

219
23



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL
DE LA PARED CELULAR DE C. ALBICANS
AISLADA DE PACIENTES SEROPOSITIVOS A VIH.
ESTUDIO PILOTO.

TESIS

QUE PRESENTAN :

ALINNE HERNANDEZ AYALA
TERESITA DEL NIÑO JESUS GONZALEZ GARCIA

PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA

Directora de Tesis
DRA. SANTA PONCE BRAVO

Asesor:
DR. EMILIO CASTELLANOS JUAREZ

México, D.F. 1996



MEXICO DE ORDEN
TESIS CON
NOO SISEL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Padres: ustedes que me han brindado todo su amor, cariño, consejos, apoyo incondicional, guía a lo largo de mi existencia, dedico con todo mi amor y corazón este trabajo que es un triunfo de ustedes.....porque sin ustedes, no lo hubiera podido llevar a cabo. Gracias por ser mis padres.....

*Pic y Mic
LOS AMO*

Bebos: Quiero agradecerles el que le proporcionen alegría y dinamismo a mi vida en todo momento, y que ese compañerismo y amor que nos tenemos nos mantenga unidos siempre.

LOS AMO

Abuelitos: Me es grato el poder ofrecerles una parte de este triunfo, que es la conclusión de mis estudios profesionales. Agradezco el cariño, confianza y fe que siempre han depositado en mi y espero siempre poder darles satisfacciones.

LOS QUIERO MUCHO.

Ato:

*Gracias por todo tu apoyo y comprensión,
por estar a todo lo largo de mi preparacion
universitaria, por verme crecer y madurar.
Contigo, el camino fué facil.....*

ALINNE

A DIOS:

Gracias por dejarme ¡ VIVIR ! este momento que significa un triunfo para mí, y gracias por darme tantas oportunidades en mi vida.

A mi madre Sra. Rosario García Vázquez, por ser una mujer ejemplar, firme y tenaz a la que nunca podre igualar; porque hasta ahora que soy esposa y madre comprendo muchas cosas que me decías, y porque a pesar de los errores tan grandes que he tenido, tu siempre estas a milado brindandome tu apoyo y amor infinitos. Este trabajo te lo dedico mamita, tratando de cumplir a tus sacrificios por brindarme una mejor vida. Gracias por tu ayuda. Te amo.

A mis abuelos Isabel † y Gerardo †, donde quiera que esten los amo, y les doy gracias por brindarme un hogar cuando el mío se destruyó, y sobre todo su amor de padres que nunca olvidaré.

A mi hermano Armando, por apoyarme y quererme siempre.

Ami esposo Gonzalo Eliseo : doy gracias a Dios, porque te puso en mi camino, nunca pense que un hombre me amara tanto como tú me lo has demostrado a pesar de las tormentas. Gracias por tu apoyo para que yo pueda superarme, tú sabes los sacrificios que ambos hicimos para que yo realizara este trabajo, mi Gonzito te amo.

A mi hija Frida, cuando tu naciste, mi vida se transformó totalmente, este trabajo está inspirado en tí, mi pequeña. Te amo.

A mi cuñada, Verónica Alvarado, por cuidar a mi hija en mis horas de estudio.

A la sra. María Elena, por cuidar a mi Frida el tiempo que dedique a este trabajo.

A mi cuñado Arturo y mi primo Joel por su apoyo.

Al sr. Gonzalo y Sra. Patricia por el apoyo y ayuda incondicional a Gonzalo y a mí.

A mi abuelita Guadalupe y Familia Estrada Agapito, por ser eso, mi familia.

A mis amigos Claudia, Galdina, Inés, Ruth, Pera, Jaime, Ricardo, Ana Lilia que estuvieron conmigo.

A mis compadres Elizabeth y Claudio con todo mi amor.

A mis futuros compadres Héctor y Emi por ser unos grandes amigos.

Al Dr. Mario Rodríguez Dorantes por su apoyo durante mi formación.

A mi padre Sr. Armando González Nates, siempre estarás en mi corazón y en mi mente, te lo digo con todo mi amor.

INDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
1. Hongos	
1.1. Generalidades del reino fungi	2
1.2. Infecciones micóticas	6
2. Candida	8
2.1. Generalidades	8
2.2. Morfología	8
2.3. Cultivo	11
2.3.1. Factores de crecimiento	12
2.3.2. Factores ambientales que afectan el crecimiento	12
2.4. Patología	15
2.5. Pared y membrana celular	17
2.5.1. Organización de la pared celular	22
2.5.2. Cambios ultraestructurales de la pared celular	22
2.6. Antigenicidad	23
2.7. Enzimas secretadas	25

2.8. Adhesión celular	26
2.9. Diagnóstico de laboratorio	26
2.10. Inmunidad	28
3. Candidiasis	29
3.1. Generalidades	29
3.2. Clasificación	29
3.2.1. Candidiasis eritematosa	31
3.2.2. Candidiasis hiperplásica	33
3.2.3. Quelitis angular	34
3.2.4. Candidiasis pseudomembranosa	35
3.3. Factores predisponentes	36
3.4. Diagnóstico	37
3.5. Diagnóstico diferencial	38
3.5.1. Leucoplasia	38
3.5.2. Leucoplasia vellosa	39
3.6. Tratamiento	40
3.6.1. Antimicóticos	40

4. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida	42
4.1. Historia	42
4.2. Definición	43
4.3. Agente etiológico	43
4.4. Epidemiología	44
4.5. Cuadro clínico	44
4.6. Diagnóstico	49
4.7. Tratamiento	49
5. Enfermedades asociadas a VIH	51
5.1. Candidiasis asociada a VIH	51
5.2. Lesiones bucales asociadas con la infección	54
5.3. Manifestaciones bucales por VIH más frecuentes	56
5.3. Manifestaciones bucales por VIH menos frecuentes	56
6. Planteamiento del problema	57
7. Justificación	58
8. Hipótesis	59
9. Objetivos general y específicos	60
III. Materiales y métodos	61

IV. Resultados	71
V. Discusión	83
VI. Conclusiones	86
VII. Bibliografía	87

FIGURAS

Fig. 1. Blastospora o levadura	3
Fig. 2. Hifa unida a un septo micelial	5
Fig.3. Formación de un tubo germinal a partir de una blastospora	5
Fig.4. Miceliación en <i>Candida albicans</i>	9
Fig.5. <i>C. eritematosa</i>	32
Fig 6. <i>C. hiperplásica</i>	33
Fig.7. <i>C. quelitis angular</i>	34
Fig.8. <i>C.pseudomembranosa</i>	35
Fig.9. Observación de colonias de <i>C. albicans</i> en medio de Agar Biggy de paciente seropositivo en donde se observa el desarrollo de formas miceliales tanto del tipo reproductivo como nutritivo	75
Fig.10. Figura que muestra el desarrollo de colonias de <i>C. albicans</i> de paciente seronegativo en medio de Agar Biggy en el cual se observan colonias pequeñas de forma circular, elevadas de color café oscuro.	76

Fig.11. Frotis de *C. albicans* de paciente seropositivo teñida con técnica de Gram en la que se observa la formación de pseudohifas tabicadas a un aumento de 100x. .77

Fig.12. Frotis de *C. albicans* de paciente seronegativo teñida con técnica de Gram en la que se ve la forma de levadura de *Candida* en gemación. Observación a 100x. .78

Fig.13. Microfotografía con ME de *Candida* in vitro en la cual se observa el desarrollo de múltiples gemas así como la presencia de cicatriz posterior al desprendimiento de la blastospora.79

Fig.14. Microfotografía con ME de *Candida* in vitro en la que se observa condensación del material electrodensó en la periferia en forma de capa, la pared es gruesa y existen acúmulos de material nuclear.80

Fig. 15. Microfotografía con ME de *Candida* in vivo en la que se puede observar laminación múltiple de la pared celular.81

Fig. 16. Microfotografía con ME de *Candida* in vivo. Se observa material osmiofílico al rededor de la pared y presencia de cocos, diplococos y bacilos.82

I. INTRODUCCIÓN

Las personas infectadas con el virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) y que han desarrollado el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), son blanco para el establecimiento de diversos procesos infecciosos bacterianos, virales y micóticos, así como también de neoplasias. Las lesiones micóticas bucales son las primeras manifestaciones de la inmunodeficiencia celular y pueden estar asociadas a otros procesos como infecciones, neoplasias entre otros. Las micosis que desarrollan pueden ser superficiales y profundas. En la boca se pueden presentar cinco tipos de micosis en relación a la infección por VIH: candidiasis, criptococosis, geotricosis, histoplasmosis y mucormicosis.

C. albicans y *C. tropicalis* son microorganismos miembros de la flora normal de piel, mucosas y tracto gastrointestinal, que se desarrollan cuando el equilibrio de la microflora es roto por antibioticoterapia prolongada, alteraciones fisiológicas locales o sistémicas o por inmunosupresión, por lo que tienden a proliferar rápidamente hasta establecer un proceso infeccioso. De estas dos especies, la que predomina es *C. albicans*.

II. 1. GENERALIDADES DEL REINO FUNGI

Los hongos son organismos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Aproximadamente existen 200,000 especies de las cuales menos de 100 son patógenas para los humanos y en mínima cantidad se comportan como parásitos (1).

Los hongos no contienen clorofila ni cualquier otro pigmento fotosintetizante, además almacenan glucógeno como reserva metabólica (2).

Los hongos por sus características morfológicas se dividen en levaduras, mohos y setas, pero aquellos que son patógenos se restringen solamente a la forma de levadura y moho. Pueden existir como parásitos o saprófitos. Algunos hongos presentan características de dimorfismo (aspecto de levadura y filamento) en tanto que otros únicamente de levadura, que existen como una sola célula [monomórfica (3)].

De esta forma, existen 2 morfotipos celulares que pueden distinguirse entre la mayoría de los hongos con importancia médica:

- a) Células de forma oval o esferoidal que son típicamente levaduras o blastosporas con un rango de 5 a 25 μm de diámetro.
- b) Células de forma tubular o filamentosa, que producen filamentos largos y ramificantes. Una sola célula de hifa puede tener un rango de 5 a 50 μm de longitud y 2 a 5 μm de diámetro. Estos hongos son comúnmente llamados mohos y cada filamento se le denomina hifa (4).

Los hongos tienen una pared celular (estructura limitante), una membrana endoplásmica, así como mitocondrias y cromosomas [fig.1(5)].

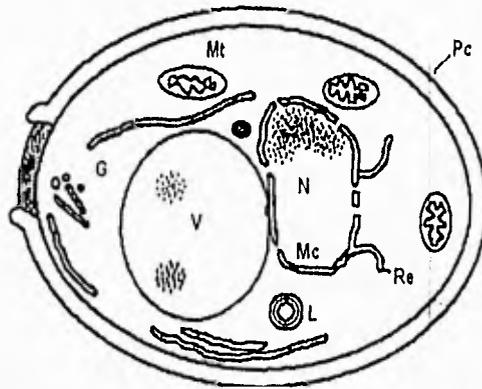


Fig. 1. Blastospora o levadura. Pc, pared celular de manan y glucano; Re, retículo endoplásmico; G, aparato de Golgi; L, gránulos de lípidos; Mt, mitocondrias; N, núcleo; Mn, membrana nuclear; V, vacuola (Tomado de: Franker Colin. P.H. Oral Mycology and Immunology. 1990;23:326).

Los hongos obtienen su energía de fuentes de carbono a partir de los ácidos orgánicos, y selectivamente de los mono y disacáridos. El potasio, magnesio y en menor grado el calcio son estimulantes del crecimiento. Otros elementos necesarios son el fósforo, el azufre y el nitrógeno. En los medios de cultivo, las fuentes usuales de nitrógeno son los productos de desdoblamiento de las proteínas, las peptonas y los aminoácidos. El crecimiento óptimo se presenta a un pH de entre 5 a 7. El oxígeno es necesario para la mayoría de los cuerpos reproductores. En la mayoría de los casos un buen crecimiento se obtiene entre los 20 y los 37°C. Algunos hongos patógenos son muy resistentes a la desecación pero todos necesitan de un grado de humedad para poder obtener un buen crecimiento; algunos crecen solamente en la superficie de medios de cultivo líquidos, mientras que otros crecen en la profundidad (1).

HIFAS

Las hifas son filamentos de forma cilíndrica o tubular, están cubiertas por una membrana que contiene al protoplasma y en el exterior por la pared celular. El alargamiento de las hifas se efectúa principalmente por crecimiento apical. Las hifas pueden ser cenocíticas (un sólo protoplasma, muchos núcleos y no forman tabiques o membranas transversales), o septadas (tabiques o septos transversales que dividen a las hifas en células y pueden tener uno, dos o muchos núcleos). Los tabiques o septos se forman a partir de la pared celular, tienen un aspecto anular y se cierran hacia el centro. Estos septos quedan con uno o varios poros pequeñísimos, a través de los cuales se ponen en contacto los protoplasmas de las células contiguas. Los mohos pueden tener forma de levadura pero su principal forma vegetativa es la hifa (4).

Las hifas a medida que crecen, producen ramas laterales o elongaciones (extensión apical) formando masas entrelazadas conocidas como micelios. Según aumenta de tamaño, la masa forma una colonia o talo (5).

Las hifas pueden dividirse en una cadena de células gracias a la formación de paredes transversas (septas), que compartimentalizan a la célula; la nueva síntesis de paredes entrecruzadas y división nuclear son coordinadas con el crecimiento de la extensión apical (fig.2). Las levaduras pueden convertirse en células hifales filamentosas por el crecimiento externo de un tubo germinal cilíndrico [fig.3 (4)].

Las hifas pueden o no estar septadas y presentar un crecimiento vegetativo o aéreo en el medio de cultivo (3).

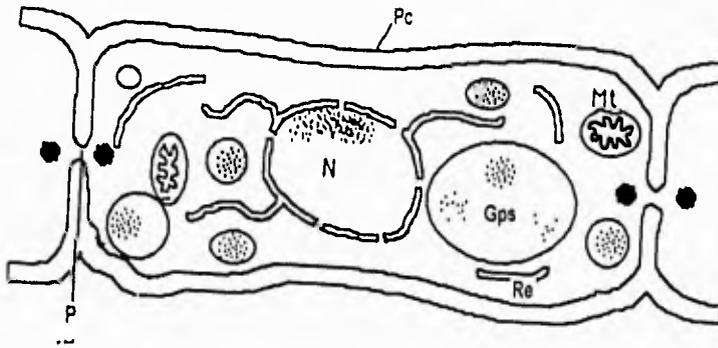


Fig. 2. Hifa unida a un septo micelial. Gps, gránulos de polisacáridos; P, poro septal; Mt, mitocondrias; Re, retículo endoplásmico; N, núcleo; Pc, pared celular (Tomado de: Franker Colin. P.H. Oral Mycology and Immunology. 1990;23:326).

