 0.25 mg/ml. Se preparó una solución stock de propóleo de 100 mg en 400 µl de etanol al 70% y de esa solución se tomó el volumen equivalente a cada una de esas concentraciones. Se preparó agar PDA (DIBICO, 1059-A), en tubos de vidrio, del cual se retiraba con la micropipeta el mismo volumen que posteriormente se le agregaría de la solución stock de propóleo, para cada una de las concentraciones. Se emplearon placas de 24 pozos de fondo plano (EVERGREEN) adicionando a cada pozo 1 ml de medio PDA adicionado con la concentración específica de propóleo. Se consideraron tres pozos para cada concentración, así como para los controles con medio PDA sin propóleo. Una vez que la placa pasó la prueba de esterilidad se inoculó el centro de cada pozo con un fragmento del cultivo de *Microsporium canis* de 1.6 mm de diámetro. Se incubaron las placas a 25°C durante 7 días hasta el desarrollo total de los controles sin extracto. Posterior a esto se realizó la lectura de la prueba, se observó cada pozo para determinar en cual hubo o no crecimiento del hongo y con estos datos se determinó la concentración mínima inhibitoria y finalmente se midió el diámetro de las colonias para determinar el porcentaje de reducción de crecimiento de la misma.

3.- Evaluación del daño celular (Modificado de Londoño, 2010)

Se sembraron 4 placas de 90 x 15 mm de agar Borelli con *M. canis* y se incubaron por 10 días a 25°C. Una vez que se desarrollaron las colonias, se procedió a cosechar las mismas agregando 4 ml caldo dextrosa Saboraud por caja, desprendiendo suavemente con una micrológica la colonia del agar, recuperando el caldo con una micropipeta. La cosecha se almacenó en un tubo de vidrio estéril, se homogeneizó utilizando el vórtex (Agitador vórtex Genie-2) y se igualó con el tubo correspondiente al 0.5 del nefelómetro de McFarland.

Posteriormente con la micropipeta se tomó de la cosecha ya estandarizada y se llenaron tres tubos para microcentrífuga (Eppendorf) estériles con 1 ml cada uno. Conjuntamente, se elaboró una solución patrón que contenía 30 mg del EEP en 1 ml de etanol al 70% para inocular al hongo a diferentes concentraciones, de tal manera que el tubo número 1 se dejó sin tratamiento a manera de control, al tubo número 2 se le agregó 1.0 mg/ml de EEP y al tubo número 3 se le agregó una concentración de 1.5 mg/ml y se incubaron en la estufa microbiológica a 25°C.

Se realizaron observaciones de la preparación de *M. canis* de cada uno de los 3 tubos, el control, el de 1.0 mg/ml y el de 1,5 mg/ml de EEP, se homogenizó la preparación con el vortex antes de tomar cada muestra, se tomó una gota de la misma y poniéndola sobre un portaobjetos, inmediatamente se tiñó con azul de algodón para su observación empleando

un microscopio (Carl Zeiss, Axioscop 40) teniendo acoplado una Cámara Evolution VF Cooled Color Media Cybernetics.

Se llevó a cabo la observación de 5 macroconidios para cada concentración y para el control a diferentes tiempos, la primera a las 0 horas, la segunda a las 5 horas, la tercera a las 10 horas, la cuarta a las 24 horas y la quinta a las 30 horas.

Adicionalmente para esta prueba se realizó la observación con microscopio de fluorescencia utilizando la tinción de blanco de calcoflúor ya que es de gran utilidad para el estudio morfológico ya que tiñe la pared celular y permite complementar la observación realizada con la coloración tradicional de azul de algodón. Ésta se empleó únicamente para observar el control de *M. canis* y para *M. canis* tratado con 1.5 mg de extracto etanólico de propóleo (EEP) ambos a las 30 horas de incubación, Para lo cual primeramente homogenizamos las preparaciones en el vórtex, tomamos una gota y la colocamos en el portaobjetos y posteriormente le agregamos una gota de blanco de calcoflúor (M2R Sigma, preparado al 0.1%) y se procedió a la observación en 40x utilizando el microscopio de fluorescencia.

Las imágenes fueron analizadas con el Software Q Capture Pro 6.0. Por medio del cual se llevaron a cabo las observaciones a detalle de las características microscópicas de la morfología de *M. canis*, las mediciones de los macroconidios y la captura de imágenes.

Una vez recabados los datos obtenidos de las pruebas, se capturaron y fueron analizados por medio del método de ANOVA con el programa para análisis estadísticos Graph Pad Prism versión 4. El cual nos permitió así mismo graficar dichos resultados.

4.-Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de propóleo (EEP) para *M. canis*. (Soares, 2001)

Esta prueba se realizó simultáneamente con la de daño celular utilizando la misma cosecha del hongo y la misma solución patrón del EEP. Se realizaron preparaciones del hongo tratados con el EEP a las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/ml, además de una preparación sin tratamiento que fue nuestro control. Cada preparación del hongo tratado fue elaborada en un tubo de microcentrifuga estéril y homogenizado en el vórtex.

Se tomó con una micropipeta 5µl de cada preparación del hongo para ser inoculada en una placa Petri de 60 mm con agar Borelli, cada concentración se inoculó por duplicado en una placa individual y se incubaron a 28°C en la estufa microbiológica, estas placas fueron identificadas como hora 0. Se inoculó nuevamente cada preparación del hongo en otras placas Petri con agar Borelli a las 5, 10, 24 y 30 horas, esto con el objetivo de evaluar el efecto del EEP sobre la cepa de *M. canis* a diferentes horas de exposición al propóleo.

Observamos el crecimiento del hongo en las placas control a los 7 días de la prueba, se procedió entonces a medir el diámetro de las colonias que se desarrollaron.

RESULTADOS

1.- PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL

Las cajas inoculadas con *M. canis* se incubaron hasta que se apreció el desarrollo del micelio desde el centro de la placa hasta la distancia en donde se había colocado el disco de control de etanol al 70%, se observó que el microorganismo creció alrededor y sobre el disco con etanol, evidenciando que el etanol no causa inhibición en el crecimiento de la cepa de *M. canis* (Figura 11).

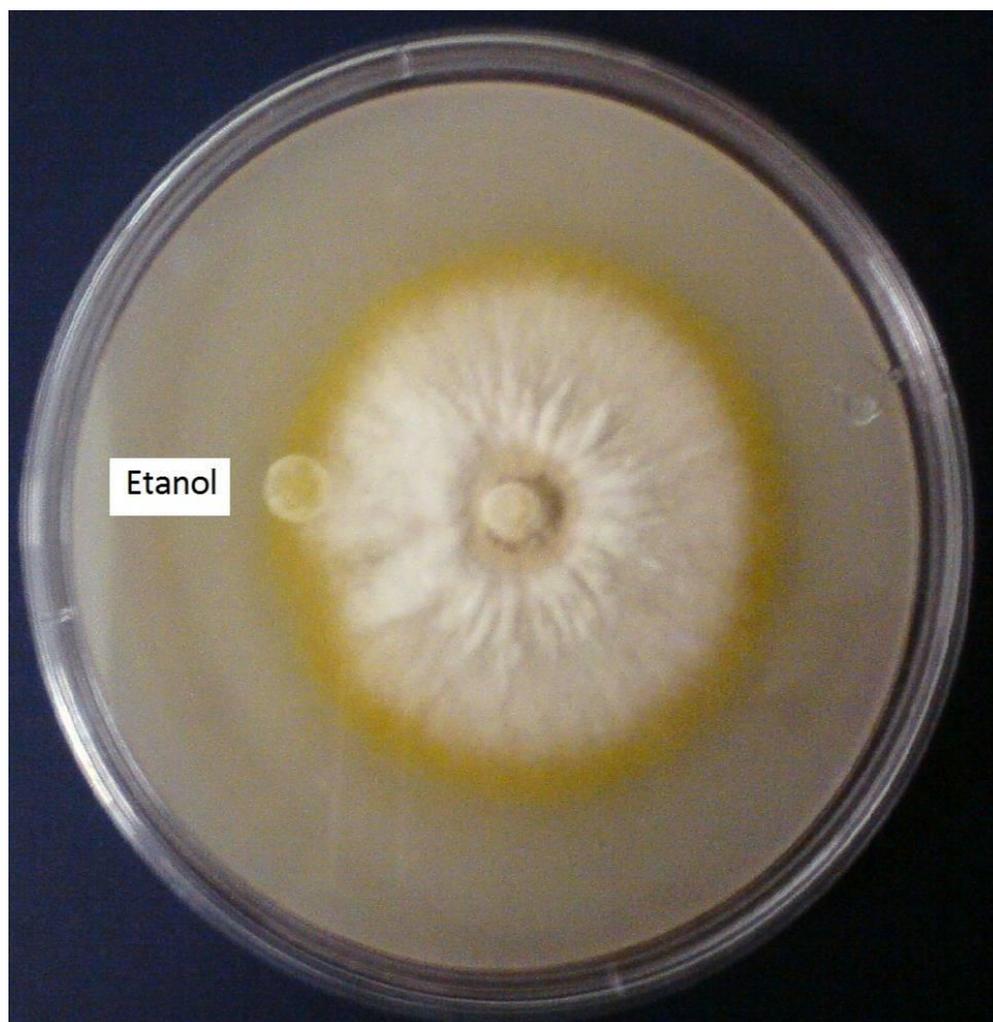


Figura 11.- Control etanol, se aprecia el crecimiento del hongo con abundancia de micelio sobre el agar y el disco control de etanol, mostrándonos que el etanol no tiene efecto inhibitorio sobre *M. canis*.

