

Efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal

Irene Lezcano, Gastón García,* Gerardo Martínez, Jesús Molerio, Zullyt Zamora, Carlos Fernández,** Addys González*** y Daily Castañeda.**

Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y 230, No. 1313, Apartado Postal 6880, Playa, *Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, **Instituto "Pedro Kouri", ***Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 1997. Aceptado: 20 de diciembre de 1997.

Palabras clave: ozono, sustancias ozonizadas, infección, vaginitis, *Candida albicans*.
Key words: ozone, ozonized substances, infection, vaginitis, *Candida albicans*.

RESUMEN. La candidiasis vaginal es una enfermedad frecuente y de amplia distribución en el mundo. Se ha comprobado que algunas sustancias ozonizadas como: el aceite de girasol y la manteca de cacao tienen efectos antimicrobianos contra *Candida albicans*. En los últimos tiempos se han desarrollado algunos modelos de candidiasis vaginal en ratones y ratas para el estudio de esta patología. El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal. Se emplearon ratas Sprague-Dawley a las cuales se les produjo infección vaginal con un inóculo de 10^6 *Candida albicans* 3153 en 0,1 mL de disolución amortiguadora y estéril de fosfato. Fueron estudiados seis grupos de animales; tres con dosificaciones diferentes de manteca de cacao ozonizada preparada en óvulos y tres grupos controles; uno tratado con óvulos de ketoconazol, otro con óvulos de manteca de cacao sin ozonizar y el último grupo sin tratamiento. El modelo animal aplicado permitió el desarrollo de la candidiasis vaginal en un 80 % de las ratas inoculadas, lo que hizo posible comprobar la efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de esta infección.

ABSTRACT. *Candida* vaginitis continues to be a prevalent disease with a world-wide distribution. Some ozonized substances as: sunflower oil and cacao butter have shown antimicrobial effects against *Candida albicans*. Lately, several experimental models of candidosis in mice and rats have been developed. The purpose of this study was to determine the effectiveness of ozonized cacao butter to treat vaginal candidosis. *Candida* vaginitis in Sprague-Dawley rats were developed with an inoculum of 10^6 *Candida albicans* 3153 in 0.1 mL of phosphate buffer solution. Six groups of infected animals were studied: three different doses of ozonized cacao butter ovules and three control groups; one was treated with ketoconazol ovules, another with untreated cacao butter ovules and the last one without treatment. The experimental model used in this paper allowed to develop vaginal candidosis in 80 % of inoculated rats; it made possible to study the effectiveness of ozonized cacao butter for the treatment of *Candida* vaginitis.

INTRODUCCION

Candida albicans es probablemente la especie fúngica patógena al hombre con mayor diversidad fenotípica. Esta levadura oportunista es capaz de invadir todos los tejidos y representa una seria amenaza para pacientes con deficiencias en su sistema inmune. De igual forma, es el máximo responsable de la

vulvo-vaginitis micótica.¹ Aunque en la actualidad se ha descubierto una variedad de agentes antifúngicos, de éstos sólo una pequeña cantidad son activos a la vez en sistemas *in vitro* e *in vivo*.²

Se ha comprobado que sustancias ozonizadas como el aceite de girasol y la manteca de cacao, poseen actividad antimicrobiana *in vitro*

contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y hongos dermatofitos.^{3,4} Por otra parte, estudios preliminares realizados en pacientes con candidiasis vaginal han mostrado resultados muy satisfactorios.⁵

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la vaginitis debido a *Candida albicans*, mediante un modelo animal con ratas Sprague-Dawley.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se fundamentó en la metodología reportada por Sobel y col. en 1985.⁶

Preparación de inóculos. Exudado vaginal

Para la preparación de los inóculos se realizó un cultivo con la cepa patrón *Candida albicans* 3153 en placas de Agar Sabouraud Dextrosa, el tiempo de incubación fue de 48 h a 30 °C. A partir del crecimiento producido, se preparó una suspensión de 10^6 - 10^7 levaduras en 0,1 mL de disolución amortiguadora y estéril de fosfato (PBS).

