

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“ACTIVIDAD *in vitro* DE SEIS TIPOS DE PROPÓLEOS NACIONALES
CONTRA LOS PRINCIPALES HONGOS DERMATOFITOS Y
LEVADURIFORMES QUE AFECTAN LA PIEL Y ANEXOS EN
PERROS”**

MARÍA RENEE LA GUARDIA GARCÍA

GUATEMALA, MAYO DE 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“ACTIVIDAD *in vitro* DE SEIS TIPOS DE PROPÓLEOS NACIONALES
CONTRA LOS PRINCIPALES HONGOS DERMATOFITOS Y
LEVADURIFORMES QUE AFECTAN LA PIEL Y ANEXOS EN
PERROS”**

TESIS

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

POR

MARÍA RENEE LA GUARDIA GARCÍA

Al Conferírsele el Grado Académico de

Médica Veterinaria

GUATEMALA, MAYO DE 2011

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Med. Vet. Leonidas Ávila Palma
SECRETARIO: Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
VOCAL I: Lic. Zoot. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II: MSc. Med. Vet. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III: Med. Vet. y Zoot. Mario Antonio Motta González
VOCAL IV: P.A. Set Levi Samayoa López
VOCAL V: Br. Luis Alberto Villeda Lanuza

ASESORES

Med. Vet. CARLOS DE LEÓN, ASESOR PRINCIPAL
Lic. ARMANDO CÁCERES, ASESOR
Msc. Med. Vet. FEDERICO J. VILLATORO PAZ, ASESOR
Med. Vet. JULIA VIRGINIA BOLAÑOS DE CORZO, ASESOR

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**En cumplimiento a lo establecido por los estatutos de la
Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su
consideración el trabajo de tesis titulado:**

**“ACTIVIDAD *in vitro* DE SEIS TIPOS DE PROPÓLEOS NACIONALES
CONTRA LOS PRINCIPALES HONGOS DERMATOFITOS Y
LEVADURIFORMES QUE AFECTAN LA PIEL Y ANEXOS EN
PERROS”**

**Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad
de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICA VETERINARA

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS:** Por su amor, misericordia, fidelidad, por darme sabiduría y las fuerzas que me permitieron llegar hasta aquí.
- A MI MAMA:** Maritza García Estrada de La Guardia por su amor, esfuerzo y su apoyo incondicional; gracias por ser la mejor madre que Dios pudo darme; te amo.
- A MI PAPA:** René La Guardia por su amor, por su comprensión y por siempre apoyarme; te amo.
- A MIS HERMANAS:** Luisa La Guardia García y Michelle Labbé García por su amor y por estar siempre a mi lado; las amo.
- A MI NOVIO:** Diego Bobadilla, por ser mi apoyo incondicional, por su amor, por completarme y por ayudarme incondicionalmente; te amo.
- A MIS ABUELITOS:** Lulú de García, Eddy García (Q.E.P.D.), Mimí Vidaurre (Q.E.P.D.) y Sofy de La Guardia (Q.E.P.D.) por ser una inspiración para mí y un excelente ejemplo de vida; los amo.
- A MI TIO:** Por su amor, por ser como un padre para mí y por ser un buen ejemplo personal y profesional; te amo.
- A MI FAMILIA:** Lilian, Luisita, Javier, Luis y Gustavito por estar siempre a mi lado y por brindarme su amor y amistad; los amo.

A MIS AMIGOS: Mariza Asencio, May Alonzo, Lucha Espósito, Luis Barillas, Angel Estrada, Robinson Monroy, Gigo Villagran y Andrea Carbonell; por ser tan buenos amigos.

A MIS PADRINOS: Gracias por apoyarme siempre.

A MIS PERRAS: Bolly (Q.E.P.D), Gina (Q.E.P.D), Milky, Matilda, Mafalda y Camila por su amor incondicional, por darme tanta alegría y por estar siempre a mi lado; las amo.

A TODOS LOS ANIMALES DEL MUNDO: Sin ustedes el mundo no sería igual.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por darme sabiduría, inteligencia, fuerzas y sobre todo por su eterno amor.

A MIS PADRES: Por apoyarme, aconsejarme, amarme y guiarme siempre.

A MIS ASESORES: Dr. Carlos de León, Lic. Armando Cáceres, Dr. Federico Villatoro y Dra. Virginia de Corzo; por brindarme la ayuda y por aconsejarme.

A MIS AMIGOS: Angel Estrada, Robinson Monrroy y Gigo Villagran (los cuatro fantásticos) por ser los mejores amigos que Dios me pudo haber dado, por ayudarme y apoyarme siempre.

AL PERSONAL: Del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial a Martín, por su ayuda, paciencia y su disposición de ayudarme.

AL PERSONAL: Del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en especial a Licda. Isabel Gaitán y Astrid García por su ayuda, paciencia y su disposición de ayudarme.

AL CIETA: Por apoyarme con la realización de esta investigación.

A TODOS: Los que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo de investigación.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1 General	3
	3.2 Específicos	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1	Propóleo	4
4.1.1	Composición del propóleo en bruto	5
4.1.2	Componentes químicos	5
4.1.2.1	Compuestos identificados en los propóleos	5
4.1.2.2	Componentes con acción biológica	6
4.1.3	Propiedades farmacológicas	6
4.1.3.1	Acción antibacteriana	7
4.1.3.2	Acción fungicida	7
4.1.3.3	Antiviral	7
4.1.3.4	Antiinflamatoria	8
4.1.3.5	Anestésica	8
4.1.3.6	Cicatrizante y epitelizante	8
4.1.3.7	Citotóxicas	8
4.1.3.8	Antioxidantes	9
4.1.3.9	Otros usos	9
4.1.4	Efectos adversos	9
4.1.5	Recolección del Propóleo	10
4.1.6	Productos a base de propóleo	10
4.2	Dermatitis Micóticas	10
4.2.1	Dermatofitosis	11
4.2.1.1	Diagnóstico	14
4.2.1.2	Tratamiento	15
4.2.2	Hongos Levaduriformes	16
4.2.2.1	Candidiasis	16

4.2.2.1.1	Diagnóstico	17
4.2.2.1.2	Tratamiento	18
4.2.2.2	Dermatitis por <i>Malassezia pachydermatis</i>	18
4.2.2.2.1	Diagnóstico	19
4.2.2.2.2	Tratamiento	20
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1	Descripción del área de estudio	22
5.2	Recursos Humanos	22
5.3	Material Biológico	22
5.4	Materiales y Equipo	22
5.4.1	Recursos de laboratorio	22
5.4.1.1	Equipo eléctrico	22
5.4.1.2	Materiales y equipo de laboratorio	23
5.4.1.3	Soluciones	23
5.4.1.4	Agares	24
5.4.2	Recursos químicos	24
5.4.3	Centros de referencia	24
5.5	Metodología	24
5.5.1	Obtención de las cepas	24
5.5.2	Obtención de los propóleos	25
5.5.3	Obtención de las tinturas de los propóleos según Katircioglu <i>et al.</i> (2006)	25
5.5.4	Evaluación de la actividad antimicótica <i>in vitro</i> ; según el método descrito por Brancato & Golding (1983), modificado por Mac Rae <i>et al</i> (1988)	26
5.5.5	Evaluación de la actividad antilevadura <i>in vitro</i> ; según el método descrito por Mitscher <i>et al</i> (1972)	27
5.5.6	Duplicación y cuadruplicación del método	28
5.5.7	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	28
5.5.8	Características Organolépticas de los propóleos	29
5.6	Método estadístico	

VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1	Identificación de los propóleos	31
6.2	Elaboración de las tinturas de los propóleos al 30%	31
6.3	Características físico-organolépticas de los propóleos	31
6.4	Determinación de la actividad antilevadura	31
6.4.1	Determinación de la relación dosis-efecto de antimicótico utilizado en el control positivo	31
6.4.2	Fase de tamizaje	33
6.4.3	Determinación de la CIM	34
6.5	Determinación de la actividad antimicótico	36
6.5.1	Determinación de la relación dosis-efecto de antimicótico utilizado en el control positivo	36
6.5.2	Fase de tamizaje	37
6.5.3	Determinación de la CIM	38
6.6	DISCUSIÓN	39
VIII.	CONCLUSIONES	43
IX.	RECOMENDACIONES	44
X.	RESUMEN	45
XI.	BIBLIOGRAFÍA	47
XIII.	ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	30
Tabla 2.	31
Tabla 3	32
Tabla 4	33
Tabla 5	34
Tabla 6	35
Tabla 7	36
Tabla 8	37
Tabla 9	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	62
Gráfica 2	62
Gráfica 3	63
Gráfica 4	63
Gráfica 5	64
Gráfica 5	64

I. INTRODUCCIÓN

Las afecciones cutáneas en los perros son muy frecuentes; encontrándose dentro de estas las dermatitis micóticas; causadas por hongos entre los que se incluyen levaduras y dermatofitos. En la microflora normal de los perros se encuentran algunos hongos, que pueden convertirse en patógenos cuando el medio cutáneo les es favorable. (Buen *et al.* 2008)

Los hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan piel y anexos de perros se combaten con dosis altas de antimicóticos comerciales (polienos, azoles); los cuales son administrados por períodos de tiempo muy largos, elevando así considerablemente los costos del tratamiento. Debido a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas dichos fármacos pueden provocar efectos secundarios en perros. Estos efectos pueden ser leves (náusea, vómitos, anorexia, dolor abdominal y diarrea) o graves (hepatotoxicidad, teratogenicidad, elevación de las transaminasas y bilirrubina). También se debe considerar que para metabolizar esta clase de fármacos se necesita un buen funcionamiento hepático, el cual es menos eficiente en animales ancianos respecto a los jóvenes. Algunos hongos dermatofitos y levaduriformes han desarrollado resistencia a dichos productos; por lo cual es importante establecer tratamientos alternativos. Dentro de los tratamientos alternativos se encuentra el propóleo, producto apícola resinoso, complejo, con apariencia física variable, recogido y modificado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*). El propóleo posee actividad antimicótica, antibacteriana, antiparasitaria, inmunoestimulante, entre otras; su composición y actividad varía, dependiendo de la región de donde provenga.

(Bankova 2005; Kujumgiev *et al.* 1999; Katircioglu *et al.* 2006)

En el presente estudio *in vitro* evalué la actividad de seis tipos de propóleos nacionales, contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que causan dermatitis micóticas en perros; como un tratamiento alternativo.

II. HIPÓTESIS

Por lo menos un propóleo nacional posee amplio espectro antimicótico y antilevaduriforme.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Generar información de la actividad de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan piel y anexos en perros.

3.2 Objetivos Específicos:

- Demostrar la capacidad inhibitoria *in vitro* de seis tipos diferentes de propóleos nacionales sobre el crecimiento de hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos de perros.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima de los propóleos que tengan actividad antimicótica ó antilevadura.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Propóleo

El propóleo o pegamento de abeja es un producto apícola resinoso, complejo, con apariencia física variable, recogido y modificado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) desde las yemas, flores y exudados de las plantas en la que realizan su actividad de pecoreo. Una vez colectado este material, es enriquecido con cera, secreciones salivales y enzimáticas de la hipofaringe y glándulas cereras presentes en los esternitos del abdomen; adicionalmente pueden añadir microelementos del entorno. Es utilizado por las abejas para cubrir sus paredes, rellenar grietas y para embalsamar a insectos invasores. Su apariencia física es variable, dependiendo de su origen; puede ser ocre, rojo, pardo, marrón claro, negro o verde; algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Peña 2008, Salamanca *et al.* 2007)

El término propóleo se deriva del griego “pro” (‘frente a’ o ‘en la entrada de’) y “polis” (‘comunidad’ o ‘ciudad’); lo cual en conjunto define al propóleo como una sustancia defensora de la colmena (ciudad).