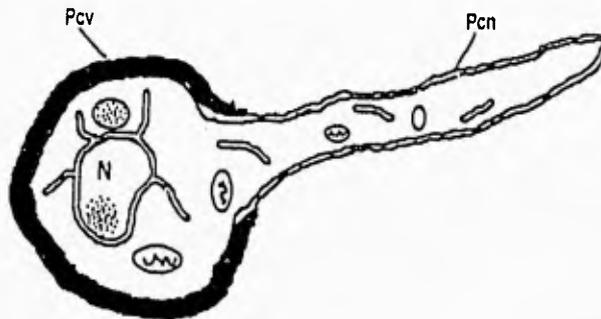


Fig. 3. Formación de un tubo germinal a partir de una blastospora. Pcv, pared celular vieja; Pcn, pared celular nueva delimitando el tubo germinal (Tomado de: Franker Colin P.H. Oral Mycology and Immunology. 1990;23:327).

1.1. INFECCIONES MICOTICAS

Las infecciones causadas por hongos son llamadas micosis, la mayoría de ellas son benignas. Factores iatrogénicos así como tratamientos inmunosupresivos en trasplantes y oncoterapia, alimentación parenteral, administración de corticoesteroides y antibioticoterapia prolongada han incrementado estas enfermedades (6).

Sin embargo, los hongos asociados con las enfermedades humanas son miembros saprófitos que forman parte de comunidades microbianas; otros existen como comensales en el tracto digestivo o son residentes en la piel que infrecuentemente se tornan patógenos. Hay hongos que son verdaderamente patógenos, es decir, capaces de infectar a personas sanas.

Los hongos producen micosis superficiales (superficies epiteliales) o profundas [invadiendo órganos y tejidos profundos (6)].

La mayoría de los hongos patógenos para el hombre son dimórficos. Cuando se cultivan in vitro generalmente existen en forma de mohos y cuando están presentes en tejidos existen en forma de levaduras. La mayoría de los hongos patógenos encuentran la temperatura corporal (37°C) adecuada para el crecimiento de las formas de levaduras, pero cuando crecen a temperaturas bajas como la temperatura ambiente, existen en forma de mohos. Las superficies también son conductoras para la forma de moho, y la forma de levadura se presenta en la profundidad de medios líquidos (7).

Los hongos oportunistas aparecen con una frecuencia elevada en relación con la aplicación de medidas avanzadas para el mantenimiento de pacientes terminales como aquellos a los que se les administran fármacos inmunodepresivos, antibióticos, quimioterapia sistémica y radiaciones para el tratamiento de tumores. Los modernos procedimientos invasivos hospitalarios y la colocación de injertos y prótesis favorecen el crecimiento de hongos oportunistas. Aunque los hongos patógenos no requieren de este tipo de factores predisponentes, pueden activarse desde una fase latente o pueden provocar un agravamiento de la infección cuando existen este tipo de factores u otros como el SIDA (6).

2. CANDIDA

2.1. GENERALIDADES

La evolución de los hongos ha seguido dos distintas líneas taxonómicas: Mycomycota y Eumycota, en este último grupo taxonómico se incluye a todos los hongos patógenos y oportunistas como *Candida albicans*.

El género *Candida* pertenece a la clase Blastomycetes, orden *Cryptococcal*, familia *Criptococcaceae*, y cuenta con las siguientes especies: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. viswanathii* y *C. guilliermondi* (1,4).

2.2. MORFOLOGÍA

Candida es un hongo en forma de levadura, Gram +, que presenta el desarrollo de blastosporas que se forman por gemación simple. Las levaduras miden de 3 a 6 μm de diámetro. *Candida* se caracteriza por presentar un desarrollo dimórfico, también presenta la forma de pseudohifa (estructura elongada). La forma terminal de clamidospora, consiste en un cuerpo celular esférico de 7 a 17 μm de diámetro y posee una pared gruesa y contráctil. Las hifas son raras y es la forma patógena cuando la barrera epitelial está alterada por trauma o cambios hormonales, el microorganismo invade los tejidos submucosos y existe depresión

inmunológica lo cual ocasiona que *Candida*, sufra cambios fenotípicos, mostrando un crecimiento hifal (fase micelial).

Las hifas tienen 2 o 3 pliegues pequeños que contienen a las blastosporas (11). Aunque se conoce un cierto número de estímulos ambientales que desencadenan o bloquean la conversión in vitro de levaduras a hifas no se conoce con certeza la regulación de la conversión de *C. albicans* (8).

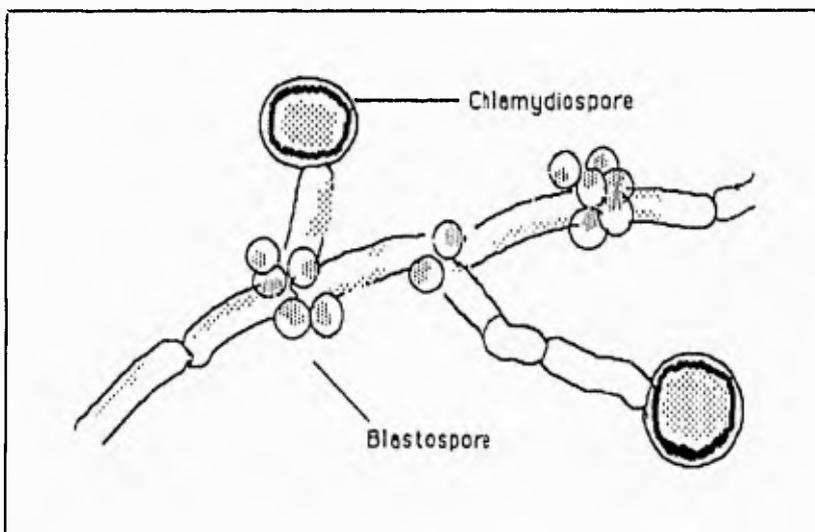


Fig. 4. Miceliación en *Candida albicans*, en la que se observa la presencia de pseudohifas, blastosporas y clamidiosporas (Tomado de: Franker Colin P.H. Oral Mycology and Immunology. 1990;23:333).

Tanto la forma de levadura como de hifa pueden ser vistas en los tejidos (la elongación de hifas que penetran los tejidos en etapas más tempranas, viven en trayectorias laterales en colonias de células en crecimiento que en torno a las nuevas penetraciones dan elevaciones en hifas). Los tubos germinales se pueden

diferenciar de las pseudohifas y son formados exclusivamente por *C. albicans* y algunos aislamientos de *C. stellatoidea* (8).

El fenotipo de las colonias consiste en las características morfológicas, la estructura de la pared celular, la dinámica del crecimiento, la localización del citoesqueleto o la posición de los organelos; así como la existencia de varias expresiones fenotípicas de la colonia. Las variaciones el resultado de cambios en la temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes (1).

Los fenotipos son heredables. Cambios en los fenotipos son acompañados por alteraciones en la adhesión, antigenicidad, producción de enzimas proteolíticas, resistencia y cambios en los requerimientos nutricionales que pueden llegar a afectar la virulencia. La forma de filamento ha sido asociada a las características de colonización debido a que permite la adhesión a las células epiteliales in vitro (9).

La presencia de componentes específicos de el tubo germinal refleja las diferencias en las estructuras superficiales entre las blastosporas y tubos germinales, la diferencia radica en que la arquitectura de los tubos germinales es en mínima parte el resultado de diferencias en proteínas superficiales, debido a una síntesis de nuevas secuencias de proteínas para la morfología de los tubos (9).

N-acetylglucosamina induce la formación de filamentos de *C. albicans* mostrando en el tubo germinal múltiples protuberancias que aparecen a los 90 minutos a temperatura de 37°C en la etapa de levadura. Las prominencias son

extensiones del citosol y contienen estructuras vesiculares, las vesículas están limitadas por una membrana y su contenido es material electrodensito granular (10).

La presencia de septos confirma que la filamentación en los tubos germinales son precursores de los septos miceliales (10).

2.3. CULTIVO

El cultivo es el procedimiento mediante el cual se promueve el crecimiento de los microorganismos al proporcionarles las condiciones ambientales adecuadas: nutrientes, pH, temperatura y aereación, así como la concentración salina, presión osmótica del medio y factores especiales como la luz para los organismos fotosintéticos (3).

Nutrición: es la provisión de nutrientes para el crecimiento tales como:

- Donadores de hidrógeno (substratos oxidables).
- Aceptores de hidrógeno (receptores de H en las reacciones óxido-reducción, que proporcionan energía).
- Fuentes de carbono.
- Fuentes de nitrógeno [el crecimiento en un medio basado en nitrógeno (de la levadura es idóneo) (6)]
- Minerales (azufre, fósforo, activadores enzimáticos como K^+ , Mg^+ , Ca^{++} , Fe^{++} .)

2.3.1. FACTORES DE CRECIMIENTO

Un factor es un compuesto orgánico que una célula debe contener para crecer, pero que ella es incapaz de sintetizar. Muchos microorganismos, cuando se les suministran los nutrientes anteriormente mencionados, son capaces de sintetizar todos los constituyentes orgánicos de su complejo protoplasma.

2.3.2. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO

Un medio de cultivo adecuado debe contener todos los nutrientes requeridos por el organismo que va a ser cultivado.

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona y dextrosa, maltosa o sacarosa.

En 24 a 48 horas producen colonias sobreelevadas de coloración cremosa y opaca de aproximadamente 2 mm de diámetro. Luego de varios días en agar se observan hifas penetrando en él. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo. El pseudomicelio de *C. albicans* se presenta bajo condiciones de cultivo semianaeróbico y está formado por células elongadas que se mantienen unidas entre sí como una cadena (11).

Las blastosporas están agrupadas en acumulos a lo largo del pseudomicelio en los sitios en que los extremos finales de las células pseudomiceliales se empalman con otras (11).

La fermentación de la glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa, son reacciones bioquímicas de gran valor para determinar las especies de *Candida* (11).

C. albicans tiene tendencia a formar clamidosporas, en un medio de cultivo especial como es el agar de maíz, las clamidosporas se desarrollan en el extremo del pseudomicelio. Una de las características diferenciales más importantes de *C. albicans*, es su habilidad de formar estas clamidosporas en ciertos medios; pero desde que *C. tropicalis* y *C. stellatoidea* también demostraron producir clamidosporas bajo algunas condiciones, se tienen que emplear exámenes diferenciales adicionales donde posteriormente estas especies se pueden encontrar. Otros criterios para diferenciarlas son: células con brotes elongados y extensión de finos miceliales (11).

Para la detección e identificación de *C. albicans* se utilizan los siguientes medios:

Agar Clamidospora	Agar base de <i>Candida</i> BCG
Agar Harina de maíz	Antisuero de <i>Candida albicans</i>
Agar de extracto de arroz	Base de Pagano Levin
Agar Levine EMB	Agar Biggy
Agar Wolin Bevis	

El Biggy es un medio selectivo recomendado para usarlo en conjunto con Agar Bacto-Aby para la detección, aislamiento y diferenciación de *C. albicans*.

La mayoría de las *Candidas* crecen rápidamente, mientras que las bacterias son inhibidas. *C. albicans* produce colonias en este medio café o negras. *C. tropicalis* produce difusión café brillante en agar Bacto- Biggy (12).

El microorganismo presenta un dimorfismo relacionado con las disponibilidades nutricionales. En condiciones generales de crecimiento y en presencia de carbohidratos fermentables, el microorganismo crece como una levadura en gemación. En medios sin carbohidratos fermentables y condiciones semianaeróbicas y/o un alto contenido en nitrógeno, la levadura experimenta una elongación formando pseudomicelios acompañados por la solución de blastoconidios y clamidoconidios (12).

En el Agar Sabouraud (glucosado) o en otros medios de cultivo similares, las colonias aparecen lisas, húmedas, blandas, de color y aspecto cremoso, con olor de levadura tanto a temperatura ambiente (24-28°C), como a 37°C, con un diámetro de 7 a 8 mm. Transcurridos 4 días, se observan la formación de pseudomicelios (12).

El medio de Pagano-Levin se ha usado ampliamente, pero sólo sirve para realizar diagnósticos presuntivos. Se basa en la diferente coloración de colonias de las distintas especies de *Candida* (12).

El segundo patógeno es *C. tropicalis*. Puede cultivarse en un medio de cicloheximida ya que es sensible a este agente químico para diferenciarlo. La diferenciación se realiza atendiendo a diversas características de cultivo, como formación de película en medios líquidos, licuefacción del medio, fermentaciones y asimilaciones diferenciales (12).

2.4. PATOLOGIA

Un 60 % de adultos tienen como habitante normal a *Candida* en ausencia de enfermedad clínica. Infecciones orales por *C. albicans* aparecen en varias formas clínicas, conjuntamente conocidas como Candidiasis oral (1).

C. albicans tiene la capacidad de adherirse a las células endoteliales y puede penetrar esta barrera por medio de procesos destructivos o por fagocitosis de el hongo por la célula endotelial (2).

La invasión de *Candida* se debe a la invasión de la superficie epitelial y proliferación formando clínicamente una placa gruesa. *C. albicans* se localiza en el estrato córneo, ya que éste es una fuente de nitrógeno de la cual se nutre. En otros casos, los hongos eventualmente entran en contacto con la membrana basal. Estudios indican que las células de *C. albicans* son capaces de adherirse a la membrana de células epiteliales a través de una interacción específica y que los tubos germinales parecen ser más adherentes que las células levaduriformes (2).

La diversidad del fenotipo del hongo hace sospechar que éste juega una papel importante en la patogenia de la infección por *Candida* (1).

La adherencia de *C. albicans* a las proteínas de la matriz extracelular es específica, esto gracias a que posee un receptor de superficie para la fibronectina; la adherencia e inmovilización de las levaduras en la proteína de la matriz extracelular puede ser inhibida por la misma síntesis de péptidos y fibronectina los

cuales actúan en la superficie celular de la levadura con los receptores de la célula (2).

Las células endoteliales con sus diferencias locales participan en la interacción con otras células efectoras de la inmunidad en la respuesta del organismo a la infección provocada por el hongo (3).