En la caja de los controles de ketoconazol y clotrimazol se observaron grandes halos de inhibición, siendo mayor el de ketoconazol en comparación con el de clotrimazol, lo que muestra que esta cepa de *M. canis* es sensible a ambos antifúngicos (Figura 12).

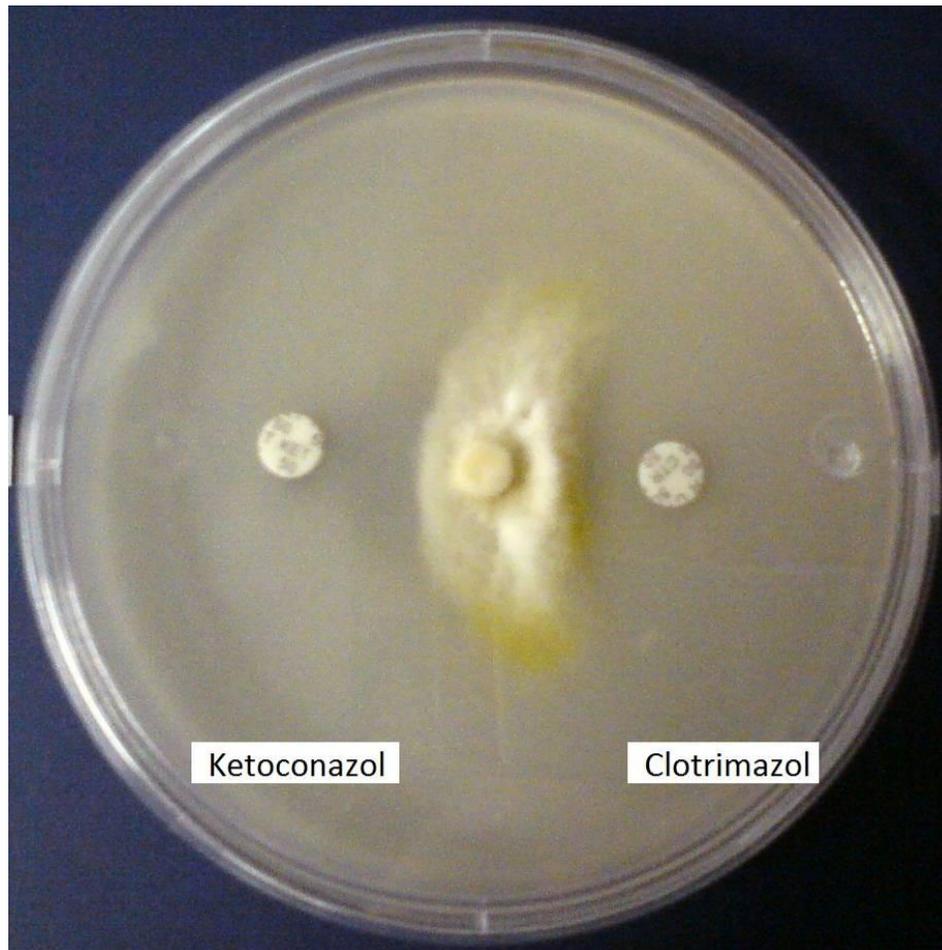


Figura 12.- Se observan los halos de inhibición dados por el ketoconazol y clotrimazol sobre la cepa de *M. canis*.

En las cajas en donde se colocaron los discos impregnados con EEP se observó la formación de medias lunas alrededor de los discos de 4, 8, 12 y 16 mg y se determinó cualitativamente que el propóleo de la FES-C a dichas concentraciones presentan actividad antifúngica ya que inhibió el crecimiento de la colonia de *M. canis*, también se observó que la densidad de micelio fue menor que la que se desarrolló en el control con etanol (Figura 13)

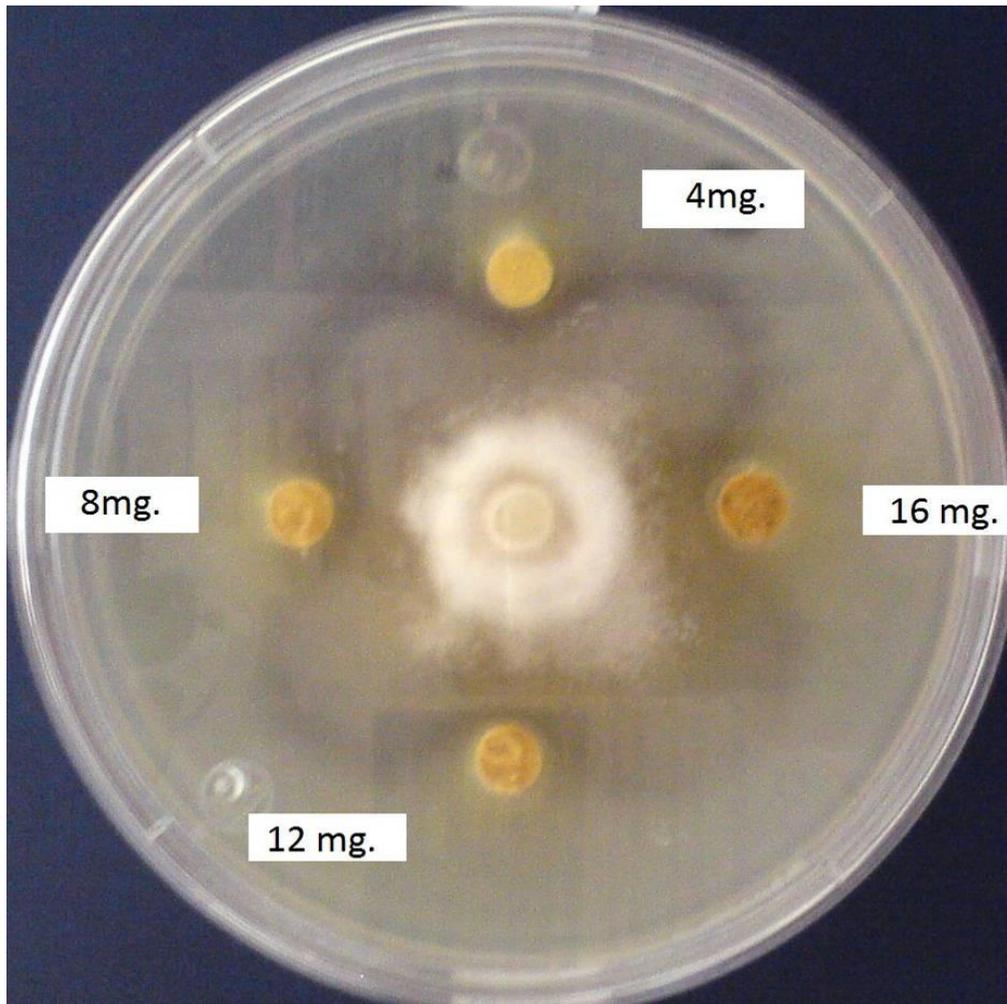


Figura 13.- Se muestra la formación de medias lunas alrededor de los discos impregnados con EEP a 4, 8, 12 y 16 mg. Nótese la reducción de la densidad del micelio.

Con estos resultados obtenidos determinamos cualitativamente que el propóleo produjo inhibición del crecimiento radial sobre *M. canis*, se observó que el etanol no causó efecto alguno en el crecimiento de misma cepa y que esta cepa en particular es sensible a ketoconazol e itraconazol.