(Castaldo *et al.* 2002, Peña 2008)

Es un material duro a los 15°C y a medida que aumenta la temperatura se ablanda. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C.

(Salamanca *et al.* 2007)

4.1.1 Composición del propóleo en bruto

- Resinas y bálsamos 50 – 55%
- Cera 25 – 35%
- Aceites esenciales o volátiles 5 -10%
- Polen 5%
- Sustancias orgánicas e inorgánicas 5%

(Massaccesi 2002)

4.1.2 Componentes químicos

Los propóleos varían en su composición química, dependiendo de la región de donde provengan; así pueden presentar diferentes propiedades químicas y farmacológicas. Actualmente se conocen más de 300 componentes, la mayor parte son flavonoides derivados de esteres y ácidos fenólicos.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Peña 2008, Ramos *et al.* 2007)

4.1.2.1 Compuestos identificados en los propóleos

- Alcoholes
- Aldehidos
- Ácidos alifáticos y esteres
- Aminoácidos
- Ácidos aromáticos y esteres
- Chalconas y dihidrochalconas
- Flavononas
- Flavonas y flavonoles
- Hidrocarburos, esteres y éteres
- Ácidos grasos
- Cetonas

- Terpenos
- Esteroides
- Azúcares
- Sustancias inorgánicas: ceras, resinas, bálsamos y granos de polen. Estos son una fuente rica de elementos esenciales, tales como magnesio, níquel, calcio, hierro y zinc.
(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002, Peña 2008, Ramos *et al.* 2007)

4.1.2.2 Componentes con acción biológica

- Ácidos aromáticos y sus esteres: benzoico, caféico, ferúlico, cinámico, cumárico, gálico, salicílico.
- Ácidos grasos: palmítico, oleico, esteárico, linoleico, araquidónico, cerótico, mirístico.
- Terpenos: cimeno, cineol, limoneno, bisabolol, xantorreol, alfa-acetoxibetulenol.
- Flavonoides:
 - Flavonas: apigenina, crisina, tectocrisina, luteolina.
 - Flavonoles: quercetina, galangina, miricetina, isorhamnetina, kampferol.
 - Flavononas: naringenina, pinobanksina, pinocembrina, pinostorbina, sakuranetina.
 (Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002, Peña 2008, Ramos *et al.* 2007)

4.1.3 Propiedades farmacológicas

El propóleo presenta propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiprotozoarios, antineoplásicas, inmunomoduladoras, antipiréticas, hepatoprotectivas, anestésicas, conservantes y de regeneración tisular. También se ha demostrado que disminuye la presión sanguínea

y los niveles de colesterol sanguíneo, así mismo se ha utilizado como tratamiento de úlceras gastroduodenales.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Peña 2008, Ramos *et al.* 2007, Salamanca *et al.* 2007)

4.1.3.1 Acción antibacteriana

La acción antibacteriana es dada por los flavonoides y algunos ácidos aromáticos (ácido benzóico, ácido caféico y ácido ferúlico) combinados. Está demostrada su acción sobre *Staphylococcus*, *Sterptococcus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Kujumgiev *et al.* 1999, Katircioglu *et al.* 2006, Massaccesi 2002)

4.1.3.2 Acción fungicida

La mayoría de los componentes activos del propóleo, contra los hongos son flavonoides. El ácidos caféico, ácido cinámico y la crisina; actúan de forma efectiva algunas micosis. Se ha demostrado su acción sobre *Candida*, *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Kujumgiev *et al.* 1999, Katircioglu *et al.* 2006, Massaccesi 2002, Peña 2008)

4.1.3.3 Antiviral

El ácido caféico, luteolina y quercitina del propóleo, son los componentes que han demostrado su acción antiviral contra el *Herpesvirus*. Se ha demostrado la acción del propóleo *in vitro* sobre el virus de la influenza A, siendo el componente activo contra éste el ferulato de isopentilo.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Kujumgiev *et al.* 1999, Katircioglu *et al.* 2006, Massaccesi 2002, Peña 2008)

4.1.3.4 Antiinflamatoria

Se ha observado su acción antiinflamatoria sobre piel, mucosas y articulaciones.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002)

4.1.3.5 Anestésica

La acción anestésica de los propóleos se debe a los terpenos que lo conforman; éstos son degradados por altas temperaturas, por lo que es necesario evitarlas. Como anestésico local es similar a la novocaína (al 5%)

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002)

4.1.3.6 Cicatrizante y epitelizante

Los polifenoles contenidos en los propóleos estimulan a los fibroblastos para producir colágeno, por lo que favorece la regeneración de tejidos.

En humanos es utilizado para el tratamiento de quemaduras, heridas supuradas, úlceras varicosas, úlcera mixta de miembros inferiores, abscesos, forúnculos, verrugas, eccemas y psoriasis.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002)

4.1.3.7 Citotóxicas

Potencializa la fagocitosis y la formación de anticuerpos, por lo que posee una influencia favorable en procesos inmunológicos.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002)

4.1.3.8 Antioxidantes

Sus propiedades antioxidantes se deben a la actividad anti radicalaria de los flavonoides, caféato de feniletilo, frente a radicales alcoxi y superóxido, así como al efecto inhibidor sobre el ión cuproso, el cual es iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad.

Evita la oxidación de la vitamina C y prolonga la vida media de la adrenalina.
(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002, Salamanca *et al.* 2007)

4.1.3.9 Otros usos

- Conservante
- Antirreumático
- Favorece la digestión de alimentos, por contener amilasa (diastasa).
- Tratamiento de laringitis, faringitis, rinofaringitis, rinitis, sinusitis, otitis, gingivitis, aftas y afecciones broncopulmonares.
- Recomendado para la higiene dental, ya que los componentes del propóleo inhiben la glucosil transferasa, que es la enzima relacionada con la fijación de microorganismos al tejido dentario.

(Bankova 2005, Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002, Peña 2008)

4.1.4 Efectos adversos

El propóleo es considerado seguro en dosis pequeñas; la dosis sin contraindicaciones en humanos es de 70mg por día por cada 50 kg de peso corporal. Entre los efectos adversos más comunes se encuentran las reacciones alérgicas, irritación de la piel o membranas mucosas. Por lo que se recomienda precaución en personas alérgicas, evitando su administración por inhalación y aplicaciones locales en personas con alergias cutáneas.

(Castaldo *et al.* 2002, Massaccesi 2002, Peña 2008)

4.1.5 Recolección del Propóleo

Puede recolectarse raspando las paredes internas de la colmena, con ayuda de una espátula; o con trampas colocadas debajo del entretecho.

(Massaccesi 2002, Vit 2004)

4.1.6 Productos a base de propóleo

- Tintura: extracción alcohólica de propóleo.
- Extracto blando: es el resultado de la concentración de la tintura.
- Pomadas: se hacen en base al extracto blando sobre una base (crema hidrosoluble, mezcla de vaselina y lanolina o cera de abejas).
- Comprimidos. (Bankova 2005; Massaccesi 2002; Vit 2004)

4.2 Dermatitis Micóticas

Las dermatitis micóticas son causadas por hongos entre los que se incluyen levaduras y dermatofitos. En la microflora normal de perros se encuentran algunos hongos, que pueden convertirse en patógenos cuando el medio cutáneo les es favorable; como ocurre cuando hay lesiones cutáneas causadas por traumatismo crónico, humedad, enfermedades inmunosupresoras, exceso de producción de sebo o cerumen. Así mismo se pueden convertir en patógenos cuando se usan de forma prolongada los corticosteroides o antibióticos de amplio espectro.

(Alzate sf, Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Medleau 2007)

Los hongos son eucariontes portadores de esporas, heterótrofos obligados, uni o multinucleados, sin clorofila, de reproducción sexual o asexual, de nutrición absorptiva, cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, están rodeadas con paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambas sustancias, junto con otras moléculas orgánicas complejas.

(Pellizzarri 2008, Vilee 1996)

4.2.1 Dermatofitosis

La micosis superficial causada por hongos dermatofitos, es llamada dermatofitosis, comúnmente conocida como Tiña. Se considera que es la zoonosis asociada a pequeños animales que más incidencia presenta; los dermatofitos no invaden tejido subcutáneo o tejidos más profundos, ya que tienen una gran afinidad por estructuras corporales que poseen una proteína, siendo la queratina su principal fuente de alimentación. La queratina se encuentra en el pelo, las uñas y la capa más superficial de la piel (estrato córneo).

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Cabañes 2000, Merck 2000, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

Las dermatofitosis son causadas por especies de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. En perros la infección suele producirse por *Microsporum canis* (40 – 90%), *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes* (6%) y raramente puede ser causada por *Microsporum persicolor* (2%) y otras especies como *E. floccosum*, *M. cookei*, *M. fulvum*, *M. vanbreuseghemii*, *T. ajelloi*, *T. equinum*, *T. rubrum*, *T. verrucosum*, etc. (2%).

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Cabañes 2000, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

La infección por *Microsporum gypseum* es más frecuente en perros que pasan mucho en la calle, ya que este hongo es geofílico y por lo tanto se encuentra en el suelo. Este produce lesiones en las áreas corporales que se encuentran en contacto con el suelo, como en las patas y el hocico. La infección causada por *Trichophyton mentagrophytes* frecuentemente está asociada al contacto con algún roedor, ya que estos son reservorios naturales de este hongo.

(Birchard *et al.* 2002, Cabañes 2000, Merck 2000, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

La Dermatofitosis se puede contagiar de forma directa (de un individuo a otro), o de forma indirecta (a través de fómites, contacto con pelos o escamas). A veces hay transmisión zoonótica, que es común con *Microsporum canis*.

(Cabañes 2000, Merck 2000, The Center of Food Security and Public Health 2005)

Cuando un individuo tiene contacto con un dermatofito, no siempre se desarrolla una infección, ya que diferentes tipos de defensa actúan dificultando la multiplicación del hongo. La primera barrera del sistema inmune para evitar la infección, son las secreciones de las glándulas de la piel, que tienen una actividad fungistática. Los animales que son bañados con una frecuencia excesiva utilizando shampoos de mala calidad son más susceptibles a padecer dermatofitosis, ya que el exceso de baños elimina de la superficie cutánea el sebo protector e incrementa la humedad relativa en la piel. Si se supera esta barrera el sistema inmune es el encargado de limitar la infección del dermatofito. Si el individuo infectado no posee otra enfermedad que disminuya sus defensas, la infección es autolimitante. El tiempo necesario para la curación puede durar varios meses, debido a esto es necesario tratar la infección, ya que durante este tiempo los animales infectados pueden estar en contacto con otros animales y con personas a las que se les puede transmitir la infección. La tiña es más frecuente en animales jóvenes, ya que estos no han desarrollado completamente sus defensas. Así mismo los animales desnutridos y aquellos que padecen algún tipo de enfermedad son más susceptibles de padecer dermatofitosis, ya que tienen disminuidas las defensas. La recuperación de la infección se asocia con el desarrollo de inmunidad mediada por células contra los antígenos dermatofíticos y normalmente se da inmunidad contra infecciones posteriores.