Algunos experimentos demuestran que las prostaglandinas como PGI 2 pueden ser especialmente importantes en la patogénesis de la diseminación de la candidiasis, ya que es un vasodilatador, (incrementa la permeabilidad endotelial e inhibe la adherencia de neutrófilos y la producción de superóxido). *C. tropicalis* no produce daños detectables en células endoteliales (3).

La habilidad de *C. albicans* para producir daño en las células endoteliales incluyen la producción de fosfolipasa y proteinasa, así como enzimas extracelulares (3).

La forma de hifa de *C. albicans* se considera la más patógena de las fases dimórficas, pero no es la única forma patógena. La patogenicidad de las hifa es en parte relacionada a su habilidad de adherirse a las células de los tejidos, la cual es promovida por los componentes de las paredes celulares (8).

Así se pueden observar tres patrones de la enfermedad:

1.- Proliferación superficial que se produce en zonas colonizadas normalmente por el hongo.

2.- Invasión profunda, que se produce a partir de las lesiones superficiales cuando existe una alteración sistémica de las defensas del huésped; puede evolucionar hacia una amplia diseminación del hongo.

3.- Inoculación directa en el torrente sanguíneo, que puede producir una candidiasis diseminada grave en pacientes inmunodeprimidos.

Por lo tanto, el espectro clínico de la candidiasis oscila entre cuadros que pueden ser tratados en la consulta médica, y cuadros que requieren el ingreso del paciente a nivel hospitalario (8).

2.5. PARED Y MEMBRANA CELULAR

La pared celular y la membrana plasmática de *C. albicans* constituyen una barrera entre el citoplasma y el medio ambiente externo. Estas capas están íntimamente involucradas con la forma de la célula, antigenicidad y secreción de enzimas histolíticas (14).

La pared celular de estas levaduras está principalmente compuesta por: B-glucanos, pequeñas cantidades de lípidos y quitina (15).

El análisis de extractos de Ditiotreitól demuestran que el exterior de la capa de la pared celular de *Candida*, blastoconidios y tubos germinales contienen polisacáridos, glicoproteínas y proteínas. Las proteínas se encuentran de un 3 a 6%, los lípidos en un 2%, manoproteínas en un 20 a 23 %, quitina de un 0.6 a 2.7 % y glucanos en un 48 a 60 %.

Cuando la pared celular se regenera, el seroplasto de *C. albicans* secreta manoproteínas, manooligosacáridos y sintetiza glucano y quitina. Los polisacáridos estructuralmente están enlazados fuertemente por proteínas durante la síntesis de estas en el citoplasma y en la superficie celular; las proteínas celulares son iguales a enzimas, y se sabe que son glicosiladas durante etapas tempranas de su síntesis en el citoplasma. Las proteínas contribuyen a dicho entrelazamiento, estabilizado por las uniones covalentes que son importantes en la determinación de la porosidad del exterior de la pared celular (9).

Por medio de inmunofluorescencia microscópica se encuentra un polisacárido epítipo obtenido por anticuerpos monoclonales (mAb), los cuales están localizados en la superficie celular y en la membrana plasmática de *C. albicans* (8).

Cassone y col. (1978) encontraron que la porción exterior de la pared de la levadura es una cápsula con protrusiones compuestas esencialmente de manosa. El glucano sólo fue encontrado en los estratos internos de la pared celular formando parte de una matriz rígida alcali-insoluble glucano-quitina (10).

La pared celular es externa a una membrana citoplásmica, sus unidades estructurales principales son polímeros de hexosas y hexosaminas [(polisacáridos) (10)].

La pared celular contiene quitina como su macromolécula estructural la cual está formada por residuos de N-acetilglucosamina unida por enlaces de β -1-4-glucósidos.

Otras unidades estructurales de la pared celular que se han detectado son el glucano insoluble (residuos de β -1,6 unidos a D-glucosa) y manan soluble (alfa-1,6 ligado a polímeros de D-manosa). También se encuentran complejos de ergosterol, proteínas y carbohidratos; las proteínas son ricas en cistina. Los enlaces S-S de la cistina pueden participar en el inicio de la formación de la yema (blastospora de la levadura). Las levaduras además contienen lípidos, los cuales constituyen hasta el 10% del peso seco de dichas células (1).

Su gruesa pared celular hace posible que las levaduras puedan detectarse a nivel microscópico, incluso en zonas de tejidos necróticos; no obstante, algunas veces son tan adherentes y están fijadas tan fuertemente que no suelen observarse en los líquidos corporales ni en los exudados, por lo que son necesarias las muestras de biopsia tisular para demostrarlas. Sus antígenos que son ricos en polisacáridos, se pueden detectar en ocasiones con motivos diagnósticos, algunos de ellos pueden inducir fuertes respuestas de hipersensibilidad de tipos III y IV (6).

Las manoproteínas de la levadura contienen un determinante antigénico, este determinante auxilia en la diferenciación de los tres grupos serológicos de *C. albicans*. [serotipos A,B y C (11)].

De los tres polisacáridos que constituyen la pared celular de *C. albicans* (manosa, quitina y β -glucano) sólo la manosa es un eslabón.

Consecuentemente, ninguno presenta inhibición a la adherencia, incluyendo aquellos con afinidad a N-acetil-D-glucosamina.

El azúcar monomérica que forma el polímero de quitina es parte interna de una porción de la pared celular de *Candida* (10).

En experimentos se ha observado a las paredes celulares de *Candida* en crecimiento a una temperatura de 37°C (condiciones miceliales) reflejando cambios en la glicosilación de moléculas de alto peso molecular, las cuales están enlazadas a otros constituyentes de la pared y algunas masas de manoproteínas de alto peso molecular que juegan un papel esencial en la determinación de la especificidad de la pared y en la morfología micelial (10).

Tanto el mecanismo de transporte y secreción de la pared de *C. albicans*, así como sus precursores desde el citoplasma, están destinados a la localización nucleada. Si bien la biosíntesis de la pared de *C. albicans* no está completamente entendida, los estudios de regeneración protoplásmica, la microscopía electrónica y la determinación química han revelado la composición química de la pared. Estas observaciones han confirmado la importancia de la membrana plasmática en la síntesis de las capas de la pared celular (17).

La membrana plasmática es de particular importancia en el control homeostático y en la susceptibilidad a agentes antifúngicos (14). Es la estructura más externa de la porción viva de la célula y se encuentra incluida en la pared celular.

Posee características de permeabilidad selectiva y rige el paso de nutrientes y productos de desecho, hacia el interior o exterior respectivamente por mecanismos

de transportación selectiva. Químicamente está constituida tanto de lípidos como de proteínas (17).

Futuros estudios del papel de la membrana plasmática en la biosíntesis de la pared celular, requieren de información detallada sobre los epítopes de la pared celular que deben asociarse con la membrana plasmática durante varios periodos de síntesis de la pared (14).

Debido a su complejidad química, estructural y funcional, las diferencias entre la membrana y pared celular de *C. albicans*, se ha sugerido que los epítopes pueden ser un factor importante en su participación en varios tiempos del ciclo celular, por lo tanto existe un epítopo que se encuentra en la membrana plasmática y también en la superficie de la pared celular de *C. albicans* [blastoconidia y tubo germinal (14)].

2.5.1. ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

Consiste en capas arregladas coaxialmente. En la pared de *C. albicans* las mannoproteínas están distribuidas a todo lo largo de ella y acumuladas en la superficie, siguiendo hacia la membrana plasmática y unidas a el β -glucano (1-6). La unión dentro y entre la pared celular le dan características tales como rigidez y retienen algunas enzimas solubles dentro de la envoltura celular (18).

2.5.2. CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES EN LA PARED CELULAR

Gracias a la microscopía electrónica, se han revelado aspectos sobre la organización ultraestructural de la pared celular de *C. albicans*. Los cambios se producen durante la formación del tubo germinal.

La pared celular de la levadura presenta 5 capas o zonas durante la formación del tubo germinal; una región electrotransparente que se convierte en el mayor componente y la región granular amorfa sobre la zona transparente. La formación del tubo germinal presenta frecuentemente una extensa aglutinación de la célula, la cual es responsable de los cambios en la superficie celular, presentando un borde fibrilar externo, las fibrillas están arregladas radialmente y perpendicularmente a la superficie celular; el material fibrilar está contenido dentro de una cubierta vellosa (18).

2.6 ANTIGENICIDAD

La inmunofluorescencia indirecta y la aglutinación directa, son pruebas para demostrar los antígenos correspondientes que se presentan en la pared celular de tres especies de *Candida* consideradas como las más patógenas (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. torulopsis glabrata*); el antígeno que parece ser predominante es un polisacárido natural, sin embargo las glicoproteínas representan la gran mayoría de antígenos de las levaduras (18).

Las diferencias en la expresión de los antígenos de superficie entre cepas de la misma especie se observan en diferentes etapas de el ciclo celular. El análisis químico y físico de la pared celular de las levaduras e hifas demuestran diferencias cuantitativas pero no en las diferencias cualitativas (19).

La superficie antigénica entra en contacto con los mecanismos de defensa del huésped, los antígenos no están en todas las cepas de *Candida*, y su expresión varía con la fase del ciclo de crecimiento de la levadura in vitro y en vivo (15).

La expresión dinámica de los antígenos y las diferencias en la composición de la superficie celular durante el crecimiento puede explicar la controversia que rodea al papel de los anticuerpos en la enfermedad, y la inconsistencia en el conocimiento de las relaciones entre huésped-parásito en las diversas micosis. También se ha demostrado que las células de *C. albicans* expresan diferencias en su antigenicidad en base a su metabolismo o sus estados morfológicos.

El complemento antigénico de la superficie de *Candida* puede ser influenciado por factores nutricionales y del medio ambiente.

La asociación de un antígeno con la membrana plasmática puede ser confirmada por ME inmunocoloidal, aislando las membranas. En el desarrollo de células hifales, el antígeno aparece primero en la Mc y luego en la superficie de la Pc (14).

El estudio de la variabilidad de la antigenicidad de la pared celular de un hongo oportunista como *C. albicans*, ha revelado la complejidad de la expresión de antígenos por el organismo. La variación en la expresión de los antígenos en la fase celular de la levadura está en relación con las fases de crecimiento, con la cepa de la levadura y con múltiples factores ambientales (18).

Observaciones sugieren que la colonización de los sitios específicos del antígeno pueden estar relacionados con las modificaciones estructurales y/o la transportación celular de componentes de la pared celular durante el crecimiento de la levadura y etapas tempranas de germinación. Entre las muchas interpretaciones de la estructura de la pared celular y el desarrollo de *C.albicans*, los anticuerpos monoclonales (mAbs) dan a los investigadores el seguimiento de su expresión y determinación particular (8).

El desarrollo del antígeno en los tubos germinales son observados primero a las 2 horas de incubación; la expresión del antígeno que se expresa en los tubos germinales es el área próxima a la membrana plasmática (19).

En este contexto los componentes de la pared celular actúan inmediatamente como desencadenantes de la respuesta inmune durante la infección, la detección de antígenos son expresados específicamente y con preferencia en la pared celular micelial, pudiendo ser usado en el diagnóstico de candidiasis invasiva. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos los constituyentes de la superficie individual contienen antígenos determinantes que no han sido identificados (8).

La caracterización de los antígenos en la superficie celular de *C. albicans* muestra heterogenicidad en la expresión de inmunodeterminantes no sólo entre las células de diferentes cepas sino también entre células en una población (8).

Esto hace pensar que las grandes diferencias observadas en la composición antigénica de la pared celular entre serotipos de *C.albicans* y otras especies de *Candida* usan anticuerpos policlonales (pAbs) semejantes, indicando la existencia de epítopes específicos en cepas, que requieren de una futura caracterización (8,16).

2.7. ENZIMAS SECRETADAS

C. albicans secreta las siguientes enzimas: fosfatasa ácida, fosfolipasa, β -glucanasa, una endonucleasa y N acetil- β glucosaminidasa. Las proteínas ácidas están implicadas en la patogenicidad de *C.albicans*.

La β -gluconasa es también secretada por la pared celular, tiene un papel importante en la morfogénesis de la doble pared celular y en la regulación de la estructura del

glucano. También existe β -gluconasa, la cual hidroliza a p-nitrofenil- β -gluconidasa y endonucleasa.

La actividad de la β -glucosidasa está localizada en la membrana plasmática. La β -gluconasa es secretada durante la fase exponencial del crecimiento y en la formación en el tubo germinal (18).

2.8 ADHESIÓN CELULAR

La pared celular de *Candida* tiene una mejor área para la investigación de las interacciones *Candida*-Huésped. La superficie celular tiene glicoproteínas que tienen que ver en la adherencia de las levaduras a las células hospederas de mamíferos (20).

Lee y King, en su trabajo se refieren a la relación de un componente compuesto de manosa y una manoproteína, en la pared celular de *C.albicans* en la adhesión de este organismo a las células epiteliales (10).

2.9. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de candidiasis es y se vuelve complicado por el factor de que *Candida* existe como comensal en la cavidad oral. Esto puede reducir el valor de la citología positiva. Por ésta razón el diagnóstico se hace a una clínica fidedigna soportado por estudios de laboratorio (1).

El punto biológico que se debe establecer es la formación de clamidosporas y blastoconidias con diversas disposiciones observados en especímenes clínicos tales

como: raspado de piel y mucosas, cabello, esputo y biopsias de tejidos. Hifas y levaduras pueden diferenciarse con tinciones (Gram) si el material clínico ha sido tratado con una solución de hidróxido de potasio que remueve residuos solubles alcalinos. La mayoría de los hongos patógenos pueden también ser cultivados en medios selectivos simples (ya descritos), lo cual facilita su identificación así como pruebas bioquímicas.

La formación de micelio oseudomicelio y la producción de clamidosporas y blastoconidias para la identificación presuntiva de especies de *Candida* sigue los siguientes patrones:

A) para *C. albicans* las clamidosporas de pared gruesa están sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas y/o las blastoconidias son producidas en densos racimos regularmente esparcidos a lo largo de las pseudohifas.

B) para *C. tropicalis* las blastoconidias son producidas escasamente en forma aislada en pequeños racimos laxos y regularmente a lo largo de las pseudohifas (13).

2.10. INMUNIDAD

C. Albicans puede interferir en los mecanismos de inmunidad produciendo toxinas y enzimas proteolíticas, queratinasas que pueden debilitar la barrera epitelial queratinizada y hacer al tejido accesible a microorganismos oportunistas.

