



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PATRONES DE SENSIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida*
AISLADAS DE LESIONES BUCALES EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS VIH/SIDA DEL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Pedro Alberto López Reynoso

Volvo Santa Ponce Bravo

TUTORA:

Dra. Santa Ponce Bravo

ASESORES:

MC Infectólogo. Rodolfo Vick Fragoso
Servicio de Infectología Hospital General "Manuel Gea
González"

E.B.C. Jesús Reséndiz Sánchez
Laboratorio de Micología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Infectólogo Pediatra . José Juan Morales Aguirre
CLINDI Hospital Infantil Federico Gómez
C.D Israel Morales Sánchez

MÉXICO D.F

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO 2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Señor gracias por dejarme conocer cada día tu grandeza y poder descubrir que junto a ti no existen límites.

A JESUCRISTO

A mi amigo incondicional que me escucha y me guía. En este momento y siempre gracias Jesús.

A la Universidad Nacional Autónoma de México "LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS"

A mi Universidad que ha dejado compartir sus conocimientos, aulas, recintos, profesores, trabajadores para que sean parte de mi formación no solo profesional sino personal. Por darme el gusto, el orgullo y satisfacción de llevar con responsabilidad y respeto el sobrenombre que me distingue como universitario que es ser *PUMA* de corazón azul y de piel dorada.

A la Dra. Santa Ponce Bravo

Gracias por compartir su amistad y conocimiento. Por la confianza y apoyo en el desarrollo de este trabajo y de permitirme el gusto de trabajar para usted lo cual ha sido una parte importante en mi formación profesional, que apenas inicia.

Al Q.F.B Jesús Reséndiz Sánchez

Por compartir su conocimiento, tiempo, experiencia y su indudable profesionalismo en todo momento, para el desarrollo de este trabajo. Por su amistad de lo cual he aprendido a ser más responsable, profesional y que así de esta manera se puede lograr cosas de excelencia. Gracias Jesús *el dominador del MICO*.

Al Dr. Rodolfo Vick Fragoso

Por transmitir sus conocimientos sobre VIH ya que esto fue parte importante para la conjunción y termino de este trabajo.

Al Dr. José Juan Morales

Por su valiosa ayuda en la captura de datos de los pacientes del Hospital Infantil.

Al Dr. Israel Morales Sánchez

Por la ayuda en la elaboración de este trabajo.

Al la Dra. Bernal y personal de laboratorio de parasitología y micología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Por todas las facilidades para el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi Papá

Por creer en mí en todo momento y ofrecerme todo su apoyo de forma incondicional. Por que gracias a tu ejemplo que demuestras día a día y a tu alegría de vivir he podido culminar con este paso en mi preparación profesional. *! Lo hemos logrado!*

A mi Mamá

Gracias por darme la vida. Y que tu esfuerzo por estar siempre pendiente de mí empieza a dar frutos. Estoy orgulloso de ti. *¡Te quiero mamá!*

A mis hermanas

Gracias Vanessa por creer en mí y apoyarme, por dejarme compartir cosas que nos agradan (arriba *el America*). Espero que muy pronto también culminen tus objetivos. Y sabes que siempre cuentas conmigo.

A Susanita por la alegría que nos das todos los días gracias por tu apoyo.

A ti Gisela

T e agradezco por cada minuto empleado y pensado en mí, cada momento de alegría y angustia, cada instante de triunfo y derrota. No sé que hubiera hecho todo este tiempo sin tu apoyo que ha sido totalmente incondicional. Solo resta decir que te *AMO* y que sigas adelante todavía mucho que hacer.

Al C.C.H SUR

Gracias por que en ti me encontré y descubrí a la vez.

A la Facultad de Odontología

A ti *alma mater* que me abrió sus puertas y así poder ser uno de los privilegiados en formarme en sus recintos.

A mis pacientes

A todos ellos que depositaron su confianza en mí y que sin esta parte importante me hubiera sido imposible aprender la práctica odontológica. Espero no haber fallado.
Muchas Gracias

A mi abuelita Soledad y a mis tíos Irene, Juan, Ricardo, Eva, Gabriel, Andrea, Ana, Benjamín, Jesús Fernández, Lupe Fernández, Roció, Sandra, Mónica, Jesús Mendoza y Guadalupe Mendoza

Gracias por su apoyo y por todos los momentos agradables que hemos compartido. Han sido un ejemplo para mí. *¡Los quiero mucho!*

A mi abuelita Graciela y a mis tíos Héctor, Georgina y Jesús

A ustedes que me han dado todo de sí y que siempre han creído en mí. *¡Los quiero mucho!*

A mis primos Rodrigo, Aura, Nicolás, Mariana, Rosa, Paco, Mayra, Melissa, Juan José, Rosa Mendoza, Zayra, Paola, Andrea, Monserrat, Gabriela, Lalo, Javier Sánchez y Ricardo

A cada uno de ustedes gracias por que han sido parte importante para llegar a esta etapa de mi vida.

A Raúl, Tere, Fabiola, Raulito y Javier

Gracias por todo el apoyo brindado y tengan por seguro que todos sus consejos han tenido un efecto positivo en mí. *¡Los admira Pedro!*

A Vicky, Lalo y Vickita

Muchas gracias por permitirme compartir algo de su vida y dejarme convivir con Vickita quien me ha hecho sonreír y quitar el stress en momentos de gran presión.

A MI PARK-Q 1993-? (Ale, Carlos, Luis, Boss, Beto, Hugo, Aurelio, Cesar, Rene, Juan, Paco, Rodrigo y Rubén)

Ustedes son parte importante de este paso. Por todo lo pasado y lo que viene **GRACIAS**.

A mis amigos Mario, Nancy, Rodolfo(bobo), Jessica, Cintia, David, Fernando, Ricardo, Nitzia, Erika y Adrianita.06

A ustedes con quienes he compartido alegrías y tristezas y que siempre me han acompañado por esto y más **GRACIAS**.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| II. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1 CANDIDOSIS BUCAL | 5 |
| 2.1.1 HISTORIA DE LA CANDIDOSIS BUCAL | 5 |
| 2.1.1.2 TAXONOMÍA DE CANDIDA | 5 |
| 2.1.1.3 BIOLOGÍA DEL GÉNERO CANDIDA | 7 |
| 2.1.1.4 MORFOGÉNESIS DE <i>C. albicans</i> | 7 |
| 2.1.1.5 SISTEMAS DE CAMBIOS (SWITCHING) EN <i>Candida albicans</i> | 9 |
| 2.1.1.6 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL GÉNERO CANDIDA | 9 |
| 2.1.2 PATOGENIA DEL GÉNERO CANDIDA | 11 |
| 2.1.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE ESPECIES DE CANDIDA | 11 |
| 2.1.2.2 INTERACCIONES DE LA SALIVA Y CANDIDA | 15 |
| 2.1.2.3 SUBSTANCIAS INHIBITORIAS EN SALIVA | 16 |
| 2.1.3. RESPUESTA INMUNE DE LA MUCOSA CONTRA EL GÉNERO CANDIDA | 17 |
| 2.1.3.1 SISTEMA SECRETOR INMUNE | 17 |
| 2.1.3.2 MECANISMOS INMUNES NO ESPECÍFICOS CONTRA INFECCIONES DE CANDIDA EN HUMANOS | 21 |
| 2.1.3.3 INMUNIDAD ESPECÍFICA EN INFECCIONES POR CANDIDA | 22 |
| 2.1.4 FACTORES PREDISPONENTES DE LA CANDIDOSIS BUCAL | 25 |
| 2.1.5 SÍNTOMAS | 31 |
| 2.1.6 PRESENTACIÓN CLÍNICA: TIPOS DE CANDIDOSIS BUCAL | 31 |
| 2.1.6.1 CANDIDOSIS SEUDOMEMBRANOSA AGUDA | 32 |
| 2.1.6.2 CANDIDOSIS ATROFICA AGUDA | 33 |
| 2.1.6.3 CANDIDOSIS ATROFICA CRÓNICA | 34 |
| 2.1.6.4 QUEILITIS ANGULAR O PERLECHE | 35 |
| 2.1.6.5 CANDIDOSIS HIPERPLÁSICA CRÓNICA O LEUCOPLASIA CANDIDÓSICA | 36 |
| 2.1.6.6 GLOSSITIS ROMBOIDEA MEDIA | 37 |
| 2.1.6.7 CANDIDOSIS MUCOCUTÁNEA | 38 |
| 2.1.7 HISTOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN DE CANDIDOSIS BUCAL | 38 |
| 2.2 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, TIPIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA CANDIDOSIS BUCAL | 40 |
| 2.2.1 EXAMEN DIRECTO | 40 |
| 2.2.2 CULTIVOS | 40 |
| 2.2.3 TIPIFICACIÓN | 42 |
| 2.2.3.1 CULTIVOS | 42 |
| 2.2.3.2 FILAMENTACIÓN EN SUERO | 43 |
| 2.2.3.3 PRODUCCIÓN DE SEUDOMICELIO Y CLAMIDOCONIDIA | 44 |
| 2.2.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS | 45 |
| 2.2.3.5 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICOTICA AL GÉNERO CANDIDA | 50 |
| 2.3.-ANTIMICÓTICOS | 55 |
| 2.3.1.HISTORIA DE LOS ANTIMICÓTICOS | 55 |
| 2.3.2 POLIÉNICOS | 56 |
| 2.3.3 ANFOTERICINA B | 58 |
| 2.3.4 NISTATINA | 62 |
| 2.3.5 IMIDAZOLES Y TRIAZOLES | 64 |
| 2.3.5.1 KETOCONAZOL | 66 |
| 2.3.5.2 MICONAZOL | 68 |
| 2.3.5.3 FLUCONAZOL | 70 |
| 2.3.5.4 ITRACONAZOL | 72 |
| 2.3.5.5 CLOTRIMAZOL | 73 |
| 2.3.5.6 ECONAZOL | 74 |
| 2.3.6 FLUCITOSINA | 75 |
| 2.3.7 NUEVOS AGENTES ANTIMICÓTICOS | 76 |
| 2.3.7.1EQUINOCANDINAS, PNEUMOCANDINAS Y PAPULOCANDINAS | 77 |
| 2.3.7.2 POLIOXINAS Y NICOMICINAS | 78 |
| 2.3.7.3 PRADAMICINAS Y BENANOMYCINAS | 78 |
| 2.3.7.4 NUEVAS TERAPIAS ANTIMICÓTICAS | 79 |
| 2.3.7.5 ANTIMICÓTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS BUCAL | 80 |
| 2.3.7.6 GUIA PRACTICA DEL TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS BUCAL | 83 |

| | |
|--|------------|
| 2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICOTICOS DEL GÉNERO CÁNDIDA | 85 |
| 2.5. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA | 97 |
| 2.5.1 ETIOLOGÍA | 97 |
| 2.5.2 EPIDEMIOLOGIA | 98 |
| 2.5.3 PATOGENIA E HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD | 99 |
| 2.5.3.1 REPLICACIÓN VIRAL Y DESTRUCCIÓN LINFOCITARIA | 99 |
| 2.5.3.2 HISTORIA NATURAL | 101 |
| 2.5.3.3 MANIFESTACIONES CLINICAS | 103 |
| 2.5.3.4 TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL | 104 |
| 2.6 MANIFESTACIONES BUCALES DE VIH DEN PACIENTES PEDIÁTRICOS | 104 |
| 2.6.1 REPORTE DE TRATAMIENTO ANTIMICOTICO Y RESISTENCIA DE CANDIDOSIS BUCAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS VIH/SIDA | 108 |
| 2.7 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PACIENTES PEDIATRICOS | 112 |
| 2.7.1 TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA LLA | 113 |
| A) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 114 |
| B) JUSTIFICACIÓN | 114 |
| C) HIPÓTESIS | 115 |
| D) OBJETIVOS | 115 |
| III. MATERIAL Y MÉTODO | 116 |
| IV. ANALISIS DE RESULTADOS | 138 |
| V. DISCUSIÓN | 162 |
| VI. CONCLUSIÓN | 169 |
| VII. ANEXOS | 171 |
| VII. REFERENCIAS | 172 |

PATRONES DE SENSIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE LESIONES BUCALES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS VIH/SIDA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar las especies del género *Candida* aisladas de lesiones bucales en pacientes pediátricos VIH/SIDA, así como también establecer la susceptibilidad de estas especies a los antimicóticos. Para realizarlo se tomaron muestras de 10 niños VIH/SIDA con candidosis bucal, 10 niños VIH-negativos inmunodeprimidos con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) portadores de candidosis bucal que acudieron al Hospital Infantil "Federico Gómez" y de 10 niños VIH-negativos sin candidosis bucal (microbiota normal) de la Clínica de Admisión de la FO UNAM. Se tomaron las muestras raspando la lesión, examen directo con KOH, siembra en Sabouraud placa (primo aislamiento), purificación de la cepa, se montó pruebas de clamidoconidias y tubo germinativo, se determinaron las especies por API ID 32 (Biomeriux), se aplicó la prueba de sensibilidad a 6 antimicóticos (5-Fluorocitosina, Anfotericina B, Nistatina, Miconazol, Econazol y Ketoconazol) con Fungus ATB. Los resultados de susceptibilidad son expresados en: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Sensible (S), Sensible Intermedia (SI) y Resistente ®. De los niños VIH/SIDA con edades de 1 mes a 9 años se obtuvieron 8 cepas de *C. albicans*, 1 cepa de *C. tropicalis* y 1 cepa de *Geotrichum capitatum*. De las cepas de *C. albicans*, dos cepas fueron resistentes a 5 fluorocitosina, otras 2 cepas a los azoles, en tanto 3 cepas presentaron SI a los azoles. Otra cepa fue R a nistatina y sensible a todos los demás, mientras que otra fue R a miconazol con SI a econazol y ketoconazol. Todas las cepas de *C. albicans* fueron sensibles a anfotericina B por lo que este antimicótico es el ideal para las candidosis difíciles de erradicar. En los niños con LLA se encontraron 9 cepas de *C. albicans* todas sensibles 5 fluorocitosina y anfotericina B, 3 cepas Rs a miconazol y 4 con SI a los azoles. Además de *C. albicans* se aisló de los niños con LLA una cepa de *C. parapsilopsis* sensible a todos los antimicóticos. En tanto que en los niños sanos se obtuvieron 10 cepas de *C. albicans* y de estas se encontraron 2 cepas Rs a los azoles, una a la nistatina, 7 con SI a los azoles y una R a 5 fluorocitosina.

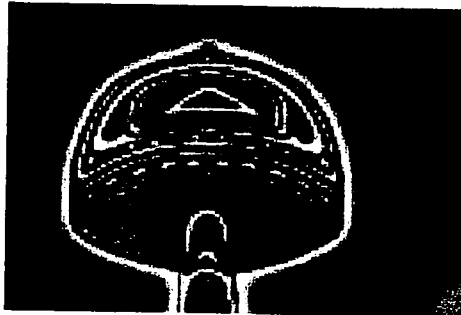


I. INTRODUCCIÓN

TESIS CON

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
ORIGEN





I. INTRODUCCIÓN

La candidosis bucal es relativamente común para nuestro conocimiento pero incompletamente entendida como una infección micótica oportunista. La presencia de *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, no indican infección para el organismo o la certeza de una subsecuente enfermedad. Sin embargo la candidosis bucal podría ser vista como un marco clínico que indica la presencia de enfermedades que marca su importancia.

Cuando analizamos esta patología en el contexto clínico es muy importante, la candidosis se da a consecuencia de un desorden en el organismo específicamente en patologías inmunitarias cobra una mayor importancia, debido a que esta infección oportunista pueda ocasionar un daño importante al organismo, como lo serían problemas en la alimentación (candidosis bucal, esofágica), problemas pulmonares, fungemias etc, que comprometen aun más importancia la salud general del paciente inclusive causar la muerte.

La candidosis bucal a tomado un repunte como enfermedad oportunista que acompaña frecuentemente a las patologías con afección al sistema inmune, principalmente a la enfermedad producida por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH). Debido a que este disminuye paulatinamente la capacidad de defensa del organismo, la levadura aprovecha estas condiciones para reproducirse y pasar de un simple comensal bucal a un agente patógeno oportunista. Por tal motivo en algunas



de las ocasiones a los pacientes se les administra un antimicótico para combatir esta infección, o simplemente se elimina atacando la enfermedad de base es decir emplear medicamentos antiretrovirales que repercutirán en la respuesta inmunológica por tanto, de esta manera eliminado el factor y sobre todo un ambiente propicio para el desarrollo del hongo.

Es importante mencionar que cuando los paciente portadores del VIH o que ya desarrollaron el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y que al haber sido tratados con terapia antiretroviral, el organismo no responde al tratamiento que por consecuencia el sistema inmunológico no se recupere(Linfocitos CD⁴).Así como también aquellos pacientes que no tienen posibilidades de adquirir los medicamentos. En estos casos la candidosis toma una importancia, debido a que en estas condiciones la infección será más recurrente.