(Birchard *et al.* 2002, Cabañes 2000, Merck 2000, Rejas 1998, NAVC 2007)

Las manifestaciones clínicas de la dermatofitosis pueden ser muy variadas, según el dermatofito que cause la tiña y la respuesta del individuo. A pesar de esto, existe un tipo de lesión con forma anular o de anillo que se considera típica, esta forma se da debido a que el hongo crece de forma centrífuga. Esta lesión es

alopécica, ya que los pelos infectados se rompen y en estas regiones puede existir inflamación de la piel; tiene una zona central pálida y un halo externo rojo, debido a que la inflamación de la piel es más fuerte en la zona recién infectada. También es usual la presencia de escamas o caspa en el centro de la lesión. Algunos individuos pueden presentar prurito, el cual lo manifestarán rascándose o lamiéndose las zonas afectadas. La intensidad del prurito puede causar que los animales se lesionen más y que las heridas empeoren, incluso que se infecten. Si un individuo es infectado por un hongo que no está adaptado a esa especie, la reacción inflamatoria es muy elevada, originando lesiones intensas; esto es lo que ocurre, por ejemplo cuando un perro es infectado por *Microsporum gypseum*. Mientras que si el hongo está adaptado a la especie que infecta, la respuesta inflamatoria es mucho menor, como en el caso de infecciones por *Microsporum canis* en perro.

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Cabañes 2000, NAVC 2007, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

En los perros pueden aparecer lesiones típicas en forma de anillo; en algunos casos se manifiesta como un querión y en casos muy raros pueden aparecer granulomas, nódulos con inflamación menos intensa que el querión. El querion dermatofítico, es una lesión anular, alopecica, de aspecto nodular con una delimitación periférica muy marcada que no tiende a expandirse, y tiene un aspecto inflamatorio, lo cual difiere de la presentación típica de dermatofitosis en los caninos. Suele aparecer de forma aguda, con un aspecto eritematoso y exudativo. Usualmente el dermatofito responsable de un querión es *Microsporum gypseum*. Las localizaciones corporales más frecuentes de la dermatofitosis en perros son la cara, orejas, patas y cola; con menor frecuencia pueden presentar infecciones de las uñas (onicomicosis), causadas por *Microsporum gypseum* o *Trichophyton mentagrophytes*. Clínicamente se observa la zona alrededor de la uña inflamada y la garra puede presentar deformidades y fragilidad.

(Birchard *et al.* 2002, Cabañes 2000, Merck 2000, NAVC 2007, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

4.2.1.1 Diagnóstico

- Historia clínica.
- Lesiones en piel y anexos.
- Lámpara de Wood: Para diagnosticar infecciones causadas por *Microsporum canis*, cuando se emplea de la forma correcta puede detectar alrededor del 50%.
- Examen microscópico del pelo o raspados (100X ó 400X): Hidróxido de potasio al 10%, detecta hifas, conidias y escamas y de pelos o escamas provenientes de la piel.
- Cultivos: realiza de pelos y escamas de los bordes activos de la lesión; se incuba a 25 – 28 °C por 3 semanas.
 - Agar Sabouraud.
 - Medio de cultivo para dermatofitos (DTM): los dermatofitos producen un cambio de color en el medio de amarillo a rojo, en el momento en que la colonia se hace visible.
- El diagnóstico definitivo y la identificación de la especie se hace extrayendo hifas y macroconidios de la superficie de la colonia usando una cinta de acetato, y examinarlos al microscopio con tinción de azul de algodón con lactofenol.

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2007, WSAVA 2008)

- *Microsporum canis*: Colonias blancas lanosas con un pigmento amarillento (que puede ser difícil de notar si el hongo crece en medios para exámenes de dermatofitos). Se observan abundantes macroconidias con forma ahusada con nudos en los extremos y poseen más de seis compartimientos internos. Unas pocas microconidias con pared suave y forma de garrote pueden también estar presentes, así como algunas macroconidias de forma redonda. Su crecimiento va de siete a 14 días.

Un pigmento amarillo profundo característico puede observarse en el lado contrario de una colonia en Agar Sabouraud dextrosa o en Medio para examen de dermatofitos (DTM). En DTM, el medio debe cambiar de ambar a rojo, concurrentemente con el crecimiento.

(NAVC 2007, WSAVA 2007, WSAVA 2008)

- *Microsporum gypseum*: Macroconidias en grandes números, son elipsoides con paredes delgadas, no tienen nudo terminal y contienen seis o menos compartimientos internos. Las colonias son planas de color canela a marrón claro con una superficie polvorosa; poseen un pigmento amarillo en la parte posterior. Crecen de siete a 14 días en agar dextrosa Sabouraud o DTM. En DTM, el medio debe cambiar de ambar a rojo concurrentemente con el crecimiento.

(NAVC 2007, WSAVA 2007, WSAVA 2008)

- *Trichophyton mentagrophytes*: Las macroconidias están formadas en pequeños números, pueden ser de desarrollo lento y tienen forma de cigarro con paredes delgadas y suaves. Las microconidias son redondas y están presentes en agregados sobre los conidióforos, también pueden estar presentes hifas en espiral. En agar Sabouraud o en DTM, crece una colonia con superficie algodonosa polvorosa que es usualmente más plana que la de *M. canis*, el lado reverso es usualmente marrón; se desarrolla dentro de siete a 14 días. En DTM, el medio debe cambiar de ambar a rojo concurrentemente con el crecimiento.

(NAVC 2007, WSAVA 2007, WSAVA 2008)

4.2.1.2 Tratamiento

- Combinar un tratamiento tópico (clotrimazol, enilconazol, ketoconazol, miconazol y tiabendazol) y uno sistémico (griseofulvina, itraconazol, terbinafina y ketoconazol). La terapia tópica sirve para destruir el material

infectivo y evitar su diseminación al ambiente; mientras que la terapia sistémica acorta el tiempo de infección en el animal. El tratamiento sistémico se debe dar durante cuatro semanas como mínimo. Los medicamentos de elección son griseofulvina (20 – 100 mg/kg BID), ketoconazol (10 mg/kg SID) e itraconazol (5 – 10 mg/kg SID).

- Control de material infectivo sobre el ambiente, para prevenir que la infección ocurra de nuevo y evitar que se contagie a otros animales o a personas.
- Aislar a los animales infectados de los sanos.

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Medleau 2007, NAVC 2007, Rejas 1998, WSAVA 2008)

4.2.2 Hongos Levaduriformes

Hongos microscópicos unicelulares, con capacidad de fermentar hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias. Algunas levaduras están formadas únicamente por células individuales y a veces cadenas cortas.

(Parés 1997, Ville 1996)

4.2.2.1 Candidiasis

Es una infección cutánea oportunista causada por *Candida albicans*, también llamada Candidosis, Moniliasis o Muguet. La *Candida albicans* es un hongo levaduriforme dimórfico que es un habitante normal de la mucosa. Generalmente un factor subyacente, favorece el crecimiento cutáneo; entre las que podemos mencionar lesiones cutáneas causadas por un traumatismo crónico, humedad, enfermedad inmunosupresora o el uso prolongado de fármacos citotóxicos corticosteroides o antibióticos de amplio espectro.

(Alzate sf, Buen *et al.* 2008, Medleau 2007)

En perros afecta principalmente zonas mucocutáneas, piel, canal auditivo, uñas, boca, nariz, espacios interdigitales y ano. Afecta más que todo a animales

jóvenes, débiles e inmunocomprometidos, por lo que se dice que es un hongo oportunista.

(Alzate sf, Buen *et al.* 2008, Medleau 2007)

Cuando afecta las mucosas se observan las uniones mucocutáneas erosionadas o ulceradas superficialmente, así mismo se pueden observar úlceras en las mucosas que no se curan, que se encuentran cubiertas por placas color blanco grisáceo con los márgenes eritematosos. Cuando afecta la piel se caracteriza por lesiones cutáneas o de las uñas que no se curan, eritematosas, húmedas, erosionadas, exudativas y con costras. En los casos crónicos hay formación de hiperqueratosis.

(Alzate sf, Buen *et al.* 2008, Carlyle *et al.* 1997, Medleau 2007)

4.2.2.1.1 Diagnóstico

- Lesiones.
- Examen citológico: se realiza una tinción de Gram o Giemsa en la que se observa inflamación supurativa con numerosas levaduras, células epiteliales reactivas y detritos celulares.
- Cultivo en Agar Sabouraud, a 37°C por 48 horas. Las colonias de *Candida albicans* son muy pequeñas y miden de 1,5 a 2 mm. de diámetro, son lisas, suaves, húmedas, de color y aspecto cremoso, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días de haberla cultivado se percibe un olor característico de levadura. Microscopicamente se observan clamidiosporas globales terminales o intercaladas, blastosporas ovoides, se pueden observar pseudohifas unidas entre sí.
- Dermatohistopatología: epidermitis superficial, hiperqueratosis, levaduras en gemación, pseudohifas ocasionales o hifas verdaderas en queratina.

(Alzate sf, Buen *et al.* 2008, Carlyle *et al.* 1997, Medleau 2007, Pardi 2002)

4.2.2.1.2 Tratamiento

- Identificarse y corregirse las causas subyacentes.
- Las zonas afectadas deben de lavarse y secarse con un astringente tópico.
- Aplicar un producto antimicótico tópico hasta que se curen las lesiones (nistatina, anfotericina b, miconazol, clotrimazol, ketoconazol).
- Para las lesiones orales o generalizadas hay que administrar fármacos antimicóticos sistémicos (mínimo 4 semanas) hasta 1 semana después de la resolución clínica (ketoconazol, itraconazol, fluconazol).

(Buen *et al.* 2008, Medleau 2007)

4.2.2.2 Dermatitis por *Malassezia pachydermatis*

Malassezia pachydermatis es una levadura lipofílica, no micelial, que se encuentra normalmente en pequeñas cantidades en los conductos auditivos externos, en las zonas periorales, en la región perianal y en los pliegues cutáneos húmedos de los perros. La Dermatitis causada por esta levadura se da en perros cuando se desarrolla una reacción de hipersensibilidad a los microorganismos o cuando hay un sobrecrecimiento cutáneo. Este sobrecrecimiento generalmente es secundario a una causa subyacente, tales como atopia, pioderma, alergia alimentaria, ectoparásitos (demodicosis), enfermedades endócrinas (hipotiroidismo,) exceso de producción o modificación del sebo o cerumen, exceso de humedad, trastornos de la queratinización (seborrea), enfermedades metabólicas o tratamiento prolongado con corticosteroides o antibióticos. La dermatitis por *Malassezia* es común en perros de razas West Highland White terriers, Dachshunds, Setter inglés, Basset hounds, Cocker spaniel americanos, Shih Tzu, Springer Spaniels, Pastores alemanes, Collie, Shetland, Jack Russel terrier, Silky terrier, Australian terrier, Maltés, Chihuahua, Poodle y Sharpei. . No existe predisposición de edad, ni por sexo excepto en un estudio que demostraba predisposición de machos y hembras esterilizados. (Alzate sf, Buen *et al.* 2008, Medleau 2007, NAVC 2007, WSAVA

2005, WSAVA 2008)

Clínicamente se observa prurito moderado a intenso, alopecia regional o generalizada, eritema, pápulas eritematosas y seborrea con descamación, costras y aspecto grasiento del pelo y piel. Se caracteriza porque el animal emana un olor corporal desagradable. Generalmente afecta los espacios interdigitales, la parte ventral del cuello, las axilas, parte ventral del abdomen la región perianal, pabellones auriculares, labios, hocico o extremidades (antebrazos, parte posterior de los muslos y patas). En casos crónicos la piel afectada puede liquenificarse y se observa hiperpigmentación e hiperqueratosis. Es muy frecuente la otitis externa causada por *Malassezia pachydermatis*, ya que la humedad que existe en el canal auditivo, es un medio favorable para su desarrollo.