2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL PROPÓLEO PARA *M. canis* POR MEDIO DEL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR EN PLACA DE 24 POZOS.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el porcentaje de reducción de crecimiento, una vez que hubo crecimiento total en los controles (a los 7 días) se midió el diámetro de cada colonia, se observó que *M. canis* solamente creció en los pozos controles y en los que tenían una concentración de 0.25 mg/ml de EEP con una reducción del tamaño de las colonias en relación a los controles y a partir de 0.5 mg/ml ya no hubo crecimiento (Figura 14) posterior a esto se obtuvieron los promedios del diámetro de las colonias desarrolladas y el porcentaje de reducción de crecimiento (Tabla 1) y finalmente se procedió a graficarlos (Gráfica 1)

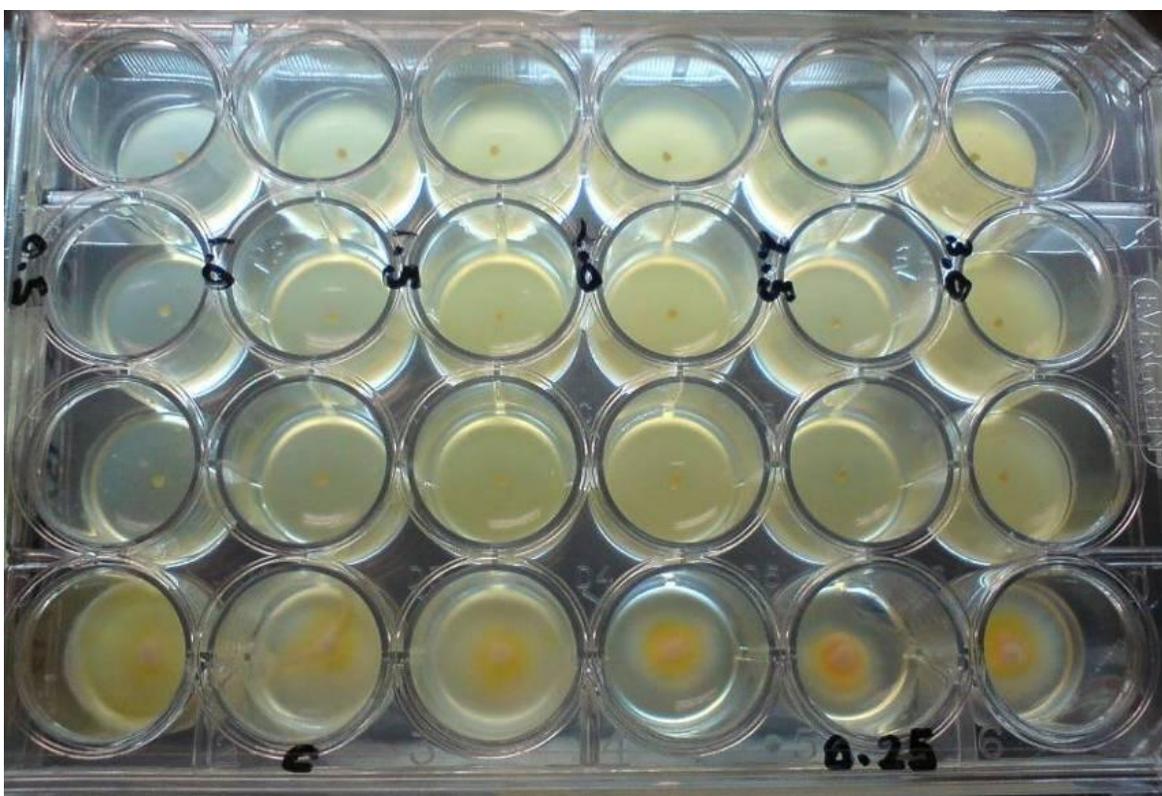
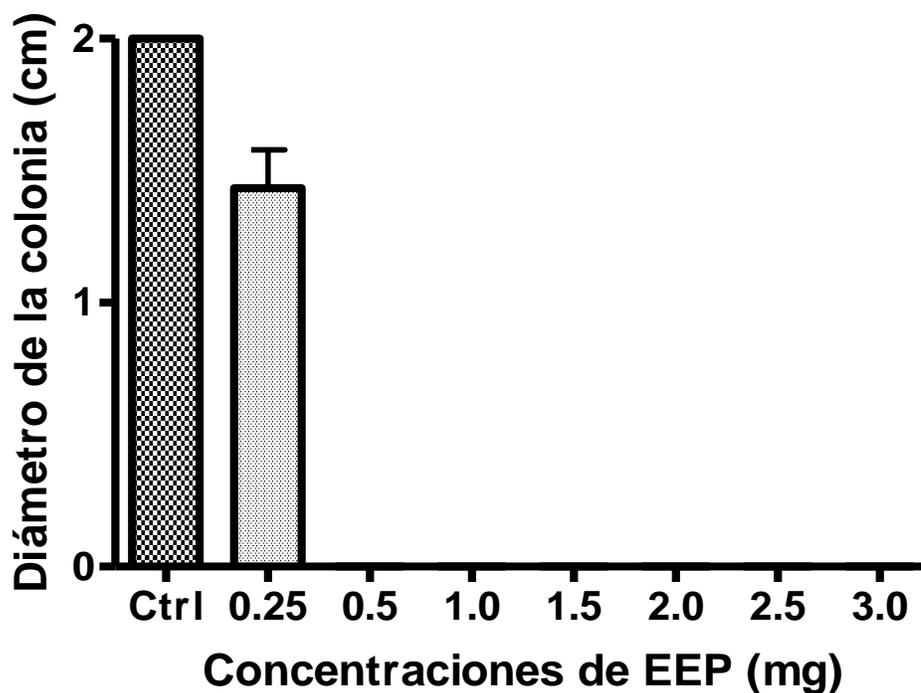


Figura 14.-Se muestra la placa a los 7 días de incubación, nótese el desarrollo total de los 3 controles, la reducción en el crecimiento de las colonias en los pozos de 0.25 mg/ml y la inhibición del crecimiento que hubo a 0.5 mg/ml en adelante.

| Concentración | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | % de inhibición del crecimiento de la colonia |
|----------------------|---|--|
| Control | 2.0 | 0 |
| 0.25 mg/ml | 1.43 | 28 |
| 0.5 mg/ml | 0 | 100 |
| 1.0 mg/ml | 0 | 100 |
| 1.5mg/ml | 0 | 100 |
| 2.0mg/ml | 0 | 100 |
| 2.5mg/ml | 0 | 100 |
| 3.0mg/ml | 0 | 100 |

Tabla 2.- Datos obtenidos de las mediciones del diámetro de las colonias, se puede ver que hubo desarrollo completo de los controles, a la concentración de 0.25 mg/ml hubo una reducción del crecimiento en un 28% y a partir de 0.5 mg/ml ya no hubo crecimiento, siendo la reducción del crecimiento en un 100%.

Dilución en placa de 24 pozos *M. canis*



Gráfica 1.- Se muestra la reducción del crecimiento de *M. canis*, nótese que a partir de 0.25 mg/ml hubo reducción del diámetro de la colonia y a partir de 0.5 mg/ml no hubo crecimiento.

Analizando los datos anteriores concluimos que a una concentración de 0.25 mg/ml hubo una reducción del crecimiento de las colonias en un promedio de 28% y que a partir de 0.5 mg/ml no hubo crecimiento de *M. canis*, siendo ésta última la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.- DETERMINACIÓN DE DAÑO CELULAR

Esta evaluación se llevó a cabo de manera cuantitativa y cualitativa.

a) Análisis Cuantitativo

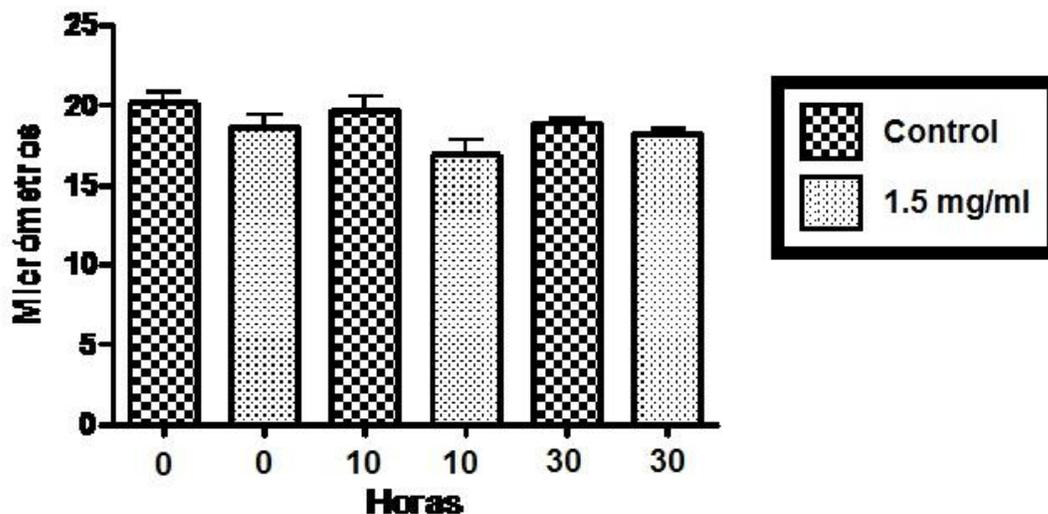
Para la evaluación cuantitativa se realizaron mediciones del diámetro de 5 macroconidios de *M. canis* por campo, tanto del control como de los tratados con EEP a 1.5 mg/ml a las 0, 10 y 30 horas respectivamente, se obtuvieron los promedios, arrojando los siguientes datos (Tabla 2).

| | Promedio del diámetro de los macroconidios | | |
|----------------|---|-----------------|-----------------|
| | 0 horas | 10 horas | 30 horas |
| Control | 20.15350 | 19.69078 | 18.80177 |
| 1.5mg | 18.60736 | 16.84631 | 18.20082 |

Tabla 3: Promedio del diámetro de los macroconidios de *M. canis* en μm .