En estos pacientes el método para erradicar la infección oportunista es el empleo de antimicóticos. Por lo cual la cotidianidad con la que se usan propician un empleo irracional en algunas ocasiones, lo que ha traído como consecuencia cepas resistentes a diferentes antimicóticos que se emplean comúnmente y que han sido básicos para tratamiento de esta micosis como lo son el ketoconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B, nistatina, miconazol así como otros.

De tal manera que al analizar el comportamiento de *Candida* como oportunista en cavidad bucal y sobretodo en las condiciones antes mencionadas en relación con los pacientes VIH/SIDA y completando en resistencia a los antimicóticos, ha sido complicado atacar esta micosis,



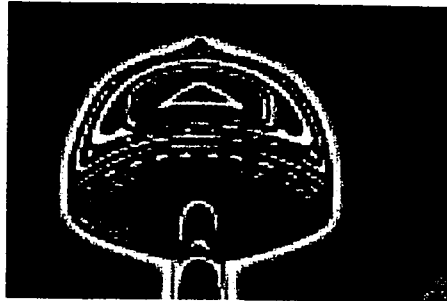
cerrando parcialmente las alternativas del paciente para controlar esta patología.

El objetivo de este estudio es conocer los factores que propicia la resistencia de estas cepas, ya sea el uso inadecuado de los antimicóticos o la levadura actúa de forma diferente en condiciones de compromiso inmunológico, o ambas razones coadyuvan en el comportamiento de *Candida*, por lo tanto la desaparición de la lesión se complica.

Es importante entender los factores de resistencia del microorganismo, para tener un uso racional de medicamentos antimicóticos, así como mejores alternativas para su tratamiento.



II. ANTECEDENTES





II. ANTECEDENTES

2.1 CANDIDOSIS BUCAL

2.1.1 HISTORIA DE LA CANDIDOSIS BUCAL

La candidosis bucal ha sido reconocida como una entidad clínica desde el tiempo de Hipócrates, quienes describieron la candidosis bucal en asociación con una severa enfermedad en el tratado de Epidemia, el cual fue publicado en el siglo IV A.C. La primera investigación fundada en la candidosis bucal fue en 1786 cuando la Real Sociedad de Medicina de Francia escribió una investigación sobre la pseudomembrana.

En 1839 Langenbeck describe un organismo consistente con *Candida albicans* el cual cultivo de la mucosa bucal de un paciente con tifo, Desafortunadamente, el sugirió que el microorganismo era el causante del tifo. En 1846 Berg fue el primer investigador para adecuadamente describir la relación entre *Candida albicans* y la enfermedad.³⁷

2.1.1.2 TAXONOMIA DE CANDIDA

La taxonomía y clasificación de *Candida albicans* permaneció sujeta a un gran debate por varias décadas como un resultado de diferente forma morfológica en el microorganismo.



En 1887 Audrey fue el primero en descubrir ambas formas morfológicas siendo el mismo microorganismo con 2 diferentes que dependen en el crecimiento ambiental. Esto no fue hasta que en 1923 que sin embargo Berkhout clarifico la taxonomia del microorganismo y separa esta especie del género *Monilia* los cuales fueron asociados con fruta podrida y levaduras. Ella propuso el nombre de *Candida* del latín *Toga Candida*, el cual se refiere al manto viejo de los candidatos para el senado romano. El nombre de la especie *albicans* también proviene del latín *albicare* que significa lo blanco. El Index Medicus no ha sido reconocido para el genero *Monilia* o el termino Moniliasis en referencia a la enfermedad humana desde 1981.

En 1849 Wilkinson describió la candidosis vaginal, sin embargo esto no fue útil hasta 1875 en que Haussman demostró que el organismo causante en ambas bucal y vaginal es la misma.

Zenker es reconocido como el primero en reportar candidiasis sistémica en 1862. Otras formas de *Candida* empiezan a ser descritas entre el siglo XIX y XX.

El género *Candida* incluye un variado número de especies, pero solamente algunas de ellas pueden ser oportunistas, sobresaliendo *C. albicans*, la que dependiendo de la topografía de donde se aisle, puede encontrar entre un 60 hasta un 80%.

La clasificación de *Candida* es la siguiente:

CLASE: *Deuteromycetes*

SUBCLASE: *Blastomycetidia*

ORDEN: *Criptococal*

FAMILIA: *Criptocacea*

GÉNERO: *Candida*

Al menos 20 géneros y cerca de 90 especies de levaduras han sido aislados del humano y siendo clasificados. Doce especies de *Candida* son conocidas



por ser patógenas, especialmente en personas inmunodeprimidas: *Candida albicans*, *C. guilleurmoundi*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. viswanathii*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. glabrata*. Los primeros de estas especies fueron descritos y clasificados por Castellini en el género *Monilia*, lo cual agrega confusión en mención a la taxonomía de estos microorganismos que persisten en nuestros días. De hecho Barnett et al ha reportado 166 sinónimos para *C. albicans*. Con excepción del pelo, estas especies han sido reportadas por infectar cada tejido humano. Cerca de una docena de otras 12 especies de *Candida* ha sido descritos en enfermedades humanas.^{37, 8}

2.1.1.3 BIOLOGÍA DEL GENERO CANDIDA

Candida crece en un medio definido que consiste en una fuente de sales, carbón (glucosa), nitrógeno (sales de amonio) y fosfato y requiere biotina. El organismo crece en un rango de temperatura de 20-40 °C y sobre un rango de pH de 2-8.⁵¹

En una variedad de cultivos *Candida* puede producir cantidades predominantes de acetato, relativamente poco de piruvato, propionico. Además fermenta glucosa, galactosa y maltosa con la formación de ácido y dióxido de carbono.⁵²

2.1.1.4 MORFOGÉNESIS DE *C. albicans*

Candida albicans exhibe un número diferente de formas morfológicas debajo de distintas condiciones ambientales incluyendo los brotes de levaduras (



blastoconidias) pseudomicelio(células levaduriformes elongadas que aparecen con filamentos en cadenas celulares), así como clamidiconideas. A temperaturas entre 33°C, las células crecen favorablemente. Estas células ovoides entre (3 x 5 μm) y la formación del brote ocurre preferentemente en la región polar de la célula distal y se forma una cicatriz. A elevadas temperaturas y pH neutral, el crecimiento pseudomicelial es favorable y la conversión de célula levaduriforme a pseudomicelio ocurre por una vía de tubo germinal. Las morfogénesis de pseudomicelio requieren 1) células levaduriformes en un estado de nutrientes correcto 2) presencia de un inductor 3) elevada temperatura 4) pH neutral.⁵⁸

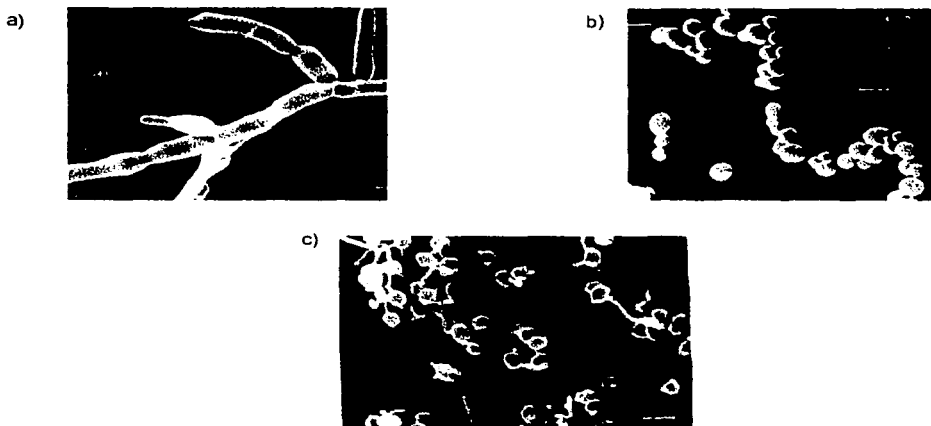


FIG.1 Diferentes formas morfológicas del género *Candida*. a) forma de pseudomicelio b) blastoconidias (forma levaduriforme) c) células de *Candida* formando tubo germinativo. Tomado de libro Oral Candidosis de Samanarayake⁵³ 1990 pag 12.



2.1.1.5 SISTEMAS DE CAMBIOS (SWITCHING) EN *Candida albicans*

La alta frecuencia y reversibilidad de el switching, el distintivo de los fenotipos en los dos sistemas de switching, las diferencias del desarrollo en la formación de seudomicelio y las diferencias de sensibilidad a los antimicóticos, sugieren que los sistemas switching tienen un rol en la patogénesis. El mecanismo de patogenia en *Candida* pudiera ser potenciado por los mecanismo switching incluida la capacidad para 1) invadir y proliferar en extremo en diferentes medios del cuerpo, 2) eludir el sistema inmune por alteraciones en la superficie antigénica y 3) escape al tratamiento. Además el switching podría selectivamente realzar la capacidad de adhesión a la mucosa bucal, penetración de tejidos y enzimas como las fosfolipasas y proteinasas.⁶⁰

2.1.1.6 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL GENERO *CANDIDA*

La pared celular esta compuesta por β -glucanos, manoproteinas y pequeñas cantidades de quitina, que componen prácticamente el 30% del peso seco de la levadura. El mayor componente son los carbohidratos (80-90%), lípidos (2%) y proteínas (3-6%).⁵³

Los niveles totales de lípidos, esteroides y fosfolípidos según Goyal los cuales fueron encontrados en forma significativa en la forma seudomicelial de *Candida albicans* que en la forma levaduriforme. Incrementado los niveles de fosfolípidos en la forma seudomicelial fueron hallados en alta cantidad la fosfatidilcolina, fosfatidilserina y el fosfatidilinositol. El análisis ácido graso en su composición revela altos niveles de ácido mirístico en la forma



levaduriforme, resultando en altos niveles de lípidos saturados que en la forma pseudomicelial. Los resultados del estudio demuestran que la levadura y pseudomicelio de *C. albicans* difieren en su composición de fosfolípidos y ácidos grasos y que los cambios en la composición lipídica son acompañados por cambios en funciones de estructura y sus propiedades. Se describe que la forma micelial fue encontrada más susceptible a los fármacos nistatina, anfotericina B y miconazol, lo cual puede ser posible a los altos niveles de fosfolípidos insaturados de ácidos grasos y esteroides.²⁴

Por su parte Herrera describió la organización de los componentes de la pared celular de *Candida albicans* la cual fue tratada por medio de tratamientos químicos como el anhídrido de etilendiamina y enzimas líticas lo que concluyó que dentro de la pared existen distintas distribuciones de manoproteínas, quitinas y glicina.³⁰

Los lípidos constituyen alrededor de 55% del peso de *Candida albicans*, donde los esteroides y los fosfolípidos de 1-2% y 1.1% respectivamente. Los fosfolípidos fueron mayormente localizado en la fracción microsomal; la fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina(PC), fosfatidiletalonaamina(PE)y fosfatidilinositol (PI) fueron la mayoría de los fosfolípidos.⁴¹



Capa fibrilar
Manoproteína

B-Glucano
B-Glucano quitina
Manoproteína
Membrana plasmática

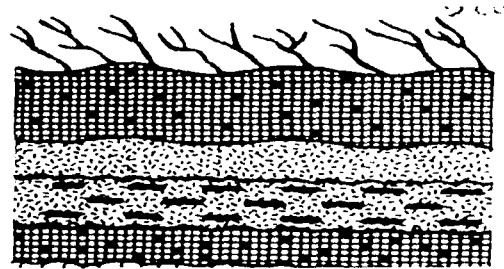


FIG.2 Arquitectura de la pared celular de *Candida*.
Tomado de libro Oral Candidosis de Samanarayake 1990⁵³
pag 15.

2.1.2 PATOGENIA DEL GENERO CANDIDA

2.1.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE ESPECIES DE CANDIDA

Proteinasas

Entre los factores potenciales de virulencia, la secreción de proteinasas de *Candida* ha sido clasificada como aspartato proteinasas, estando relacionada la pepsina, renina y catepsina D. Estas ha sido indetificadas de aislamientos de *C.albicans* y *C.tropicalis* en varios grados. Existe amplia evidencia de



proteolisis por estas especies durante la infección en humanos. El papel de las proteínas fungicas como factor de virulencia es soportado por la evidencia de la alta citotoxicidad para monocitos humanos.

Entre las proteínas en saliva, lactoferrina, lactoperoxidasa y mucina son degradadas como las inmunoglobulinas secretadas. Estas requieren 37°C y pH bajo.⁵³

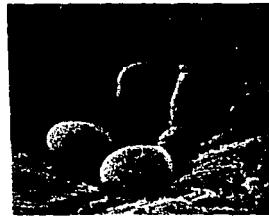


FIG.3 Proyección de micrografía electrónica de la germinación de *Candida albicans*, invadiendo el epitelio bucal no queratinizado humano, 2 horas después de la infección en la muestra del tejido con blastoconidias. Subsecuentemente la reacción inmune demuestra que el hongo expresa la proteinasa antigénica. Tomado del libro Oral Candidosis de Samanarayake 1990 ⁵³ pag.53

Lipasas

La actividad lipolítica de las especies de *Candida* han sido reconocidas. El efecto de estas enzimas se le puede asociar a la adherencia al epitelio bucal.⁵³

“*Candida* es el agente etiológico de la candidosis bucal. La adhesión a las superficies de la mucosa bucal es considerada un prerrequisito para una satisfactoria colonización y una subsecuente infección, y esto es relativo a la



hidrofobicidad de la superficie celular(CSH) y esto contribuye a una fuerza física. Para determinar la adhesión Ellepola hizo 10 aislamientos del hongo, en el cual las puso diferentes concentraciones de antifungicos y correlaciono estos hallazgos con su adhesión a las células epiteliales bucales. El porcentaje promedio de reducción de hidrofobicidad de la superficie celular después de la exposición de nistatina, 5- fluorocitosina, ketoconazol y fluconazol fueron 27.14%, 9.46%, 19.47% y 6.16%".¹⁷

Los factores de virulencia en la patogenicidad de *C.albicans* podrían incluir la imitación molecular de estructuras mamíferas *C.albicans* y *C.stellatoidea*, en contraste con otras especies de *Candida*, expresa un análogo CR3 integrina que puede jugar un papel en su adhesión de endotelio y epitelio. Las células epiteliales secretan al menos dos enlaces principales para *Candida* uno es para inactivar C3b y otra es la fibronectina. Ambos de estos ligandos contienen Arg-Gly-Asp secuenciados para enlazar a CR3.⁴³

Uno de los factores de patogenia de *Candida* es la invasión al epitelio Berhardt demostró comparando la adherencia de un mutante con señal transductora de *C.albicans* (*skkl*) para la monocapa de células esofágicas humanas en línea (HETI-A), con una cepa de origen y con su gen reconstituido. La *skkl* mutante no pudo formar seudomicelio en medio de agar de laboratorio estandarizado y fue avirulenta en un modelo de candidosis.⁶

Candida albicans expresa varios factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis. Estos factores incluyen reconocimiento de biomoléculas del hospedero (adhesinas), morfogénesis (la reversible transición entre levaduras y formas seudomiceliales), secretan aspartil proteasas y



fosfolipasas. Además el fenotipo de switching (cambio de levadura a pseudomicelio) es acompañado por cambios en expresión de antígenos, morfología colonial y afinidad tisular en *C.albicans* . El switching podría promover células con una flexibilidad que resulta en la adaptación de el organismo para las hostiles condiciones no solo impuestas por el hospedero sino también por el medicamento tratante de la infección.

Otros mecanismos incluyen percepción de células en la mucosa destruida dentro del interior de los tejidos, han sido observada también como inductor de fagocitosis por los tejidos. Estos mecanismo podrían tener relación en la invasión de las mucosas.¹²

Especies de *Candida* ahora suman arriba de 50% de las candidosis profundas, todavía no se le ha dado la atención que ha estado pagando la virulencia atribuida a estos hongos. La adherencia a los tejidos del huésped, respuesta a los cambios del ambiente y la secreción de hidrolasas, todo esto puede ser importante en la virulencia de estas especies.

La adherencia es a veces citada como el primer paso del proceso infeccioso por miembros del genero *Candida* y varias interacciones específicas entre estos hongos y otros organismos, dispositivos médicos y del hospedero han sido descritos. Por ejemplo, *C.dublinskiensis* esta coagregado con una bacteria oral *Fusobacterium nucleatum*, y *C.tropicalis* ha demostrado interactuar con *Streptococcus gordonii* y esto pudiera facilitar la sobrevivencia en la comunidad mixta bucal. Además las especies de *Candida* pueden formar biopelículas en las superficies de dispositivos médicos particularmente catéteres, resultando en el incremento de resistencia a los fármacos antifungicos. De las especies que forman biopelículas son *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* y *Candida kefyr*.²⁸



Otros factores de virulencia

Se han mencionado toxinas que no han sido identificadas plenamente. Así como metabolitos producidos por *Candida*, tales como cadenas cortas de ácido carboxílico. Esto quiere decir que este género tiene un marcado potencial ácido génico.⁵³

2.1.2.2 INTERACCIONES DE LA SALIVA Y CANDIDA

Uno de los mayores componentes del ecosistema bucal con el cual las levaduras interactúan es la saliva. En combinación o completa: la saliva consiste en secreciones de la glándulas salivales mayores (parotida, submandibular y sublingual) y glándulas salivales menores y con una variable cantidad de liquido crevicular. También están presentes células epiteliales exfoliadas, microorganismos bucales y sus productos además de restos de comida. El tipo de secreción y composición de la mezcla salival puede ser combinada por un amplio rango de variables incluyendo edad, sexo, periodo del día y posiblemente diferencias genéticas como una alta composición proteínica de un individuo a otro.⁵³



2.1.2.3 SUBSTANCIAS INHIBITORIAS EN SALIVA

Lisosima

La lisosima en la saliva mixta es derivada de las glándulas salivales mayores y menores, también de exudado crevicular y de leucocitos posiblemente. Diferentes especies examinadas *C. krusei*, *C. parapsilosis* demostraron ser más sensibles a la lisosima y con menos sensibilidad *C. albicans* y *C. glabrata*. Samanrayake 1988.