(Buen *et al.* 2008, Medleau 2007, NAVC 2006, NAVC 2007, WSAVA 2005, WSAVA 2008)

La respuesta del hospedador frente a la *Malassezia pachydermatis* incluye mecanismos de defensa no específicos (fagocitosis por neutrófilos) y mecanismos defensivos específicos mediado por células (linfocitos T producen linfoquinas que estimulan la fagocitosis por macrófagos y la multiplicación de las células basales de la epidermis). Esto lleva a la destrucción de las levaduras o a una eliminación mecánica por descamación. *Malassezia* produce un gran número de enzimas (lipasas y proteasas) que contribuyen a una inflamación cutánea por proteólisis, por lipólisis que da lugar a la alteración de la barrera lipídica, cambios en el pH cutáneo, una liberación de eicosanoides y activación del complemento.

(NAVC 2006, NAVC 2007, WSAVA 2005, WSAVA 2008)

4.2.2.2.1 Diagnóstico

- Historia clínica y examen físico.
- Examen citológico: se realiza una tinción de Gram en la que se observa se observan células alargadas o redondeadas de 3 a 5 micras de diámetro, con un aspecto típico de gemación unipolar semejante a una huella o cacahuete, células epiteliales reactivas y detritos celulares. Algunos

autores afirman que la presencia de unas cuantas levaduras es significativa, mientras que otros consideran que se da enfermedad solo si hay un elevado número de levaduras por campo.

- Impronta: técnica muy fiable.
- Técnica con cinta de acetato: técnica muy fiable.
- Raspado
- Frotis con hisopo: examen citológico del conducto auditivo.
- Dermatohistopatología: muestra levaduras en la superficie de la epidermis o en la queratina.
- Citología óptica: se realiza una tinción de Wright modificada (Dif-Quick), para observar la presencia e identificación del microorganismo.
- Cultivos:
 - Agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximidina, a 37°C por 48 horas. Las colonias son redondas, convexas y amarillentas. La *Malassezia pachydermatis* es de tamaño pequeño de 2 a 7 micras y no produce pseudomicelios.
 - Agar de Dixon modificado: crecen todas las especies de *Malassezia*.
(Buen *et al.* 2008, Medleau 2007, NAVC 2007, WSAVA 2005)

4.2.2.2.2 Tratamiento

- Tratamiento sistémico (ketoconazol, itraconazol, fluconazol, nistatina y anfotericina B), cuando los signos clínicos son severos y cuando es generalizada. La griseofulvina o los derivados de la alil-amina no son eficaces en el tratamiento de la infección por *Malassezia pachydermatis*.
- Terapia tópica, cuando las lesiones están localizadas, se debe de aplicar 2 a 3 veces por semana durante 2 semanas y luego seguir con una vez por semana. No se debe de usar sola, sino que debe de combinarse siempre con algún tratamiento sistémico.
- El tratamiento debe durar como mínimo un mes, pudiéndose alargar hasta 2 meses. Normalmente se sigue dando tratamiento 7 -10 días tras la curación.

- Otitis externa: nistatina, tiabendazol, clotrimazol, miconazol, agentes limpiadores antisépticos.
- Pioderma: se debe de complementar la terapia con tratamiento antibiótico.
- Se debe de tratar adecuadamente la enfermedad que desencadeno la dermatitis por *Malassezia*.

(Buen *et al.* 2008, Medleau 2007, NAVC 2006, NAVC 2007, WSAVA 2005, WSAVA 2008)

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción del área de estudio

- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).
- Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), USAC.

5.2 Recursos Humanos

- Estudiante tesista
- Profesionales asesores
- Personal de laboratorio

5.3 Material Biológico

- Hongos dermatofitos: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*.
- Hongos levaduriformes: *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*.
- Seis propóleos nacionales

5.4 Materiales y equipo

5.4.1 Recursos de laboratorio

5.4.1.1 Equipo eléctrico

- Agitador
- Autoclave

- Balanza analítica
- Congelador a -20°C
- Incubadoras a 27°C y 37°C
- Refrigeradora a 5°C
- Campana bacteriológica de flujo laminar

5.4.1.2 Materiales y equipo de laboratorio

- Algodón
- Asa de nicromo en argolla
- Beakers
- Cajas de Petri simples y cuadriplate
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Erlenmeyers
- Guantes de látex
- Hisopos estériles
- Mechero
- Papel parafilm
- Pipetas automáticas
- Plantilla para siembra
- Puntas amarillas de 200 μ l
- Puntas azules de 1000 μ l
- Regla graduada en milímetros
- Seis recipientes de vidrio opaco
- Tubos con tapón de rosca de 10 y 15 ml

5.4.1.3 Soluciones

- Agua desmineralizada
- Caldo Sabouraud
- Caldo tripticasa soya

- Dextrosa
- Etanol al 95%
- Fosfato diácido de potasio
- Peptona
- Solución salina isotónica
- Sulfato de sodio

5.4.1.4 Agares

- Agar - agar
- Agar Sabouraud
- Agar Mycosel

5.4.2. Recursos químicos

- Ketoconazole
- Fluconazole

5.4.3 Centros de referencia

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- Internet

5.5 Metodología

5.5.1 Obtención de las cepas

Utilicé del cepario del laboratorio de Microbiología, FMVZ, USAC; las cuales fueron colectadas de muestras de piel y anexos de perros que padecían dermatitis micóticas: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes*,

Malassezia pachydermatis y *Candida albicans*. Para el aislamiento de las cepas de hongos levaduriformes se realizó un hisopado de oído para la recolección de la muestra; esta se sembró por agotamiento en agar Sabouraud y se incubó a 37°C por 48 horas. Para el aislamiento de las cepas de hongos dermatofitos se realizó un raspado de piel con bisturí estéril para la recolección de la muestra; esta se sembró en agar Mycosel y se incubó a temperatura ambiente por 14 días.

5.5.2 Obtención de los propóleos

Colecté seis muestras de propóleo crudo, provenientes de diferentes regiones del país; procurando tomar una muestra del área norte, sur, este, oeste, centro y Petén. Esto lo realicé de esta forma ya que la flora varía dependiendo de la localización geográfica; con el fin de obtener la mayor diversidad posible, debido a la influencia de la vegetación. Todas las muestras de propóleo fueron proporcionadas por el apicultor Vicente Arévalo, para asegurar el mismo manejo en todas las muestras y así no tener variaciones en la colecta y almacenamiento. Coloqué el propóleo crudo en recipientes estériles y herméticos de vidrio opaco, para que no fuera afectado por la luz. Mantuve el propóleo crudo de forma individual en el refrigerador, hasta el momento de la extracción.

5.5.3 Obtención de las tinturas de los propóleos según Katircioglu *et al.* (2006)

- Determiné que el etanol al 95% extrae la mayor cantidad de solutos de cada propóleo.
- Congelé el propóleo crudo durante 48 horas.
- Trituré lo más finamente posible el propóleo crudo, luego de congelado.
- Mezclé 300 gramos de propóleo crudo en un litro de alcohol etílico al 95% y agité la mezcla 30 minutos diarios, durante 15 días a temperatura ambiente.
- Centrifugué la mezcla, para eliminar las ceras y demás solutos presentes en los propóleos.

- Almacené en recipientes de color ámbar, la tintura elaborada.

(Katircioglu *et al.* 2006, Massaccesi 2002)

5.5.4 Evaluación de la actividad antimicótica *in vitro*; según el método descrito por Brancato & Golding (1983), modificado por Mac Rae *et al* (1988)

- Realicé siembras de los hongos dermatofitos en agar Sabouraud y los incubé a temperatura ambiente por 21 días, para obtener una cepa fresca.
- Sembré los hongos dermatofitos en el medio de cultivo Takashio en tubo y los incubé a 27°C durante 21 días, hasta obtener un crecimiento homogéneo.
- Luego de los 21 días le agregué 2 ml de solución salina al 85% estéril a cada tubo con el medio de cultivo Takashio; y desprendí el hongo con una varilla, esto lo trasvasé a tubos con tapa de rosca y los agité por un minuto.
- Mediante la cámara de Neubauer estandaricé la cantidad de esporas de dermatofitos a 100 esporas/ μ l (aproximadamente 10 esporas/cuadrante).
- Realicé el agar-propóleo a una concentración de 1mg/ml; agregando 1.5 ml de tintura de propóleo y 13.5 ml de agar Sabouraud previamente esterilizados y enfriados a 50°C. Por lo que la concentración final de propóleo fue del 3%. Dejé solidificar las placas con agar-propóleo y las incubé a 37°C por 24 horas para comprobar esterilidad.
- En cada una de las placas con agar-propóleo abrí 4 agujeros con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro; en forma equidistante. En cada agujero deposité 30 μ l de la suspensión de esporas e incubé a 27°C por 21 días.
- Realicé cuatro repeticiones en la misma forma por cada hongo dermatofito.
- Para cada tipo de hongo dermatofito realicé un control positivo con ketoconazole; determinando la relación dosis-efecto. Utilicé una concentración estándar de 10 μ L/ml, con diluciones a un Log10 mayor (100 μ l/ml) y menor (1 μ l/ml) a esta concentración, para validar el método y determinar la concentración ideal a utilizar como control positivo.

- Para cada tipo de hongo dermatofito realicé un control negativo con etanol al 95%; utilizando una caja petri con 13.5 ml de agar saboraud y 1.5 ml de etanol al 95%.
- Realicé la lectura de los resultados midiendo el diámetro de la colonia del hongo en milímetros y calculé el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro con el de las colonias en las cajas control negativo.
- Interpreté como positivos las tinturas que redujeron el diámetro de la colonia en un 75% o más.

(Brancato *et al.* 1983, Mac Rae *et al.* 1988)

5.5.5 Evaluación de la actividad antilevadura *in vitro*; según el método descrito por Mitscher *et al* (1972)

- Realicé siembras de hongos levaduriformes en agar Sabouraud y las incubé a 37°C por 48 horas.
- Realicé una solución de esporas de la siguiente forma: en 5 ml de caldo Sabouraud inoculé una asada del cultivo fresco y lo incubé a 37°C por 48 horas. Luego tomé con una pipeta 50 µl de este cultivo y lo coloqué en 4.95 ml de solución salina estéril al 85%; para obtener una dilución 1:10.
- Preparé el agar-propóleo, agregando 1 ml de tintura de propóleo al 30% en cajas petri con 9 ml de agar Sabouraud previamente esterilizados y enfriados a 50°C, para obtener una concentración final de 1 mg/ml. Por lo que la concentración final de propóleo fue del 3%. Dejé solidificar el medio y posteriormente lo incubé durante 24 horas a 37°C para comprobar esterilidad.
- En el agar-propóleo inoculé una asada de la suspensión de levaduras en posiciones asignadas al azar en una disposición radial, realizando cinco repeticiones por cada hongo levaduriforme. Deje reposar durante 5 - 10 minutos y luego las incubé a 37°C durante 48 horas.
- Para cada tipo de hongo levaduriforme realicé un control positivo con ketoconazole; determinando la relación dosis-efecto. Utilicé una

concentración estándar de 10 µl/ml, con diluciones a un Log10 mayor (100 µl/ml) y menor (1 µl/ml) a esta concentración, para validar el método y determinar la concentración ideal a utilizar como control positivo.