Los exudados vaginales se realizaron mediante lavados con 0,2 mL de PBS. Posteriormente, 0,05 mL del fluido obtenido se sembraron en placas de Agar Sabouraud Dextrosa. La incubación fue de 48 h a 30 °C.

Establecimiento de la infección vaginal

Cincuenta ratas Sprague-Dawley, de 175 a 200 g de peso corporal fue-

ron ovariectomizadas, 14 d después se les realizó un exudado vaginal con el objetivo de determinar la fase del ciclo estral y la presencia de *Candida albicans*. Luego de comprobar la ausencia de células queratinizadas, se procedió a estrogenizar con 0,5 mg de valerato de estradiol en 0,5 mL de aceite de sésamo por vía subcutánea; 48 h después se analizaron nuevamente las características celulares de la mucosa vaginal y se realizó la selección de aquellas ratas con exudados negativos para levaduras y condiciones propias del estadio estro.

A estos animales se les inoculó intravaginalmente 0,1 mL de la suspensión de levaduras preparada previamente, con un tiempo no superior a 20 min. Cuatro días después de la inoculación, se realizó otro exudado para comprobar la presencia de infección. En esta ocasión continuaron el experimento aquellas ratas que presentaron más de 10^2 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, las que se consideraron como infectadas.⁷

Tratamiento

Las ratas infectadas se dividieron en seis grupos de seis animales cada uno. Se cuidó la homogeneidad en el grado de infección entre los grupos. A tres de ellos, se les aplicaron dosis diferentes de manteca de cacao ozonizada, con un índice de peróxidos de 770 y preparada en óvulos de 50 mg, las cuales se distribuyeron de la forma siguiente:

Grupo I: Tratado con 250 mg · kg⁻¹.

Grupo II: Tratado con 200 mg · kg⁻¹.

Grupo III: Tratado con 150 mg · kg⁻¹.

Se trabajó con tres grupos controles:

Grupo IV: Tratado con óvulos de manteca de cacao sin ozonizar (250 mg · kg⁻¹).

Grupo V: Tratado con óvulos de ketoconazol (9 mg · kg⁻¹).

Grupo VI: Sin tratamiento.

Se aplicó un óvulo diario a cada rata durante 10 d. Se realizaron exudados de control a los 5 d de iniciado el tratamiento, al finalizar este y 48 h después.

Examen histológico

Luego de concluido el experimento, las vaginas de las ratas fueron extraídas con un mínimo de manipulación, divididas transversalmente y fijadas en disolución de formol al 10 %. Se analizaron aspectos tales como edema, infiltración leucocitaria y microabscesos.

Todos los datos fueron procesados automática y estadísticamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de infección

Tres ratas murieron debido a la operación; de las 47 restantes, se seleccionaron 45 para realizar la inoculación con *Candida albicans*. Estas fueron las que dieron resultados negativos en el exudado y además, presentaron características de la mucosa vaginal que indicaban un franco estadio estro.⁶ De estos animales, 36 llegaron a presentar levaduras en cantidades superiores a 10^2 UFC/mL (Tabla I), esta concentración ha sido reportada⁷ como suficiente para considerar válido el proceso infeccioso, lo que permitió establecer la efectividad en un 80 %, por debajo de la obtenida por Sobel y col. en 1985.⁶ Sin embargo, estos autores utilizaron un cultivo salvaje de *Candida albicans*, recientemente aislado, mientras en este trabajo, se empleó una cepa de referencia, a la que no fue posible activarla la virulencia, según recomienda Peña en 1983.⁸ De esta forma, se puede pensar que con la activación del cultivo microbiano antes de la inoculación, se podrían lograr resultados superiores en el proceso de infección.