Se procedió a analizar estadísticamente los datos obtenidos por medio del programa Graph pad versión 4 utilizando el método de ANOVA, y obtuvimos un valor de $P > 0.05$ lo cual indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de los macroconidios de *M. canis* control y de los macroconidios de *M. canis* tratado con propóleo. Dichos datos se graficaron y se visualizan de la siguiente manera (ver Gráfica 2).

Diámetro de macroconidios *M. canis*



Gráfica 2-Se muestra comparativamente los diámetros de los macroconidios de *M. canis* del los controles a las 0, 10 y 30 horas respectivamente en relación con los tratados y Al realizar el análisis estadístico ($P > 0.05$) se concluye que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ellos en cuanto a diámetro se refiere.

Al analizar estos datos pudimos observar que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de los macroconidios del control a las 0, 10 y 30 horas y los de *M. canis* tratados a las mismas horas, por lo tanto el EEP no causo efecto en el diámetro de los macroconidios.

b) Análisis cualitativo

En lo que se refiere a la evaluación de las características cualitativas, realizamos la observación de 5 macroconidios para cada una de las concentraciones y para el control a las 0, 5, 10, 24 y 30 horas respectivamente. Hallamos diversas alteraciones en los macroconidios tratados con EEP, las cuales se iban acentuando con el paso del tiempo y también conforme al aumento de la concentración de propóleo, estas alteraciones son: reducción del citoplasma, citoplasma de apariencia espumosa, células sin contenido citoplasmático e hifas con apariencia de estar vacías (Tabla 3). En los controles no se observaron esas alteraciones (ver Figuras 15, 16 y 17) así mismo se observó que el número promedio de macroconidios tratados con EEP a las diferentes horas y concentraciones no varió en relación al control correspondiente.

Así mismo para la tinción de blanco de calcoflúor para el control de *M. canis* y para *M. canis* tratado con 1.5 mg/ml de EEP a las 30 horas de incubación se observaron las mismas alteraciones antes mencionadas.

| | | Reducción del citoplasma | Citoplasma espumoso | Células vacías | Hifas vacías |
|-----------|----------|--------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| Control | 0 horas | - | - | - | - |
| | 5 horas | - | - | - | - |
| | 10 horas | - | - | - | - |
| | 24 horas | - | - | - | - |
| | 30 horas | - | - | - | - |
| 1.0 mg/ml | 0 horas | - | X | X | - |
| | 5 horas | X | X | - | - |
| | 10 horas | - | X | X | X |
| | 24 horas | X | X | X | - |
| | 30 horas | X | X | X | X |
| 1.5 mg/ml | 0 horas | X | XX | X | X |
| | 5 horas | - | XX | X | X |
| | 10 horas | X | XX | X | - |
| | 24 horas | X | XX | X | X |
| | 30 horas | X | XX | X | - |

Tabla 4.- Registro de las alteraciones halladas en las observaciones al microscopio donde X= alteración presente, XX= alteración muy marcada.

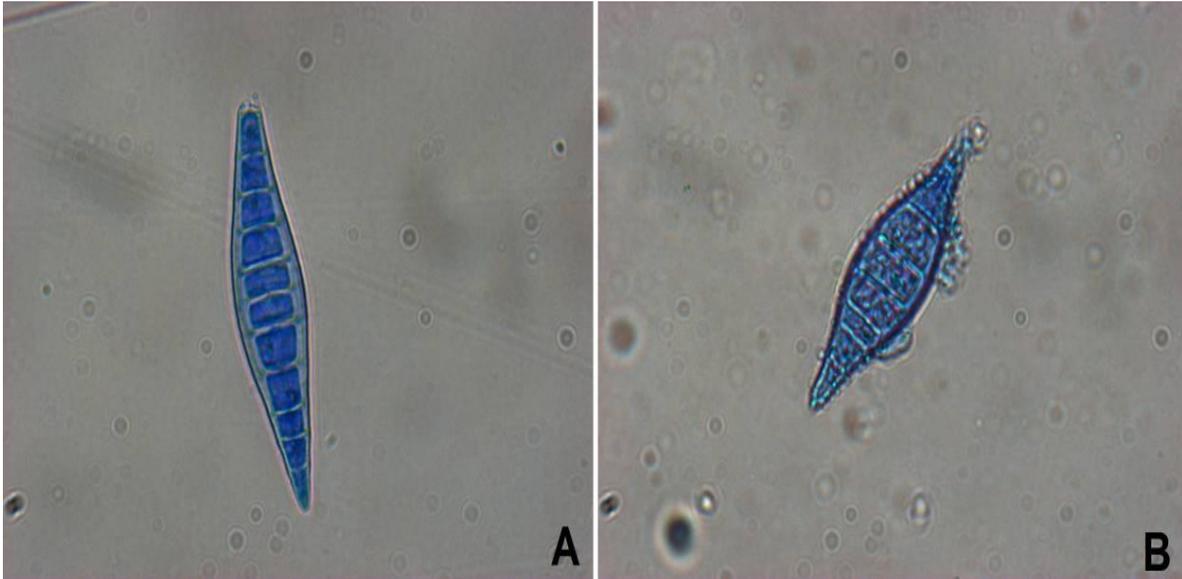


Figura 15. A. Se muestra un macroconidio del control de *M. canis* y en la figura B se aprecia un macroconidio alterado de *M. canis* tratado con propóleo en el que se ve el citoplasma de aspecto espumoso, ambas fotografías se tomaron en 40x.

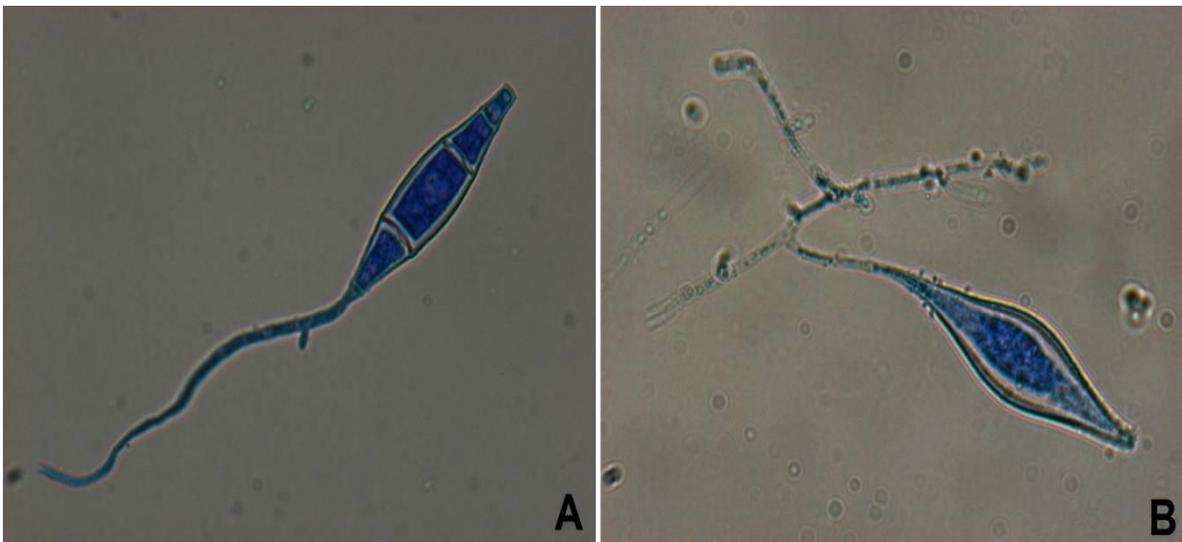


Figura 16.- A. Se ve una hifa, del control de *M. canis*, el contenido se ve de aspecto homogéneo y no se observan fragmentos sin contenido a diferencia de la hifa que se muestra en la figura B. la cual pertenece a *M. canis* tratado con EEP, ésta se observa vacía en algunas partes y con un poco de contenido espumoso en otras, ambas fotografías fueron tomadas en 40x.