- Para cada tipo de hongo levaduriforme realicé un control negativo con etanol al 95%; utilizando una caja petri con 9 ml de agar Saboraud y 1ml de etanol al 95%.
- Interpreté como negativas las placas en las que hubo un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo e interpreté como positivas las placas en las que no hubo crecimiento a lo largo del inóculo.

(Mitscher *et al.* 1972)

5.5.6 Duplicación y cuadruplicación del método

- Realicé el ensayo para levaduras y dermatofitos duplicando la concentración inicial (3%), por lo que la concentración fue del 6%. Esto lo realice de la misma forma descrita anteriormente.
- Realicé el ensayo para levaduras y dermatofitos cuadruplicando la concentración inicial (3%), por lo que la concentración fue del 12%. Esto lo realice de la misma forma descrita anteriormente.

(Cáceres *et al.* 1998)

5.5.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

- Realicé el ensayo para levaduras y dermatofitos con las seis tinturas de propóleo, de la misma forma descrita anteriormente.
- Las concentraciones que realice fueron al 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9%.

5.5.8 Características Organolépticas de los propóleos

El aspecto, estructura, consistencia, color, olor y sabor los determiné mediante pruebas sensoriales descriptivas, realizadas por un grupo de 10 personas

semientrenadas que calificaron los atributos, utilizando escalas de intervalo. Las escalas fueron de dos puntos (homogénea y heterogénea) para la estructura; de cuatro puntos para el aspecto (polvo, granulado, trozos irregulares opacos, trozos irregulares con brillo); de tres puntos para la consistencia (blanda, poco blanda y dura), de dos para el olor (resinoso suave y resinoso aromático) y de tres para el sabor (insípido, dulce, picante) y de 12 puntos para el color (distintas tonalidades de marrón de la paleta de colores Sherwin Williams).

Para el análisis se colocaron las muestras en bolsas plásticas individuales, debidamente identificadas. El aspecto y la estructura las determiné por observación visual, la consistencia por opresión de la muestra con los dedos, el color mediante la comparación con una escala de colores, el olor mediante el olfato y el sabor mediante el gusto.

5.6 Método estadístico

Trabajé los ensayos en base a una prueba de hipótesis de una variable binomial con un error alfa de 0.05. Realicé un estudio no probabilístico a conveniencia, utilizando estadística no paramétrica.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de los propóleos

Estudie seis propóleos de diferentes regiones del país:

Tabla No. 1 Información sobre los propóleos en estudio

Propóleo	Localización	Altitud: metros sobre el nivel del mar (msnm)	Zona de vida de Holdridge
A	La Libertad, Petén	190 msnm	Bosque húmedo subtropical
B	Aldea Saholón, Cobán, Alta Verapaz	1316 msnm	Bosque muy húmedo subtropical
C	Jacaltenango, Huehuetenango	1,437 msnm	Bosque húmedo Montano bajo Subtropical
D	San Juan Mixtán Masagua, Escuintla	300 msnm	Bosque muy húmedo subtropical
E	Amatitlán, Guatemala	1248 msnm	Bosque húmedo subtropical
F	Barberena, Santa Rosa	732 msnm	Bosque húmedo subtropical

Fuente: datos experimentales, INGUAT 2011, Conap 2010

La mayoría de propóleos provenían de bosque húmedo subtropical. Los propóleos se obtuvieron en crudo para luego poder realizar la tintura al 30%. Todos los propóleos le fueron comprados al Lic. Zootecnista Vicente Arévalo, con el fin de asegurar que se le dieran el mismo manejo luego de la colecta.

6.2 Elaboración de las tinturas de propóleo al 30%

Tabla No. 2 Tintura de propóleo al 30%

Propóleo	ml inicial	Sedimento	ml final
A	80	8	72
B	80	7	73
C	80	19.9	60.1
D	80	6	74
E	80	8	72
F	80	16	64

Fuente: datos experimentales

El Propóleo C y F tenían más sedimento a comparación con los propóleos A, B, D y E; esto se debe a una mayor cantidad de ceras presentes en los propóleos.

6.3 Características Físico-organolépticas de los propóleos

El propóleo A, B y C poseen una estructura homogénea; mientras que los propóleos D, E y F poseen una estructura heterogénea. Todos los propóleos en estudio tienen un olor resinoso aromático, así mismo todos los propóleos en estudio son insípidos y de consistencia dura. El aspecto de los propóleos en estudio es variable, ya que el propóleo A y C poseen un aspecto de trozos irregulares con brillo, el propóleo B, D y F poseen un aspecto de trozos irregulares opacos y por último el propóleo E posee un aspecto granulado. En cuanto a color se refiere, todos los propóleos en estudio fueron calificados en la escala de colores de Sherwin Williams en el color SW 6076.

6.4 Determinación de la actividad antilevadura

6.4.1 Determinación de la relación dosis-efecto de antimicótico utilizado en el control positivo.

Preparé tres concentraciones del antimicótico ketoconazole a un Log10 de diferencia para determinar la relación dosis-efecto, determinar la concentración a la cual es efectivo contra los microorganismos en estudio y así validar el método. La concentración base utilizada fue 10 µg y preparé concentraciones a un Log10 mayor (100 µg) y a uno menor (1 µg). Las concentraciones base fueron determinadas según la concentración estándar utilizada en los discos para pruebas de sensibilidad. (Tabla No. 3).

Tabla No. 3 Determinación de la relación dosis-efecto de ketoconazole (1, 10 y 100 µg/ml).

Antimicótico y concentración	Microorganismos	
	<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
Ketoconazole 1 µg	-	-
Ketoconazole 10 µg	+	-
Ketoconazole 100 µg	+	-

(+) = Actividad positiva del ketoconazole

(-) = Actividad negativa del ketoconazole

Fuente: datos experimentales

Resultado de cuatro repeticiones

El ketoconazole a las concentraciones de 1, 10 y 100 µ/ml no tiene actividad contra *Candida albicans*. El ketoconazole a la concentración de 1 µ/ml no tiene actividad contra *Malassezia pachydermatis*, mientras que a las concentraciones de 10 y 100 µg/ml si tiene actividad.

Preparé tres concentraciones del antimicótico fluconazole a un Log10 de diferencia para determinar la relación dosis-efecto, determinar la concentración a la cual es efectivo contra *Candida albicans* y así validar el método. La concentración base utilizada fue 100 µg y preparé concentraciones a un Log10 mayor (1000 µg) y a uno menor (10 µg). Las concentraciones base fueron determinadas según la concentración estándar utilizada en los discos para pruebas de sensibilidad. (Tabla No. 4).

Tabla No. 4 Determinación de la relación dosis-efecto de fluconazole (10, 100 y 1000 µg/ml).

Antimicótico y concentración	Microorganismos
	<i>Candida albicans</i>
Fluconazole 10 µg	+
Fluconazole 100 µg	+
Fluconazole 1000 µg	+

(+) = Actividad positiva del fluconazole

(-) = Actividad negativa del fluconazole

Fuente: datos experimentales

Resultado de cuatro repeticiones

El fluconazole a las concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/ml tiene actividad contra *Candida albicans*.

6.4.2 Fase de tamizaje

Determiné la actividad de cada una de las tinturas de propóleo al 3%, 6% y 12% obtenidas contra los hongos levaduriformes *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*. (Tabla No. 5).

Tabla No. 5 Actividad antilevadura de las tinturas de Propóleo al 3%, 6% y 12% en el procedimiento de tamizaje

Propóleo	Concentración	Microorganismo	
		<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
A	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+
B	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+
C	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+
D	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+
E	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+
F	3.0 %	-	-
	6.0 %	-	-
	12 %	+	+

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

Fuente: datos experimentales

Las tinturas de propóleo al 3% y 6% en estudio no tuvieron actividad contra la cepa de *Malassezia pachydermatis* ni contra la cepa de *Candida albicans*. Mientras que todas las tinturas de propóleo al 12% en estudio tuvieron actividad antilevadura contra la cepa de *Malassezia pachydermatis* y contra la cepa de *Candida albicans*.

6.4.3 Determinación de la CIM

Determiné la CIM a partir de la tintura de propóleo al 12%, contra los hongos levaduriformes *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*. Por lo que trabaje con concentraciones de 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9%. (Tabla No. 6)

Tabla No. 6 Actividad antilevadadura de las tinturas de Propóleo al 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9% en la determinación de la CIM

Propóleo	Concentración	Microorganismo	
		<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
A	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-
B	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-
C	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-
D	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-
E	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-
F	11.5 %	+	+
	11.0 %	+	+
	10.5 %	+	+
	10.0 %	-	-
	9.5 %	-	-
	9.0 %	-	-

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

Fuente: datos experimentales

Todas las tinturas de propóleo al 10.5% en estudio tuvieron actividad antilevadura contra la cepa de *Malassezia pachydermatis* y contra la cepa de *Candida albicans*; por lo que la CIM para las seis tinturas de propóleo en estudio es de 10.5%.

6.5 Determinación de la actividad antimicótica

6.5.1 Determinación de la relación dosis-efecto de antimicótico utilizado en el control positivo.

Preparé tres concentraciones del antimicótico ketoconazole a un Log10 de diferencia para determinar la relación dosis-efecto, determinar la concentración a la cual es efectivo contra los microorganismos en estudio y así validar el método. La concentración base utilizada fue 10 µg y preparé concentraciones a un Log10 mayor (100 µg) y a uno menor (1 µg). Las concentraciones base fueron determinadas según la concentración estándar utilizada en los discos para pruebas de sensibilidad. (Tabla No. 7).

Tabla No. 7 Determinación de la relación dosis-efecto de ketoconazole (1, 10 y 100 µg/ml).

Antimicótico y concentración	Microorganismos		
	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Ketoconazole 1 µg	-	-	-
Ketoconazole 10 µg	+	+	+
Ketoconazole 100 µg	+	+	+

(+) = Actividad positiva del ketoconazole

(-) = Actividad negativa del ketoconazole

Fuente: datos experimentales

Resultado de cuatro repeticiones

El ketoconazole a la concentración de 10 µg/ml y a la concentración de 100 µg/ml tiene actividad contra los hongos dermatofitos en estudio.

6.5.2 Fase de tamizaje

Determiné la actividad de cada uno de las tinturas de propóleo al 3%, 6% y 12% contra los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes* (Tabla No. 8).