Los leucocitos polimorfonucleares son importantes en la defensa contra infecciones micóticas pero, debido a su tamaño, las hifas y pseudohifas de *Candida* son resistentes a la fagocitosis. El sistema inmune del huésped contra *Candida* puede ser celular y humoral. Componentes séricos como opsoninas, complemento y transferrina, pueden inhibir el desarrollo de *Candida*.

Los anticuerpos específicos contra *Candida* tienen un efecto directo mínimo pero pueden:

- 1) Inhibir el agrupamiento normal de levaduras por suero.
- 2) Afectar la morfogénesis o respiración de las levaduras.
- 3) Funcionar como opsoninas.
- 4) Mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los neutrófilos, inactivan, envuelven y matan al hongo, protegiendo al resto de las células. Estas defensas celulares destruyen del 30 al 40% de las levaduras infectantes (6).

3. CANDIDIASIS

3.1. GENERALIDADES

Micosis incorrectamente llamada "Moniliasis", (palabra que alude a un hongo que crece en la madera podrida). El término correcto es "candidiasis" (21).

La candidiasis es una infección causada por cualquier especie de *Candida*. Estos microorganismos son miembros de la flora normal de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal. Durante el nacimiento, o poco después, todos los humanos adquieren y son colonizados por especies de *Candida*. Así, claramente, el riesgo de infección endógena está siempre presente. De hecho, la candidiasis es la micosis sistémica más común y es de incidencia mundial (22).

3.2. CLASIFICACIÓN

Las lesiones candidiasicas bucales, presentan diferentes características, dependiendo del factor desencadenante, la edad del paciente y el sitio afectado.

Formas más comunes de candidiasis bucal:

AGUDAS

a) Candidiasis pseudomembranosa

b) Candidiasis atrófica

CRONICAS

- a) Candidiasis atrófica
- b) Queilitis candidiasica
- c) Candidiasis hiperplásica

Formas raras:

- a) Candidiasis mucocutánea crónica
 - 1.- Candidiasis mucocutánea crónica familiar
 - 2.- Síndrome de candidiasis endócrina o endocrinopatía candidiasica
 - 3.- Candidiasis mucocutánea crónica de ataque tardío
 - 4.- Candidiasis mucocutánea crónica difusa
- b) Candidiasis mucocutánea asociada a inmunodeficiencia
 - 1.- Síndrome de Di George
 - 2.- Displasia tímica hereditaria
 - 3.- Agamaglobulinemia tipo Suizo
 - 4.- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida [SIDA (23)].

En general, la candidiasis bucal ocurre en cuatro variantes clínicas separadas:

- 1) Candidiasis pseudomembranosa (Psc)
- 2) Candidiasis eritematosa (Ec)
- 3) Candidiasis hiperplásica
- 4) Queilitis angular (23).

3.2.1. CANDIDIASIS ERITEMATOSA

La forma eritematosa de la candidiasis parece ser la manifestación bucal temprana más común en las personas infectadas por VIH. Se presenta como máculas de color rosa o rojo, típicamente en el paladar y en el dorso de la lengua, es asintomática (24).

En la mayoría de los casos se observa glositis romboidea media (25)

Otro factor que desencadena la iniciación de la candidiasis eritematosa es la irritación del paladar con la base acrílica de la dentadura con la subsecuente colonización micótica (26)

Se ha demostrado en muchos casos que la candidiasis de tipo eritematoso precede al desarrollo de la candidiasis pseudomembranosa (26).

Histológicamente se observa pérdida de la continuidad del tejido epitelial, zonas de hiperplasia, acantosis severa, presencia de hifas en el estrato córneo, pérdida de estratificación, exocitosis y abundante infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario.

El tratamiento requiere la remoción y desinfección de la prótesis, el uso de antimicóticos y la identificación y corrección de cualquier factor sistémico alterado que ocasione menor resistencia al huésped (27).



Fig. 5. Paciente de sexo femenino de 34 años de edad que presenta Candidiasis eritematosa en el paladar.

3.2.2. CANDIDIASIS HIPERPLÁSICA

Los pacientes infectados por VIH, desarrollan la candidiasis hiperplásica crónica teniendo como sitio de aparición la mucosa bucal y los bordes de la lengua, en tanto que los pacientes seronegativos a VIH presentan este tipo de lesiones más comúnmente en las comisuras labiales (25).

Se caracteriza clínicamente por aparecer como placas blancas que sólo pueden ser raspadas con mucha dificultad o simplemente no pueden ser removidas (28).

Histológicamente se observa un fenómeno de inyección biológica y las hifas de *C. albicans* no llegan más allá del estrato córneo (25).



Fig. 6. Paciente de sexo masculino de 37 años de edad que presenta candidiasis hiperplásica en carrillos

3.2.3. QUELITIS ANGULAR

Consiste en fisuras o grietas eritematosas de las comisuras labiales frecuentemente asociadas con placas blancas. Dicha infección puede ser multifactorial en su etiología y estar asociadas con otras enfermedades bacterianas. El agente etiológico más importante es *C. albicans* (25).

Los factores predisponentes más comúnmente citados son la pérdida de la continuidad del epitelio y una deficiencia vitamínica de riboflavina y hierro.

La sintomatología que presentan las personas con ésta lesión son: sensación de ardor (quemazón) y resequedad en las comisuras de los labios (28).

Existen dos tipos de queilitis angular: erosiva y granular. La de tipo erosivo, presenta dolor, enrojecimiento, erosiones y fisuras de las comisuras de color rojo brillante con zonas de descamación. La de tipo granular, presenta inflamación labial(28).



Fig. 7. Paciente de sexo masculino de 27 años de edad que presenta queilitis angular en la comisura labial.

3.2.4. CANDIDIASIS SEUDOMEMBRANOSA

La candidiasis de tipo pseudomembranoso se caracteriza por la presencia de placas blancas o amarillentas elevadas en la superficie de la mucosa que pueden ser removidas raspando o frotando la zona, dejando una superficie sangrante y dolorosa. Este tipo de candidiasis puede desarrollarse en cualquier parte de la mucosa bucal pero afecta más frecuentemente paladar, mucosa labial y bucal (25).

Las placas pseudomembranosas están formados por células epiteliales descamadas, leucocitos, hifas de *Candida*, bacterias, queratina, tejido necrótico y restos de alimento. La prevalencia de este tipo de candidiasis varía de 6 a 69% en pacientes infectados con VIH (26).



Fig. 8. Paciente de sexo femenino de 36 años de edad que presenta Candidiasis pseudomembranosa en el paladar.

3.3. FACTORES PREDISPONENTES A CANDIDIASIS

Los factores predisponentes provocan cambios, que permiten que *Candida* sufra modificaciones de una forma comensal a una forma patógena.

El crecimiento de *Candida* puede ser estimulado por factores locales y generales o sistémicos, dando como resultado la penetración de *Candida* en los estratos más superficiales del tejido epitelial (29).

El uso de terapia con esteroides antiinflamatorios en forma sistémica o tópica disminuye la inmunidad local permitiendo con esto que *Candida* prolifere. Los antibióticos (especialmente los de amplio espectro o terapia combinada de antibióticos) también están involucrados con el desarrollo de candidiasis; se cree que esto ocurre por el cambio en el equilibrio de la flora microbiana bucal (28).

La radioterapia o la quimioterapia antineoplásica causan mucositis y xerostomía, lo que también ocasiona que *Candida* se desarrolle en la cavidad bucal, en parte por deficiencia en la inmunidad humoral y por otra parte por daño o alteración a la integridad estructural de barreras epiteliales y suministro vascular (28).

Cambios en el flujo salival por alteraciones hormonales se ocasionan durante el embarazo así como por el uso de anticonceptivos orales, lo cual en ambos casos permite el desarrollo de micosis (28).

Drogas que inducen neutropenia como son los inmunosupresivos, así como drogas psicoactivas permiten la ploriferación candidiásica (28).

Las deficiencias nutricionales pueden alterar los mecanismos de defensa del huésped o la calidad de la superficie epitelial lo cual promovería la adherencia de *Candida* a las superficies epiteliales (28).

Los factores mecánicos actúan cambiando el medio ambiente local y creando grietas en la superficie epitelial. Actualmente la infección por VIH es otro factor predisponente (28).

3.4. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de Candidiasis bucal se hace en base a sus características determinadas (clínicas) por medio de historia clínica y exploración clínica. Los criterios recomendados por Lehner (1904) para dicho diagnóstico incluyen:

- 1) Placas blancas o áreas difusas eritematosas
- 2) Cultivo de *Candida* de la saliva
- 3) Presencia de micelio en la examinación directa de un frótis de la lesión
- 4) Examinación de biopsia mostrando hifas en el epitelio y cambios histológicos característicos (no necesaria)
- 5) Determinación en suero, por inmunofluoriscación del anticuerpo en contra de *C. albicans* sobre 1:16, y un exámen positivo del anticuerpo en saliva (26).

Para observar mejor la presencia de micelio, los frótis pueden ser preparados con 10% de hidróxido de potasio, teñidos con ácido Peryodico de Schiff o solución de Gram (26).

La técnica de frótitis consiste en raspar la mucosa con una espátula delgada o un abatelenguas, esparciendo la muestra en una laminilla y fijandola con calor, un fijador citológico o fijador de cabello (en los fijadores de cabello, el alcohol fija hongos y los otros ingredientes causan adhesión de las células a la laminilla (26).

3.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A las lesiones candidiasicas, debido a sus características clínicas, se les puede confundir con otras lesiones como son la leucoplasia y leucoplasia vellosa.

3.5.1. LEUCOPLASIA

El término "leucoplasia" implica únicamente la característica clínica de una placa blanca en la mucosa y no tiene connotación histológica alguna. Los factores etiológicos más frecuentemente citados son el tabaco, alcohol, sepsis bucal, irritación local, deficiencia vitamínica, trastornos endócrinos entre otros (30).

Aunque placas leucoplásicas se pueden encontrar en cualquier sector de la cavidad bucal, se notan algunos sitios de predilección como son la mucosa vestibular y las comisuras, seguidas en orden descendente por la mucosa alveolar, lengua, labios, paladar blando y duro, piso de boca y encía. La extensión de las lesiones varía desde pequeñas placas irregulares bien localizadas a lesiones difusas que cubren una porción considerable de la mucosa bucal. Se presenta por igual en ambos sexos (30).

3.5.2. LEUCOPLASIA VELLOSA

El diagnóstico exacto de leucoplasia vellosa (LV) es importante porque ésta lesión bucal puede ser un signo temprano de infección por VIH en sujetos aparentemente normales y, además, un predictor del desarrollo total subsecuente del SIDA (31).

La LV tiene importancia pronóstica significativa con respecto al desarrollo subsecuente de SIDA en pacientes seropositivos a VIH que no tienen síntomas. Por esta razón la LV está dentro del grupo IV (otras enfermedades secundarias específicas infecciosas) del sistema de clasificación de los Centros de Control de Enfermedades para la infección por VIH (31).

La LV usualmente se observa como una lesión bilateral, blanca, no desprendible, en la lengua de aspecto corrugado o tiene una apariencia peluda o velluda, asintomática, y no tiene potencial premaligno conocido. Se observa en el 25% de las personas infectadas con VIH (31).

Las características histológicas de la LV incluyen proyecciones de queratina, paraqueratina, o hiperparaqueratosis, bordes irregulares, hiperplasia, acantosis, algunas o ningunas células de Langerhans e infiltrado celular inflamatorio poco denso en la lámina propia (24).

La LV muestra una amplia variedad clínica e histopatológica y puede ser difícil de distinguir de otras lesiones blancas de la lengua como candidiasis

hiperplásica, algunas formas de líquen plano, nevo blanco esponjoso, leucoplasia idiopática asociada al tabaco y queratosis friccional (31).

3.6. TRATAMIENTO

Antes de establecer un plan de tratamiento se deben de tomar en cuenta tres consideraciones:

- 1) Identificación y manejo de cualquier condición sistémica predisponente
- 2) Eliminación de factores locales
- 3) Antibioticoterapia

3.6.1. ANTIMICÓTICOS

Nistatina (Micostatin). Es el antimicótico más comúnmente empleado. Se usa en forma tópica ya que requiere contacto cercano con el tejido infectado para ser efectivo. No se absorbe por el tracto gastrointestinal, por lo que, deglutiéndolo no se obtiene efecto sistémico. Sus beneficios son en forma tópica. En casos de candidiasis esofágica se administra por vía oral. La nistatina tiene varias presentaciones, como son: enjuagues, suspensiones acuosas y cremas. El contacto con el tejido y el antimicótico puede ser mayor usando tabletas en vez de suspensiones; sin embargo, las tabletas son de sabor desagradable (32).

Ketoconazol (Nizoral). Es eficaz para el tratamiento de candidiasis pseudomembranosa severa y candidiasis esofágica. Las manifestaciones secundarias

que presenta son: anorexia, náusea, elevación de aminotransferasas, lo cual indica daño hepático (32,33).

Fluconazol. Es eficaz para el tratamiento de esta micosis. Es bien absorbida, en el tracto digestivo aún en ausencia de jugos gástricos (32,34).

4. SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

4.1. HISTORIA

En 1981 se identificó el primer caso claro de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en Estados Unidos. En la primavera de 1983 fue identificado un virus en el Instituto Pasteur (Francia) y luego en los Institutos Nacionales de la Salud (EE.UU.) que fue considerado como el agente etiológico de este síndrome. El SIDA es una enfermedad que ocasiona devastación del sistema inmune (38).

Desde 1977 se asoció a un retrovirus con cierta transformación neoplásica de las células T que daba por resultado una leucemia de linfocitos T en el adulto. Este descubrimiento realizado en Japón, se confirmó en Estados Unidos en 1980.

En 1982, la leucemia de las células velludas fue asociada con un segundo retrovirus. A partir de entonces, estos agentes se denominan HTLV I y HTLV II (human T lymphocyte virus, virus de los linfocitos T humanos). En 1984 se anunció un tercer retrovirus, entonces llamado HTLV III y conocido en la actualidad como VIH (39).

4.2. DEFINICIÓN

El SIDA está caracterizado por una deficiencia básica de la inmunidad celular, por pérdida de la competencia inmune debido a la destrucción de las células T por el virus VIH, sin otra causa primaria conocida que la infección viral, y es acompañado por un conjunto de anormalidades inmunológicas y neurológicas que culminan con un deterioro del sistema linfoide y que, generalmente, puede conducir a la muerte del paciente por aparición de infecciones oportunistas o neoplasias (40).