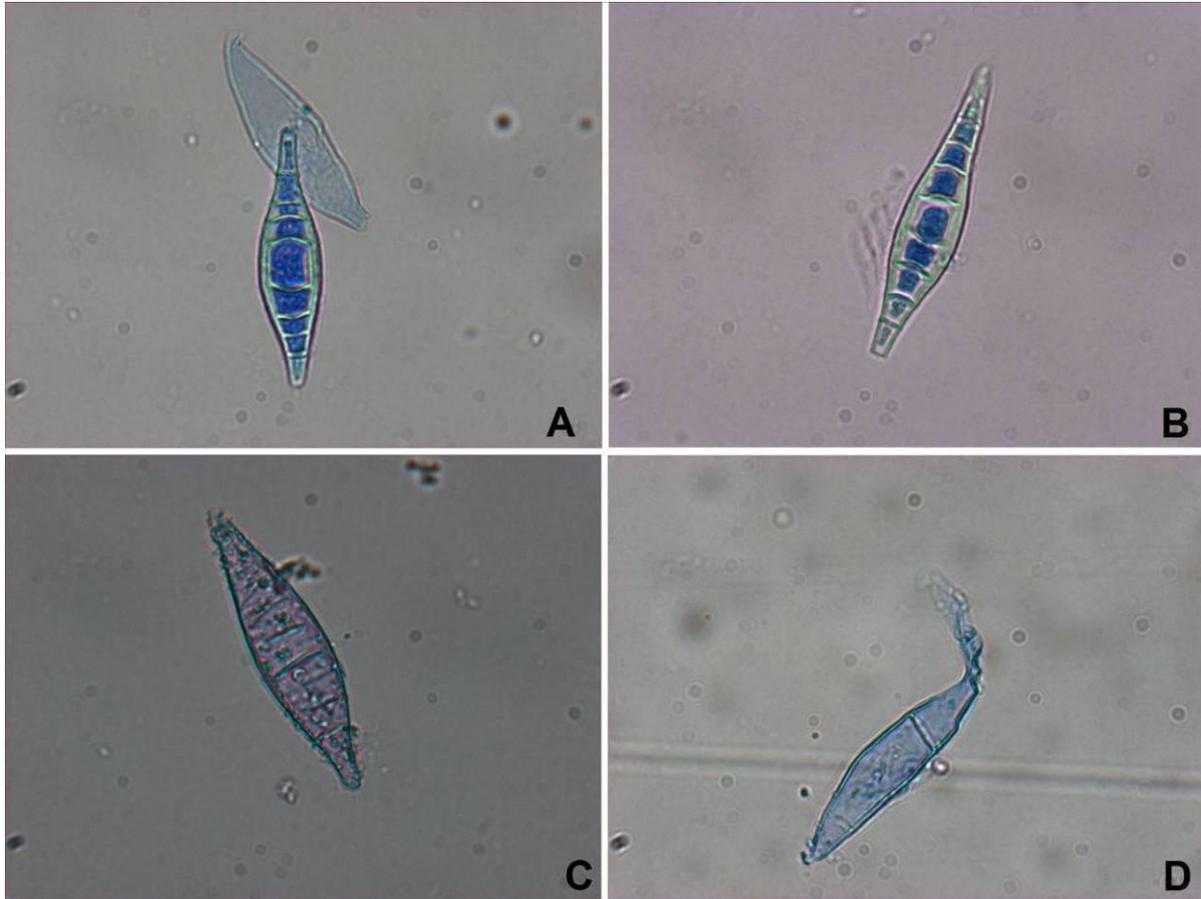


Figura 17.- Podemos ver en las figuras **A, B, C y D** tomadas en 40 x, las alteraciones encontradas en los macroconidios tratados con EEP. En la figura **A y B** la reducción o contracción del contenido citoplasmático y en las figuras **A, C y D** se puede ver la alteración de la estructura del macroconidios después de haber sido tratados.

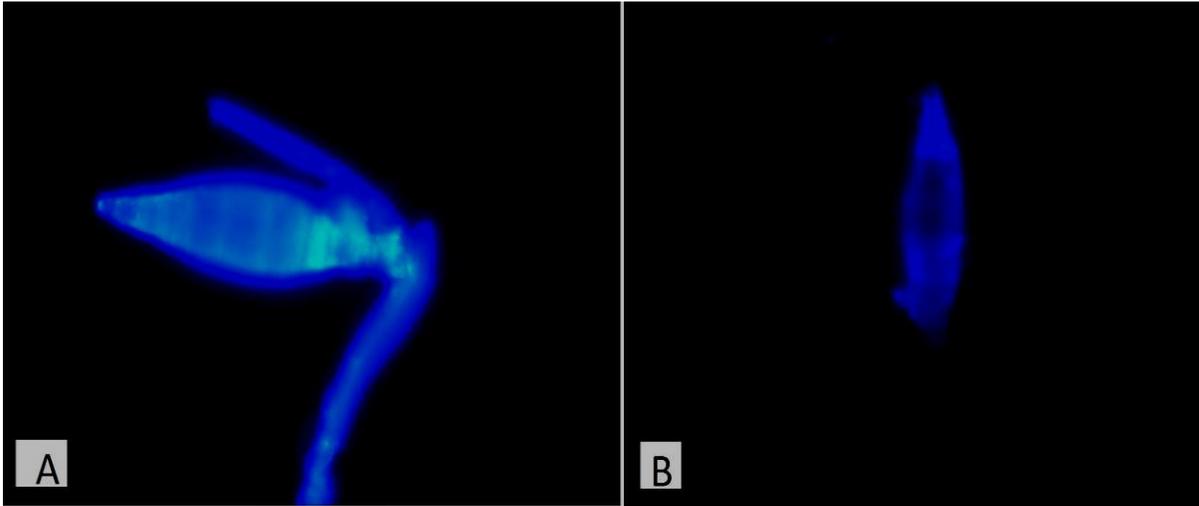


Figura 18.- A. Se muestra un macroconidio proveniente del control de *M. canis*. B. Un macroconidio de *M. canis* tratado con 1.5 mg de EEP, ambos a las 30 horas de incubación, en un aumento de 40x. Nótese el desarrollo de la hifa en el control y el aspecto homogéneo del contenido celular, en donde se aprecian con claridad los septos a diferencia del tratado con propóleo, en el cual no hay presencia de hifas y el aspecto del contenido citoplasmático es irregular, en algunas porciones pareciera no haber contenido celular y no se observan con claridad los septos.

Para la evaluación cualitativa de las características de los macroconidios, encontramos que los tratados con EEP tuvieron alteraciones en su estructura celular, de igual manera las hifas tuvieron alteraciones en comparación con las hifas de *M. canis* del control.

4.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Una vez incubadas las placas durante 7 días y al observar el desarrollo de las colonias de *M. canis* de los controles se procedió a observar y realizar la medición del diámetro de las colonias que se desarrollaron en las diferentes placas. De manera general todas las cajas de los controles se desarrollaron normalmente y para fines comparativos se tomó el crecimiento total del control de cada hora como el 100% y de ahí se observó que había una disminución gradual del diámetro de las colonias conforme el tiempo avanzaba y la concentración de extracto etanólico de propóleo (EEP) era más alta (Tabla 4).

Se observó que a las 0 horas en todas las placas inoculadas hubo crecimiento desde el control hasta la placa que se inoculó con *M. canis* tratado con 3.0 mg/ml, sin embargo hubo una disminución gradual en el diámetro de las colonias, ya que conforme aumentaba la concentración de propóleo, las colonias eran más pequeñas.

A las 5 horas el control de se desarrolló normalmente y hubo una reducción gradual del diámetro de las colonias conforme la concentración de EEP iba aumentando y a partir de la concentración de 1.0 mg/ml ya no hubo crecimiento.

A las 10 horas se repitió la misma metodología y se encontró que de igual manera el control de *M. canis* se desarrolló normalmente y a partir de la concentración de 1.5 mg/ml de EEP ya no hubo crecimiento.

A las 24 horas, el control de *M. canis* creció de manera normal, gradualmente el diámetro de las colonias disminuyó y se observó que a partir de la concentración de 1.0 mg/ml de EEP no se registró crecimiento.

A las 30 horas el control creció de manera normal, en la caja que se sembró con *M. canis* tratado con 0.25 mg/ml hubo crecimiento pero las colonias presentaron una reducción de tamaño muy significativa y a partir de la concentración de 0.5 mg/ml de EEP ya no hubo crecimiento (Figura 19).