El efecto sobre las levaduras es aun incompleto pero se hace hipótesis de que daña la pared celular, la membrana y activa enzimas auto líticas.⁵³

Sistema de peroxidasa

Este sistema consiste en peróxido de hidrógeno H_2O_2 y iones de tiocinato(SCN) han sido encontrados en saliva.

Si embargo otro sistema es encontrado con una actividad fungicida en *Candida* y consiste en la mieloperoxidasa (derivados de leucocitos polimorfonucleares), cloruro de sodio (NaCl) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un número de especies han sido susceptibles a este sistema *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. Krusei*.⁵³

Lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína ligada al hierro la cual es excretada en saliva y también presente en gránulos específicos de leucocitos polimorfonucleares. No se conoce el mecanismo exacto de la lactoferrina la cual atrapa el Fe^{++} lo que si se conoce es que disminuye el crecimiento en medios con lactoferrina, con lo que se supone que el Fe^{++} es necesario para el desarrollo de *Candida*.⁵³



2.1.3. RESPUESTA INMUNE DE LA MUCOSA CONTRA EL GENERO CANDIDA

2.1.3.1 SISTEMA SECRETOR INMUNE

Varias membranas mucosas del cuerpo están constantemente expuestas a microorganismos y la secreción baña la superficie epitelial y juega un papel en la protección de las superficies mucosas contra microorganismos el cual incluye varios hongos como *Candida*.

Los sistemas comprenden las superficies mucosas bañadas por secreciones del cuerpo y estas asociadas a glándulas. El organismo incluye el ojo, oído medio, glándulas salivales, pulmones, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario y glándulas mamarias. El tejido linfoide que esta especializado con el sistema de secreción en el intestino (intestino asociado al tejido linfoideo) y en los pulmones (sistema bronquial asociado a tejido linfoideo). Esto es aparente además de que la cavidad bucal tiene varios factores en común con otras superficies bucales. ⁵³

Estimulación del sistema inmune de secreción

Anticuerpos pueden ser inducidos en saliva y otras secreciones tambien por inmunización local, o alternativamente por estimulación del intestino asociado al tejido linfoide y también por ingestión del antígeno o por deposito del antígeno en intestino que lleva a la liberación del de IgA de células de las placas de Peyer las cuales migran selectivamente a las mucosas. Estas células precursoras de células plasmáticas son maduras dentro linfáticos



Locales de donde migran secuencialmente a los nódulos linfáticos del mesenterio , después al conducto torácico y a otros conductos de secreción incluyendo glándulas salivales. La inmunización local permite una proliferación de estas células , restableciendo el de otras y aumentando la secreción local de IgA secretoria en su respuesta. Es posible que otros anticuerpos anti-candida sean estimulados en algunas otras mucosas como la del intestino⁵³.

- 1 - GLANDULAS SALIVALES
- 2 - CONDUCTO TORAXICO
- 3 - NÓDULO LINFÁTICO MESENTERICO
- 4 - PLACAS DE PEYER
- 5 - INTESTINO DELGADO

- 6 - GLANDULAS LAGRIMALES
- 7 - GLANDULAS MAMARIAS
- 8 - SISTEMA GENITOURINARIO
- 9 - PULMONES

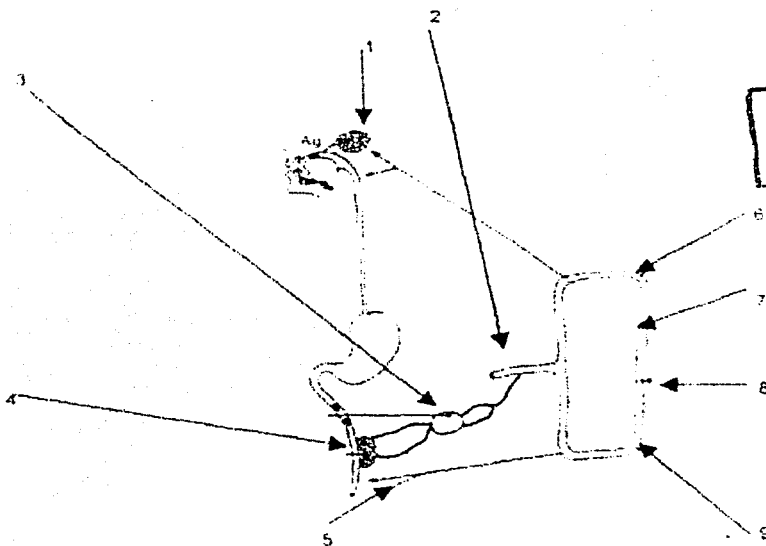


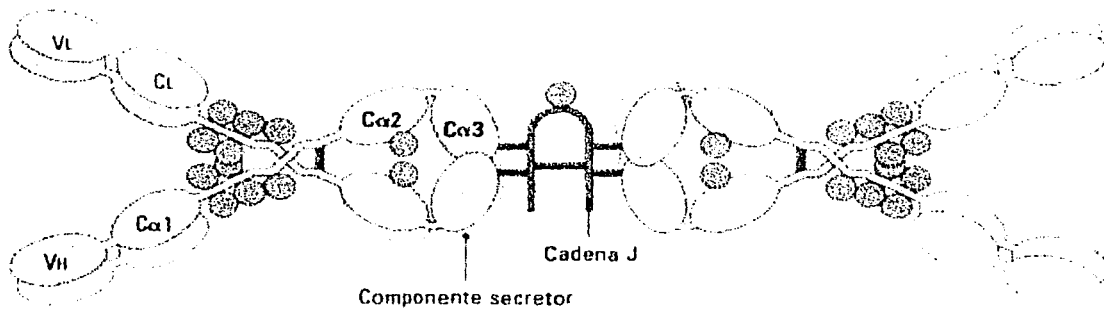
FIG. 4 A) Vía de las células en el sistema inmune secretor. Deposición del antígeno en las placas de Peyer que estimulan la realización de células precursoras de IgA las cuáles migran a todos los tejidos secretores.

Tomado del libro Oral Candidosis de Samanarayake⁵³.1990.PAG 106.



IgA Secretoria

La IgA en secreción difiere de la plasmática y por esto es llamada IgA de secreción (SigA). Las moléculas de IgA en secreción son completamente diméricas y son independientes de la IgA monomérica de suero. Algunas veces se refiere como una " mucosa pintada", anticuerpo de IgAS han sido encontrados cubriendo las superficies mucosas y pueden en parte estas ligadas al alto peso molecular de las mucinas. Además la cadena J , dimeros de IgA son complementados con otra proteína, el componente secretor el cuál es sintetizado por células epiteliales y actúa como un vehículo para el transporte de IgA de la lámina propia para superficies mucosas, además de que la protege de la acción lítica de enzimas digestivas. ⁵³



El componente secretor de la SigA se encuentra enrollado probablemente alrededor del dímero y unido por enlaces disulfuro al dominio C α 2 de cada monómero IgA .La cadena J es necesaria para unir las dos subunidades.

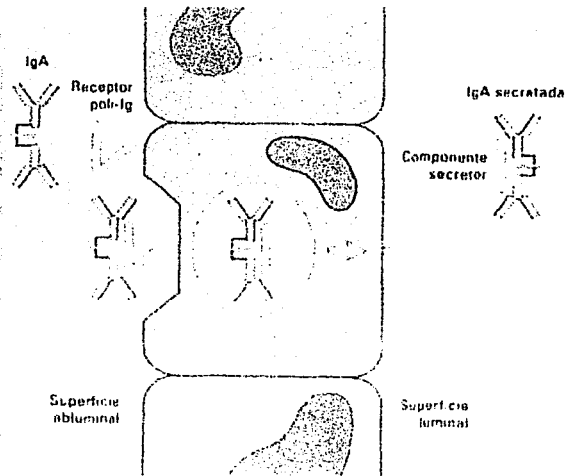


FIG 5

Transporte de IgA a través de las mucosas. Los dímeros de IgA secretorios, segregados hacia el espacio intersticial por las células plasmáticas, se unen a los receptores de membrana en la superficie interna (abluminal) de las células epiteliales. A continuación el complejo IgA receptor es endocitado y transportado a través de la célula unido a la membrana de una vesícula de transporte. Estas vesículas se fusionan luego con la membrana plasmática en la superficie luminal, liberando dímeros de IgA unidos al componente secretor, un producto escindido del receptor. Fuera de la célula, la IgA dimerica queda protegida del ataque de las enzimas proteolíticas gracias a este componente secretor.



Mecanismos inmunes no específicos para infecciones *Candida* en humanos

La IgAS no tienen la capacidad de la opsonización o fijación del complemento para su actividad biológica, porque ni los componentes del complemento ni los fagocitos son normalmente encontrados en abundancia en las secreciones, por no tener su fracción Fc libre que le da esta propiedad. La acciones son:

- Neutralización de virus(virus de la polio)
- Neutralización de toxinas
- Inhibición de la adherencia o crecimiento de microorganismos en células epiteliales y otras superficies como los dientes.
- Exclusión del antígeno para prevenir el acceso del antígeno al sistema inmune sistémico y con ello llevar a la tolerancia. ⁵³

2.1.3.2 MECANISMOS INMUNES NO ESPECIFICOS CONTRA INFECCIONES DE *CANDIDA* EN HUMANOS

La piel y las membranas mucosas de los humanos no solo representan barreras formidables para los microorganismos patógenos, pero también protege por varios factores con sus secreciones. ⁵¹

La saliva no es un agente específico en su papel en la salud e la mucosa bucal pero tiene efecto de buffer o neutralizador y efecto de barrido.



La fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos pueden fagocitar y matar a *Candida* incluso en la ausencia de anticuerpos específicos opsonizantes (IgM o IgG).⁵³

Las células asesinas naturales o Natural killer (NK) son marginalmente citotóxicas a *C.albicans* con o sin IgG o IgM que sería en este caso la citotoxicidad dependiente de Anticuerpos (ACDC).⁵³

2.1.3.3 INMUNIDAD ESPECIFICA EN INFECCIONES POR CANDIDA

Anticuerpos de suero

El complemento (C') tiene acción lítica por si solo gracias al complejo de ataque a la membrana el (MAC). El mayor potencial de los anticuerpos del suero ha sido visto como opsonizante para polimorfonucleares y macrófagos y actúa como estimulante para que estas células actúen por quimiotaxis en el sitio de la infección. A través del Fc y R11 del CD32 que es el receptor que reconoce al anticuerpo opsonizante.

Los anticuerpos IgA para la totalidad de células de *Candida* se ha visto que pueden inhibir la adherencia de células del hongo a la superficie de la mucosa bucal.⁵³

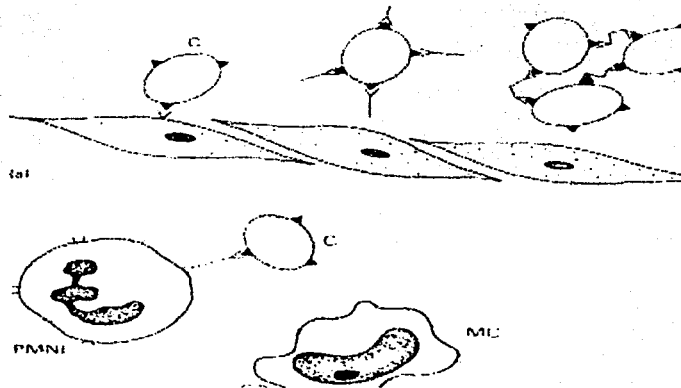


Fig. 6 Mecanismos de inhibición para la adherencia de *Candida* por anticuerpos (a) Inhibición de la adherencia de *Candida* (C) al epitelio oral (OE) por bloqueo de los sitios de enlace de la superficie de la levadura por IgAS. IgAS también aglutina la *Candida*. (b) La opsonización de *Candida* (C) por IgG y complemento para la fagocitosis por polimorfonucleares (PMNL) y macrófagos (MC) via sus receptores Fc-IgG y C3b. Tomado de libro de Samanarayake⁵³ 1990 pag 115.



Respuesta inmune de secreción

Esta es generalmente aceptada que después de la inmunización local, antígenos que son tomados de las placas de Peyer vía folículo asociada al epitelio, donde los pliegues luminales endocitan el antígeno. Después la estimulación del antígeno, localmente induce IgA específica de secreción. Las células B y T migran a los tejidos efectores de la mucosa, en la lamina propia gastrointestinal, vías respiratorias altas, tracto genitourinario además de glándulas secretoras guían un camino común de la mucosa inmune. Las células intestinales de la lamina propia presentan el 30 a 40% del total de linfocitos CD⁺4 y CD⁺8. Los subgrupos de células CD3 y CD4 Th están presentes en la lamina propia. Las citosinas producidas por células Th 2 principalmente interleucinas (IL) -4, IL-5 y IL-6 podrían actuar directamente en la secreción de linfocitos B sobre IgA e inducir a las células B a diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA. Además un adecuado número de células T funcionales es requerida para el desarrollo de una respuesta inmune de secreción para *Candida* y cuando se ha visto a las células T jugar un papel crítico en la estimulación de diferenciación de linfocitos B secretores de IgA a producir secreciones de IgA, además de diferenciarse a linfocitos B de memoria.⁴³

Respuesta celular inmune

Mediante modelos experimentales de candidosis se ha demostrado que la infección provoca una respuesta inflamatoria aguda seguida de una masiva migración de células T CD⁺4 y macrófagos dentro del epitelio. La densidad de células CD⁺4 permanece alta en la capa basal por más de 30 días post-infección. Después de un segundo ataque tópico de la infección se calma



dentro de 48 hrs. contrastando con los 5 a 7 días de infección local observadas en la primera infección. Estudios histológicos demostraron un típico retraso de reacción de hipersensibilidad de tipo IV. De estos datos es igual que los linfocitos T CD4 podrían actuar localmente contra la infección de *Candida* por sintetizar citosinas e inducir el retraso de un tipo de reacción de hipersensibilidad retardada; mediada por LTh1.

Porque la predominación de la respuesta de tipo Th2 en placas de Peyer después de la inmunización bucal con *Candida* abundante IL4 podría estar expectante de que existiera en mucosa. Esto es concebible que IL-4 el cual fue reportado para incrementar la expresión de receptor de manosa en macrófagos, podría contribuir a la defensa de la mucosa contra *Candida* por incremento de receptor-mediador de manosa clarificando porque los macrófagos abundan debajo de la superficie epitelial y activar así la cascada del C' via independientes anticuerpos. ⁴³

2.1.4 FACTORES PREDISPONENTES DE LA CANDIDOSIS BUCAL

Los factores sistémicos y locales pueden incrementar en un individuo la susceptibilidad a la candidosis, así como las características del propio organismo. Los factores del hospedero incluyen edad (neonatos y adultos mayores), diabetes, portadores de dentaduras, usan de antibióticos de amplio espectro y esteroides. Cierta población de pacientes con algunas marcadas enfermedades podría predisponerse a la candidosis.

Los factores del patógeno han estado implicados en el desarrollo de infecciones con candidosis bucal incluyendo los componentes de la pared celular que aumentan la adhesión a las células epiteliales, hidrofobicidad del organismo, formación del seudomicelio, habilidad para persistir dentro de las



células epiteliales, producción de endotoxinas, inducción del factor de necrosis tumoral (TNF), producción de proteinasa ácida y el fenotipo de switching (cambio).¹⁸

Neonatos

Los neonatos son susceptibles a la candidosis bucofaringea debido a que su sistema inmunológico esta inmaduro. La infección es usualmente adquirida durante el nacimiento por una madre con candidosis vaginal y dentro obviamente de la primera semana y aun sin que la madre presente candidosis vaginal ocurre esto.

En niños significantes relaciones fueron encontradas de la recuperación de levaduras y el uso del chupón, sobre los 12 meses de edad y además para enfriar soplando la comida y la limpieza del chupón por parte de la madre en su propia boca. Siendo una de las fuentes de contaminación de levaduras para los neonatos o en niños pequeños.