Tabla No. 8 Actividad antimicótica de las tinturas de propóleo al 3%, 6% y 12% en el procedimiento de tamizaje

Propóleo	Concentración	Microorganismos		
		<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
A	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+
B	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+
C	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+
D	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+
E	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+
F	3.0 %	-	-	-
	6.0 %	-	-	-
	12 %	+	+	+

(+) = Actividad positiva de la tintura de propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura de propóleo

Fuente: datos experimentales

Las tinturas de propóleo al 3% y 6% no presentaron actividad contra los hongos dermatofitos en estudio. Mientras que todas las tinturas de propóleo al 12% presentaron actividad contra los hongos dermatofitos en estudio.

6.5.3 Determinación de la CIM

Determiné la CIM a partir de la tintura de propóleo al 12%, contra los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*. Por lo que trabaje con concentraciones de 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9%. (Tabla No. 9)

Tabla No. 9 Actividad antimicótica de las tinturas de Propóleo al 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9% en la determinación de la CIM

Propóleo	Concentración	Microorganismo		
		<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
A	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-
B	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-
C	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-
D	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-

E	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-
F	11.5 %	+	+	+
	11.0 %	+	+	+
	10.5 %	+	+	+
	10.0 %	-	-	-
	9.5 %	-	-	-
	9.0 %	-	-	-

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

Fuente: datos experimentales

Todas las tinturas de propóleo al 10.5% tuvieron actividad antimicótica contra las cepas de *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*; por lo que la CIM para las seis tinturas de propóleo en estudio es de 10.5%.

6.6 Discusión.

El presente estudio se realizó con el fin de encontrar alternativas naturales, eficaces, económicas, disponibles y no dañinas; para el tratamiento de los hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan piel y anexos en perros. Las dermatitis micóticas son muy frecuentes y el tratamiento tiene efectos secundarios debido a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas; así mismo se debe considerar que para poder metabolizarlos se necesita un buen funcionamiento hepático, el cual es menos eficiente en animales ancianos respecto a los jóvenes. Algunos hongos dermatofitos y levaduriformes han desarrollado resistencia a dichos productos, por lo cual es importante establecer tratamientos alternativos.

La composición y actividad del propóleo varía, dependiendo de la región de donde provenga; posee actividad antimicótica, antibacteriana, antiparasitaria, inmunoestimulante, entre otras; debido a esto se seleccionó como terapia alternativa.

La tintura de propóleo la realicé con alcohol etílico al 95%, ya que a ésta concentración es la que extrae más sólidos, dentro de los que se incluyen ceras, compuestos insolubles en agua y basuras. El propóleo se protegió en todo tiempo de la luz y del calor; ya que estos lo desnaturalizan y pierde su actividad. (Bankova 2005, Massaccesi 2002)

El propóleo C y F tenían mayor cantidad de sedimento, en relación a los propóleos A, B, D y E; lo que puede deberse a una mayor cantidad de ceras presentes, mayor cantidad de basura adicionada por las abejas al momento de la elaboración del mismo o basura que se adhiere al propóleo por una mala técnica de colecta. Este dato es de importancia, ya que mientras más sedimento tiene un propóleo menor cantidad de tintura se obtiene al final, lo cual implica mayores costos al productor.

(Bankova 2005, Massaccesi 2002)

Los hongos a estudiar se seleccionaron en base a la prevalencia de los que causan dermatitis micóticas en perros; siendo estos la *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*.

(Birchard *et al.* 2002, Buen *et al.* 2008, Cabañes 2000, Rejas 1998)

Para evaluar la actividad antilevadura utilicé el método de Mitscher *et al.* (1972), y el método de Brancato & Golding (1983) modificado por MacRae *et al.* (1988) para evaluar la actividad antimicótica. Estos métodos son aplicables en su totalidad para la realización de bioensayos contra patógenos que afectan a animales.

Determiné la relación dosis-efecto con ketoconazole, uno de los antimicóticos utilizados con más frecuencia en la clínica, para poder validar el método y determinar la concentración ideal a utilizar como control positivo en el bioensayo. Las concentraciones base fueron determinadas según la concentración estándar utilizada en los discos para pruebas de sensibilidad. Los resultados demostraron que el control positivo más adecuado fue ketoconazole a la concentración de 10 µg/ml

contra todos los hongos dermatofitos y contra *Malassezia pachydermatis*; no así contra el hongo levaduriforme *Candida albicans*. Por este motivo determiné la relación dosis-efecto con fluconazole, uno de los antimicóticos utilizados con más frecuencia en la clínica, para poder validar el método y determinar la concentración ideal a utilizar como control positivo en el bioensayo. Los resultados demostraron que el control positivo más adecuado para *Candida albicans* es fluconazole a la concentración de 10 µg/ml. Estos datos son útiles para estudios posteriores sobre patógenos similares o sobre estudios similares con el mismo patógeno. La resistencia de *Candida albicans* al antimicótico comercial ketoconazole, puede deberse al uso indiscriminado de dicho antimicótico sobre este microorganismo.

Inicialmente en la fase de tamizaje utilicé la tintura de propóleo al 3%, ya que en estudios anteriores se ha demostrado la actividad del propóleo desde una concentración del 0.4% hasta el 14%; debido a este gran rango seleccioné el 3% como concentración inicial para poder realizar la CIM.

(Sforcin *et al.* 2011)

En la fase de tamizaje del ensayo, las tinturas de propóleo al 3% no mostraron actividad contra ningún hongo estudiado, esto pudo deberse a que la concentración de la tintura del propóleo era muy baja, por lo que procedí a realizar otro ensayo duplicando y cuadruplicando la concentración, para cumplir con el objetivo de determinar la actividad antimicótica y antilevaduriforme. En la fase de tamizaje del ensayo las tinturas de propóleo al 6% no mostraron actividad contra ningún hongo estudiado; mientras que, las tinturas de propóleo al 12%, sí mostraron actividad contra todos los hongos bajo estudio. Estos resultados demostraron que el propóleo es un compuesto dosis dependiente.

La CIM la realicé a partir de la concentración de las tinturas de propóleo al 12%, concentración que mostró actividad contra los hongos estudiados; determine que la CIM de las seis tinturas de propóleo es de 10.5%, ya que en dicha concentración las tinturas inhibieron el crecimiento de los hongos bajo estudio.

Debido a que la infección por *Microsporium canis* es la causa más común de dermatofitosis en perros, es de utilidad saber que la tintura de propóleo al 10.5% se puede considerar como un tratamiento alternativo. Así mismo es de gran utilidad saber que el propóleo es efectivo contra el hongo levaduriforme *Candida albicans*; la importancia de este dato radica en la resistencia ocasional de este hongo al ketoconazole.

(Birchard *et al.* 2002, Cabañes 2000, Rejas 1998, The Center of Food Security and Public Health 2005, WSAVA 2008)

A pesar que los propóleos procedían de diferentes departamentos del país, no hubo variación en cuanto su actividad; ya que mostraron la misma efectividad, al elevar la concentración de la tintura.

Otras terapias alternativas contra hongos dermatofitos y levaduriformes son extractos de plantas medicinales, las cuales necesitan para su elaboración equipo de laboratorio sofisticado, mientras que para elaborar la tintura de propóleo no se necesita equipo sofisticado, esto es una ventaja ya que se puede realizar a nivel de campo.

La información generada en este estudio valida la actividad antimicótica y antilevaduriforme del propóleo a una concentración de 10.5%. Así mismo de la potencial aplicación clínica de estos resultados en perros que padecen dermatitis micóticas. Este estudio es punto de partida para otras investigaciones, en las que se puede validar otras actividades biológicas del propóleo en animales de compañía y en animales de producción.

VII. CONCLUSIONES

1. Las tinturas de propóleo al 3%, 6%, 9%, 9.5% y 10% no tienen actividad antimicótica ni antilevadura *in vitro*.
2. El propóleo es un compuesto apícola dosis dependiente.
3. La *Candida albicans* bajo estudio, es resistente al antimicótico comercial ketoconazole, pero no así al antimicótico comercial fluconazole *in vitro*.
4. Todas las tinturas de propóleo al 10.5% (CIM) y concentraciones superiores, poseen actividad antimicótica y antilevadura *in vitro*.
5. No hubo variación en cuanto a la actividad antimicótica y antilevadura *in vitro*, de los diferentes propóleos nacionales utilizados en el estudio.
6. Las concentraciones base para los controles positivos fueron determinadas según la concentración estándar utilizada en los discos para pruebas de sensibilidad.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antimicrobiana del propóleo contra diferentes microorganismos patógenos que afectan a los animales.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria, analgésica y cicatrizante del propóleo, que validen su uso como parte del tratamiento de patologías en medicina veterinaria.
3. Realizar estudios *in vivo*, para evaluar la actividad antimicótica y antilevadura del propóleo, como un tratamiento alternativo de las dermatitis micóticas en perros.
4. Mejorar las técnicas para la recolección del propóleo, para reducir el sedimento al mínimo.

IX. RESUMEN

El objetivo del estudio fue generar información científica que respalde el uso de productos naturales como alternativa terapéutica en la clínica de especies menores. Evalué la actividad antimicótica y antilevaduriforme *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*, y los hongos levaduriformes *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*; que afectan piel y anexos en perros.

Utilicé el método de dilución (Mitscher *et al.* 1972) para evaluar la actividad antilevaduriforme, y el método propuesto por Brancato & Golding (1983) y modificado por MacRae *et al.* (1988) para evaluar la actividad antimicótica. Se demostró actividad antimicótica y antilevaduriforme de todas las tinturas de propóleo al 10.5% y superiores. No hubo variación en cuanto a la actividad de los diferentes propóleos nacionales utilizados en el estudio.

La información generada en este estudio valida la actividad biológica de las tinturas de los propóleos al 10.5% contra hongos causantes de dermatitis micóticas en perros. Además de la aplicación clínica de estos resultados, es punto de partida para diversas investigaciones que validen el uso de dichas tinturas como parte del tratamiento de patologías en medicina veterinaria.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to generate scientific information to support natural products as an alternative therapy in the small animal practice. I evaluated the *in vitro* antimicrobial and antiyeast activities of six different national propolis tinctures against the dermatophytic fungus *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Tricophyton mentagrophytes*, and the yeasts *Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans*; that affect skin and annexes in dogs.

I used the dilution method (Mitscher *et al.* 1972) to evaluate the antiyeast activity, and the method proposed by Brancato & Golding (1983) modified by MacRae *et al.* (1988) to evaluate the antimicrobial activity. It was shown that all the propolis tinctures at 10.5% and superior. There was no variation in the activity of the different national propolis used in the study.

The given information validates the biologic activity of the propolis tinctures at 10.5% against the fungus that causes micotic dermatitis in dogs. Beside the clinical applications of the results, is a departure point for future investigations, to support the use of medicinal plants as part of the pathologies treatment in veterinary medicine.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alzate, G. sf. Micosis cutánea (en línea). Consultado 7 sep. 2009. Disponible en <http://www.scribd.com/doc/7210036/1-aMicosis-Cutanea>
2. Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Journal and Oxford University Press eCAM* 2005; 2(1) 29-32
3. Birchard, SJ; Sherding, RG. 2002. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2 ed. Madrid, ES, McGraw Hill. 1857p.
4. Brancato, FP; Golding, NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 45:848-863.
5. Buen, N; Guzmán, M; et al. 2008. Atlas de dermatología diagnóstica en perros y gatos. Buenos Aires, AR. Inter-Medica. 112 p.
6. Cabañes, F. 2000. Dermatophytes in domestic animals. *Revista Iberoamericana de Micología.* E-48080:104-108
7. Cáceres, A *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202.
8. Carlyle, J; Duncan, R; et al. 1997. *Veterinary pathology.* 6ed. USA. Ed. Wiley-Blackwell. 1392p.
9. Castaldo, S; Capasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Elsevier. Fitoterapia* 73 Supple 1. S1-S6
10. Conap (Consejo Nacional de Áreas Protegidas). 2010. Zonas de Vida Holdridge (en línea). Consultado 15 de ene. 2011. Disponible en <http://www.conap.gob.gt/quienes-somos/mapas/mapas-tematicos-1/Zonas%20de%20Vida.jpg/view>
11. El Manual Merck de Veterinaria. 2000. 5 ed. España. Océano. 2558 p.
12. INGUAT (Instituto Guatemalteco de Turismo, GT). 2011 (en línea). Consultado 15 ene. 2011. Disponible en <http://www.visitguatemala.com/>
13. Kujumgiev, A; Tsvetkova, I; *et al.* 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235–240.