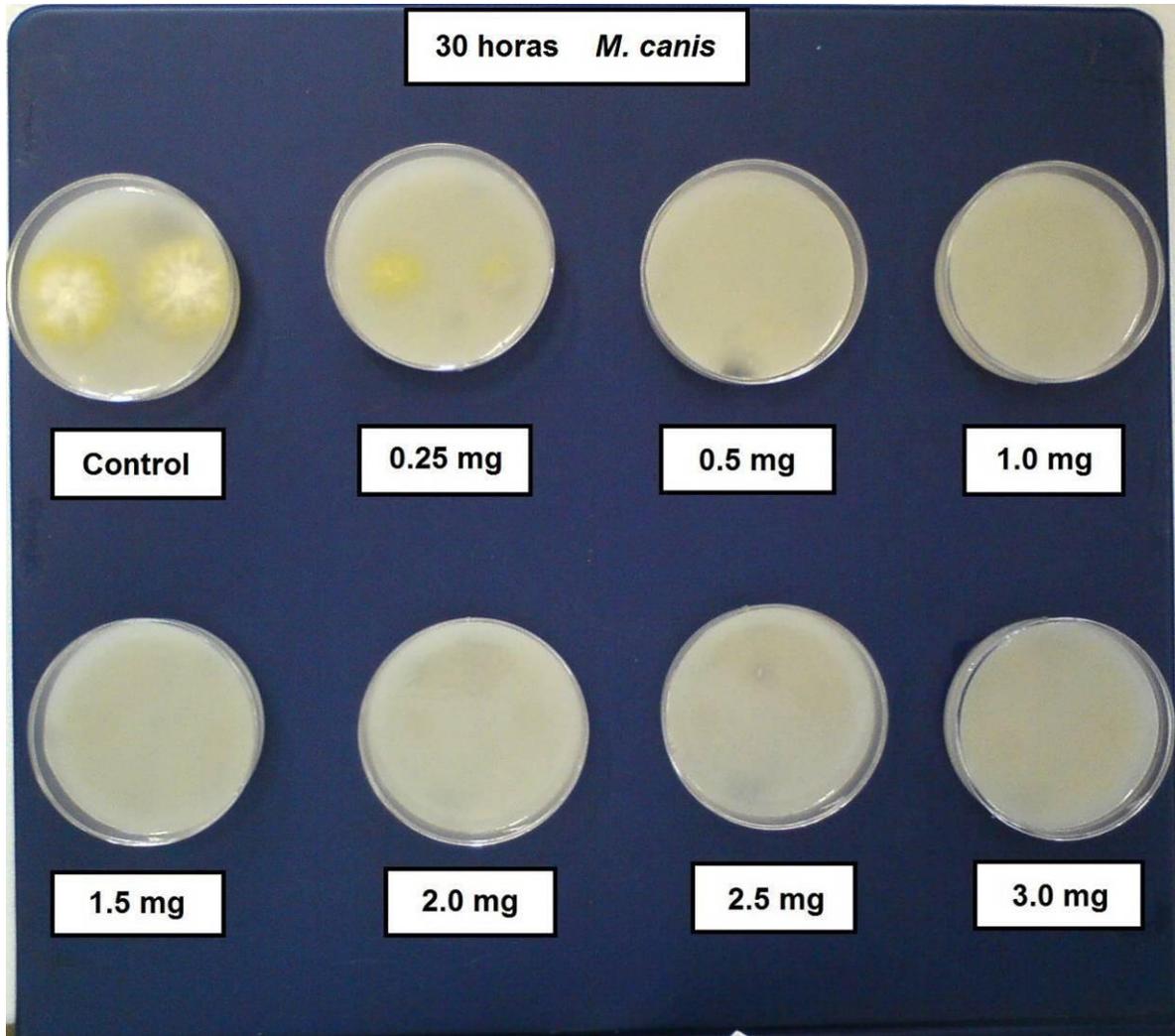


Figura 19.- Se muestra la serie de cajas sembradas con *M. canis* tratado con cada una de las concentraciones de EEP a las 30 horas, obsérvese el desarrollo de las colonias pertenecientes al control y la reducción considerable del tamaño de las mismas a la concentración de 0.25 mg/ml y que a partir de 0.5 mg/ml ya no hubo crecimiento.

| Concentración de EEP (mg/ml) | 0 horas | | 5 horas | | 10 horas | | 24 horas | | 30 horas | |
|------------------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|
| | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | Porcentaje de reducción | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | Porcentaje de reducción | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | Porcentaje de reducción | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | Porcentaje de reducción | Promedio del diámetro de la colonia (cm) | Porcentaje de reducción |
| Control | 4.3 | 0 % | 3.5 | 0 % | 3.2 | 0 % | 2.9 | 0 % | 2.6 | 0 % |
| 0.25 | 3.0 | 30 % | 2.5 | 29 % | 1.9 | 41 % | 1.3 | 55 % | 1.4 | 46 % |
| 0.5 | 3.0 | 30 % | 2.2 | 37 % | 1.7 | 47 % | 1.0 | 66 % | 0 | 100 % |
| 1.0 | 2.8 | 35 % | 0 | 100 % | 1.3 | 59 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % |
| 1.5 | 3.1 | 28 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % |
| 2.0 | 1.9 | 56 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % |
| 2.5 | 1.6 | 63 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % |
| 3.0 | 2.2 | 49 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % |

Tabla 5.- En esta tabla se muestran las mediciones del diámetro de las colonias de *M. canis* en centímetros, donde vemos que el porcentaje de reducción del mismo se da de una manera gradual conforme aumenta el tiempo y la concentración de EEP

Una vez que se analizaron los datos anteriores concluimos que el EEP tuvo un efecto fungicida a una concentración de 1.5mg/ml a partir de las 5 horas de incubación y a partir de las 30 horas a una concentración de 0.5 mg/ml una concentración de 0.5 mg/ml, siendo éstas las concentraciones fungicidas mínimas (CFM).

DISCUSIÓN

En base al los resultados de todas las pruebas realizadas, encontramos que esta cepa de *Microsporum canis* en particular fue susceptible al extracto etanólico de propóleo de la FES Cuautitlán.

Aunque Moreno (2009) recomienda el medio SDA y agar arroz para el cultivo de *M. canis*, observamos que esta cepa tuvo un crecimiento muy lento y en ocasiones nulo en esos agares, sucedió lo mismo con el medio PDA. Se optó por utilizar agar Borelli para las diversas pruebas realizadas, al utilizar este agar como lo propone Betancourt (2009) se favoreció el crecimiento y esporulación del hongo así como la producción del pigmento característico de *M. canis*, lo que permitió una buena apreciación del crecimiento del hongo al realizar la lectura de las pruebas, aún cuando en la metodología se indicaba la utilización de medio PDA (Wang y Bun, 2002).

En relación a la prueba de inhibición del crecimiento radial se observó que el extracto etanólico de propóleo (EEP) causó una disminución en cuanto al espesor del micelio que se desarrolló en la caja en donde se pusieron los discos impregnados con propóleo en comparación con la caja control de *M. canis* en donde se colocó el disco de etanol (ver figuras 11 y 13). Así mismo el EEP inhibió el crecimiento del hongo en todos los discos impregnados con el EEP. Comparando el tamaño de los halos de inhibición producidos por el propóleo con los controles de ketoconazol y clotrimazol, fue muy evidente la diferencia ya que los halos de éstos dos últimos fueron mucho más grandes, a pesar de que cada disco de esos antifúngicos contenía una concentración mucho menor, siendo de 50 µg (0,05 mg) y los de propóleo tenían 4, 8, 12 y 16 mg respectivamente. A pesar de ello se demostró que el propóleo causó inhibición sobre el crecimiento de *M. canis*, determinándose así que ésta cepa en específico es altamente sensible al ketoconazol y al clotrimazol a diferencia de lo que señala Rejas (1998) en su publicación, en donde menciona que es común que *M. canis* desarrolle resistencia al ketoconazol, y Rubio (1999) quien afirma que *M. canis* responde mal a los tratamientos con los azoles en general.

Para la prueba de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) no encontramos referencias de trabajos previos en los que se haya determinado la concentración mínima inhibitoria de propóleos mexicanos para *M. canis*, encontramos una publicación en la cual se menciona que la CMI de un EEP proveniente de Azerbaiyán Occidental probado contra *M. canis*, *M. gypseum* y otros dermatofitos, estuvo dentro de un rango de 62.5-500 µg/ml (Ownagh, 2010) hallándose así concordancia con la CMI que obtuvimos en este trabajo que es de 0.5 mg/ml, lo que es equivalente a 500 µg/ml.