Tratamiento

A los 5 d de iniciado el tratamiento fue posible observar que los grupos IV (placebo) y VI (sin tratamiento) mantenían el 100 % de las ratas infectadas. Los grupos I y II presentaron una ligera diferencia con los controles anteriores, mostrando el 83,3 % de las ratas infectadas. El grupo III tratado con 150 mg · kg⁻¹ de manteca de cacao ozonizada mostró un decrecimiento mayor en el número de ratas con candidiasis vaginal, con el 66,6 % de animales enfermos. Por otra parte, las ratas tratadas con ketoconazol quedaron totalmente curadas en estos cinco días (Fig. 1).

Diez días después de iniciado el tratamiento se observó un comportamiento similar en las ratas tratadas con 250 y 200 mg · kg⁻¹ de manteca ozonizada y los controles (placebo y sin tratamiento). En todos estos casos, el porcentaje de ratas infectadas fue del 83,3 %. El resto correspondió a la eliminación de la infección en una rata. Sobel y col. en 1985⁶ reportan la eliminación espontánea de la enfermedad en el 10 % de las ratas infectadas semanalmente, por lo que estos resultados pueden ser atribuidos a las características del modelo empleado, máxime cuando se observa el mis-

Tabla 1. Resultados del proceso de infección en ratas.

Animales infectados	Candida albicans (UFC/mL)	(%)
6/45	10^4 - 10^5	13,3
21/45	10^3 - 10^4	46,7
9/45	10^2 - 10^3	20,0
9/45	10 - 10^2	20,0

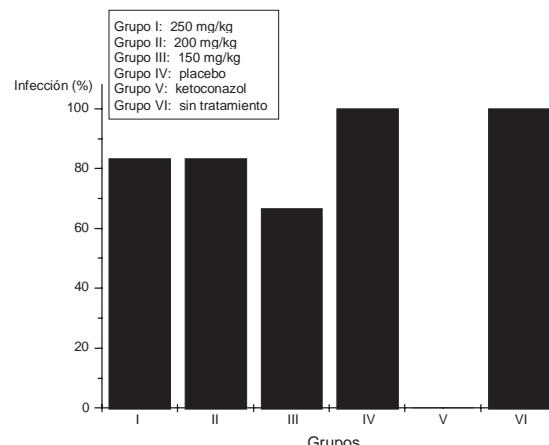


Fig. 1. Animales infectados a los cinco días de tratamiento.

mo comportamiento en las ratas sin tratamiento que en los grupos I, II y IV. El grupo tratado con $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de manteca de cacao ozonizada presentó todos los animales totalmente curados y el grupo tratado con ketoconazol permaneció libre de infección (Fig. 2).

En el exudado vaginal efectuado a cada grupo 48 h después de terminado el tratamiento, no se presentaron diferencias de consideración con el comportamiento anterior (Fig. 3).

Estos resultados evidenciaron que la dosis efectiva de manteca de cacao ozonizada resulta $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. En este caso, se logró la curación total de las ratas entre los seis y diez días de tratamiento. El resto de las dosis aplicadas, a pesar de ser más elevadas, no mostraron resultados positivos, lo que podría estar vinculado al mecanismo de acción del producto, aspecto que en la actualidad se investiga.

Los exámenes histológicos realizados evidenciaron en los grupos I, II, IV, VI, presencia de daños celulares, con edema, infiltración leucocitaria, hiperemia moderada y en algunos casos microabscesos, aspectos característicos del proceso de infección.⁶ En el grupo III, con dosis de $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, en algunos animales, se observaron signos de inflamación, no obstante, se detectó una rata con características celulares normales, lo que induce a pensar que aunque ya no existía presencia de microorganismos, el tiempo transcurrido a partir de la desinfección no permitió un proceso de recuperación del tejido antes del análisis histológico. En el grupo V, tratado con ketoconazol, sólo se observaron células queratinizadas.