14. Katircioglu, H; Mercan; N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5, Num. 11, pp. 1151-1153
15. Mac Rae, WD, *et al.* 1988. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 22:143-172.
16. Massaccesi, C. 2002. Apicultura (en línea). Consultado 27 ago. 2009. Disponible en <http://www.scribd.com/doc/8430180/manuales-apicultura>
17. Medleau, L. 2007. *Dermatología de pequeños animales: atlas en color y guía terapéutica*. España. 2da ed. Ed. Elsevier. 527p.
18. Mitscher, LA *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.
19. NAVC (North American Veterinary Conference) (2006, USA). 2006. *Malassezia Otitis Externa - Etiology and Treatment*. Gotthelf, L. USA.
20. _____. (2007, USA (a)). 2007. *Dermatophytosis: Over and Under*. Garfield, R. USA.
21. _____. (2007, USA (b)). 2007. *Diagnosis and Management of Malassezia*. Bloom, P. USA.
22. _____. (2007, USA (c)). 2007. *Malassezia "Hypersensitivity" in Otitis Externa*. Paterson, S. USA.
23. Pardi, G. 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans*. *Acta odontológica Venezolana: Volumen 40 No. 1: 2002*
24. Parés, R. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Ed. Reverte. 380p.
25. Pellizzarri, E. 2008. *Tópicos de Micología* (en línea). Consultado 30 ago. 2009. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/micologia/index.html>
26. Peña, C. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cien.Inv.Agr.* 35 (1): 17-26. 2008.
27. Ramos, A; Miranda, J. 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.13, n.4, p.697-710, 2007.

28. Rejas, J. 1998. Dermatofitosis (tiñas) en animales de compañía (en línea). Consultado 30 ago. 2009. Disponible en <http://www3.unileon.es/dp/dmv/texto-hongos.htm>
29. Salamanca, C; Correa, I; et al. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical* 25 (2): 95-102. 2007.
30. Sforcin, JM; Bankova, V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? [*Journal of Ethnopharmacology*](#) (EEUU). 133: 253-260
31. The Center of Food Security and Public Health (2005, Iowa, USA). 2005. Ringworm, Tinea, Dermatomycosis. Iowa, USA.
32. Villee, C. 1996. Biología. México. 8va ed. McGraw Hill. 944p.
33. Vit, P. 2004. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *INHRR V*. 35, no.2
34. WSAVA (World Small Animal Veterinary Association Congress) (30, 2005, México). 2005. *Malassezia*, Dermatitis in the dog. Carlotti, D. México.
35. _____. (32, 2007, Sydney, Australia). 2007. In-house testing in veterinary dermatology. Mueller, R. Sydney, Australia.
36. _____. (33, 2008, Dublin, Irlanda). 2008. Ringworm. Bettenay, S. Dublin, Irlanda.
37. _____. (33, 2008, Dublin, Irlanda). 2008. *Malassezia* dermatitis: diagnosis & management. Ihrke, P. Dublin, Irlanda.
38. _____. (33, 2008, Dublin, Irlanda). 2007. Quick test in veterinary dermatology. Mueller, R. Dublin, Irlanda.

XI. ANEXOS

111 Hoja de resultados Hongos Dermatofitos

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Propóleo: _____ Concentración: _____

Localización: _____

Altitud: _____

Zona de vida: _____

RESULTADOS HONGOS DERMATOFITOS						
Repeticiones	1	2	3	4	Control +	Control -
Hongo						
<i>Microsporum canis</i>						
<i>Microsporum gypseum</i>						
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>						

Resultados de hongos dermatofitos

11.2 Ficha resultados Hongos Levaduriformes

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Propóleo: _____ Concentración: _____

Localización: _____

Altitud: _____

Zona de vida: _____

RESULTADOS HONGOS LEVADURIFORMES						
Repeticiones	1	2	3	4	Control +	Control -
Hongo						
<i>Candida albicans</i>						
<i>Malassezia pachydermatis</i>						

Resultados de hongos levaduriformes

11.3 Encuesta sobre características físico-organolépticas de los propóleos

Universidad de San Carlos De Guatemala

Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

PROPÓLEO _____

- ESTUCTURA: observación visual
 - Homogénea
 - Heterogénea

- OLOR:
 - Resinoso suave
 -
 - Resinoso aromático

- SABOR:
 - Insípido
 - Dulce
 - Picante

- CONSISTENCIA: opresión de la muestra con los dedos
 - Blanda
 - Poco blanda
 - Dura

- ASPECTO: observación visual
 - Polvo
 - Granulado
 - Trozos irregulares opacos
 - Trozos irregulares con brillo

- COLOR: Escala de colores marrón de Sherwin-Williams.

▪ SW 6045	▪ SW 6073	▪ SW 6080
▪ SW 6046	▪ SW 6074	▪ SW 6081
▪ SW 6047	▪ SW 6075	▪ SW 6082
▪ SW 6048	▪ SW 6076	▪ SW6083

11.4 Hoja de registro de los propóleos nacionales

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 1 Información sobre los propóleos en estudio

Propóleo	Localización	Altitud: metros sobre el nivel del mar (msnm)	Zona de vida de Holdridge
A			
B			
C			
D			
E			
F			

Tabla No. 2 Tintura de propóleo al 30%

Propóleo	ml inicial	Sedimento	ml final
A			
B			
C			
D			
E			
F			

11.5 Hoja de registro para la evaluación de controles positivos para la actividad antilevadadura

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 3 Determinación de la relación dosis-efecto de ketoconazole (1, 10 y 100 µg/mL).

Antimicótico y concentración	Microorganismos	
	<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
Ketoconazole 1 µg		
Ketoconazole 10 µg		
Ketoconazole 100 µg		

(+) = No hay crecimiento o actividad positiva

(-) = Si hay crecimiento o actividad negativa

Tabla No. 4 Determinación de la relación dosis-efecto de fluconazole (10, 100 y 1000 µg/ml).

Antimicótico y concentración	Microorganismos
	<i>Candida albicans</i>
Fluconazole 10 µg	
Fluconazole 100 µg	
Fluconazole 1000 µg	

(+) = No hay crecimiento o actividad positiva

(-) = Si hay crecimiento o actividad negativa

11.6 Hoja de registro para la evaluación de la actividad antilevadadura de las tinturas de los propóleos.

Universidad de San Carlos De Guatemala

Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 5 Actividad antilevadadura de las tinturas de Propóleo al 3%, 6% y 12% en el procedimiento de tamizaje

Propóleo	Concentración	Microorganismo	
		<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
A	3%		
	6%		
	12%		
B	3%		
	6%		
	12%		
C	3%		
	6%		
	12%		
D	3%		
	6%		
	12%		
E	3%		
	6%		
	12%		
F	3%		
	6%		
	12%		

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

11.7 Hoja de registro para la evaluación de la CIM de los hongos levaduriformes

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 6 Actividad antilevadura de las tinturas de propóleo al 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9% en la determinación de la CIM

Propóleo	Concentración	Microorganismo	
		<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida albicans</i>
A	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		
B	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		
C	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		
D	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		
E	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		
F	11.5%		
	11%		
	10.5%		
	10%		
	9.5%		
	9%		

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

11.8 Hoja de registro para la evaluación de controles positivos para la actividad antimicótica

Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 7 Determinación de la relación dosis-efecto de ketoconazole (1, 10 y 100 µg/ml).

Antimicótico y concentración	Microorganismos		
	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Ketoconazole 1 µg			
Ketoconazole 10 µg			
Ketoconazole 100 µg			

(+) = Actividad positiva del ketoconazole

(-) = Actividad negativa del ketoconazole

11.9 Hoja de registro para la evaluación de la actividad antimicótica de las tinturas de los propóleos

Universidad de San Carlos De Guatemala

Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 8 Actividad antimicótica de las tinturas de propóleo al 3%, 6% y 12% en el procedimiento de tamizaje

Propóleo	Concentración	Microorganismos		
		<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
A	3%			
	6%			
	12%			
B	3%			
	6%			
	12%			
C	3%			
	6%			
	12%			
D	3%			
	6%			
	12%			
E	3%			
	6%			
	12%			
F	3%			
	6%			
	12%			

(+) = Actividad positiva de la tintura de propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura de propóleo

11.10 Hoja de registro para la evaluación de la CIM de los hongos dermatofitos

Universidad de San Carlos De Guatemala
Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

Tabla No. 9 Actividad antimicótica de las tinturas de propóleo al 11.5%, 11%, 10.5%, 10%, 9.5% y 9% en la determinación de la CIM

Propóleo	Concentración	Microorganismo		
		<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
A	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			
B	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			
C	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			
D	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			
E	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			
F	11.5%			
	11%			
	10.5%			
	10%			
	9.5%			
	9%			

(+) = Actividad positiva de la tintura del propóleo

(-) = Actividad negativa de la tintura del propóleo

11.11 Hoja de registro de las características organolépticas de los propóleos

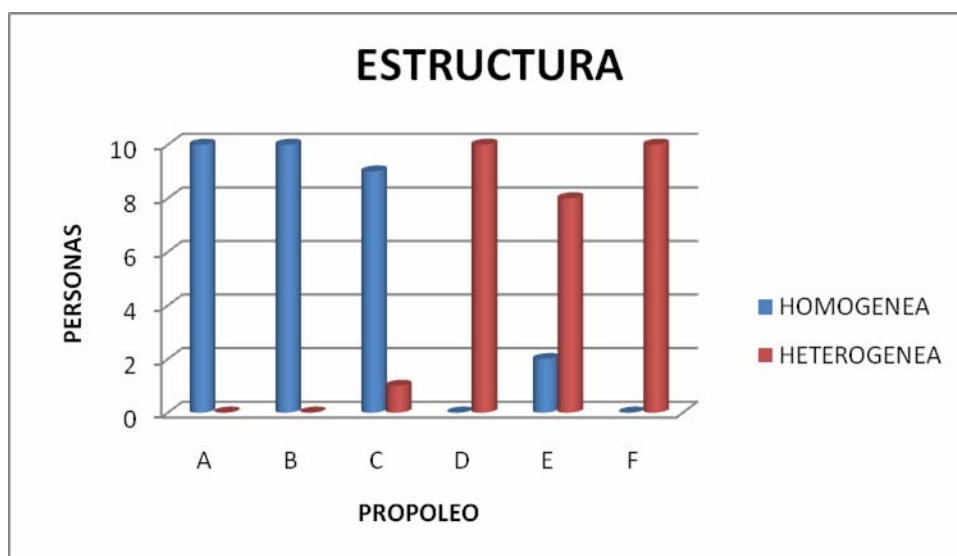
Universidad de San Carlos De Guatemala
 Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia
 Escuela de Medicina Veterinaria