4.3. AGENTE ETIOLÓGICO

El agente responsable del SIDA es el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), también conocido como Virus Linfocitotrópico de las células T humanas tipo III (HTLV-III) y Virus Asociado a la Linfadenopatía (LAV), es un virus que pertenece a la familia de los retrovirus género *Lentivirus*, constituido por una sola cadena de ácido ribonucleico (ARN), una transcriptasa inversa, proteínas estructurales y glicoproteínas de envoltura (41).

4.4. EPIDEMIOLOGÍA

El VIH se limita a grupos definidos de riesgo: hombres homosexuales y bisexuales, drogadictos intravenosos, hemofílicos y receptores de hemoderivados, parejas sexuales de los individuos pertenecientes a estos grupos y personal del sector salud (38).

Se ha demostrado que sólo se puede transmitir este virus por vía sexual, por contacto directo con sangre contaminada y vía trasplacentaria (39).

4.5. CUADRO CLÍNICO

Para definir en forma exacta la infección por el VIH, los CDC han desarrollado una clasificación que consiste en cuatro grupos que se excluyen entre sí, basados en los síntomas clínicos y la duración de la infección (38).

GRUPO I = Las infecciones de este grupo se definen como un "síndrome similar a la mononucleosis" que se produce unos días o semanas después de la infección inicial con el virus en un 30-50% de las personas expuestas. El cuadro se caracteriza por linfadenopatía difusa, faringitis, exantema maculopapular, fiebre y mialgias difusas. También puede presentarse una meningitis aséptica. Los síntomas se resuelven después de 14 días.

GRUPO II = Varios meses después de que se detectan los anticuerpos contra el VIH. Las personas infectadas son asintomáticas y no presentan evidencias clínicas de infección (42).

GRUPO III = Los pacientes de este grupo presentan linfadenopatía generalizada, por lo general tienen dos o más linfadenopatías extrainguales. Sólo un grupo puede encontrarse en el área cervical. Estos ganglios, que pueden tener más de 1 cm de diámetro, pueden persistir más de tres meses. No existen otras causas identificables de linfadenopatía (38).

GRUPO IV = La infección de éste grupo incluye los síntomas, infecciones oportunistas y neoplasias que constituyen los criterios de vigilancia para el diagnóstico de SIDA.

Éste grupo está formado por cinco subgrupos. Con frecuencia, los pacientes presentan características de más de uno de los subgrupos.

SUBGRUPO A = Se incluyen a las personas consideradas anteriormente con un complejo relacionado con SIDA y que presentan fiebres persistentes no justificadas, diaforesis nocturna, astenia, pérdida de peso, candidiasis oral y leucoplasia vellosa.

SUBGRUPO B = Se define por las enfermedades neurológicas asociadas con la infección por VIH. El espectro de estas enfermedades se extiende desde parestesias periféricas menores, incontinencia y demencia.

SUBGRUPO C = Comprende los pacientes con infecciones oportunistas, entre las cuales se han registrado infecciones parasitarias, micóticas, virales y bacterianas.

SUBGRUPO D = Comprende los pacientes con las neoplasias observadas en la infección por VIH: sarcoma de Kaposi, linfomas no Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central.

SUBGRUPO E = Se encuentran los pacientes con enfermedades específicas atribuibles a la infección por VIH (38,42).

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana ocasiona muy diversas enfermedades clínicas.

Existe un número mayor de personas infectadas con VIH que muestran síntomas, pero que no cumplen con los criterios empíricos del cuadro "florido", y que pueden tener fiebre, pérdida de peso, diarrea, fatiga, sudores nocturnos, linfadenopatía y anormalidades inmunológicas. Esta constelación de signos y síntomas en el marco de una infección por VIH ha sido llamado *complejo relacionado con SIDA o ARC*. Se calcula que, en promedio 25% de los sujetos con ARC mostrarán enfermedad totalmente desarrollada en término de tres años. Sin embargo, el propio complejo puede presentar un cuadro grave (40).

Un número importante de personas ha muerto por el síndrome de consunción que es propio del complejo, sin haber evolucionado a la forma florida del SIDA.

En unos cuantos pacientes se ha corroborado la presencia de enfermedad aguda tres a seis semanas después de la infección primaria con el VIH, y se caracteriza por fiebre, escalofríos, artralgias, mialgias, erupción maculopapulosa, urticaria, cólicos abdominales y diarrea. El cuadro dura dos a tres semanas y cede espontáneamente. La seroconversión ocurre 8 a 12 semanas después del supuesto contacto o exposición (40).

En promedio, 50% de los pacientes presentan neumonía por *Pneumocystis carinii*, sin sarcoma de Kaposi, y aproximadamente 27% sufren el sarcoma mencionado, sin la neumonía. Menos del 10% presentan las dos entidades. No es raro que un sujeto muestre simultáneamente infección por varios oportunistas. Se ha identificado un número cada vez mayor de enfermos que tienen neoplasias linfoides que son consecuencia del defecto inmunitario subyacente (40).

Los individuos con neumonía por *Pneumocystis carinii* pueden presentar los signos típicos de la enfermedad como fiebre, disnea e hipoxia.

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) son muy comunes en sujetos con SIDA y se manifiestan por fiebre y ataque diseminado de órganos y sistemas.

De importancia particular es la coriorretinitis por CMV que ocasiona trastornos visuales graves, y a veces culmina en la ceguera completa. La enteritis por dicho virus puede ocasionar diarrea incoercible (40).

El virus de Herpes simple puede producir trastornos mucocutáneos graves en sujetos con SIDA, y es típico en ellos el ataque perianal.

La infección por *C. albicans* es muy común en sujetos con SIDA y se manifiesta por algodoncillo en la boca o esofago (40).

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* es una cuadro común por oportunistas que coexiste con SIDA. La infección por *Cryptococcus neoformans* parece una forma de meningitis o un cuadro diseminado. Las infecciones por *Toxoplasma gondii* pueden aparecer en la forma de coriorretinitis, más comúnmente como lesiones intracerebrales "expansivas".

La diarrea persistente es muy común en el SIDA y en el complejo relacionado con SIDA. Se ha demostrado la aparición de síndromes diarreicos como resultado de enteritis por citomegalovirus secundaria a la infección, por el protozoococcidio *Cryptosporidium*, secundario a sarcoma de Kaposi en vías gastrointestinales, o como consecuencia de la acción de otros parásitos intestinales. Sin embargo, un número importante de sujetos con SIDA muestran diarrea incoercible, y absorción deficiente sin causa identificada (40).

En 33% de las personas con SIDA se observa un cuadro neuropsiquiátrico grave que se caracteriza por signos neurológicos muy heterogéneos que incluyen meningitis aguda o crónica y demencia progresiva en presencia o ausencia de signos de localización (40).

4.6. DIAGNÓSTICO

Se cuenta con una técnica de inmunosorbente acoplada a enzimas (ELISA), muy sensible y de fácil práctica para detectar anticuerpos contra el VIH. El análisis Western Blott, que define la especificidad de la reacción inmunológica entre anticuerpos y las proteínas que codifican el virus, puede utilizarse para confirmar los datos obtenidos por ELISA cuando es necesario (40).

4.7. TRATAMIENTO

El tratamiento del SIDA asume tres formas: combatir las complicaciones secundarias como serían las infecciones por oportunistas y las neoplasias; combatir la infección de VIH, y mejorar o reconstituir el deficiente sistema de inmunidad (40).

Ninguna de las drogas que pueden ser utilizadas para tratar pacientes infectados por VIH pueden erradicar la infección, todas deben ser consideradas como paliativos (32).

ZIDOVUDINA: (retrovir o también llamado AZT) es un análogo nucleótido que inhibe la transcriptasa reversa del VIH; disminuye los antígenos p24 circulantes, las células-T CD₄ circulantes y disminuye la frecuencia de infecciones oportunistas en pacientes infectados por VIH con la enfermedad de SIDA avanzada (32).

La droga ha sido asociada con un aumento en la supervivencia de menos de 9 meses a más de 2 años después del diagnóstico de SIDA. El uso de ésta en pacientes seropositivos a VIH sintomáticos ha mostrado lento progreso o desarrollo hacia el SIDA y prolonga el tiempo de vida.

Algunos efectos secundarios que provoca la zidovudina son: anemia, neutropenia, náusea, vómito, cefalea, fatiga, miopatía y hepatitis (32).

5. CANDIDIASIS Y VIH

La candidiasis bucal es considerada como una infección oportunista en la enfermedad por VIH. Entre el 11 y el 96% de los pacientes infectados con VIH, desarrollan candidiasis bucal en algún estadio de la enfermedad. Es considerada como una enfermedad con implicaciones en su pronóstico, así como una de las primeras manifestaciones de la infección por VIH.

La xerostomía desarrollada en la enfermedad por VIH puede predisponer al desarrollo de candidiasis.(39).

Algunos estudios indican que la candidiasis bucal está presente en un 75 a 91% de personas con SIDA o con complejo relacionado con el SIDA, el cual se refiere a que la persona es seropositiva a este virus y presenta algunos síntomas sin llegar a desarrollar propiamente SIDA (26).

Debido a que los cuatro tipos de candidiasis ocurren con diferente frecuencia en pacientes con SIDA, pacientes con complejo relacionado con el SIDA y en personas seropositivas a VIH que no presentan signos y síntomas, es importante el distinguir las cuatro variantes (35).

La candidiasis seudomembranosa y la candidiasis eritematosa son los tipos más comunes en pacientes con VIH. Se ha establecido que la candidiasis bucal del tipo pseudomembranoso está asociada con la supresión inmune y es predecible para el desarrollo de SIDA, pero poco es sabido acerca del pronóstico de la candidiasis eritematosa (36).

El tipo de infección seudomembranosa en VIH es asociada con una significativa depresión de la inmunidad mediada por medio de linfocitos CD4⁺. La respuesta linfocitaria se encuentra disminuida en pacientes con candidiasis bucal comparada con aquellos pacientes que tienen mucosa bucal sana (ambas, la candidiasis seudomembranosa y eritematosa están asociadas a inmunodepresión). A diferencia de la candidiasis pseudomembranosa, la candidiasis eritematosa es usualmente sintomática y fácil de observar (36).

Para ambos tipos de candidiasis bucal, se sabe que la gravedad de su pronóstico está relacionado con el bajo conteo de CD4⁺ y a la decreciente respuesta mitógena (36).

El sistema inmune humano contiene múltiples componentes (leucocitos, macrófagos, células de Langerhans) que proveen protección en contra de infección por *Candida* en individuos sanos. Los macrófagos participan tanto en la respuesta inmune humoral, como en la celular y actúan tratando de eliminar al patógeno del torrente sanguíneo y de los tejidos (37).

Existen reportes recientes de que el tratamiento profiláctico con antibióticos para enfermedades sistémicas puede ocasionar el desarrollo de candidiasis. La desaparición de las manifestaciones clínicas no significa que la infección micótica haya sido controlada, principalmente en personas con defectos inmunes graves (19).

5.1. LESIONES BUCALES ASOCIADAS CON LA INFECCIÓN POR

VIH

INFECCIONES MICOTICAS

- Candidiasis

Pseudomembranosa

Eritematosa

Hiperplásica

Quelitis angular

INFECCIONES VIRALES

Causadas por:

- Virus Herpes simple

- Citomegalovirus

- Virus Epstein-Barr

Leucoplasia vellosa

- Virus Varicela Zoster

- Herpes zoster

- Varicela

- Papilomavirus humano

Verruga vulgar

Condiloma

Hiperplasia epitelial focal

INFECCIONES BACTERIANAS

- Gingivitis necrozante asociada a VIH

- Gingivitis asociada a VIH

- Periodontitis asociada a VIH

- Actinomicosis

- Sinusitis

- Exacerbación de periodontitis apical

- Celulitis submandibular

NEOPLASIAS

- Sarcoma de Kaposi
- Ca. de células escamosas
- Linfoma No-Hodgkin

DISTURBIOS NEUROLÓGICOS

- Neuropatía del trigemino
- Parálisis facial

CAUSA DESCONOCIDA

- Ulceración de aftas recurrentes
- Ulceración necrozante progresiva
- Trombocitopenia idiopática
- Agrandamiento de glándula salival
- Xerostomía
- Hiperpigmentación melanótica (35).

5.2. MANIFESTACIONES BUCALES DE LA INFECCIÓN POR VIH

MÁS FRECUENTES

- Candidiasis
- Gingivitis asociada a VIH
- Parodontitis asociada a VIH
- Sarcoma de Kaposi
- Leucoplasia vellosa
- Herpes simple
- Herpes zoster
- Tuberculosis (24).

5.3. MANIFESTACIONES BUCALES DE LA INFECCIÓN POR VIH

MENOS FRECUENTES

- Faringitis
- Linfomas
- Carcinoma de células escamosas
- Reticulosis polimórfica
- Aftas
- Estomatitis gangrenosa
- Hiperpigmentación bucal
- Quelitis exfoliativa
- Púrpura bucal (43).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La difícil erradicación de las candidiasis bucales en personas con SIDA obliga a realizar estudios, que determinen la existencia de cambios de adaptación en la Pc (pared celular) y Mc (membrana celular), en la dinámica del crecimiento, la localización del citoesqueleto o la posición de organelos lo que pudiese indicar cambios en el fenotipo. Dichas variaciones pueden ser el resultado de cambios en la temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes que permiten o no que *Candida* se desarrolle con mayor facilidad en los pacientes seropositivos en comparación con pacientes seronegativos a VIH.

7. JUSTIFICACIÓN.

Los hongos por lo general no inducen enfermedad, pero pueden causarla en personas con algún tipo de inmunosupresión. *Candida* forma parte de la microflora bucal en condiciones normales, si se da un desequilibrio en la microflora (como sucede en pacientes seropositivos a VIH), éste se vuelve un patógeno oportunista al modificarse sus condiciones de crecimiento, reflejándose en cambios morfológicos y ultraestructurales de la Pc y Mc, dichos cambios también pueden estar directamente involucrados con las actividades metabólicas del hongo *Candida* lo que pudiese permitir el desarrollo de cepas resistentes a antimicóticos como se está dando en la actualidad.

Por lo expuesto anteriormente consideramos importante el investigar para conocer si es que sufre alguna alteración, cambio de adaptación en la pared celular y/o la membrana citoplasmática de *Candida* en pacientes seropositivos en comparación con pacientes seronegativos a VIH, ya que obtendríamos más información acerca del comportamiento de ésta levadura que nos ayudaría a buscar mejores alternativas para su tratamiento y/o prevención de la candidiasis bucal.