Por su parte Mattos-Graner en su estudio obtuvo como resultados que sugieren que el uso de chupón es un importante factor en la colonización y proliferación de levaduras en la cavidad bucal.^{18, 44}

Diabetes

Los pacientes diabéticos con los niveles de glucosa elevada y una reducción del factor de quimiotaxis de la saliva, alteración de la función del neutrofilo y la reducción del número celular podría jugar un rol en la patogénesis de la candidosis.¹⁸



Portadores de dentaduras

La candidosis bucofaringea afecta a cerca de 65% de pacientes viejos que portan dentadura completa superior. Los portadores de dentaduras susceptibles a esta infección podría ser debido al aumento de la adherencia de especies de *Candida* al acrílico, reducción de flujo de la saliva debajo de las superficies ajuste de la prótesis y del impropio ajuste de las dentaduras o pobre higiene bucal.¹⁸

Mala función de glándulas salivales

La poca secreción y bajo pH en la saliva podría contribuir al desarrollo de candidosis. Esta secreción salival contribuye al movimiento de organismos de la superficie mucosa. Proteínas antimicrobiales en la saliva, incluyen lactoferrina, sialoperoxidasa, lisosima, polipéptidos ricos en histidina y anticuerpos específicos anticandida, interactúan con la mucosa bucal para prevenir sobrecrecimiento de *Candida*.

Fármacos que causan xerostomia pueden predisponer a los pacientes en esta infección. Pacientes con cáncer de cabeza y cuello, quienes han recibido radiación o que puedan tener problemas en glándulas mayores o menores. Transplantados de medula ósea y pacientes que reciben quimioterapia pueden experimentar disfunción glandular.¹⁸



Rompimiento de la mucosa bucal

Pacientes que reciben quimioterapia de leucemia aguda han alterado la regeneración en la mucosa haciendo a esta más vulnerable a la infección especialmente en los pacientes con inmunocompromiso.¹⁸

Cáncer y terapia de cáncer

La candidosis en pacientes con leucemia y los transplantados de médula ósea causan morbilidad (alteración del sabor, sensibilidad bucal, disfagia debido a esofagitis, fiebre) y llevar un considerable riesgo de mortalidad. Se ha encontrado que el aumento al el factor de riesgo de mortalidad en la candidosis bucofaríngea a es la fiebre de periodos largos y una disminución de la médula ósea en pacientes con leucemia.

La candidosis bucofaríngea es reportada en un tercio de los pacientes con leucemia.

El tratamiento frecuente con antibióticos de amplio espectro en pacientes con neutropenia también alteran la microbiota bucal normal y predispone al paciente a la candidosis.

Debido a la disminución de la función normal de los neutrofilos y la neutropenia en pacientes con Leucemia estos predisponen a las infecciones micóticas como la candidosis.

Las infecciones por *Candida* generalmente superficiales pueden también llegar a invadir o penetrar sistémicamente y podría resultar en mortalidad.

Dentro de los pacientes con leucemia y que reciben quimioterapia el 90% presenta *Candida*.^{18, 38}



Infección por VIH/SIDA

Pacientes con una disminución de linfocitos CD4+ debido a la infección por HIV es una también un alto riesgo para candidosis bucofaringea, la cual es muy común en el paciente en un severo estadio dentro de la clasificación de SIDA. La candidosis bucal es la infección más prevalente en este grupo ocurriendo en 95% de los pacientes. Esta también predice sobre la progresión de la enfermedad en pacientes infectados con HIV.

Las diferentes manifestaciones clínicas de la candidosis bucofaringea en SIDA pueden variara sobre el tiempo y clásicamente incluye pseudomembranosa, eritematosa y queilitis angular.¹⁸

Deficiencia en la secreción de IgA

Pacientes con desordenes de la secreción de IgA en el sistema inmune (deficiencia del componente de secreción o disminución de la secreción de IgA) estos son propuestas para el desarrollo crónico de diarrea y candidosis intestinal recurrente, sin incremento de la susceptibilidad para candidosis diseminada.⁴³

Influencia de la edad en la candidosis bucal

La candidosis bucal es frecuentemente vista en los pacientes viejos. Tanida examino la influencia de la vejez en la adhesión de candida y los agentes de inhibición de crecimiento a la levadura en 45 pacientes sanos y 60 con candidosis bucal. Los resultados de su estudio determinaron que la disminución de la velocidad del fluido salival denominado SFRs y los factores salivales anticandida, así como la supresión de la función de los neutrofilos y



el incremento de la adhesión de candida en sitios sobre los queranocitos predispuso a los pacientes ancianos a la candidosis bucal.⁶²

Anormalidades del sistema inmune

Los pacientes con Síndrome de Down en el estudio de Carlstedt tienen una propensión a la colonización por *Candida* que los pacientes sanos. Las anomalías del sistema inmune responden porque en los niños con síndrome de Down puede contribuir al incremento de *Candida* en cavidad bucal.¹³

Anormalidades en la respuesta inmune celular

Dentro de las inmunodeficiencias que repercuten en el tipo de respuesta inmune celular se encuentran las de tipo congénito como los síndromes de De George que se caracteriza por aplasia tímica y valores normales de inmunoglobulinas séricas pero que carecen de inmunidad mediada por células así como el síndrome de Nezelof que es un trastorno que se caracteriza por hipoplasia tímica disminución de la reacción de hipersensibilidad de tipo tardío y valores normales de inmunoglobulinas ambos síndromes se hace aparente la anomalía de las células T durante los primeros meses de vida por una mayor susceptibilidad a las infecciones micóticas en especial las causadas por *Candida albicans*.

La agammaglobulinemia tipo Swiis y Bruton que puede heredarse como carácter ligado al sexo o autosómico recesivo. Estos pacientes se caracterizan por tener cifras de linfocitos bajas, deficiencia grave de inmunoglobulinas y ausencia de la inmunidad celular; es muy común dentro de las infecciones la candidosis localizada o sistémica.



Y dentro de las inmunodeficiencias adquiridas se encuentra la diabetes ya mencionada y la leucemia, además de los Linfomas que son un grupo de tumores sólidos malignos que afecta las células del sistema linfático o inmunitario, como linfocitos B, T y monocitos. Y dentro de las manifestaciones de estos tumores se encuentran las infecciones micóticas como la candidosis.³⁸

2.1.5 SINTOMAS

Los síntomas podrían estar asociados con la infección incluyendo ardor, sensibilidad, gusto alterado, cambio en el sentido del olor. Esto si se envuelve una extensión de la bucofaringe con lo que se produce disfagia y odinofagia podría ocurrir.⁵³

2.1.6 PRESENTACIÓN CLÍNICA: TIPOS DE CANDIDOSIS BUCAL

La candidosis bucal puede asumir una variedad de formas clínicas. Varias clasificaciones y esquemas han sido propuestos para describir las formas clínicas de las candidosis. El esquema de división clínica de la lesión: aguda, crónica y mucocutánea. La aguda es además subdividida en pseudomembranosa y forma atrófica aguda (estomatitis por antibióticos). La candidosis crónica incluye la atrófica crónica (estomatitis por dentadura queilitis angular, glossitis romboidal media) y forma hiperplásica crónica. Las Mucocutáneas pueden ser localizadas en familia o síndromes relacionadas.³⁷



AGUDAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.6.1 CANDIDOSIS SEUDOMEMBRANOSA AGUDA

Es la forma clásica de candidosis bucal. Es común en recién nacidos, pacientes geriátricos y enfermedades terminales, diabetes, leucemia y VIH, (típicamente la lesión superficial es un conjunto de colonias micóticas que se traducen en placas sobre la mucosa bucal).

Estas placas pueden ser retiradas en la cual dejan una superficie eritematosa y denudada.³⁷



Fig.7 Candidosis pseudomembranosa que muestra placas confluentes blanquecinas en la mucosa bucal de un paciente HIV-seropositivo. Tomado del libro Oral Candidosis de Samanarayake 1990⁵³.



2.1.6.2 CANDIDOSIS ATROFICA AGUDA

Difiere de la seudomembranosa ya que las placas blancas están ausentes, dejando una zona eritematosa con dolor, sensación de quemazón y estomatitis clínica evidente.³⁷

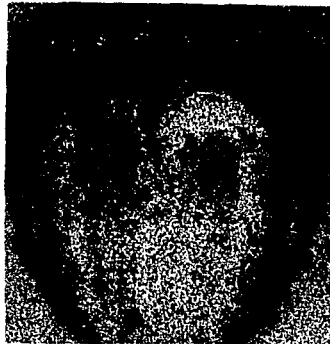


Fig.8 Candidosis atrófica aguda en el dorso de la lengua debido a la terapia antibiótica de amplio espectro. Tomado de libro Oral candidosis Samanarayake 1990⁵³.



CRONICAS

21.6.3 CANDIDOSIS ATROFICA CRÓNICA

Referida como estomatitis por dentadura, es la más común forma de candidosis. Esta ha sido descrita en más del 60 % de portadores de dentaduras, con una predominancia en numero elevado de estudios. Característicamente la lesión se presenta como asintomático, extremadamente eritematosa mucositis, limando únicamente en el área de la dentadura sobre la mucosa.³⁷

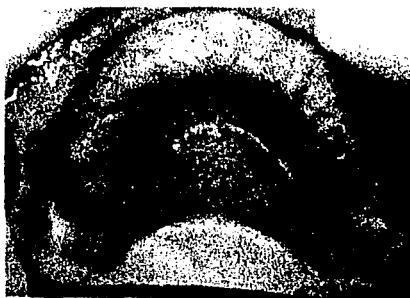


Fig. 9 Candidosis atrófica crónica en un portador de dentadura. Tomado de libro Oral candidosis de Samanarayake 1990⁵³.



2.1.6.4 QUEILITIS ANGULAR O PERLECHE

Es frecuentemente vista en asociación con candidosis atrófica crónica. Esta caracterizada por sensibilidad, eritema y fisuras en las esquinas de la boca. Tradicionalmente es tipo de candidosis ha sido atribuido a la vitamina B en complejo de deficiencia, disminución de la dimensión vertical o candidosis local.³⁷

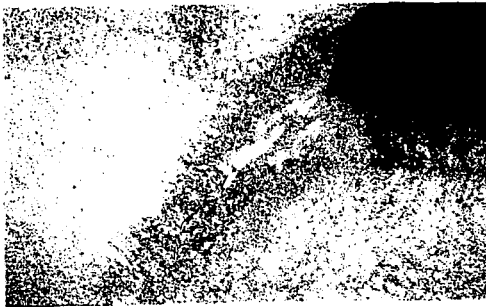


Fig.10 Queilitis angular: con un inflamación amplia a lo largo de la fisura en la comisura labial de la boca de un paciente portador de dentadura. Tomado del libro Oral Candidosis de Samanarayake 1990⁵³.



2.1.6.5 CANDIDOSIS HIPERPLASICA CRÓNICA O LEOCOPLASIA CANDIDOSICA

Es tal vez la más interesante variante de candidosis bucal. En cada uno de los casos las lesiones son normalmente encontradas en alta incidencia de fumadores. Un significativo incremento de atipia epitelial y degeneración maligna es notado cuándo el tabaco es estáticamente controlado. En contraste a otra forma de candidosis bucal, sedo micelios de candida son frecuentemente encontrados al estar invadiendo el epitelio a otras que simplemente colonizan la superficie.³⁷



Fig. 11 Candidosis hiperplásica crónica (leucoplasia candidosica): presentación clásica en las comisuras. Tomado de libro Samanarayake 1990⁵³



2.1.6.6 GLOSITIS ROMBOIDEA MEDIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta lesión es característicamente encontrada entre la unión de los dos tercios anteriores con el tercio posterior de la lengua y aparece asintomático, parece una zona en diamante y depapilada.³⁷



Fig.12 Glositis romboidea que muestra la característica en el sitio y lugar de la lesión en la lengua. Tomada de libro Samanarayake 1990⁵



2.1.6.7 CANDIDOSIS MUCOCUTÁNEA

Es una infección multifocal que resulta en parte de una inefectiva respuesta celular inmune para *Candida*, sin embargo otras inmunodeficiencias han sido descritas en esta condición. Como por ejemplo endocrinopatías, como hipotiroidismo, enfermedad de Adisson e hipotiroidismo.³⁷

2.1.7 HISTOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN DE CANDIDOSIS BUCAL

La característica histológica aparente de la forma mucocutánea es de un infiltrado crónico de células inflamatorias, primariamente linfocitos y después histiocitos. Además el epitelio demuestra hiperqueratosis parakeratosis y acantosis. Ocasionales microabcesos pueden ser vistos aparecer compuestos de polimorfonucleares como en las células de inflamación crónica.

Las placas de la candidosis seudomembranosa aguda son causados por invasión de células del epitelio por pseudo micelios con una proliferativa respuesta del epitelio. Los neutrofilos están presentes en el epitelio paraqueratósico pero particularmente en la unión de la zona rica en glucógeno donde se forman microabcesos.

En la candidosis atrófica crónica el epitelio es acantósico, atrófico y edema de la superficie epitelial es frecuentemente visto en el infiltrado celular crónico.



La característica de la candidosis hiperplásica crónica es esencialmente epitelio paraqueratósico invadido por pseudomicelios e infiltrado por un exudado inflamatorio crónico.⁵³



a)



b)

Fig. 13 a) Corte histopatológico con la tinción de Grocott de una sección de candidosis hiperplásica. Esta tinción demuestra que los elementos micóticos (en negro) sin embargo esta pobremente visualizadas las células del huésped. b) Corte histopatológico de una lesión de candidosis crónica hiperplásica por ácido periódico de Schiff (PAS). Un número amplio de pseudomicelios se observan infiltrados en la capa superficial del epitelio hiperplásico, acompañados por neutrofilos. Tomado de libro Oral candidosis de Samanarayake 1990⁵³



2.2 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO, TIPIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA CANDIDOSIS BUCAL

2.2.1 EXAMEN DIRECTO

El material biológico obtenido se coloca entre el porta y cubreobjetos con un aclarante, de preferencia KOH al 10%. Se puede realizar también tinciones con Gram. La observación al microscopio se realiza con los exámenes directos o tinciones, presentándose grandes acúmulos de blastoconidias de aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro y pseudomicelio cortos o largos esta determinará el estado patógeno y virulento de la levadura confirmando el diagnóstico.⁸

2.2.2 CULTIVOS

Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de los cultivos habituales, como son : Saouraud agar, gelosa sangre, infusión de cerebro corazón y extracto de levadura. Es importante notar que *C.albicans* crece en los medios de micosel, sin embargo algunas otras son inhibidas por la cicloheximida (*C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* y *C.zeylanoides*), por lo que se recomienda hacer las siembras a la par en medios Sabouraud. Las características de las colonias en la mayor parte de los medios son similares: crecen en 2 a 3 días a 28 ó 37C. dando las colonias blanquecinas, húmedas, limitadas, opacas y en ocasiones se observa dentro del agar el pseudomicelio. Hay medios de cultivos selectivos para el género *Candida*, como el Biggy, que contiene una gran cantidad de citratos, que elimina la flor bacteriana y



sulfitos que son reducidos a sulfuros; de manera que las colonias se ven de color café claro u obscuro, lo que hace distinguibles de otros hongos levaduriformes este medio es sumamente útil para el trabajo rutinario. Actualmente han surgido una serie de medios de cultivos, que permiten hacer una identificación primo aislamiento de algunas especies por ejemplo el medio comercial candiselect permite el reconocimiento de *C. albicans* y el agar Pagano Levine que se presenta en placa preferentemente, en el cual se siembran en estría por secciones, las diferentes cepas de *Candida* para su estudio; según cada especie desarrollara una colonia con un pigmento característico, que varía del blanco al violeta, aunque no es muy precisa debido a que un tono puede corresponder a varias especies. ^{8, 36}

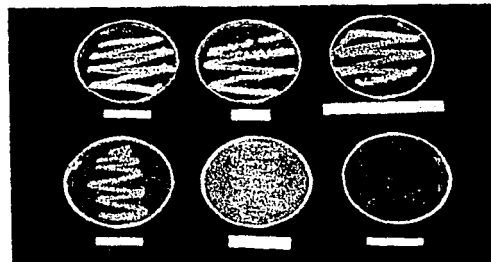


FIG.14 Medio de Pagano-Levine que ayuda a diferenciar algunas especies de *Candida* por la coloración que adquiere este medio es una prueba de reducción del cloruro trifenil-tetrazolio. Tomado de libro Micología Médica de López Martínez 1995³⁶.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2.2.3 TIPIFICACIÓN

Al igual que en las bacterias su tipificación se hace basándose en pruebas fisiológicas y morfológicas, las más importantes son las siguientes:

2.2.3.1 CULTIVOS

Aunque pueda haber pequeñas diferencias entre la morfología colonial de las diversas especies de *Candida*, por lo regular es similar. Se desarrollan en el medio Sabouraud agar en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a 25 C, dando colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas, aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco o amarillento, rara vez pueden dar tonalidades rosa. (*C. guilliermondi*) algunas veces es posible ver formaciones de pseudomicelio que se entremeten en agar.