El diámetro de los macroconidios, en la prueba de evaluación cuantitativa de daño celular, no tuvo una variación estadísticamente significativa entre *M. canis* tratado y el control ($P > 0.05$), el diámetro de los macroconidios de ambos grupos entraban dentro del rango de lo establecido, ya que Pontón (2002) establece un rango de 12-25 µm de diámetro concluyendo de esta manera que no hubo efecto del propóleo en cuanto a un aumento o reducción del diámetro de los macroconidios. Para la evaluación de tipo cualitativa hallamos que los macroconidios y las hifas tratadas con EEP en la gran mayoría se vieron

afectadas en su morfología, principalmente en las características de su citoplasma, esto lo pudimos apreciar tanto con la tinción de azul de algodón como con la de blanco de calcoflúor. No sabemos con exactitud a que se deben dichas alteraciones en el citoplasma de los macroconidios y de las hifas, Gutiérrez (2011) menciona que el ácido cinámico y algunos flavonoides presentes en el propóleo causan una desorganización del material citoplasmático, pero hacen falta más estudios para poder profundizar más acerca de la causa y el mecanismo de este tipo de alteraciones. Para obtener más datos acerca del efecto del propóleo en *M. canis* mediante ésta prueba, se sugiere estandarizar el inóculo del dermatofito contabilizando el número de macroconidios por medio de una cámara de Neubauer para poder determinar si el EEP causa una reducción en el número de macroconidios después del tratamiento del hongo con dicho extracto.

En lo que se refiere a la determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) determinamos que hubo un efecto fungicida a una concentración de 1.5 mg/ml de EEP sobre *M. canis* a partir de las 5 horas y para la concentración de 0.5 mg/ml de EEP a partir de las 30 horas también se observó un efecto fungicida. En lo que respecta a la concentración de 1.0 mg/ml los resultados fueron inesperados ya que a las 5 horas no hubo crecimiento pero a las 10 horas si y posteriormente a partir de las 24 horas ya no se presentó crecimiento nuevamente, este resultado pudiera ser explicado por un fenómeno llamado efecto Eagle o efecto paradójico, el cual ha sido descrito en bacterias (Lovesio 2001), levaduras y hongos filamentosos (Azanza 2008), es un fenómeno poco explicable en el cual la proporción de células sobrevivientes aumenta significativamente a medida que la concentración del antibiótico aumenta por encima de la concentración bactericida mínima (CBM) en bacterias. Este efecto es particularmente común con agentes activos contra la pared bacteriana, se ha planteado como hipótesis que las concentraciones elevadas podrían llegar a desinhibir mecanismos de resistencia de las bacterias, hongos y levaduras frente a estos antibióticos, aunque hasta la fecha no ha podido señalarse la repercusión práctica de este fenómeno ya que este fenómeno sólo se presenta *in vitro*.

La dermatofitosis por *M. canis* no es importante sólo porque afecta a los animales, sino que a su vez es un serio problema de salud pública ya que es una de las principales zoonosis, principalmente en niños, en adultos mayores y personas inmunocomprometidas tal como lo refiere Sumano (2006) y Segundo (2004), puesto que también la labor del Médico Veterinario Zootecnista es salvaguardar la salud humana por medio de la salud animal, al incursionar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas de origen natural para los animales, como lo es el propóleo, pudieran establecerse así mismo las bases para traspasar estas nuevas alternativas para el tratamiento de las dermatofitosis en humanos, en virtud de que éste producto de la colmena ha sido utilizado ampliamente desde tiempos inmemoriales y hasta la fecha por diversas culturas alrededor del mundo por sus abundantes propiedades terapéuticas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores y podemos decir que el propóleo puede ser una buena alternativa efectiva y natural para el tratamiento de las dermatofitosis producidas por *M. canis*, ya que los fármacos que se utilizan actualmente para dicho fin, a pesar de ser efectivos en la mayoría de los casos, representan por otra parte un riesgo para la salud de los pacientes pediátricos, geriátricos, gestantes, con daño renal o hepático e

inmunocomprometidos al presentarse diversos efectos colaterales y tóxicos durante su uso como lo señala Sumano (2006). La mayoría de los autores concuerdan en que la griseofulvina es el tratamiento de primera elección para las dermatofitosis a pesar de los efectos adversos que se presentan en los pacientes, principalmente en los gatos, sin embargo Patel (2010) refiere que en el Reino Unido, la griseofulvina ya no está disponible como tratamiento autorizado para los animales de compañía y que sólo el itraconazol es el único fármaco autorizado para los gatos dado que su toxicidad es menor a la de los demás antifúngicos.

Como ya hemos mencionado, existen trabajos previos que muestran que el propóleo tiene actividad antifúngica contra los dermatofitos, y se sabe que es efectivo contra *M. canis* (Bogdanov, 2011) pero aún no se sabe cuál es el mecanismo de acción. Al concluir este trabajo de investigación pudimos ampliar el conocimiento acerca de la eficacia del propóleo mexicano sobre este dermatofito, ya que hay muy poca información de los propóleos de nuestro país, también obtuvimos la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración fungicida mínima (CFM) y describir los daños morfológicos causados por el propóleo en *M. canis*, tanto en los macroconidios como en las hifas.

A diferencia de otros países, en México no existe una normatividad que asegure la calidad del propóleo así como su obtención, procesamiento, elaboración de subproductos y comercialización, es por eso que es de suma importancia el elaborar una normativa mexicana que garantice la calidad de cualquier propóleo que se pretenda utilizar terapéuticamente, además de que se podría impulsar aún más a los apicultores mexicanos a conseguir un ingreso extra con este subproducto de las abejas, ya que en las últimas décadas los productos naturales han tenido una mayor demanda.

Se sugiere continuar con esta línea de investigación para determinar el mecanismo de acción del propóleo sobre este dermatofito, poder determinar una dosis terapéutica y posteriormente llevar a cabo pruebas en animales de laboratorio, reproducir la enfermedad y de esta manera implementar un tratamiento adecuado con algún producto a base de propóleo con la finalidad de evaluar su eficacia, además de determinar el nivel de inocuidad o toxicidad con este tipo de tratamiento para conocer si el efecto *in vitro* del propóleo es el mismo una vez que es implementado *in vivo*.

CONCLUSIONES

- 1) Se analizó la actividad *in vitro* del propóleo de la FES-C contra una cepa de *M. canis* comprobando en todas las pruebas realizadas que éste microorganismo fue sensible al extracto etanólico de propóleo (EEP).
- 2) Se demostró de manera cualitativa que el propóleo de la FES Cuautitlán inhibió el crecimiento de la cepa de *Microsporium canis* por medio de la prueba de inhibición de crecimiento radial.
- 3) Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo que fue de 0.5 mg/ml sobre la cepa de *Microsporium canis* por el método de dilución en placa de 24 pozos.
- 4) Se evaluó el daño celular sobre la cepa de *Microsporium canis* causado por el extracto etanólico de propóleo mediante microscopía óptica y análisis de imagen, se encontraron diversas alteraciones morfológicas en el citoplasma de los macroconidios e hifas de *M. canis* tratado con EEP a diferencia de *M. canis* sin tratamiento. En el análisis cuantitativo no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto al diámetro de los macroconidios entre ambos grupos.
- 5) Se determinaron las concentraciones fungicidas mínimas del EEP para *M. canis*, 1.5 mg/ml a partir de las 5 horas de incubación y 0.5 mg/ml a partir de las 30 horas de incubación.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere continuar con esta línea de investigación para determinar el mecanismo de acción del extracto etanólico de propóleo contra *Microsporum canis*.
- Llevar a cabo la observación de *M. canis* tratado con propóleo usando microscopía electrónica para determinar con mayor precisión el tipo del daño producido y las estructuras celulares en las que se produce.
- Incluir pruebas en modelos biológicos para establecer una dosis terapéutica y comprobar su efectividad e inocuidad a nivel clínico.
- Se propone establecer una normatividad en México que regule la calidad de los propóleos que salen a la venta, a fin de estandarizarlos para asegurar su calidad y eficiencia.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.-**Agüero B, Gonzalez M, Lima B, Svetaz L, Sánchez S, Zacchino S, *et al.* Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58 (1): 194 - 201.
- 2.-**Alaniz, R. *et. al.* . Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos recolectados de apiarios del Estado de Jalisco, México Avances en la investigación científica en el CUCBA, XIX semana Nacional de la investigación, 2008, 559- 574.
- 3.-**Azanza J, Montejo M. Anidulafungina en el tratamiento de la infección fúngica invasora. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Supl 14: 14 - 20.
- 4.-**Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A. Chemical composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch* 2002; 57: 530 - 533.
- 5.-**Betancourt O, Salas V, Otarola A, Zaror L, Salas E y Neumann J. *Microsporum canis* en gatos dermatológicamente sanos en Temuco, Chile, *RevIberoamMicol.* 2009; 26(3): 206 – 210.
- 6.-**Bogdanov S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*, 4 July 2011 disponible en: www.bee-hexagon.net.
- 7.-**Bonifaz A. *Micología médica básica*, tercera edición. Editorial Mc Graw Hill, México, 2010; 61 - 97.
- 8.-**Cabañes F. J *Dermatofitosis animales. Recientes avances* *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S8 - S12.
- 9.-**Carlotti DN. *Tratamiento de la dermatofitosis en:* Locke P.H.; Harvey R.G.; Mason I.S. *Manual de dermatología en pequeños animales*, Reino Unido: Ediciones S, 1999: 313-318.
- 10.-**Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México) *Información Tecnológica.* 2011; 22(5): 21-28.
- 11.-**Cervantes O. Ringworm Infection in Dog and Cats. In: Carmichael L. *Recent advances in canine infectious diseases.* International Veterinary Information Service. 2003; 71 - 78.
- 12.-** Cole LK. Anatomy and physiology of the canine ear., *Veterinary Dermatology.* 2009; 21: 221–231.
- 13.-**De Buen AN, Guzmán BM, Ordóñez C, Chávez G. *Atlas de dermatología diagnóstica en perros y gatos.* Editorial Inter-Médica. Argentina, 2008: 30 - 33.