8. HIPÓTESIS.

Las variaciones que existen en los factores del medio ambiente bucal y de la economía que influyen en el desarrollo de *C. albicans* entre un paciente seronegativo y un paciente seropositivo a VIH provocan modificaciones en la Pc y Mc.

Los cambios en la Pc y Mc de *C. albicans* aislada de personas seropositivas a VIH las hace más agresivas en su comportamiento clínico y biológico.

9. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la existencia de cambios en la Pc y Mc de *C. albicans* aislada de pacientes seropositivos a través de microscopía electrónica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Comparar Pc y Mc de *C. albicans* aislada de pacientes seropositivos y pacientes seronegativos a VIH.
- 2.- Determinar si existen cambios en la Pc y Mc de *C. albicans* aisladas de sujetos seropositivos a VIH.
- 3.- Relacionar los cambios ultraestructurales con cambios morfológicos.
- 4.- Correlacionar los cambios ultraestructurales con los aspectos de cultivo (tipo de crecimiento, colonia y requerimientos nutricionales).

III. MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

30 Cepas de sujetos seropositivos a VIH

4 Cepas de sujetos seronegativos a VIH

EQUIPO

- Balanza granataria (Ohaus)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Microscopio electrónico (Zeiss)
- Fotomicroscopio electrónico (Zeiss)
- Refrigerador (Bendix)
- Gradillas
- Mechero
- Escarchadora (Scopsman)
- Moldes para inclusión
- Malla de asbesto
- Autoclave
- Incubadora bacteriológica de calor seco (Blue M)
- Ultracentrífuga (Zeiss)

VARIOS

- Algodón
- Navajas
- Botes con tapa rosca de plástico de 50 y 100 ml
- Puntas azules para micropipetas
- Abatelenguas
- Cinta testigo
- Papel estraza
- Masquintape
- Plumones y marcadores
- Gasa
- Parafilm
- Guantes
- Cubrebocas
- Bolígrafos
- Película para microscopía electrónica (Kodak electron microscope film 4489)
- Papel aluminio
- Papel F3

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Biggy
- Agar nutritivo
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Caldo Dextrosa Sabouraud

Estos medios de cultivo se preparan según las indicaciones del fabricante.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Agua destilada
- Paraformaldehido
- NaOH
- Glutaraldehido al 3%
- Cacodilato
- Alcohol al 50, 70, 80, 95 y 100%
- Oxido de propileno
- Ac. Tánico
- Tetraóxido de osmio
- Ferrocianuro de potasio
- Resina epóxica polibet
- Acetato de uranilo
- Tolueno

- Cloroformo
- Citrato de plomo
- Metanol
- Acido clorhídrico

RECURSOS FINANCIEROS

Todos los materiales y reactivos anteriormente mencionados fueron proporcionados por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM. Excepto el equipo y reactivos para la microscopía electrónica y toma de fotografías de dicha técnica, fue proporcionado por la Unidad de Investigación Médica en Patología Experimental del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

PROCEDIMIENTO

TOMA DE MUESTRAS

Para tomar las muestras se utilizaron:

- abatelenguas estériles
- medios de cultivo de Agar Biggy en placa y agar dextrosa Sabouraud en tubo inclinado.
- marcadores
- tubos de ensaye con glutaraldehído al 3%

Con el abatelenguas se raspó la zona, con la misma toma se sembraron en los medios de cultivo, se deposita en glutaraldehído al 3% para fijar la muestra, se etiquetaron los medios de cultivo y el tubo de ensaye con el fin de llevar un control de las muestras e identificarlas posteriormente.

Los medios de cultivo se incubaron en la estufa durante 24 hrs a 37° C, al termino se observó el desarrollo de las colonias, tipo de colonias, se hicieron frotis y se tiñeron con tinción de GRAM y PAS. Las cepas posteriormente fueron purificadas en el medio de caldo dextrosa Sabouraud adicionado con acido clorhídrico para posteriormente resembrarlas e identificarlas.

Para conservarlas y evitar su deshidratación se colocaron en refrigeración.

Las muestras de individuos seronegativos fueron tomadas de pacientes que fueron atendidos en la Clínica de Patología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Las muestras de individuos seropositivos fueron tomadas de pacientes que son atendidos en el Departamento de Infectología, pabellón 405, del Hospital General de México.

FIJACIÓN

PREPARACIÓN DE FIJADOR KARNOUSKY

Este fijador es de alta osmolaridad para microscopía electrónica (44).

Preparación: 2mg. de polvo de paraformaldehído, este se disuelve en 25 ml. de agua calentándose a una temperatura de 60 a 70°C. Una o tres gotas de NaOH(pH) son agregadas para que se integren bien los componentes, y el líquido no esté turbio. Se afora rectificando los 25ml.

A la solución ya fría, se le agregan 5 ml. de glutaraldehído al 50% y el volumen se debe aforar a 50ml. preparando antes 0.2 ml. de cacodilato Buffer a un pH de 7.4.

Con esto se fijaron las muestras.

FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se colocó 1.5 ml de fijador Karnousky (prefijación) con una micropipeta automática en un microtubo de plástico de polipropileno para centrifugar, verificando que la muestra quede en el fondo ya que es fácilmente suspendible.

Después de 1 h a 4°C en fijador, se retira, se coloca el buffer en que se preparó el fijador y se dieron dos baños en éste para después colocar el tetraóxido de osmio (solución A: O_5O_4 al 2% en agua destilada. Solución B: O_5O_4 al 2% en agua destilada + ferrocianuro al 3% en partes iguales. Postfijación). La solución B se preparó al final (porque el tetraóxido de osmio se reduce y no tiene el mismo poder de penetración), dejándose la muestra 1 h a temperatura ambiente. Cabe mencionar que entre cada cambio de líquido se centrifugó la muestra.

Posteriormente se retiró el tetraóxido y se realizaron 3 lavados de 2 min. cada uno en agua destilada, seguido de la tinción en block con acetato de uranilo al 1% durante 1 h a temperatura ambiente en la obscuridad, para lo cual se forra el microtubo con papel aluminio y se coloca en un cuarto oscuro.

El siguiente paso fue la deshidratación con alcoholes a diferentes grados (50, 70, 80, 96 y 100%) lavando las muestras durante 10 minutos en cada alcohol. Después dependiendo de la resina utilizada se utiliza el óxido de propileno o el tolueno, retirando el último alcohol absoluto y sustituyéndolo por cualquiera de las sustancias mencionadas durante 30 minutos 2 veces, el óxido de propileno que es el que comúnmente se utiliza es un líquido volátil y explosivo. El siguiente paso es la inclusión para lo cual se requiere colocar la resina en diferentes

proporciones:(según se muestra en la tabla 1), relación óxido de propileno y Polibet 2 a 1 durante 1 hora, 1 a 1 durante 1 hora y 1 a 2 toda la noche. Este último cambio de resina y óxido se retira, para realizar la inclusión en resina sola, colocandose ahora en cápsulas para inclusión y a una temperatura de 60°C durante toda una noche para su polimerización.

Los aldehídos fijan todo desde los fosfolípidos de la membrana y pared celular. El tetraóxido de osmio fija y tiñe. La microscopía electrónica se basa en el principio de la luz y los colores, para la transmisión de sombras. Los electrones pasan a través de los tejidos y al utilizar metales pesados estos retienen a los electrones, pudiendo observar la sombra de las estructuras, ya que los electrones no atraviesan los tejidos. En este caso hablamos de muy, menos o nada electrodenso. El metal pesado utilizado es el tetraóxido de osmio al 1% y para darle mayor realce se le agrega 1.5% de Ferrocianuro de potasio, lo que hace que los tejidos con él teñidos sean más electrodensos.

Se realizaron cortes para ME en el ultramicrotomo (el bloque de tejido avanza aproximadamente de 40 a 80 nm entre cada movimiento de corte) con cuchilla de diamante. Los cortes flotan en agua situada detrás del borde de la cuchilla y son montados en rejillas de cobre para cortes finos, y para las fases (cortes semifinos) se montan en portaobjetos (las rejillas de cobre permiten el paso de electrones). Estas rejillas se revisten con Formvar (película de sostén delgada de plástico) o carbón, de modo que la rejilla sostiene la película y la película, a su vez, sostiene el tejido.

Los cortes finos fueron teñidos con acetato de uranilo e hidróxido de plomo (metales pesados) en tanto que los cortes semifinos con Paragon (azúl de toludina y fuscina básica).

Obteniendose mayor contraste en las imágenes en blanco y negro, en la pantalla fluorescente o en la película fotográfica.

Para posteriormente ser observados al ME y ser tomadas las microfotografías electrónicas.

UNIDADES DE MEDIDA . Las unidades utilizadas en la actualidad para ME atacan estrictamente el sistema métrico. El micrómetro (μm) es 0.001 de milímetro. El nanómetro (nm) cuya raíz es la palabra griega nanos, enano es 0.001 de μm (y en consecuencia, una millonésima de milímetro). También se encontrará el nombre de unidad de Angstrom (A°) equivalente a 0.1 nm, en consecuencia $1\text{nm} = 10\text{A}^\circ$.

GROSOR DE CORTE. Una consideración importante para interpretar las micrografías electrónicas gira sobre el hecho de que los cortes utilizados para ME (60 a 80 nm) son mucho más delgados que los empleados para microscopía de luz (5 a 8 μm), en consecuencia, suelen llamarse cortes ultradelgados.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se estudiaron muestras de *Candida* de 34 pacientes (100%), de los cuales, 30 correspondían a pacientes seropositivos a VIH (88.2%) y 4 (11.7%) eran seronegativos.

De las 4 muestras de personas seronegativas, 3 eran del sexo femenino y uno del sexo masculino, entre la 4a. y la 5a. década de la vida. Las lesiones se encontraban localizadas 3 en paladar y la otra en la lengua, dos correspondieron a Candidiasis pseudomembranosa y las otras dos a Candidiasis eritematosa. Tres de los pacientes eran portadores de prótesis total, todos ellos se encontraban en buenas condiciones de salud y no estaban recibiendo ningún tipo de tratamiento médico en el momento de la toma de la muestra.

Dentro de las 30 muestras obtenidas de pacientes seropositivos a VIH (100%), 10 eran de tipo hiperplásico (33.3%), 3 eritematosas (10%), y 17 del tipo pseudomembranoso (56.6%). Dichas muestras se tomaron de los siguientes sitios: 18 de la lengua (60%), 8 en mucosa de carrillos (26.6%), 3 de paladar duro (10%) y 1 de orofarínge (3%). Se observó una prevalencia en la 3a. y 4a. década de la vida (25 casos, 83.3%), 4 casos se presentaron en la 5a. década de la vida y uno en la 6a. década. El sexo masculino fue más afectado con 23 casos (76.6%), y 7 casos fueron del sexo femenino. (23.4%).

Veintinueve de los casos contrajeron el virus del SIDA por contacto sexual (97%), sólo un caso (3%) fue por transfusión sanguínea.

Todos los pacientes a los que se les tomó muestra se encontraban en el estadio IV de la enfermedad del SIDA. Además, ninguno de ellos había tomado algún antimicótico anteriormente, pero estaban bajo tratamiento sistémico con AZT o Bactrim al momento del muestreo.

Se realizaron 34 frotis, los cuales se tiñeron con técnica de Gram. Sólo 8 laminillas se consideraron por ser las más representativas, de las cuales 6 eran de pacientes seropositivos y 2 de seronegativos.

Los frotis de pacientes seronegativos presentaban hifas, algunas levaduras en gemación y levaduras con formación de una pseudohifa.

Los frotis de pacientes seropositivos mostraban una característica invasión de bacterias, la disposición de las bacterias es en forma de cocos y diplococos, hay presencia de bacilos entremezclados con pseudohifas y micelios. Se observan pseudomicelios tabicados.

En las muestras observadas en los medios de cultivo de pacientes con SIDA, las colonias de *C. albicans* se desarrollaron de forma abundante en Agar dextrosa Sabouraud, las colonias fueron de color blanco mate, de bordes bien definidos, de consistencia cremosa, en tanto que en el medio de Agar Biggy, las colonias fueron lisas, hemisféricas o circulares, de color café oscuro, con crecimiento en forma de domo y centro deprimido, de bordes bien definidos, pero que mostraban crecimiento micelial tanto aéreo como vegetativo, observándose en este último un entrecruzamiento de los micelios. Estas colonias se desarrollaban antes de 24 hrs de haberse cultivado (fig.9).

En las muestras in vitro de pacientes seronegativos, las colonias se desarrollaron de forma aislada, no formaban agrupaciones, eran de tamaño pequeño, de bordes bien definidos y no mostraban crecimiento micelial aéreo. Dichas colonias se desarrollaron entre las 24 y 72 horas de haberse cultivado, aproximadamente la mayoría fué apartir de las 36 horas.

HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES

En las observaciones con microscopía electrónica no existe gemación múltiple, habiendo una clara gemación con estrangulación una vez concluída ésta, hay acúmulos de material nuclear, sólo hay una capa de pared celular, el material electrodensó se concentra en la periferia en forma de capa y la capa más externa es osmiofílica (fig.15).

Las fotografías tomadas con microscopía electrónica de muestras in vivo de pacientes seropositivos, revelaron la presencia de gemación múltiple y con tamaño variable de las gemas resultantes, hay presencia de cicatriz en la gemación.

También se observó distribución del material genético en forma difusa, desarrollo de hifas tabicadas y no tabicadas, así como depósitos de material amorfo alrededor de *C. albicans* en diferentes formas y material electrodensó. Las células epiteliales presentaron cambios citolíticos con levaduras adheridas a ellas y algunos pseudomicelios y micelios que atravesaban las uniones intercelulares. También se observaron otros microorganismos como: streptomyces, diplococos y cocos.

En las muestras in vivo de pacientes seronegativos con microscopía electrónica, fueron escasos los procesos de estrangulamiento y la formación de un tabique que separa a la célula hija.