Todas las especies se reproducen por blastoconidias, dependiendo de cada una de ellas fluctúan entre 2 a 10 micrómetros de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño; en ocasiones se logra observar pseudomicelio, sobretodo cuando proviene de medios muy pobres o viejos.⁸

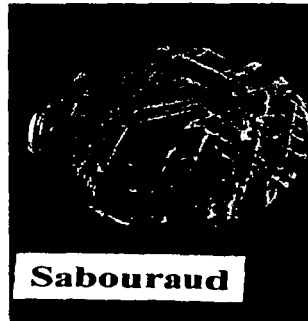


Fig.15 Medio Agar Dextrosa Sabouraud donde se observan las colonias blanco-cremosas de *Candida sp.*

2.2.3.2 FILAMENTACIÓN EN SUERO

Se realiza en suero humano fresco. Se siembra la cepa a investigar en 0.5ml de suero, se incuba a 37 C durante 3 a 3 horas y media, posteriormente se practica un examen en fresco. Esta prueba es presuntiva de *Candida albicans*, si se forma tubo germinal de aproximadamente 5 a 15 micrómetros de largo, que parte de la célula levaduriforme. Es importante remarcar que después del periodo indicado de incubación, todas las especies de *Candida* pueden formar tubos germinativos. La prueba a reportado falsos positivos.⁸



2.2.3.3 PRODUCCIÓN DE SEUDOMICELIO Y CLAMIDOCONIDIA

Se lleva a cabo en medios pobres y tensos, como el harina de maíz agar (Corn meal) al que se le agrega 1% de algún tenso activo como el tween 80. El medio se siembra en cajas de Petri por estrías, incubándose a 25 C durante 72 horas, para hacer la observación se coloca un portaobjetos sobre la colonia; posteriormente la caja se coloca sobre la platina del microscopio. Todas las especies oportunistas de *Candida* presentan pseudomicelios largos y ramificados, con cúmulos de blastoconidias; con excepción de *C.glabrata*. En caso específico de *C.albicans* se ven clamidioconidias terminales o intercalares que miden entre 10 y 12 micrómetros de diámetro, con una doble membrana bien formada. Esta prueba biológica es determinante para *C.albicans*, y sólo en raras ocasiones se puede presentar en *C.stellatoidea*.⁸



Fig. 16 Medio harina de arroz para la determinación de formación de clamidoconidias de *Candida*



2.2.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se basan en la fermentación (zimograma) y utilización de carbohidratos (auxonograma). Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies.⁸

Auxonograma

Se puede emplear auxonograma del nitrógeno o del carbono. Este último es el más utilizado. A través del patrón de asimilación de azúcares se identifican las diferentes especies de levaduras de *Candida*. Se puede utilizar dos métodos: el auxonograma en placa, en el que se utilizan soluciones de azúcares. En el primer método se vierten 25ml de medio base a 50 °C, en una caja de Petri; a continuación se prepara una suspensión de levaduras proveniente del cultivo puro en tres días de crecimiento a una concentración igual a la del tubo No. 1 de la escala de Mc Farland, se agrega 1 ml de la suspensión en la caja y ésta se gira en círculo para distribuir homogéneamente el inóculo de levaduras y al solidificar el agar se depositan los discos impregnados de azúcares distribuidos a una distancia razonable. Se incuba a 37°C durante tres días y se hace la lectura. Los halos de crecimiento alrededor de los discos indican la asimilación del azúcar.

En el método del auxonograma en tubo se agregan dos gotas de una suspensión de levaduras a cada uno de los tubos que contienen los azúcares, se incuban a 37°C por tres días y se hace lectura. La turbiedad de la fase líquida indica el crecimiento de la levadura. Se debe constatar al microscopio que no haya además, crecimiento bacteriano.³⁶

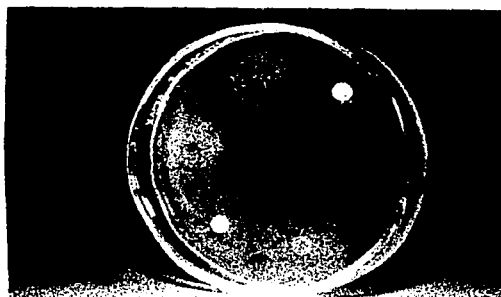


FIG.17 Auxonograma del carbono. Los halos de crecimiento, alrededor de los discos, indican la asimilación del azúcar correspondiente. Tomado de libro Micología Médica de López-Martínez. 1995³⁶

Zimograma

Las propiedades fermentativas de cada especie de *Candida* son características y se demuestran por la producción de ácido y gas; algunas especies no producen enzimas. La acidez se demuestra por el cambio del

color del indicador de pH, de verde a amarillo y, cuando hay producción de gas, éste se acumula en la campana invertida de Durham. Se puede sustituir la campana de Durham vertiendo sobre el tubo, con el sistema de zimograma, ml de vaspar a 40 °C (vaselina y parafina a partes iguales). La producción de gas se demuestra al desplazarse el tapón hacia arriba. Los sistemas de zimograma se incuban a 37 °C por siete días.

Además de las pruebas anotadas, se pueden utilizar " kits " comerciales, como son: API-20 y API 32, los cuales ponen de manifiesto la actividad de



asimilación de los azúcares. Las principales ventajas de estos procedimientos son: la rapidez con que se obtienen los resultados (aproximadamente en 24 horas) y, por la gran cantidad de carbohidratos que se utilizan, la posibilidad de precisar mejor la especie de levadura en estudio ya sea del género *Candida*, *Geotrichum* etc.³⁶

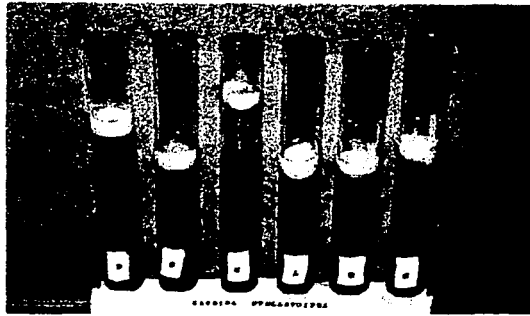


FIG.18 Zimograma. Identifica las especies de *Candida* por el grado de fermentación a través de la producción de ácidos (cambia el color del medio hacia el amarillo) y de gas (desplazamiento del tapón de vaspar).

Resistencia al actidione

Puede medirse simplemente con el crecimiento en medio micosel.⁸

Reducción de las sales de tetrazolio

La reducción de sales de tetrazolio se realiza en Sabouraud con 0.1 g % de trifeniltetrazolio, que es incoloro y si se reduce adopta color rosado a rojo púpura.³



Tabla 1. Representa pruebas bioquímicas complementarias y fisiológicas para la determinación de especies de *Candida*. Tomado de libro de Micología del Dr. Arenas³ 1993 pag 231.

| | Morfología | | | Auxonograma | | | | | | | | Zimograma | | | | | | Otros caracteres | | | | |
|----------------------------|------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|---------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|----------|-----------|------------------|----------|--------|----------------|------------------------------|
| | | | | Indispensable | | | | Electivo | | | | | | | | | | | | | | |
| | Moheño o pseudomicelio | Clamidosporas | Filamentación en suero 37°C, 4h | Glucosa | Maltosa | Sacarosa | Galactosa | Lactosa | Rafinosa | Inositol | Celobiosa | Xilosa | Trehalosa | Glucosa | Maltosa | Sacarosa | Galactosa | Lactosa | Rafinosa | Ureasa | Red. terrazolo | Res. Actidione (crecimiento) |
| <i>Candida albicans</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | B | + | - |
| <i>C. stellatoidea</i> | + | ± | ± | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | R | + | - |
| <i>C. tropicalis</i> | + | - | - | + | + | + | + | - | - | V | + | + | + | + | + | + | - | - | - | Vi | - | - |
| <i>C. parapsilosis</i> | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | R | - | - |
| <i>C. krusei</i> | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | B | + | - |
| <i>C. pseudotropicalis</i> | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | V | - | + | + | + | + | + | - | - | R | + | - |
| <i>C. guilliermondii</i> | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | R | + | - |
| <i>C. zeylanoides</i> | + | - | - | + | + | + | V | - | - | - | - | + | V | - | - | - | - | - | - | R | - | - |

+ positivo; - negativo; ± casi siempre es positivo; V - variable; B - blanco; R - rosado; Vi - violeta; Red. - reducción; Res. resistencia a.



Fungitest® es un kit relativamente nuevo que permite la determinación de sensibilidad de levaduras a los agentes antifungicos de acuerdo a la estandarización de la NCCLS. Este Incluye 6 agentes antifungicos a dos diferentes concentraciones en presencia de un indicador de REDOX de pH. El crecimiento se estima en vire del indicador de color el cual puede tornar al medio de azul a rosa. Cuando el crecimiento es inhibido por el agente antifungico el medio se torna azul.

De acuerdo a la comparación de estos dos métodos Sensitabs y Fungitest este ultimo constituye un método confiable y con menores discrepancias la estandarización, además de ser un método sencillo.⁶¹

¿Cuándo deberíamos hacer pruebas de sensibilidad a los agentes antifungicos de tipo azol?. Recientemente la respuesta a esta pregunta podría ser mejor " cuando no hacer. No-se tenia métodos estandarizados de métodos de las pruebas de sensibilidad, pues no definian los puntos de corte es decir el punto de sensibilidad , y además los datos no se correlacionaban entre los resultados in vitro e in vivo en infecciones micoticas de humanos. Los agentes para el tratamiento antifungico fueron algunas veces empírico y una tarea relativamente fácil por el numero de agentes disponibles. Siguiendo con la preocupación del incremento y espectro de infecciones micoticas, todas estas áreas de incertidumbre han beneficiado el tremendo interés en el conocimiento de clínicos y microbiólogos.

Ahora tenemos un tentativo método de referencia de levaduras, así como varios procedimientos simplificados , al menos para *Candida albicans* y fluconazol. Se tiene una clara correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, pero se restringe solo a un caso clínico, nombrado candidosis



bucofaríngea en pacientes con infección por HIV. Todavía no se asegura los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria (CIM) diferenciando aislamientos sensibles de los resistentes.

Sin embargo las infecciones micóticas no solo se restringen a la candidosis bucofaríngea causada por *Candida albicans*. Al menos de este límite, muy frecuente la situación, en la identificación precisa de levaduras para el nivel del género, al menos para *Candida*, al nivel de las especies es importante determinar individualmente los valores de la CIM porque las diferentes especies de *Candida* tienen un grado de predicción de susceptibilidad a los compuestos azólicos, y porque adquieren resistencia continuando raramente en pacientes que no tienen VIH. Por ejemplo infecciones debido a *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* usualmente responden al *ketoconazol*, donde las infecciones debido a *Candida glabrata* responden solo en un 50% de los casos, infecciones debido a *Candida krusei* no responden.

Las indicaciones para determinar la susceptibilidad de *Candida* a los azoles varía acorde a la situación clínica y también al tipo de laboratorio. La candidosis bucofaríngea en pacientes infectados con HIV, sus pruebas de susceptibilidad a los azoles podría no hacerse de rutina pero solo en caso de resistencia de un agente estandarizado, en el caso de infección recurrente o en situaciones interacción de fármacos podrían ser responsables de la falla clínica.⁷

El examen de susceptibilidad para los hongos no ha sido estandarizado como en las bacterias, pero esta en desarrollo. El Comité Nacional para estandarización de Laboratorios Clínicos esta desarrollando guías para los exámenes de sensibilidad antifúngica. La continuidad con que se aplica la susceptibilidad antifúngica in vitro es limitada por la inadecuada



estandarización e insuficiente correlación del resultado *in vitro* con el resultado clínico. La ausencia de guías de estandarización podría también estar relacionada a la limitada indicación para la ejecución del examen de susceptibilidad, el pequeño número de agentes antifúngicos disponibles y las dificultades de la técnica asociadas con las pruebas de las levaduras. Estudios de susceptibilidad a antifúngicos podrían ayudar a clarificar cuáles cepas están en vía para desarrollar resistencia durante largos periodos de terapia.⁸

De tal forma Tortorano realizó un estudio con tres pruebas de susceptibilidad para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 47 cepas de *C. albicans* aisladas secuencialmente de cavidad bucal de 5 pacientes con SIDA con tratamiento de azoles. Estas pruebas incluyeron un método de microdilución (BM) realizado acorde al comité Nacional de Estandarización de Laboratorios Clínicos, el método de agar en dilución (AD) y el E test que se realizó en Casitona (Etes-Cas) y agar (RPMI) y placas de petri (150mm en diámetro) conteniendo 60ml de medio bañado con una suspensión de 5×10^5 células/ml, el exceso de fluido se retira con pipeta y lo que resta de humedad se deja absorber las tiras de E test se aplicaron a cada placa a 35°C por 24 a 48 hrs. Dando como concordancia entre AD y BM resulta pobre para los azoles, ya que resultaron aumentos en la CMI. El E test resultó con más similitud al método BM. Concluyendo en diferencias de los métodos en el aumento de la CMI y comparando con la disminución de la respuesta al fluconazol.⁶⁴



Dentro de las pruebas de sensibilidad es importante resaltar partes importantes del procedimiento que podrían marcar errores de lectura así como de operación terapéutica. Como lo señala Tornatore que en su estudio donde 9 cepas aisladas de *Candida albicans* fueron examinadas para susceptibilidad a la anfotericina B y al fluconazol usando tres métodos para estimar el efecto de incubación tiempo y buffer en su concentración. El cual determino que altas concentraciones de buffer o tiempo de incubación prolongado podrían dar falsos resistencias *in vitro* para agentes como el fluconazol.⁶³



2.3.-ANTIMICÓTICOS

2.3.1 HISTORIA DE LOS ANTIMICÓTICOS

La década de 1960 y 1970 puede ser considerada la era de la anfotericina B. Durante estas dos décadas el tratamiento mas usual para la mayoría de las micosis que requerían hospitalización necesitaban una administración de anfotericina de 6-12 semanas. La terapia fue considerada con importantes efectos tóxicos y a algunos pacientes se les relegaba el tratamiento.

La década de 1980 puede ser considerada la era del ketoconazol. La introducción de este imidazol oral fue permitida por primera vez en pacientes con micosis como la histoplasmosis, blastomicosis y coccidioidomicosis. Sin embargo aunque menos toxico que la anfotericina B el ketoconazol presentaba problemas en la administración de dosis mayores de 800 mg diarios ya que causaba recurrentemente efectos adversos hepatitis fármaco inducida, nausea y vómito.

Durante la década de 1990 la incidencia de micosis oportunistas así como el numero de pacientes con inmunocompromiso. Estas infecciones trajeron mayor causa morbilidad y mortalidad en pacientes con inmunosupresores, malignidades hematológicas etc. Esta década fue considerada como la era de los triazol. El fluconazol y el itraconazol fueron realizados entre 1990 y 1992 respectivamente y ambos agentes han encontrado importantes lugares en el tratamiento de infecciones antifungicas.

Para micosis endémicas es importante notar que no existen problemas directamente comparado con la anfotericina B. Históricamente los controles han sido usados con la realización que grupos de pacientes y médicos practicaron en la década de 1980 y 1990 y claramente difiere en los hechos durante la década de 1960 y 1970. Para varias infecciones micoticas y



oportunistas como la candidemia, han sido poco controladas, comparativamente con los ensayos que han sido realizados y directamente comparados los azoles con la anfotericina B, esto ha ayudado a definir el rol que juegan los azoles en estas circunstancias³³.

Por su parte Epstein cerca del tratamiento de infecciones micóticas superficiales menciona que ya existía de forma no específica y cuestionable a principios de 1900. Para esas fechas los antifúngicos sistémicos no existían. Entre las viejas preparaciones tópicas estaba la violeta de genciana, el cual fue usada hasta el primer polieno, la nistatina, que fue descubierta en 1951. La actividad antifúngica de la anfotericina B fue reportada en 1956, y esta agente fue el primer agente disponible para el tratamiento de infecciones sistémicas. La anfotericina B por seguir perdurando es el estándar contra nuevas terapias con la cual es comparada.

El primer azol benzimidazole, fue descubierta en 1944, Los azoles incluyen a los triazoles. Varios azoles ah sido estudiados, incluyendo el miconazol y clotrimazol(ambos identificados en 1969) y el ketoconazol (1977). La actividad antifúngica de los triazoles incluyendo el fluconazol e itraconazol, fueron reportados a mediados de 1980.¹⁸

2.3.2 POLIÉNICOS

Mecanismo de acción

Estos agentes se fijan a los esteroides de la membrana de las células eucarióticas (mamíferos, hongos y protozoos, sin embargo es mucho mayor su afinidad por el ergosterol de los hongos que por el colesterol de las células de mamífero, lo cual les confiere especificidad de acción. Como



consecuencia de esta unión, la membrana del hongo se desestructura y se forman poros y canales que aumentan la permeabilidad y permiten la salida de elementos intracelulares vitales para el hongo.

En experimentos *in vitro*, se observa que la administración va seguida, inmediatamente, de una pérdida de K^+ ; 10 minutos más tarde de una pérdida de Mg^{2+} , disminución del transporte de aminoácidos e inhibición de la síntesis de proteínas. A los 20 minutos se inhibe la síntesis de RNA y el consumo de glucosa.