- 14.-**De Castro S L Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of this Bee-product. ARBS Ann Rev Biomed Sci. 2001; 3: 49 - 83.
- 15.-**Delgadillo K L, Rodríguez F A. Micosis superficiales: dermatofitosis. Virbac al día, animales de compañía. 2006; 7: 12 - 15.
- 16.-**Del Palacio A, Cuétara M, Valle A, González A, Almondarain I, Ramos CM, Moran VA y Pereiro MM. Cambios epidemiológicos observados en un decenio en las dermatofitosis del hospital universitario "12 de Octubre" de Madrid: nuevas especies emergentes. Rev Iberoam Micol. 1999; 16: 101 - 106.
- 17.-**Del Palacio A, Garau M, Cuétara MS Tratamiento actual de las dermatofitosis Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 68 - 71.
- 18.-**Dyce, KM. Anatomía Veterinaria, Segunda edición Mcgraw-Hill interamericana, México. 1996. 2: 53 - 55.
- 19.-** Dyce KM. Sack WO. Wensing CJG. Anatomía Veterinaria, Ed. El Manual Moderno, 3° ed. México 2007.
- 20.-**Egas M, Duarte G, King B, Rivero J. Estudio Químico Y Biológico de una muestra de Propóleos recolectada en el Estado de Guanajuato. Rev. Latinoamer. Quim. Supl. Esp. 2012; 39: 231.
- 21.-**Fernández A, Fernandes L, Sforcin J. The antibacterial activity of propolis produced by apis mellifera L. and brazilian stingless bees. J Venom Anim. Toxins. 2001; 7: 173 - 182.
- 22.-**Fierro W. Evidencia científica del propóleos desde el punto de vista médico. Memorias de Congreso Internacional de propóleos; 2000 septiembre 1-2, Buenos Aires Argentina. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2000.
- 23.-**Fokt H., Pereira A., A. M. Ferreira, A. Cunha, and. Aguiar C. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology A. Méndez-Vilas (Ed). 2010.
- 24.-**Giral, T; Hugues, B.; Soto, C.J. Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en aves ornamentales. REDVET Revista electrónica de Veterinaria. 2007; 3: 1 - 5.
- 25.-**Gutiérrez E. "Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejos". Tesis de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2011.

- 26.-Harvey RG, McKeever PJ, Manual ilustrado de enfermedades de la piel en perro y gato Grass Ediciones. 2001; 2: 15.
- 27.-Hegazi A. Propolis an overview. J. Bee Informed. 1998; 5: 22 - 28.
- 28.-Hernández J. *et. al.* Sonoran propolis: Chemical composition and Antiproliferative Activity on Cancer cell lines. Planta Med. 2007; 73: 1469 - 1474.
- 29.-König H. Liebich H. Anatomía de los animales domésticos tomo II, órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Editorial Médica Panamericana, 2º edición, Madrid 2005.
- 30.- Lloyd HD, Patel AP. Estructura y funciones de la piel, In: Foster, Aiden , Foil, Carol, Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos. España Segunda edición, Servicio Universidad. 2008; 1 - 13.
- 31.-Londoño OA. Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. (Tesis de doctorado) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México. Instituto tecnológico de Costa Rica 2010.
- 32.-Lovesio C, Empleo de antimicrobianos en terapia intensiva. En: Medicina intensiva Editorial El Ateneo. 2001; 14 - 19.
- 33.-Loyo HJL. *Microsporum canis* en gatos domésticos (tesis de licenciatura). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- 34.-Lozina, L. Boehringer, S. Teibler, P. Acosta de Pérez, O. Acción del propóleos sobre una levadura (*Malassezia pachydermatis*) aislada a partir de otitis externa canina. Rev. Vet. 2005; 16: 32 – 35.
- 35.-Mazón A, Salvo S, Vives R, Valcayo A, Sabalza M. Estudio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España) Rev Iberoam Micol. 1997; 14: 65 – 68.
- 36.-Moreno-C G, Palomares M, Fernández-MR, Arenas R. Características morfológicas de 45 cepas de *Microsporum canis*. Rev Mex Micol. 2009; 29: 31 - 35.
- 37.-Moreno N, Isla M, Cudmani N, Vattuone M, Sampietro A. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. J. Ethnopharmacol. 1998; 68: 97 - 102.
- 38.-Navarro NM, Hernández-MJ y Velázquez-CCA. Propóleos, producto de la abeja para combatir infecciones. Epistemus Junio 2011, Número 10.

- 39.**-Ocaña FC, Zurutuza I, Valdivielso P. Dermatofitosis en animales de compañía: riesgo zoonótico, centro veterinario No.44 2011 marzo-abril, revista de la asociación madrileña de veterinarios de animales de compañía AMVAC.
- 40.**-Ownagh A , Tukmechi A , Adibhesam M , Ebrahimzadeh S. Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi Urmia Med J. 2010; 21(3): 1027 - 3727.
- 41.**-Patel A, Forsythe P. Dermatología en pequeños animales colección soluciones saunders en la práctica veterinaria, España: Elsevier Saunders. 2010; 169 - 175.
- 42.**-Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos, Cien. Inv. Agr. 2008; 35(1): 17-26.
- 43.**-Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G. Hongos y actinomicetos alergénicos Revista Iberoamericana de Micología, 2002.
- 44.**-Principal J, Pacheco NT, Barrios C, Corrales F y Moreno F. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. Gaceta de ciencias veterinarias 2005; 11 (1).
- 45.**-Quintero M, Londoño A, Soto C, García C, Carrillo L, Penieres J, Cruz T. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). 2011; 3: 1068 - 1073.
- 46.**-Rejas L J. Dermatofitosis: ¿qué hay de nuevo? Consulta de Difusión Veterinaria. 1998, 6 (46): 79 - 80.
- 47.**-Rubio M C, Rezusta A, Gil T J, Ruesca R B Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev Iberoam Micol. 1999; 16: 16 - 22.
- 48.**-Segundo C, Martínez A, Arenas R, Fernández R y Cervantes A R. Dermatocosis por *Microsporium canis* en humanos y animales. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 39 - 41.
- 49.**-Segundo FN. Uso de extractos etanólicos de propóleo para el control de *Staphylococcus aureus* in vitro obtenidos de leche de vacas con mastitis. (informe técnico del proyecto de investigación). Sangolquí, Ecuador: escuela politécnica del ejército facultad de ciencias agropecuarias, 2005.
- 50.**-Soares M, Cury A. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against, Dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. Brazilian Journal of Microbiology. 2001; 32(2): 130 - 134.

- 51.-**Sumano LHS, Camberos OL, Farmacología Veterinaria, 3ra ed. México MacGraw-Hill Interamericana. 2006; 175 - 179.
- 52.-**Tolosá L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche Ars Pharmaceutica. 2002; 43:1-2: 187-204.
- 53.-**Valencia D. *et, al.* Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. Food Chemistry. 2012; 131: 645 – 651.
- 54.-**Vera M E. Dermatitis alérgica por piquete de pulga en el perro (revisión bibliográfica) (Tesis de licenciatura). Morelia (Michoacán) México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2009.
- 55.-**Wang H, Bun T. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 2002; 61: 1 - 16.
- 56.-**Ye X, Wang H. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatín-like proteín from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. Biochemical and Biophysical Research Communication. 1999; 263: 130 - 134.
- 57.-**Zarco G, Rivero B, Duarte G, López A, Correa A, Rivero J. Composición Química de Propóleos Recolectados En La Zona Rural De México. Rev. Latinoamer. Quim. 2012; 39: 232.