Aunque se logró determinar que la manteca de cacao ozonizada es efectiva *in vivo* para el tratamiento de la candidiasis vaginal y se llegó a

establecer una dosis en la que se alcanza la curación total de los animales infectados. Es necesario realizar nuevos experimentos para estudiar los efectos que podría producir la aplicación de dosis menores de este producto, lo que permitiría establecer la dosis efectiva media para su formulación en un medicamento óptimamente activo.

CONCLUSIONES

La manteca de cacao ozonizada presenta actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *in vivo*, por lo que es posible recomendar su aplicación en el tratamiento de la candidiasis vaginal.

La dosis efectiva encontrada en este trabajo fue de $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, administrada cada 24 h durante 10 d como máximo.

BIBLIOGRAFIA

1. Velegraki A. *In vitro* susceptibility to itraconazole and fluconazole of switch phenotypes of *Candida albicans* serotypes A and B isolates from immunocompromised hosts. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33, 83, 1995.
2. Gil C., Pérez-Díaz R. and Nombela C. Inhibitory and morphological effects of several antifungal agents on three types of *Candida albicans* morphological mutants. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, 151, 1994.
3. Contreras R., Gómez M., Menéndez S., Molerio J., Roura G., Fernández D.Y. y Eng L. Efecto de la sustitución del aceite de oliva por aceite de girasol en la actividad antimicrobiana del aceite ozonizado. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 120, 121, 1989.
4. Rodríguez M., Guerra M., Molerio J., García M.Y. y Díaz W. Actividad *in vitro* del OLEOZON pinzeladas. II Conferencia de Aplicaciones del Ozono. XII Seminario Científico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba, 1995.
5. Morris G., Gómez M., Menéndez S., Correa M., Pérez N.Y. y Fernández L.A.. Tratamiento con ozono en ginecología. I Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono, Cuba, 1990.
6. Sobel J.D., Muller G. and McCormick J.F. Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 23, 199, 1985.
7. Segal E. and Josef A. Induction of candidal vaginitis in diabetic mice and attempts to prevent the infection. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33, 1, 1995.
8. Peña Yáñez J. Micología Clínica. Técnicas y diagnóstico de las micosis. Cap 8. Inoculaciones en animales. Ed. Ciencia, Madrid, 155-163, 1983.

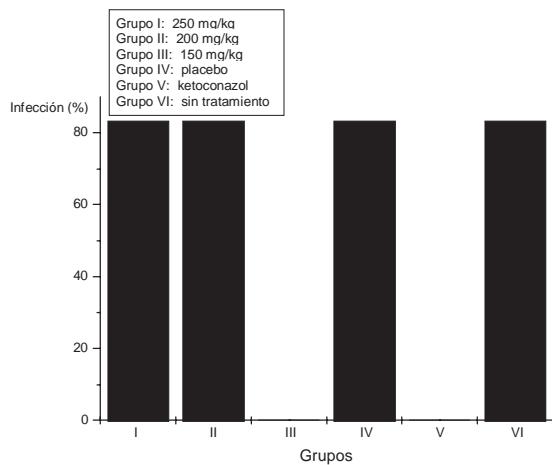


Fig. 2. Animales infectados a los 10 d de tratamiento.

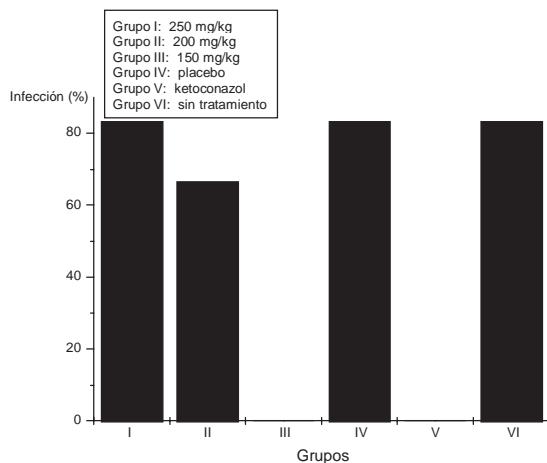


Fig. 3. Animales infectados a los 2 d de terminado el tratamiento.