El ejemplo de la anfotericina B que se inserta entre las 2 cadenas lipídicas de la membrana formando un poro, a través de uniones de tipo de hidrógeno entre la estructura del fármaco y el ergosterol de la membrana.⁶⁵

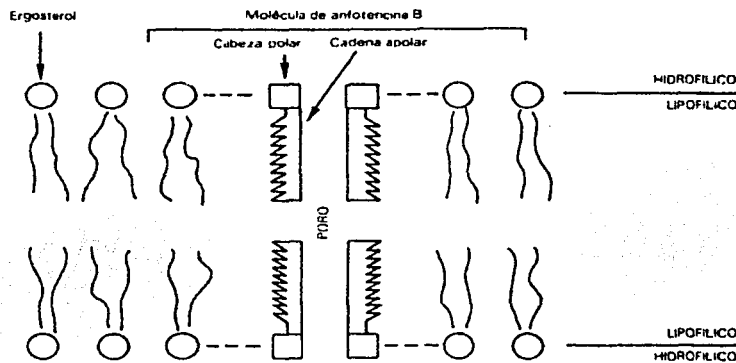


FIG 19. Mecanismo de acción de la anfotericina B. Tomado de libro de Velásquez de Farmacología⁶⁵ pag 999.



Por su parte Georgopapadakou describe a los polienos como funguicidas y como también con actividad de amplio espectro en el uso clínico antifúngico. Estos hacen un complejo con el ergosterol en la membrana plasmática del hongo y por esto comprometo la función de esta barrera. Además causan daño con oxidación, al cual puede contribuir a su acción funguicida. El único polieno sistémico usado en clínica es la anfotericina B. Este tiene una alta afinidad por el ergosterol que con su contraparte mamífera el colesterol y esto determina su menos toxicidad en células mamíferas. Sin embargo en los pacientes se presenta una aguda y crónica nefrotoxicidad. Los efectos adversos son significativamente reducidos cuando la anfotericina B es usada con una formulación lipídica, lípidos complejos (Abelect) y dispersiones coloidales (Amphocil/ Amphotec).²²

2.3.3 ANFOTERICINA B

Este fármaco es producido por una cepa de *Streptomyces nodosus* . *Streptomyces lavandulae* es mencionado en la referencia de Bonifaz. Su molécula consta de porción hidrofílica de varios carbonos hidroxilados y una porción hidrofóbica de 7 carbonos unidos por dobles enlaces (poliénicos) y una cadena lateral de micros amina, que es una aminodeoxihexosa. Esta es una estructura anfipática y esto es responsable de su peculiar mecanismo de acción.

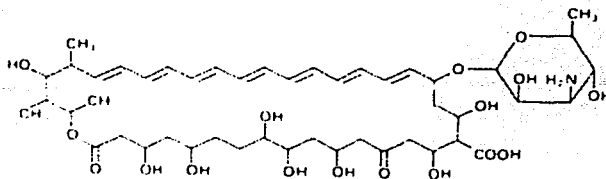


FIG.20 Estructura química de la anfotericina B. Tomado de libro Oral candidosis de Samanarayake 1990.

La modificación de la permeabilidad de la membrana explica también que la anfotericina B potencie el efecto de otros antifúngicos.^{8, 65, 23}

Actividad antimicótica

La anfotericina B es un agente fungistático aunque a altas dosis puede resultar fungicida. Posee un espectro de acción muy amplio. Siendo el fármaco de elección de infecciones para *Candida*, *Histoplasma* y *Criptococcus* y *Coccidioides*.⁶⁵

Farmacocinética

Se absorbe poco por vía oral (5%), por lo que la vía de elección es la intravenosa (i.v). por vía intrarticular o tópica (o en casos de candidosis cutáneas y algunas muco cutáneas agudas). Además sus características anfipáticas permiten que el fármaco puede ser administrado en liposomas.



Se trata de un compuesto poco soluble en agua, por lo que es necesario administrar el fármaco en una dispersión coloidal de deocoxilato sódico (o administrar otras formulaciones N-metil derivados de anfotericina B).

Se une en un 95 % a β -lipoproteínas plasmáticas. Atraviesa mal la barrera hematoencefálica y algo mejor la barrera placentaria. Penetra en escasa proporción en líquido pleural, el humor vítreo y el líquido sinovial.

Sufre metabolismo hepático y se elimina por bilis y orina en menor proporción (4-5%).

Posee una vida media de 24 horas, seguida de un período de eliminación más lento (unos 15 días). El fármaco puede detectarse en suero durante 7-8 semanas, debido a su gran redistribución tisular.⁶⁵

Reacciones adversas

Tras la administración i.v es frecuente la aparición de irritación local (tromboflebitis, aunque el valor de la heparina y los corticoides para evitar esta complicación es dudosa), escalofríos y fiebres (reacciones adversas muy frecuentes), reacciones anafilácticas generalmente moderadas (a veces se requiere tratamiento con antihistamínicos, AINEs o corticoides).

Durante el tratamiento puede aparecer anemia hipocrómica normocítica, con valores del hematocrito de 20 -30%.

Pero la reacción adversa más frecuente e importante es la lesión renal (en alrededor del 80% de los pacientes): hay un aumento de la creatinina sérica entre la 4 y 6 semana de tratamiento.

Lógicamente, la nefrotoxicidad por anfotericina B aumenta en tratamientos concomitantes con diuréticos aminoglucosidos y ciclosporina.



La fiebre y la cefalea son reacciones muy comunes y pueden disminuir con administración intrarraquídea de 10 a 15mg de hidrocortisona.⁶⁵

Aplicaciones terapéuticas

Es el fármaco de elección en el tratamiento sistémico de : candidosis, aspergilosis, critococcosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis.

Por vía tópica se ha empleado en algunas candidosis cutáneas. Por menciona la anfotericina B local (FUNGIZONE) también se ha administrado en la candidosis cutánea y mucocutánea. Se distribuye en el comercio como loción, crema y pomada, dichos preparados contienen 3% de anfotericina B y se aplica en la lesión, dos a cuatro veces al día.²³

Pro su parte Epstein menciona en sus nuevas terapia la aplicación de la anfotericina B a través de un enjuague de vía tópica para el tratamiento de candidosis bucofaríngea.¹⁸

Preparados, vías de administración y dosis de la anfotericina B

Anfotericina B: en viales de 50 mg. Para administración i.v (intravenosa) añadir 50 mg a 500 mL de solución de dextrosa al 5%. La administración propiamente dicha puede hacerse de manera progresiva(transfundiendo una dosis de prueba de 1mg durante 1 a 4 horas e ir aumentando la dosis en 5 hasta 10 mg incluso llegar a 30 mg/día. Si produce hipotensión, reducir la dosis y administrarla durante un periodo de 12 a 18 hrs., para luego ir aumentándola gradualmente) o *rápida* (dosis de prueba como antes; y una



tercera dosis, al día siguiente, de 50 mg inmediatamente después, y una tercera dosis al siguiente día de 50 mg).

La anfotericina B también se presenta en comprimidos intrabucales, suspensiones y crema vaginal en combinación con otros antifúngicos (Funganiline, Fungizona).⁶⁵

2.3.4 NISTATINA

Es un antimicótico de aplicación exclusivamente tópica, ya que por vía sistémica es muy tóxico. Es producido por el *Streptomyces noursei*. Su mecanismo de acción es similar al de la anfotericina B.

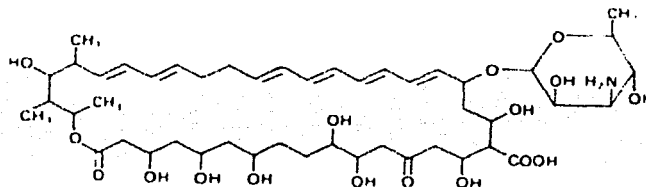


Fig. 21 Estructura química de la nistatina. Tomada de libro de Oral candidosis de Samanrayake1990.



Debido a su toxicidad por vía sistémica, es necesario reducir su aplicación terapéutica al tratamiento local de infecciones muco cutáneas por *Candida albicans* de localización bucal, esofágica o vaginal.

Apenas se absorbe por el tracto gastrointestinal, y se elimina totalmente por las heces la cantidad administrada por vía oral. Existen de todas formas, preparaciones adecuadas (suspensión, tabletas) para el tratamiento de esofagitis y enteritis.

Las reacciones adversas que se han descrito son escasas: náuseas, vómitos y diarrea tras la administración oral y, tras la administración tópica, ocasionalmente irritación y raramente produce alergias.

La nistatina se emplea en el tratamiento de la candidosis de localización buco faríngea, esofágica, intestinal y vaginal.⁶⁵

PREPARADOS, VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS DE LA NISTATINA

Nistatina: en grageas, suspensión oral, pomada, crema y tabletas vaginales (Mycostatin), (Sudermin), con 100 000 U por gramo de pomada o cc de suspensión y 500 000 U por gragea para el tratamiento de las micosis de hongos sensibles. Se administran 2 grageas 3 veces/día ó 2.5-5 cc de suspensión oral, enjuagándose la boca y tragándose el exceso 2-4 veces/día.⁶⁵



2.3.5 IMIDAZOLES Y TRIAZOLES

Se comportan como funguicidas a altas concentraciones y fungistáticos a bajas.

Estos fármacos inhiben la enzima esteroles 14 α -desmetilasa, dependiente del citocromo P450, inhibiendo la formación del ergosterol y aumentando la formación de esteroles 14 α - metil derivados. Además, parece ser que estos complejos inhiben la cadena respiratoria del hongo, al bloquear la cadena de transporte de electrones. La acumulación de H₂O₂ formado como producto de la cadena respiratoria del hongo es nociva para este.

Un tercer mecanismo de acción propuesto para estos compuestos para estos compuestos es la inhibición de la transformación de levaduras a hifas.⁶⁵

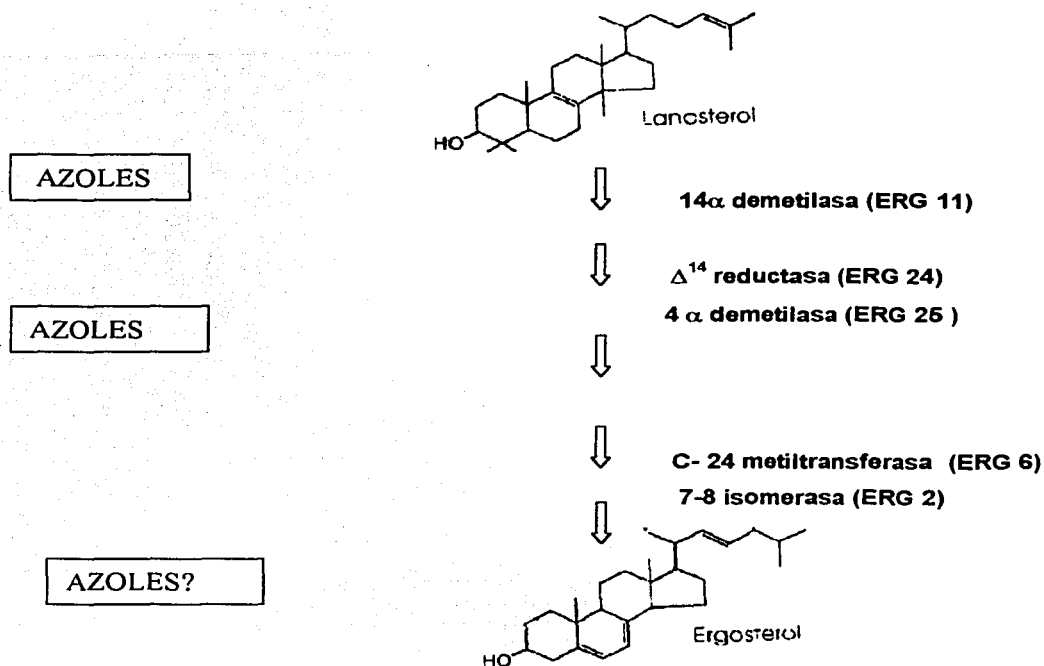


FIG.22 Biosíntesis del ergosterol y sitios de inhibición de los agentes antimicóticos de tipo azol. Tomado del artículo de Georgepapadaku²² pag 548.



2.3.5.1 KETOCONAZOL

Actividad antimicótica

Es eficaz frente a un número elevado de micosis profundas y diseminadas, aunque en muchas de ellas su actividad por vía oral es menor que la anfotericina B (por vía i.v).⁶⁵

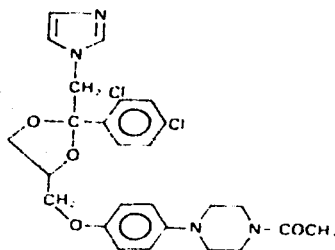


FIG.23 Estructura química del ketoconazol. Tomado del libro Oral candidosis de Samaranayake 1990⁵³.

Farmacocinética

La administración oral varía mucho de unos pacientes a otros, ya que la solubilidad depende de la existencia de un medio ácido en el estómago.

Posee una vida media entre 6 a 8 horas. Se metaboliza en el hígado en gran proporción, y se excreta por las heces (la concentración urinaria es baja).

En el plasma parece unido a proteínas plasmáticas en un 84%, un 15% a los eritrocitos y 1 % circula libre. Se distribuye bastante bien y penetra en los queratinocitos y flujos vaginales (es eficaz su administración oral para el tratamiento de micosis superficiales de cabello y piel).⁶⁵



Interacciones

La absorción oral es menor en presencia de antiácidos o antagonistas de receptores H2 de histamina (pero la presencia de alimentos no parece interferir con su absorción).

La rifampicina acelera el metabolismo hepático del fármaco y éste compite con el metabolismo de la ciclosporina y de la warfarina, aumentando la toxicidad de ambos.⁶⁵

Reacciones adversas

Las más frecuente (20%) son náuseas vómitos y anorexia. Los vómitos pueden reducirse administrando las dosis a la hora de acostarse o junto con alimentos.

Alergia, prurito, cefaleas y hemorragias gingivales son otras reacciones adversas. El ketoconazol interfiere con la síntesis de esteroides.

El incremento asintomático leve de la actividad de amino transferasa en plasma es frecuente y aparece en 5 a 10% de los pacientes. Dichos valores se normalizan de manera espontánea,. Es infrecuente la hepatitis sintomática o fármaco inducida, pero puede ser letal; dicha inflamación se puede observar después de unos días de tratamiento puede surgir muchos meses después.^{65, 23}

Aplicaciones terapéuticas

El ketoconazol se considera el antifúngico ideal como sustituto de la anfotericina B, histoplasmosis, coccidioidomicosis y blastomicosis.



Se utiliza en el tratamiento de la candidosis muco cutánea crónica y la candidosis oral y esofágica. Aunque su uso por vía oral es más efectiva para la vulvo vaginitis candidosica, se prefiere utilizar el tratamiento tópico con otros fármacos, debido a la posibilidad de desarrollo de hepatitis y teratogenia.⁶⁵

Preparados y vías de administración y dosis

Ketoconazol (Fungarest, Panfugol): en comprimidos de 200mg, suspensión de 20mg/mL, crema al 2 5y óvulos de 400 mg, para el tratamiento de las micosis superficiales y profundas y mantenimiento y profilaxis y de la aparición y la recurrencia de micosis en inmunodeprimidos. Dosis habitual: 200mg una vez al día; en candidosis vaginales. 400 mg v.o durante 5 días o 1 óvulo diario.⁶⁵

2.3.5.2 MICONAZOL

Se trata de un antifúngico de amplio espectro.

Mecanismo de acción

Tiene un mecanismo de acción similar al del ketoconazol. Además, actúa en la membrana celular, alterando la captación de glutamina, un precursor de muco polisacáridos y de los precursores purínicos de los ácidos nucleicos.⁶⁵

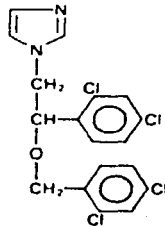


Fig.24 Estructura del miconazol.

Farmacocinética

Se absorbe por el tracto gastrointestinal y se administra por infusión i.v lenta en el tratamiento de micosis profundas.

Más frecuentemente se administra por vía tópica. Penetra fácilmente en el estrato córneo y persiste más de 4 días tras la administración tópica.⁶⁵

Reacciones adversas

Por vía i.v es bastante tóxico: tromboflebitis, prurito (que puede llegar a ser incapacitante), náuseas y anorexia, taquicardia y taquipnea. Quizás debido al aceite de resino, puede elevar la concentración plasmática de lípidos (triglicéridos y colesterol).⁶⁵

Aplicaciones terapéuticas

Por vía tópica es eficaz en el tratamiento de la dermatofitosis del tipo de tiña del cuerpo y pitiriasis versicolor.



Por vía oral, para el tratamiento de candidosis bucofaríngeas e intestinales.⁶⁵

Preparados, vías de administración y dosis

Miconazol: (Daktarin, Fungisidin): en gel oral, crema 2%. polvo y pomada vaginal. Se aplica 1-2 veces al día. Para onicomycosis por hongos sensibles.⁶⁵

2.3.5.3 FLUCONAZOL

Es un triazol unas 100 veces más potentes que el ketoconazol, con potente actividad frente a candidosis vaginales y mucocutáneas.