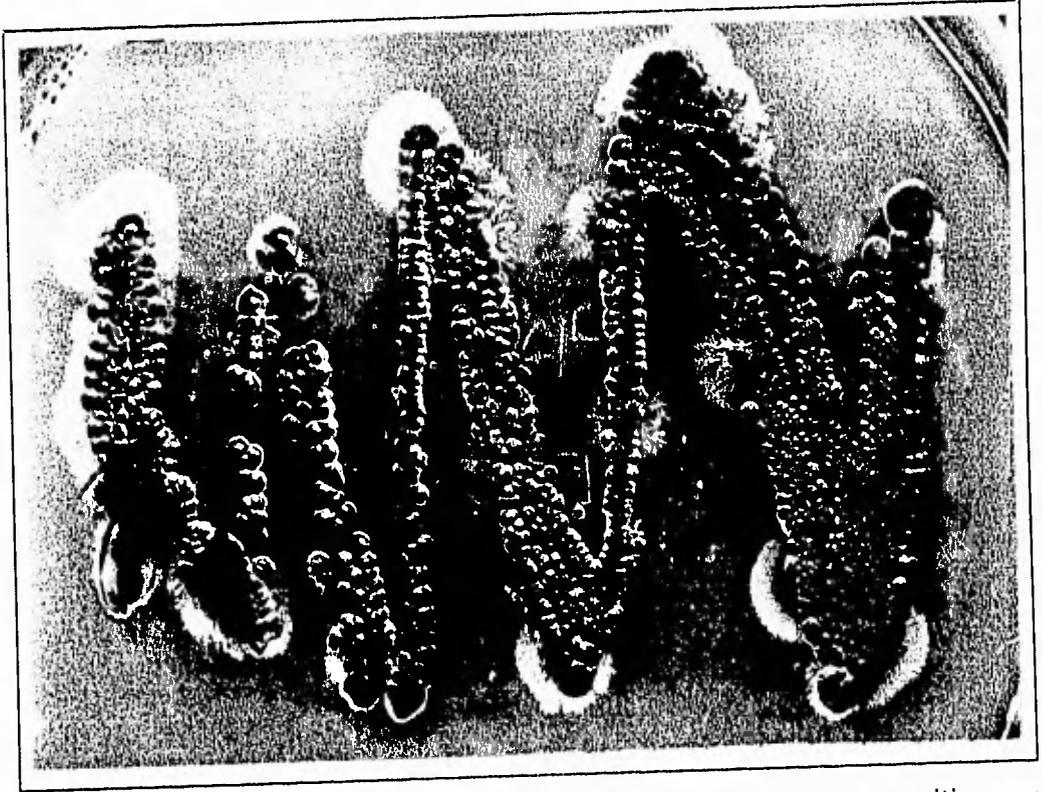


Fig.9. Vista superficial de las colonias de *Candida* de pacientes seropositivos en Agar Biggy, en la cual se observa un crecimiento en forma de domo con centro umbilicado, de color café oscuro, con crecimiento de formas miceliales tanto del tipo reproductivo como nutritivo.

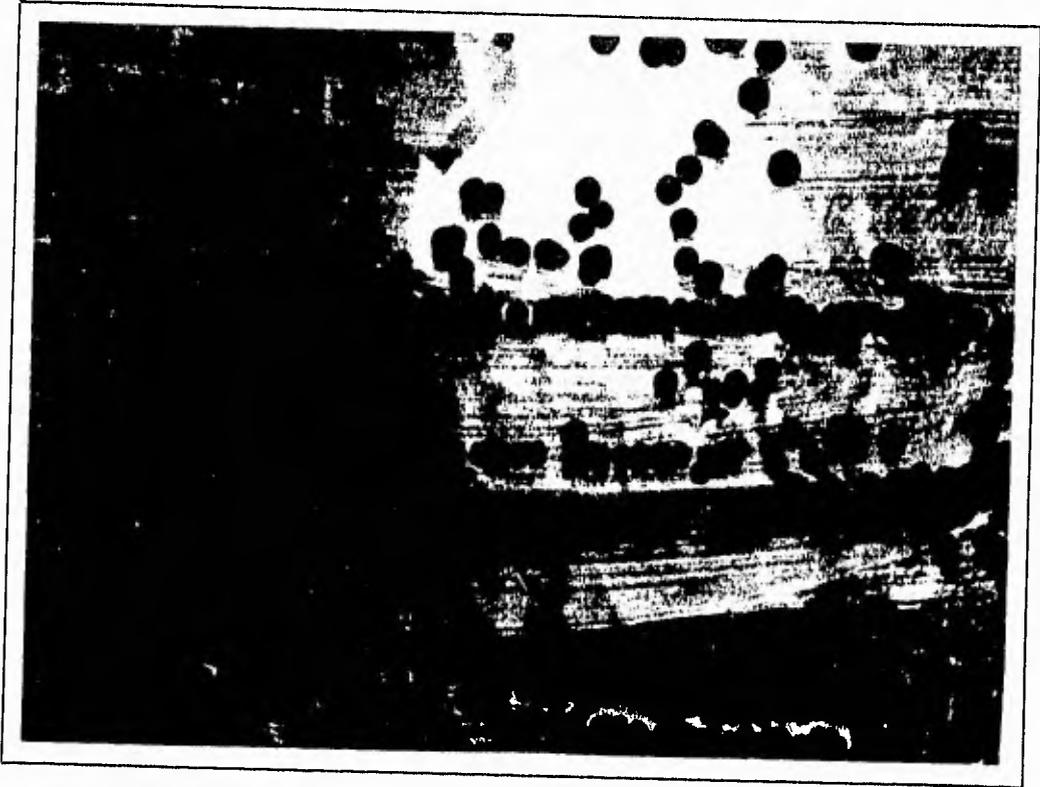


Fig.10. Vista superficial de las colonias de *Candida* de pacientes seronegativos en Agar Biggy. Se observa menor desarrollo de las colonias, sin presencia de micelios vegetativos.

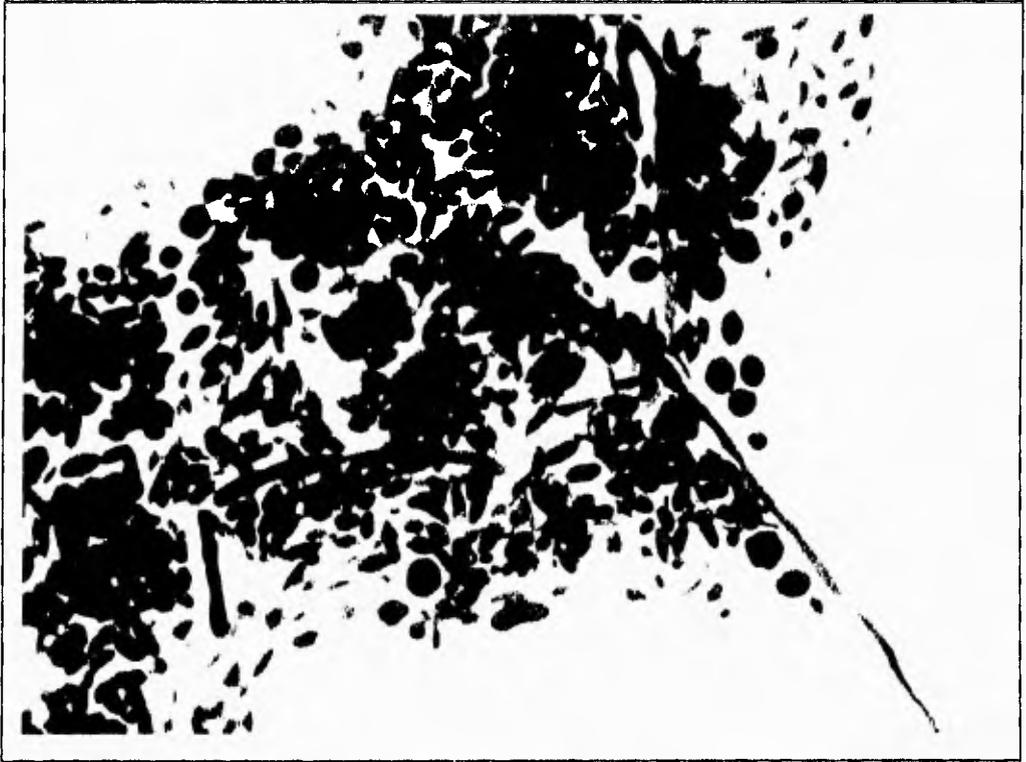


Fig.11. Frotis de un paciente seropositivo teñida con técnica de Gram, en el que se observan levaduras agrupadas, pseudohifas tabicadas de gran tamaño y la presencia de bacilos.a un aumento de 100x.

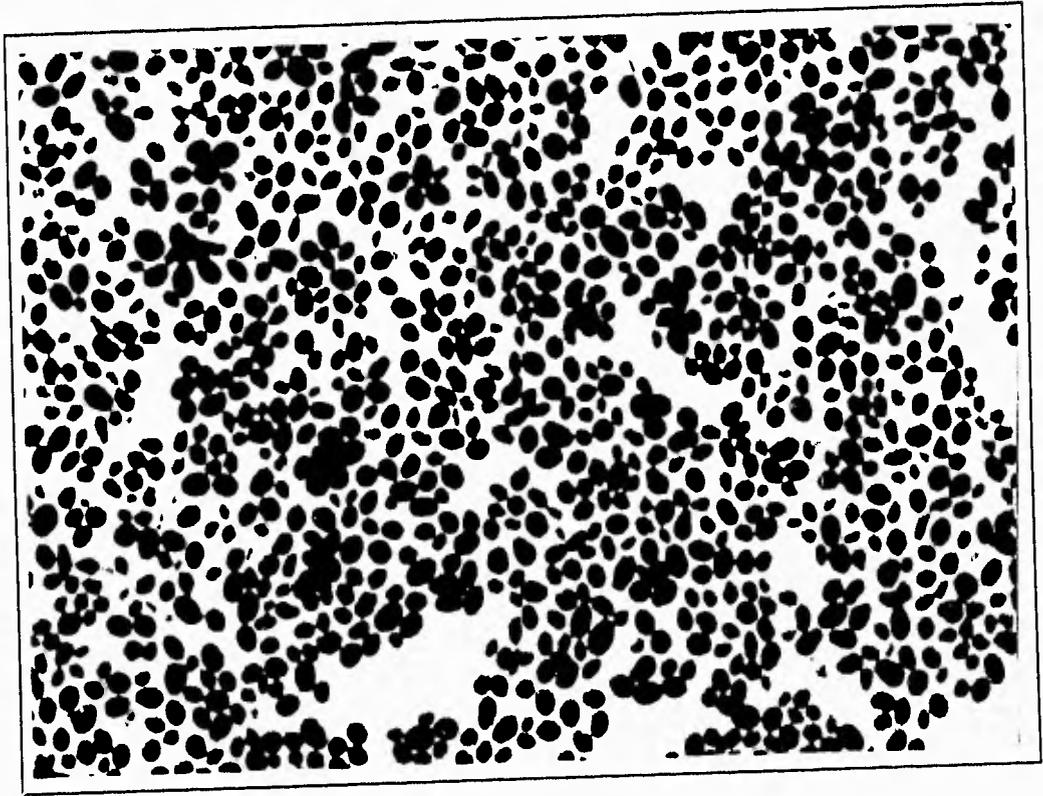


Fig.12. Frotis de un paciente seronegativo teñido con técnica de Gram, en la que se puede ver levaduras de forma redonda u ovalada en gemación. Observación a 100x.

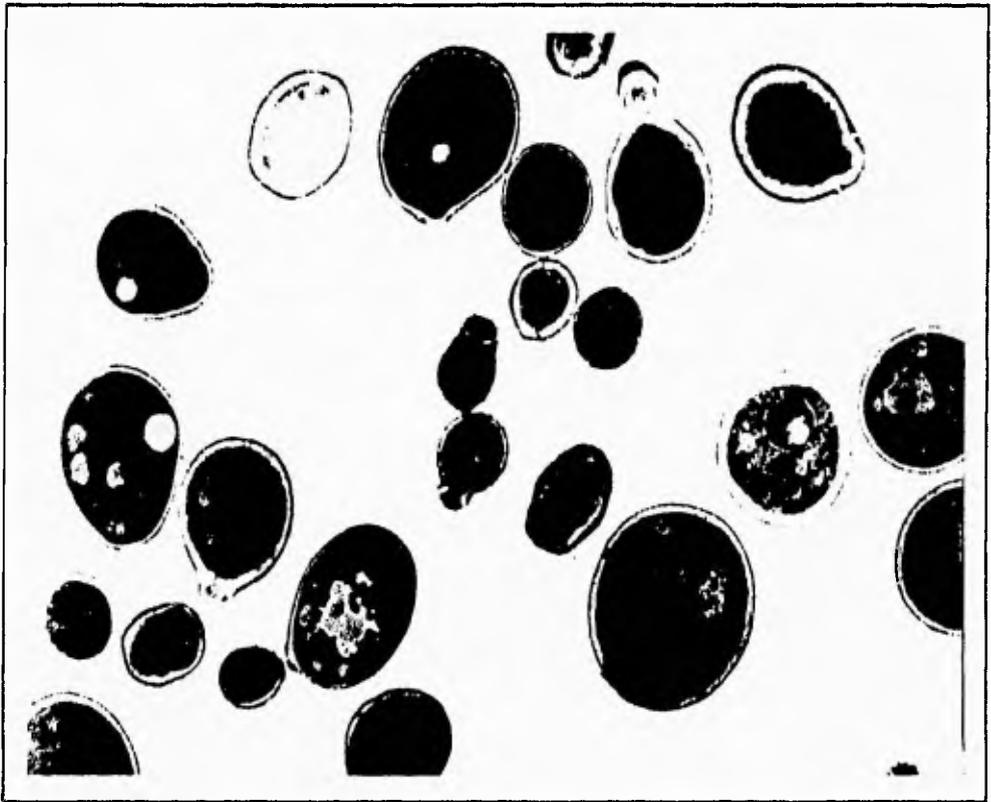


Fig. 13. Microfotografía en la cual se observa *Candida* in vitro. El material nuclear se encuentra agrupado, en el proceso de división existe la formación de un penacho y la separación de la gema hija de menor tamaño que la célula madre dejando una cicatriz al separarse (posiblemente por efecto de corte). La pared se observa multilaminar.