“Actividad *in vitro* de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros”

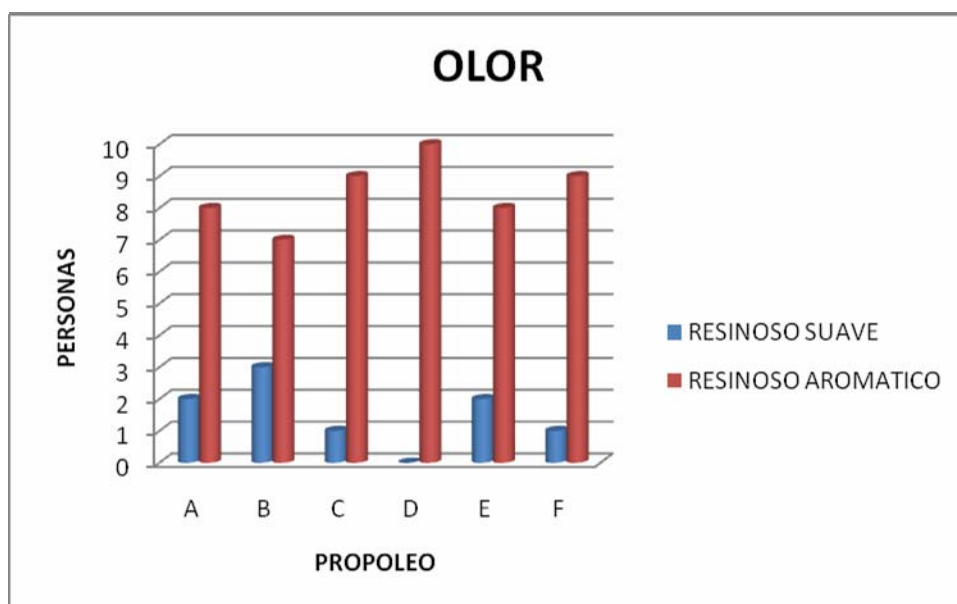
PROPOLEO	ESTRUCTURA		OLOR		SABOR		
	HOMOGENEA	HETEROGENEA	RESINOSO SUAVE	RESINOSO AROMATICO	INSIPIDO	DULCE	PICANTE
A	10	0	2	8	10	0	0
B	10	0	3	7	10	0	0
C	9	1	1	9	10	0	0
D	0	10	0	10	10	0	0
E	2	8	2	8	10	0	0
F	0	10	1	9	10	0	0

PROPOLEO	CONSISTENCIA			ASPECTO				COLOR
	BLANDA	POCO DURA	DURA	POLVO	GRANULADO	TROZOS IRREGULARES OPACOS	TROZOS IRREGULARES CON BRILLO	ESCALA COLORES
A	0	0	10	0	0	0	10	SW 6076
B	0	0	10	0	0	10	0	SW 6076
C	0	1	9	0	0	0	10	SW 6076
D	0	2	8	0	0	9	1	SW 6076
E	0	0	10	0	9	1	0	SW 6076
F	0	2	8	0	0	9	1	SW 6076

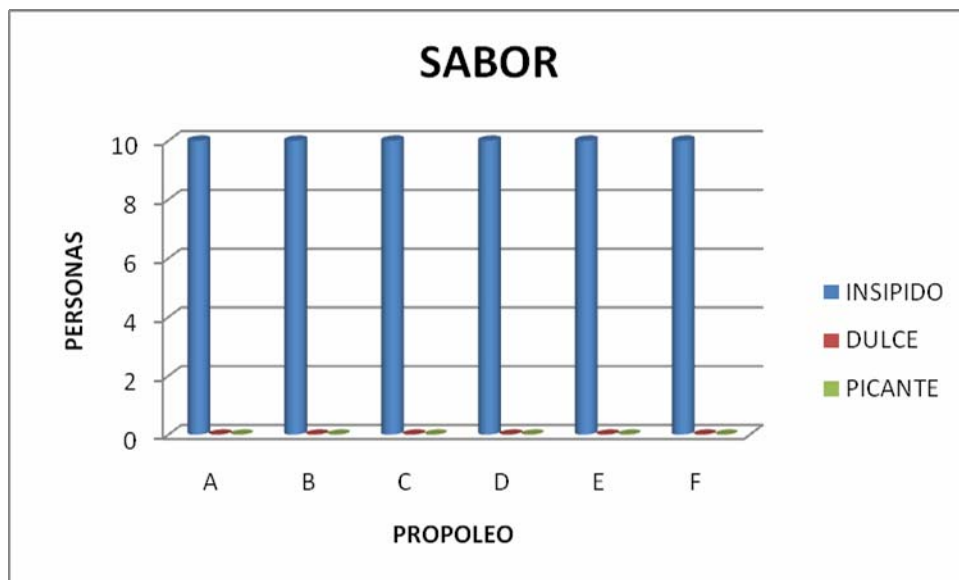
11.12 Graficas de las características organolépticas de los propóleos



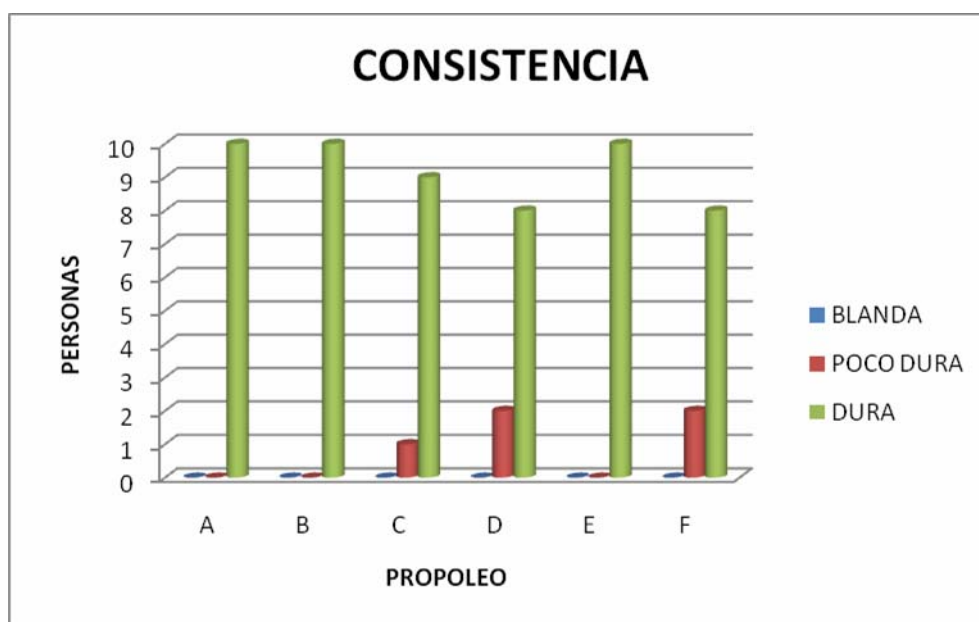
Gráfica 1: Estructura de los propóleos nacionales



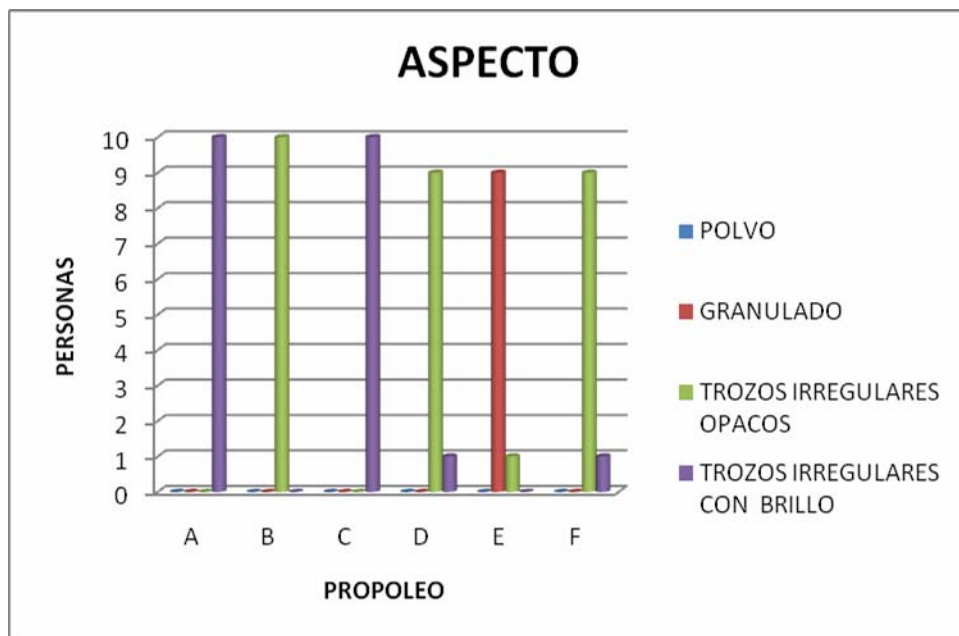
Gráfica 2: Olor de los propóleos nacionales



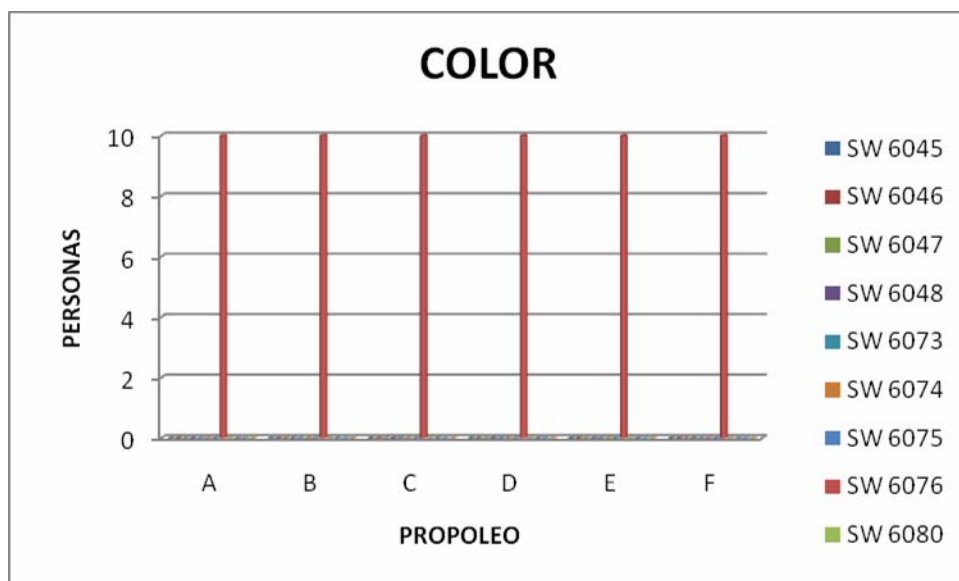
Gráfica 3: Sabor de los propóleos nacionales



Gráfica 4: Consistencia de los propóleos nacionales



Gráfica 5: Aspecto de los propóleos nacionales



Gráfica 6: Color de los propóleos nacionales