Mecanismo de acción

El Nitrogeno del anillo azólico del fluconazol se une a la enzima del lanosterol 14 α -demetilasa dependiente del citocromo P450 del hongo, inhibiendo la conversión del lanosterol a ergosterol. La disminución de ergosterol altera la permeabilidad de la membrana.⁶⁵

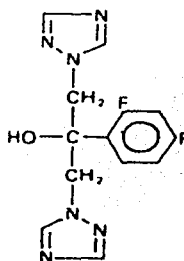


FIG.25 Estructura química del fluconazol. Tomado del libro Oral Candidosis de Samaranayake 1990.

Farmacocinética

Se absorbe casi por completo por el tracto gastrointestinal (las concentraciones plasmáticas son iguales tras la administración i.v u oral), y su absorción no es interferida por la presencia de alimentos o alteraciones de la acidez gástrica. Su biodisponibilidad es mayor del 90%. Circula unido a proteínas plasmáticas sólo en un 11 %. Difunde rápidamente a los tejidos y alcanza concentraciones terapéuticas incluso en la expectoración y la saliva. El Fluconazol penetra fácilmente en líquidos corporales, incluidos esputo y saliva. Las concentraciones en el Líquido Cefalo Raquídeo son de 50 a 90% de los valores simultáneos en plasma.²³

Interacciones

El fluconazol puede aumentar concentraciones plasmáticas de fenitoína, sulfonilureas, warfarina y ciclosporina.⁶⁵



Reacciones adversas

Son escasas: alteraciones gastrointestinales menores, alergias, alteraciones transitorias de las transaminasas y trombocitopenias.⁶⁵

Aplicaciones terapéuticas

Se utiliza en casos de candidosis oral o esofágica en enfermos de SIDA y en meningitis por *Cryptococcus* en pacientes infectados por VIH/SIDA.⁶⁵

Preparados, vías de administración y dosis

Fluconazol: (Diflucan, Afungil) en cápsulas de 50, 100, 150, 200mgy viales de 100 y 200 mg, para el tratamiento sistémico de hongos sensibles.⁶⁵

2.3.5.4 ITRACONAZOL

Es un triazol estrechamente relacionado con el ketoconazol, con menos efectos secundarios y algo más amplio espectro de acción(Dermatofitos, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* y *Aspergillus*)

Se absorbe fácilmente por vía oral. También se administra por vía tópica, y en algunos tejidos se puede observar concentraciones 10 veces superiores a las plasmáticas: en el estrato córneo persiste 4 semanas tras el cese del tratamiento.⁶⁵



Interacciones

La rifampicina estimula el metabolismo del itraconazol.

El itraconazol provoca reacciones gastrointestinales menores en 10-15% de pacientes. También se han referido alergias, prurito, edemas en extremidades inferiores, parestesias, impotencia y disminución del libido.⁶⁵

Preparados, vías de administración y dosis

Su presentación más frecuente es la vía oral de tabletas de 100/mg/24hrs (Sporanox).⁶⁵

2.3.5.5 CLOTRIMAZOL

Es un antimicótico cuyo mecanismo de acción se localiza en la membrana de la célula: perturba el transporte de algunos aminoácidos y , en consecuencia, la síntesis de proteínas.

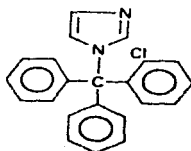


FIG.26 Estructura del clotrimazol. Tomado de libro Oral candidosis Samaranayake 1990.



Su absorción es menor del 0.5% tras su administración tópica. Por vía vaginal, llega al 10 %. La pequeña cantidad absorbida se metaboliza por el hígado y se excreta por orina y heces.

Las reacciones adversas son escasas: eritema, edema y otras manifestaciones alérgicas.

Se emplea en dermatofitosis eficaz en 60 a 100% y en candidosis cutáneas en 80 a 100%. En vaginitis candiadiasica en 7 días da un resultado del 80 %.⁶⁵

Preparados, vías de administración y dosis

Clotrimazol: (Canesten) en crema, solución, polvo o comprimidos vaginales de 100 o 500mg (una sola vez).⁶⁵

2.3.5.6 ECONAZOL

Se trata del derivado de la molécula del miconazol sin un cloro en el segundo anillo de la molécula. Penetra fácilmente en el estrato córneo y pueden observarse concentraciones eficaces hasta la dermis, encontrándose solo en sangre el 1%.

Las reacciones adversas son escasas: eritema local y prurito.

Se emplea en el tratamiento de tiñas de los pies (4 semanas) inguinal y corporal(2semanas) y candidosis cutáneas superficiales.⁶⁵

Preparados, vías de administración y dosis



Econazol.: (Ecotam) en crema, óvulos, polvos (con 10/mg/g) y comprimidos vaginales (Conazol K).⁶⁵

2.3.6 FLUCITOSINA

Química y origen

Es un análogo de la citosina. Se trata de la 5-fluorocitosina. Carece de actividad citotóxica frente a células de mamífero, pero posee actividad antifúngica.⁶⁵

Mecanismo de acción

El fármaco penetra en la célula del hongo, por la acción de la permeasa de la citosina, donde sufre la desaminación (citosina desaminasa) a 5- fluoracilo. Este último compuesto se transforma en 5-fluoracilo-ribosa monofosfato, por acción de la pirofosforilasa de uridina monofosfato.

El 5-fluoracilo monofosfato se transforma en el trifosfato y se incorpora al ARN de la célula, desplazando al uracilo del hongo.

Una segunda vía de acción, partir del 5- fluoracilo ribosa monofosfatos la reducción proporcionando 5-fluoruro-dexosiuridina 5 monofosfato que resulta un potente inhibidor de la timidilato sintetasa en hongos y células de mamíferos, lo cual significa un bloqueo de la síntesis de la timidina monofosfato y consecuentemente de ADN.⁶⁵

Actividad antimicótica

Es activo ante *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*.⁶⁵



Farmacocinética

Se absorbe bien por el tracto gastrointestinal y se distribuye fácil y rápidamente por el organismo. Aparece en LCR (concentraciones del 65 al 90 % de las plasmáticas) y en humor acuoso, sinovial y saliva(un 25 %).

Se une muy poco a proteínas plasmáticas. Se excreta por orina (80%) sin ser metabolizada, y su administración debe ser cuidadosamente regulada por enfermos con alteraciones renales previas. Su vida media es de 3 a 5 horas.⁶⁵

Reacciones adversas

Puede deprimir la médula ósea y producir leucopenia. Otros efectos adversos son alergias, vómitos, náuseas, diarrea o enterocolitis grave.⁶⁵

Aplicaciones terapéuticas

Infecciones del tracto urinario causadas por *Candida* y en combinación con anfotericina B y en meningitis por *Cryptococcus* y *Candida*.⁶⁵

2.3.7 NUEVOS AGENTES ANTIMICÓTICOS

Los nuevos agentes antifungicos han sido originados de una cuestión casual o de la proyección de nuevos sitios blanco de productos naturales y sintéticos los cuales han sido llevados a su optimización.²²



2.3.7.1 EQUINOCANDINAS, PNEUMOCANDINAS Y PAPULOCANDINAS

Estos antifungicos son productos naturales descubiertos en los años 70. La equinocandinas son ácidos grasos derivados del ciclo hexapetidos, las papulocandinas son ácidos derivados del disacáridos β -(1,4)-galactosa y glucosa. Ambas clases inhiben la síntesis de glucano no competitivamente, sin embargo podrían ligarse a diferentes sitios de la síntesis de glucanos desde algunas cepas resistentes a los equinocandinas y con más susceptibilidad a las papulocandinas. Los glucanos son homopolímeros de glucosa β (1-3) unidos a los residuos con ocasionales cadenas laterales β (1-6) y que son los mayores componentes de la pared celular micotica. La polimerización es catalizada por β (1-3) glucano sintetasa.

La papulocandinas no han sido ampliamente usadas como antifungicos, debido a que la actividad *in vitro* es limitada a las especies de *Candida*. Las equinocandinas han tenido actividad *in vitro* y en animales. Dos soluciones acuosas semisintéticas derivados de equinocandina B y neumocandina B, han registrado resultados *in vitro* e *in vivo* contra especies de *Candida*.²²

Villanueva reporta el uso de la caspofungina que es un nuevo antifungico de amplio espectro y que pertenece al grupo de las equinocandinas. En su estudio conduce a estimar la eficacia, seguridad y la tolerabilidad de la caspofungina con relación a la anfotericina B en pacientes adultos con endoscopia documentada y esofagitis sintomática. Este reporte provee la primera demostración de la utilidad clínica para una equinocandina compuesta. La Caspofungina fue más efectiva y mejor tolerada que la anfotericina B para el tratamiento de candidosis esofágica.⁶⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2.3.7.2 POLIOXINAS Y NICOMICINAS

Las polioxinas y la nicomicina son antibióticos péptido nucleótidos producidos por *Streptomyces* y descubiertas en los 60 y 70. Estos inhiben a la síntesis de la quitina competitivamente, actuando como a análogos del substrato UDP (uridil difosfato) *N*-acetilglucosamina. La quitina es un homopolímero de $\beta(1,4)$ de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y es el mayor componente de la pared celular.

Las polioxinas y nicomicinas han tenido una modesta actividad contra patógenos humanos debido a las limitaciones de transporte: como lo son la toma por una permeasa dipéptido en los fluidos del cuerpo que antagonizan su transporte. La nicomicina Z es la única de esta clase que ha demostrado una actividad en modelos animales como un agente y sinérgico con la inhibición de la síntesis del ergosterol, esta se encuentra en fase I.²²

2.3.7.3 PRADAMICINAS Y BENANOMICINAS

Estos medicamentos son en realidad quinonas benzonofaticinas conjugadas con D-amino ácido y una cadena lateral discarida.

Su acción antifúngica incluye al calcio dependiente de un complejo grupo de carboxilos con la porción sacarida de las manno proteínas de la superficie celular seguida por un rompimiento de la membrana plasmática y la salida del potasio intracelular.

La Pradimicina es activa en modelos animales de candidosis y anfotericina B. La Pradimicina es soluble al agua como el BMS 181184 el cual es sintetizado experimental, pero su desarrollo ha sido parado por sus efectos tóxicos.²²



2.3.7.4 NUEVAS TERAPIAS ANTIMICÓTICAS

Entre estas se encuentran según la revisión de Graybill la combinación de antifungicos como se realiza en estudios animales con la flucitosina y el flcuonazol para el tratamiento de infecciones debido a *Candida tropicalis* y *C.albicans*, sin embargo un similar beneficio de interacción fue revisado, con resultados en desacuerdo.²⁵

Graybill también enuncia en la revisión en aumento de las defensas del huésped incrementando el interés de la combinación de agentes antifungicos con citosinas, las cuales son los mediadores de la respuesta inflamatoria y respuesta inmune. Se menciona tambien en estudios en animales el uso del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) para candidosis los cuales son mas numerosos y podrían beneficiar, sin embargo mucho a quedado sin claridad.²⁵



2.3.7.5 ANTIMICÓBICOS PARA EL TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS BUCAL

Tópicos

La nistatina y la anfotericina B son producidas por especies de *Streptomyces*. Estos agentes actúan por en lace al ergosterol y posiblemente a otros esteroles en la membrana celular del hongo alterando la permeabilidad, además de formar canales que da salida a los componentes celulares y traen la muerte celular.

La nistatina es el agente mas ampliamente usada para el inicio del tratamiento de pacientes con candidosis bucofaringea. Este es disponible como enjuague bucal, crema tópica, pastillas orales y polvo. La nistatina no se absorbe sistemicamente y además esta ausente de una seria toxicidad. Efectos adversos generalmente envuelven el tracto gastrointestinal e incluye nausea, Vomito y diarrea. El enjuague de nistatina es altamente endulzado con sucrosa y podría ser usado en pacientes con xerostomia y edentulos, para quienes tabletas puedan ser dificiles de disolver e irriten la mucosa bucal, particularmente si la mucosa es friable.

La nistatina es comúnmente usada como profiláctico para el tratamiento de candidosis en pacientes con SIDA o cáncer, aunque varios reportes de la revisión del autor han mostrado fallas al tratamiento y prontas recaídas.¹⁸

Darwase demostró que *in vivo* la exposición a la nistatina produce una significativa reducción en la adhesión de *Candida* a las células epiteliales de pacientes diabéticos y de pacientes sanos o controles.¹⁶



Boon reporto en su estudio de infantes y recién nacidos con candidosis bucal a los cuales se les aplico ketoconazol en suspensión (20mg por ml) al cual se le comparado con la nistatina (100.000U por ml). Como resultado el 80% de los pacientes con nistatina fueron curados y en el 94% con ketoconazol por lo que se concluyo que el este ultimo es mas efectivo y eficiente contra la candidosis bucal.⁹

El clotrimazol un imidazol de amplio espectro fue el primer antifungico de amplio espectro de esta clase. Las tabletas de clotrimazol son más agradables que la suspensión de nistatina y podría ser usado en pacientes que toleren el sabor de la nistatina. El clotrimazol ha sido reportado como efectivo en la profilaxis y tratamiento de candidosis bucal y en pacientes con cáncer, en los cuales podría prevenir el desarrollo de esofagitis, al parecer es menos efectivo que el fluconazol en pacientes con VIH que tienen candidosis bucal.⁶⁵

Tratamientos sistémicos

La terapia sistémica podría ser necesaria en pacientes con candidosis bucofaringea que son refractarias al tratamiento tópico y quienes no toleran los agentes tópicos, además de pacientes con riesgo de infección sistémica. El polieno antimicótico anfotericina B ha demostrado ser el más efectivo cuando se administra intravenosamente en pacientes con una severa candidosis bucofaringea o quienes tienen infecciones refractarias a otros agentes.



Esta rutina para el uso de la anfotericina B para candidosis bucal ha sido limitada por sus efectos tóxicos. La toxicidad afecta a varios órganos e incluye toxicidad general.¹⁸

En cuanto a los azoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol e itraconazol) han sido usados ampliamente en infecciones superficiales. El ketoconazol fue el primer imidazol encontrado para tener actividad sistémica. Sin embargo esta ha sido efectiva en el tratamiento de candidosis bucofaríngea en pacientes con cáncer y VIH, sin embargo se ha demostrado que el ketoconazol es menos efectivo que el fluconazol. El ketoconazol requiere acidéz gástrica para su absorción, el cual podría reducir su efectividad en pacientes con SIDA u otros desordenes gastrointestinales.¹⁸

Los triazoles, fluconazol e itraconazol son nuevos azoles disponibles. El fluconazol es particularmente usado en pacientes que requieren prolongada terapia antifungica, porque es relativamente bien tolerado y es tomado solo una vez al día. Ambos han demostrado ser efectivos en tratamiento de candidosis bucofaríngea en pacientes con HIV y cáncer.¹⁸

EL itraconazol tambien ha sido encontrado ser más efectivo en el tratamiento de candidosis crónica bucal y infección de candidosis en VIH. Sin embargo ha sido recomendad que la dosis de itraconazol podría ser incrementada del estándar de 100mg una vez al día para pacientes no inmunocomprometidos a 200 mg una vez al día para pacientes con SIDA debido a al reducción de la absorción de la droga en estos individuos.¹⁸



2.3.7.6 GUIA PRACTICA DEL TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS BUCAL

Las terapias tópicas podrían ser la primera elección para la infección local. En la opinión de Epstein cuando la terapia sistémica es juzgada necesaria, medicamentos tópicos podrían ser continuados en sospecha de infección orofaríngea, debido a que esta podría permitir una dosis baja y una corta duración de la terapia sistémica. Porque pocos medicamentos pueden permanecer en contacto con los tejidos bucales por periodos prolongados, las aplicaciones de terapias tópicas son necesarias.

En la elección del medicamento podría tomarse en consideración las condiciones de la cavidad bucal y el costo. Tales factores como el sabor, textura y en todo caso el alcohol podría considerarse cuando es seleccionado un medicamento y su formulación. Varios de los productos bucales contienen una alta concentración de sucrosa y esta contiene un alto potencial cariogénico, lo cual es particularmente importante en pacientes dentados con boca seca. En pacientes con boca seca, las tabletas administradas para disolver en la boca podrían ser poco solubles y la superficie áspera de los tejidos blandos de la cavidad bucal traerían irritación.; suspensiones orales podrían ser una buena elección en estos pacientes. Formulaciones en crema de medicamentos apropiados podrían ser fácilmente aplicadas solo en superficie de tejidos de dentaduras. Las cremas son aplicadas en las comisuras labiales. Una simple dosis proveerá información sobre la aceptabilidad del producto.¹⁸

El manejo de la candidosis bucal según Rex es dominado por los azoles. Estos fármacos pueden ser usados sistémicamente y tópicamente, estas proveen seguridad y eficacia. Un problema en este tipo de lesiones es la



propensión a la recaída, algunas de estas son debido al estado inmunológico del paciente como en la infección por VIH.