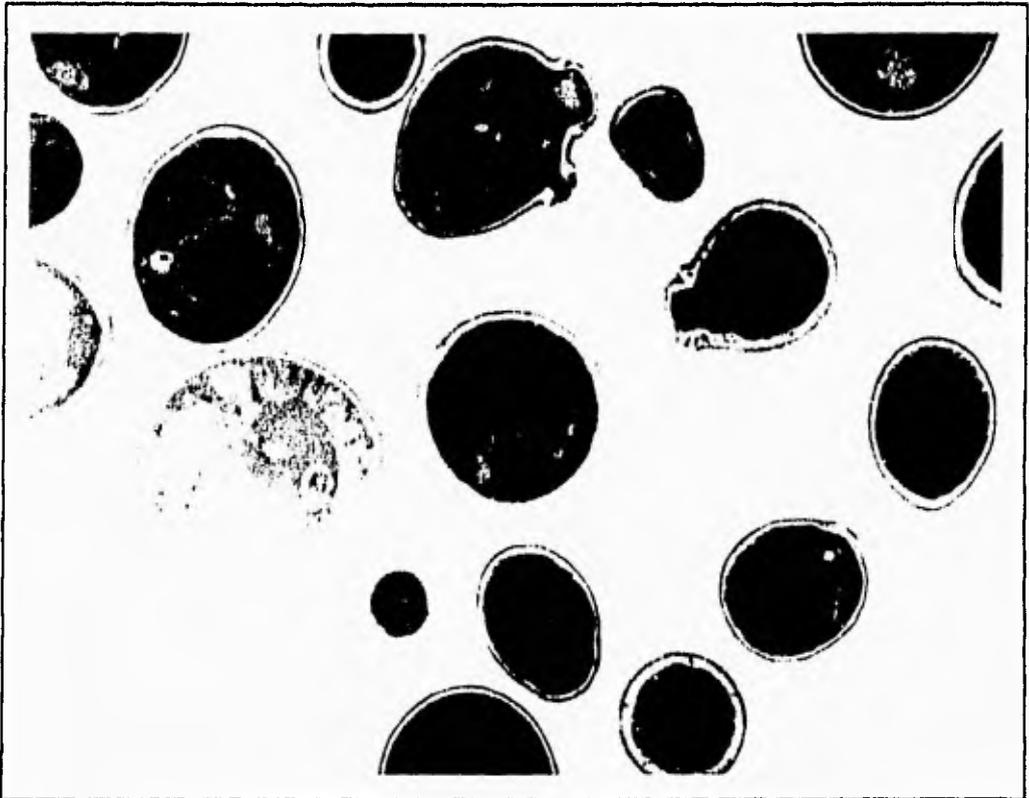


Fig. 14. Microfotografía de *Candida* in vitro. La capa más externa es osmiofílica, se encuentra condensación de material electrodensó en la periferia en forma de capa y existen acúmulos de material nuclear.



Fig. 15. Microfotografía de *Candida* in vivo. Se observa depósitos de material amorfo alrededor de *Candida* en sus diferentes formas, no hay presencia de cicatriz en la gemación, la distribución del material genético es en forma difusa y hay laminación múltiple de la pared celular.



Fig. 16. Microfotografía de *Candida* in vivo. Se puede apreciar la célula de *Candida* y alrededor de ella una célula epitelial. La pared celular es osmiofílica., encontramos cocos, diplococos y bacilos entre las células de *Candida*. y se observa división celular.

V. DISCUSIÓN

Este estudio comprendió el análisis de cepas de *C. albicans* de pacientes con y sin SIDA, desde el punto de vista morfológico y ultraestructural.

Comparamos los organismos obtenidos en medios de cultivo de dichos pacientes y observamos que: las colonias de *C. albicans* tomadas de pacientes seropositivos a VIH se desarrollaban en menos de 24 hrs. (esto es debido a que la toma de las muestras se llevaba a cabo de las 9:00 a 13:00 hrs., los cultivos se introducían a la estufa alrededor de las 14:00 hrs. y a las 8:00 hrs. del día siguiente se sacaban de la estufa para su observación), cultivados en medios de agar dextrosa Sabouraud y agar Biggy. Las colonias de pacientes seronegativos a VIH, en comparación con las cepas de pacientes con SIDA, se desarrollaron entre 24 y 72 horas, lo cual nos habla de una diferencia metabólica.

Es importante hacer notar que las características de las colonias obtenidas de los pacientes seropositivos a VIH mostraban un crecimiento micelial tanto del tipo aéreo (superficial o de reproducción) como vegetativo (profundo o de nutrición), lo cual no se presenta en pacientes seronegativos, lo que confirma que tienen un sistema metabólico más activo, estos cambios son debidos principalmente a los cambios en el pH, en la disminución de IgAs y alteraciones en el equilibrio de la microflora bucal (18). Además, el crecimiento de las colonias se desarrolló en forma agrupada, en cambio las de pacientes seronegativos se desarrollaron en forma aislada y eran de menor tamaño, al menos estos hallazgos no se encuentran reportados en la literatura, datos importantes que pueden permitir entender el comportamiento in vivo de *Candida* en pacientes con SIDA. Esto puede significar que las cepas obtenidas de pacientes con SIDA, por su misma patogenicidad, muestran en su membrana citoplásmica un sistema enzimático más activo que las cepas obtenidas de pacientes sin SIDA, este podría explicarse también por la

actividad de la pared celular en la formación del seudomicelio en tubo germinal (18) situación que se presenta in vivo en los pacientes con SIDA.

Las observaciones realizadas en los frotis (obtenidos in vitro), revelaron que dichas muestras de pacientes seronegativos estaban constituidas por levaduras y pseudohifas, así como también se encontraron algunos hongos filamentosos (Actynomicetos).

En cambio, en los frotis de pacientes seropositivos se encontró invasión de bacterias, presencia de bacilos entremezclados con las hifas y micelios, colonias en forma de cocos o diplococos y micelios tabicados (hongos filamentosos), lo que permite establecer que el paciente con SIDA es el habitat adecuado para el desarrollo de cualquier microorganismo.

Así también comparamos los microorganismos de estos dos grupos clínicos al hacer el estudio de microscopía electrónica lo cual nos llevó a observar ciertas diferencias tales como el engrosamiento de la pared celular por la multilaminación de la misma, la cual por reportes se establece que la pared celular de *C. albicans* en el tubo germinal se encuentra constituido por 5 láminas (18), existe depósito de material amorfo electrodenso en la superficie externa alrededor de *Candida* en sus diferentes formas, encontramos además diferencias en la distribución de material genético, formas anormales y múltiples en la gemación así como alteraciones en el tamaño de las gemas resultantes y falta de cicatriz de la levadura madre. También se observan hifas tabicadas y no tabicadas. Todos estos cambios descritos son de muestras in vivo obtenidas de los pacientes con SIDA lo que demuestra que *C. albicans* tiene un comportamiento más agresivo debido a las alteraciones en los factores ambientales que afectan el crecimiento. Dichos factores son inducidos por la inmunodeficiencia que presentan los pacientes, aunados a que las fuentes de nitrógeno y carbono pueden ser proporcionados por el propio hospedero (6).

Los hallazgos obtenidos de los medios de cultivo (in vitro), permite observar que no existen gemaciones múltiples, pero hay una clara gemación con estrangulación una vez concluida esta. En cambio in vivo no se observa el proceso de estrangulación, sino la formación de un tabique que separa a la gema hija, la formación de cicatrices en el lugar del desprendimiento de la gema.

Las muestras in vivo de pacientes seronegativos estudiadas a través de microscopía electrónica nos muestran que no existe gemación múltiple, sólo hay una capa de pared celular, existe una condensación de material electrodensó en la periferia en forma de capa, la capa más externa es osmeofílica y existen acumulos de material nuclear.

En la literatura no se encontró estudios que respaldaran las anteriores observaciones en microscopía electrónica, por lo que es importante profundizar en este estudio.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Las variaciones que existen en los factores del medio ambiente bucal entre un paciente seropositivo y un paciente seronegativo a VIH, influyen en el desarrollo de *C. albicans*.
- 2.- Se observaron cambios morfológicos y ultraestructurales en la pared celular como el incremento en el número de láminas, y la membrana celular presentó un engrosamiento, también hay cambios en el contenido intracelular y división celular de las muestras de pacientes seropositivos a VIH en estudios con microscopía electrónica.
- 3.- En cultivos y frotis se observaron cambios morfológicos en el crecimiento de las cepas de pacientes seropositivos en comparación con las de seronegativos.
- 4.- Los cambios morfológicos y ultraestructurales que sufre *C. albicans*, nos sugieren que ésta puede ser más agresiva en su comportamiento biológico y clínico.
- 5.- Los cambios que sufre la levadura nos indican un intento de ésta por adaptarse al medio ambiente en que se encuentra y que le es más propicio para su desarrollo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burnett G.W., Scherp H.W, Schuster G.S. Manual de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de la Boca.De.- Ciencia y Tecnología S.A. México. 1990;737-750.
- 2.- Junqueira L.C. Carneiro J. Histología básica. Tercera edición. De.- Salvat. 1989.
- 3.- Jawetz Ernest, Joseph, Melnick, Adelberg Edward A. Microbiología Médica. Doceava edición. Ed.-El manual moderno S.A. de C.V. México;1987:339.
- 4.- Herrera Teófilo.Reino de los hongos. Primera edición. De.- Fondo de Cultura Económica. UNAM. México, 1991.
- 5.- Franker Colin P.H. Oral Mycology and Immunology. 1990;23:325-335.
- 6.- Cotran,Kuman,Robbins. Patología Estructural y Funcional. Cuarta edición. De.- Interamericana Mc Graw Hill. 1990.
- 7.- Mardon D., Balish E., Phillips A. Control of Dimorphism in a Biochemical Variant of *Candida albicans*. Journal of Bacteriology. 1969;2:701-707. Vol. 100.
- 8.- Gil M.L., Casanova M., Martínez J.P., and Sentandreu R. Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. Journal of General Microbiology. 1991;137:1053-1061.
- 9.- Ponton J., Jones J.M. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blot techniques. Infection and Immunity. 1986;53:565-572.
- 10.- Sandin R.L., Rogers A.L., Patterson J.R., Beneke E.S. Evidence for Mannose-Mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. Infection and Immunity. 1982;45:79-85.

- 11.- González Figueroa. Cameros Figueroa. Microbiología Bucal. Segunda edición. Ed.- Mendez. México, 1993:183-189.
- 12.- DIFCO. Technical Information. Detection and Identification of *Candida albicans*.
- 13.- Sundstrom P.M., Kenny G.E. Enzymatic release of germ tube-specific antigens from cell walls of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 1985;49:609-614.
- 14.- Kai-Li R., Cutler J.E. A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 1991;137:455-464.
- 15.- Brawner D.L., Cutler J.E. Variability in expression of cell surface antigens of *Candida albicans* during morphogenesis. *Infection and Immunity*. 1986;51:337-343.
- 16.- Wills J.W., Lasker B.A., Sirotkin K., and Riggsby W.S. Repetitive DNA of *Candida albicans*: Nuclear and mitochondrial components. *Journal of Bacteriology*. 1984;157:918-924.
- 17.- Nolte William A. Microbiología Odontológica. Cuarta edición. Ed.-Interamericana. México D.F.;1985:549-568.
- 18.- Hopwood V.; Poulain D., Fortier B., Evans G., and Vernes A. A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 1986;54:222-227.
- 19.- Fukazawa Y., Takako Shinoda and Tsuchiya T. Response and Specificity of antibodies for *Candida albicans*. *J Bacte*. 1968; 95:754-763.
- 20.- Klotz S.A., Drutz D.J., Harrison J.L., Huppert M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infection and Immunity*. 1983: 374-384.
- 21.- Burrows Williams, Freeman Bob. Microbiología. Primera edición. De.- Interamericana. México D.F. 1986.

22.- Ahonen P., Myllarniemi S., Sipila I. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal-dystrophy in a series of 68 patients. *N. Engl. J. Med.* 1990;322:1829-36.

23.- Wood Norman, Goaz Paul. *Diferential diagnosis of oral lesions*. Cuarta edición. Mosby Year book. 1991, USA:203.

24.- Scully Crispian, Laskaris George, Porter R. Stephen. Oral manifestations of HIV infection and their management. I. More common lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 1991;71:158-66.

25.- Pindborg. *Atlas of diseases of the oral mucosa*. Quinta edición. Copenhagen. 1994. p. 56-62.

26.- Reichl Robert. *Oral Candidiasis: An old disease of growing concern*. General Dentistry. 1990.

27.- Crockett David N., O'Grady John F., Reade C. Peter. *Candida species and Candida albicans morphotypes in erythematous candidiasis*. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 1992;73:559-63.

28.- Fotos G. Pete, Hellstein W. Johon. *Oral candidiosis revisited*. *General Dentistry*. 1991;nov:422-429.

29.- Van der Waal, Van der Kwast. *Oral pathology*. Quintessence Publishing Co. Chicago Illinois. 1988:17-19.

30.- Shafer William, Levy Barnet M. *Tratado de Patología Bucal*. Tercera edición. Interamericana. México D.F. 1982:357-360.

31.- Engelbert A. J., M. Schulten, Snijders Peter. *Oral hairy leucoplakia in HIV infection: A diagnostic pitfall*. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 1991;71:32-7.

32.- *The medical letter, on drugs and therapeutics*. 1993;35:79-86.

-
- 33.- Scully C., Porter S.R., Luker J. An ABC of oral health care in patients with HIV infection. *British dental Journal*. 1991;23:149-150.
- 34.- AIDS Update. *British dental Journal*. 1989;23:110.
- 35.- Pindborg J. Jeans. Classification of oral lesions associated with HIV infection. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 1989;67:292-5.
- 36.- Nielsen H. Bensten K.D., Højtved L., Willemoes E.H., Scheuts F. Oral Candidiasis and immune status of HIV-infected patients. *J. Oral Path Med*. 1994;23:140-3.
- 37.- Maordi L., Korchak H.M. and Johnston R.B. Mechanism of host defense against *Candida* species. *J Immun*. 1991;8:2783-9.
- 38.- Kelley William N. *Medicina Interna*. Ed.-Panamericana. Buenos Aires, Argentina;1990:605,1739-1740,19225-1926,19229-1936. Vol.-I,II.
- 39.- Sande M.A., Volberding P.A. *Manejo Médico del SIDA*. Segunda edición. Ed.-Interamericana. México D.F.;1992:23-35.
- 40.- Isselbacher Kurt J., Braunwald Eugene. *Principios de Medicina Interna*. Onceava edición. Ed.-Interamericana. México D.F.;1989:2207,908-909,1700-1704 Vol.-I,II.
- 41.- SIDA: Un problema de salud universal. *Simposio*. 1987:35-55.
- 42.- Lobos Nelson, Freyre James. *Sida y Odontología*. Avances Madrid. 1992:90.
- 43.- Scully Crispian, Laskaris George, Porter R. Stephen. Oral Manifestations of HIV infection and their management. II. Less common lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 1991;71:167-71.
- 44.- Karnousky, J.M. *Journal Cell Biology*. 1965;27:137A.