La guía practica para el tratamiento según este autor es la siguiente:

Objetivo. La eliminación de los signos y síntomas de la enfermedad y la prevención de la recurrencia.⁴⁹

Opciones del tratamiento. Los azoles como las tabletas de clotrimazol, así como cápsulas fluconazol, ketoconazol o itraconazol o polienos orales como la nistatina o anfotericina B en suspensión son usualmente efectivos. Para las infecciones recurrentes la administración oral y absorbible de azoles como el ketoconazol, fluconazol e itraconazol (solución) así como la anfotericina B en suspensión o por vía intravenosa (solo en infecciones recurrentes) podrían ser usados.

Resultados. Solución de la patología sin recurrencia.

Evidencias clínicas. En pacientes VIH infectados, sintomáticamente podrían desarrollar resistencia con cada régimen. Por lo tanto de acuerdo a la revisión de este autor la terapia con fluconazol es superior al ketoconazol y el itraconazol en cápsulas son equivalentes en eficacia al ketoconazol. La solución al itraconazol es mejor absorbida que las cápsulas y esto es comparable al fluconazol. Las terapias crónicas y supresivas con fluconazol es efectiva en la prevención en la candidosis bucofaringea en SIDA. La terapia supresiva crónica.

Los polienos orales, como la anfotericina B y la nistatina son menos efectivos en la prevención de esta infección.

Las infecciones recurrentes en terapia con azoles en VIH son asociados al fluconazol y $CD4 < a 50/mm^3$. En casos como este la terapia antiretroviral disminuye los episodios de recaída de candidosis bucofaringe.⁴⁹



2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL GÉNERO CÁNDIDA

La resistencia a los polienos es virtualmente desconocida en años de uso clínico según Epstein.¹⁸

Pero en la revisión de Georgepapadaku menciona que la resistencia a los polienos es asociada con alteración de los lípidos de la membrana, particularmente los esteroides. Otro mecanismo de resistencia podría involucrar la alteración de fosfolípidos y el incremento de la actividad catalítica con disminución a la alteración oxidativa. La resistencia a la anfotericina B sigue siendo rara en *Candida*.²²

Los triazoles presentan quizá el mayor problema en términos de resistencia. Los azoles actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol y el resultado de la acumulación de C sustituidos de esteroides no permiten el metabolismo celular en más hongos patógenos. El mecanismo de resistencia ha sido bien estudiado según la revisión de Graybill, con levaduras patógenas y el fluconazol. Estos tienen cuatro o quizá más mecanismos de resistencia. El primero disminuye la penetración del fluconazol al interior de la célula. Este es un amplio paso de resistencia que ha sido demostrado en *C. glabrata* y es común en otros organismos. La disminución de la penetración del fluconazol podría reflejar un flujo al fluconazol dependiente de energía a través de un transportador.

El segundo mecanismo de resistencia es el incremento de la producción de sitios blanco de la enzima para los triazoles, esencialmente resultando en el requerimiento de más fármaco para tener la misma cantidad de inhibición. Un tercer mecanismo es la mutación de la enzima blanco lo cual no permite la eficiencia de enlace de los triazoles Y el cuarto sería la habilidad del hongo



para mantenerse viable a pesar de la acumulación de intermediarios como el 14- dimetilzimosterol.²⁵

En cuanto resistencia a los azoles particularmente el fluconazol ha emergido en *C.albicans* después de largos periodos de terapia supresiva para la candidosis bucofaringea. La resistencia al fluconazol ha sido reportada en especies de *Candida* como *C. glabrata* y *C. krusei*. La resistencia es debido a la disminución de la permeabilidad de la membrana resultando cambios en los esteroides de la membrana, un flujo activo y alteración y sobreexpresión en P-450 (correspondiente a la enzima en la 14- α desmetilasa de lanosterol) que contribuye a la formación del ergosterol. La trasportación asociada a la resistencia es asociada con el incremento del flujo. Existen dos tipos de bombas de flujo en las levaduras, el ATP de enlace del tipo cassette (ABC) y los facilitadores mayores (MFs). Cerca de 30 genes que codifican transportadores ABC y MF se han identificado en *C.albicans*. Dentro de los transportadores ABC identificados en la resistencia a los azoles ha estado relacionado el CDR en *C.albicans*. y dentro de los MFs se ha correlacionado la sobreexpresión de *MDR1* el cual se ha encontrado ser especifico para el fluconazol.²²

Sin embargo menciona que la resistencia a los azoles particularmente en pacientes de SIDA va apareciendo con alta frecuencia. La falla terapéutica debido a la resistencia al fluconazol en pacientes con SIDA aparece con el avance de la enfermedad o después de repetidas y prolongadas terapias.¹⁸

En cuanto a la resistencia a la 5-fluorocitocina es usualmente debido al deterioramiento de la permeasa de la citosina. La segunda forma de la resistencia común es cuando la 5.fluorocitosina es usada sola, resulta en



mutaciones en algunas de las enzimas necesarias para la acción de este antimicótico particularmente la uracil fosforibosil transferasa.²²

Resistencia al fluconazol en *C.albicans* podría ocurrir en dos caminos: en la reducción de la acumulación del fluconazol o la alteración del blanco del fármaco (14alfa-esterol demetilasa, codificado por *ERG16*). Aquí no hay una evidencia de que el fluconazol es modificado e inactivado por *C.albicans*. Pocas cepas de *C.albicans* demuestran una sobreexpresión de *ERG16* RNAm, pero esta probablemente no es la mayor causa de resistencia en estos aislamientos. La evidencia sugiere que un mecanismo de resistencia es reducir la acumulación del fluconazol, también es un resultado de la reducción de la captación o del incremento del flujo. Dos genes que también codifican proteínas podrían ser asociados con el flujo del fármaco y que han sido identificados en *C.albicans*. El gen *CDR1* codifica un ligando de ATP de tipo cassette (ATP binding cassette ABC) que es un transportador. Un número de aislamientos de resistencia a los azoles de *C.albicans* de pacientes de SIDA ha demostrado un incremento en las cantidades de *CDR1* en el RNAm, implicando un rol de esta proteína en la resistencia a los azoles. Para clarificar además el supuesto rol de proteínas de flujo para el fármaco en resistencia a los azoles de *C.albicans* de tal manera se han aislado mutantes resistentes al fluconazol de *C.albicans*.⁵⁶

De acuerdo al estudio de Gregory, un mutante de *C.albicans* resistente al fluconazol fue aislado de un medio que sí contenía fluconazol. Las células de la cepa mutante, demostraron una reducción en el tipo de acumulación, comparado con la cepa inicial y no fue resistente a otro tipo de antifúngico de tipo azol. Las cepas resistentes al fluconazol de *C.albicans* contenían un elevada cantidad de enlaces de RNAm codificados por *CDR1*, y un tipo de



transportador de ATP ligando del tipo cassette (ABC). Además las mutantes de *C.albicans* aumentaron el RNAm codificado por *BEN^r*, un facilitador mayor de la superfamilia de transportadores. El resultado de este estudio sugiere que el fluconazol entra a las células de *C.albicans* por difusión facilitada y que la resistencia al fluconazol podría envolver flujo del fármaco dependiente de energía asociada al incremento de *BEN^r* y/o *CDR1*.¹

El SIDA es caracterizado por un marco de depresión celular inmunológica que algunas veces permite múltiples infecciones oportunistas y en particular infecciones micóticas. Estudios retrospectivos han revelado que de 60 a 80% de los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia VIH desarrollan uno o más infecciones fúngicas en algún tiempo durante su enfermedad la más frecuente sigue siendo candidosis bucofaringea. El mayor agente de candidosis bucofaringea es *C.albicans* sin embargo otras especies también participan como *C. tropicalis* *C.glabrata* o *C. krusei* han también sido implicadas.⁵⁴

El tratamiento de las infecciones de *C. albicans* han sido facilitadas desde la introducción de antimicóticos de tipo azol en lo particular fluconazol. Porque de este la solubilidad en agua y su alto grado de biodisponibilidad después de la administración oral este ha sido usado extensamente para el tratamiento de un amplio rango de infecciones de *Candida*. El nivel de este azol para el tratamiento de candida bucofaringea en pacientes con SIDA ha sido aumentado dramáticamente. Usualmente la respuesta clínica en pacientes con candidosis bucofaringea es satisfactoria pero las requeridas o reinfecciones frecuentemente ocurren probablemente debido a una incompleta erradicación de células levaduriformes en pacientes tratados.



Además varios pacientes con SIDA han recibido fluconazol por largos periodos de tiempo y para profilaxis. Estos cursos de tratamiento repetido y múltiples exposiciones de múltiples especies de *Candida* a los azoles con un resultado del desarrollo de resistencia al fluconazol.

Existe un número limitado de reportes de los mecanismos de resistencia clínica de *C. albicans*, estas cepas han sido usadas en estudios y fueron aisladas de pacientes después de la falla al tratamiento con los derivados azólicos como ketoconazol y más recientemente al fluconazol. Mecanismos de resistencia han sido reportados uno de estos reduce la permeabilidad de varias cepas de *C. albicans* a los agentes antimicóticos de tipo azol posiblemente envolviendo cambios en los fosfolípidos y en los esteroides de la membrana. Otro mecanismo de resistencia fue documentado en una cepa clínica resistente a los azoles de *C. albicans* con Vanden Bossche el cuál el blanco de los agentes antifúngicos P-450 (14 demetilasa) continuó activo pero tuvo una baja afinidad hacia los azoles. Howell investigó otra cepa resistente de *Candida albicans* y observó que estas exhibían un alto contenido del colesterol .

Los mecanismos de resistencia han sido también investigados en especies de *Candida* aislados después de tratamientos con antimicóticos de tipo azol. Vandemn Bossche reportó un aislamiento clínico con *C. glabrata* con resistencia cruzada al ketoconazol e itraconazol la resistencia fue debido al efecto de reducción de la permeabilidad a los azoles, altos contenidos de 14 α demetilasa en la célula.⁵⁴

La investigación de los mecanismos de resistencia hacia los agentes antifúngicos a nivel molecular en aislamientos clínicos de *C. albicans* este estudio se enfoca en mecanismos de resistencia relacionados a los puntos blancos de los azoles como el citocromo P-450 de la 14 α desmetilasa estos



regulan el transporte o la acumulación de fluconazol. El análisis secuencial de los aislamientos de *C. albicans* con incremento de los niveles de resistencia al fluconazol de 5 pacientes con SIDA demostraron que la sobreexpresión del gen que codifica la metilasa también por la amplificación o por la desregulación del gen no fue una mayor causa entre los aislamientos clínicos. En este reporte se encontró que la resistencia al fluconazol de *C. albicans* fallaron para la acumulación de un fluconazol marcado. De hecho algunos pero no todos los aislamientos al fluconazol de *C. albicans* exhibieron un incremento en los niveles de RNAm por una reciente clonación del transportados ABC del recién llamado CDR1 en un aislamiento resistente al azol de *C. albicans* no sobre expresó CDR1, otro gen para las bombas de flujo llamado BEN^f fue masivamente sobre expresado al menos la sobreexpresión o sobreregulación de estos dos genes potencialmente median la resistencia a los azoles en aislamientos de *C. albicans* de pacientes con SIDA de candidosis bucofaringea.⁵⁴

De tal manera Lyons en su estudio describe que el amplio uso de los antifungicos ha permitido el desarrollo de resistencia en aislamientos. Varios mecanismos han contribuido a la resistencia del fármaco y han sido identificados como el incremento de los niveles de RNAm para dos tipos de bombas de flujo. Como el ATP ligando de tipo cassette que es transportador, los CDRs (*CDR1* y *CDR2*) así como el facilitador mayor el gen *MDR1*. Los en sayos en este estudio demostrar que *MDR1* y *CDR* mRNAs son transcripcionalmente sobre expresados en los aislamientos resistentes de *Candida albicans*.³⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Los mecanismos de resistencia a los agentes antifúngicos de tipo azol fueron investigados en el estudio Sanglard dos pares de aislamientos clínicos de *Candida glabrata* recuperados de dos pacientes con SIDA . Cada par contenía un aislamiento susceptible al fluconazol y otro resistente a fluconazol, después con resistencia cruzada a itraconazol y ketoconazol. Desde la acumulación de fluconazol fue reducido en los aislamientos resistentes a los azoles, realizó el flujo de la droga el cuál fue considerado como un mecanismo de resistencia. La expresión de los genes transportadores del flujo de los multifármacos fue además examinado en los aislamientos de levaduras susceptibles y resistentes a los azoles para este propósito los genes que confieren resistencia a los azoles antifúngicos *C.glabrata* fueron clonados de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* el cuál (ATP binding cassette) ABC del gen transportador del *PDR5* fue suprimido . Los tres diferentes genes fueron recobrados y entre ellos solo *CDR1 C.glabrata (Cg CDR1)* un gen similar al de *Candida albicans*, en los transportados ABC de sus genes *CDR*, fue sobrerregulado en los aislamientos resistentes a los azoles. Una correlación entre la sobrerregulación de este gen y la resistencia a los azoles fue en estos establecida . La supresión del gen *CgCDR1* en un aislamiento clínico resistente al azol *C. glabrata* rindió el resultado de un mutante susceptible a los derivados azólicos como en la cepa susceptible al azol de origen , estos demostraron una evidencia genética que un mecanismo fue envuelto en la resistencia de un aislamiento clínico , el estudio demostró por primera vez la determinación del rol de un gen que codifica un transportador ABC en la adquisición de resistencia a los antifúngicos por los aislamientos de *C. glabrata*.⁵⁴



Sanglard determinó que la alta frecuencia de resistencia a los azoles por *Candida glabrata* es determinada in vitro por la sobrerregulación de genes *CgCDR1* and *CgCDR2*.⁵⁴

Franz en una serie de aislamientos de *Candida albicans* de episodios de candidosis bucofaringea de 4 pacientes con SIDA los cuáles obtuvieron resistencia durante la terapia y fueron analizados por métodos moleculares. La huella de los patrones de los aislamientos demostraron que los cuatro pacientes que desarrollaron resistencia al fluconazol en una cepa previamente más susceptible en dos casos la resistencia se correlacionó con el aumento de la expresión de la codificación de múltiples genes en proteínas para resistencia al fármaco que median el flujo del fármaco. Aumentado los niveles de RNAm de los CDR1/CDR2 que codifican los transportadores ABC que fue observado en los aislamientos de resistencia al fluconazol de un paciente comparado correspondiente a un aislamiento susceptible. Los aislamientos resistentes al fluconazol de otro paciente exhibieron altos niveles de RNAm del gen CDR1 que codifica un transportador proteínico de la membrana del facilitador de la superfamilia que no fue expresado ni detectado en ninguno de los aislamientos susceptibles al fluconazol. Estos resultados demostraron que los pacientes con SIDA desarrollan resistencia al fluconazol y este es causado por cambios moleculares, de una previa cepa susceptible de *C albicans* del mismo paciente²¹.

El esteroles 14 α desmetilasa P-450 (CYP51) de un aislamiento resistente al fluconazol de *Candida albicans*, demostró reducción de la susceptibilidad a este azol pero con un ligero cambio en la actividad catalítica. Doce substituciones de nucleótidos resultando en cuatro cambios de aminoácidos



fueron plenamente identificados en el gen *CYP51* (codifica la 14 desmetilasa p-450) en comparación con un reporte de la secuencia del *CYP51* de una desordenada susceptibilidad al fluconazol de *C. albicans*. Siete de estas substituciones incluyen todos los demás cambios en los aminoácidos. Estos hallazgos sugieren que parte de la resistencia al fluconazol del fenotipo de *C. albicans* fue adquirida a través de una mutación puntual del área del *CYP51*, la cuál podría promover la resistencia al fluconazol.⁴

Los mecanismos moleculares de la resistencia de *Candida albicans* a los azoles, incluyen alteraciones en la enzima blanco e incremento del flujo del fármaco han sido descritos pero la epidemiología de los mecanismos resistencia no han sido establecidos. En el estudio de Perea han investigado los mecanismos de la resistencia a los azoles en cepas *C. albicans* exhibiendo altos niveles de resistencia al fluconazol (CMI, mayor 64 microgramos/ml) aislado de pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia adquirida VIH con candidosis bucofaringea. Los niveles de expresión de los genes que codifican la α 14 desmetilasa de lanosterol (ERG 11) y los transportadores de flujo (MDR1 y CDR) implicados en la resistencia a los azoles fueron monitoreados en grupos de aislamientos con susceptibilidad y resistencia. Además los genes ERG11 fueron amplificados por PCR y la secuencia de sus nucleótidos fueron detectados puntos mutantes con un posible defecto en la afinidad por los azoles el análisis del estudio confirmo la naturaleza multifactorial de la resistencia al azol y la prevalencia de estos mecanismos de resistencia en *C. albicans* exhibieron una franca resistencia al fluconazol, con un predominio de la sobreexpresión de los genes que codifican las bombas del flujo, detectado en 85% de todos los aislamientos resistentes. Las alteraciones de la enzima blanco, incluyen una substitución funcional de aminoácidos y sobreexpresión del gen que



codifica la enzima, fueron detectados en 65 a 35 % de los aislamientos respectivamente sobretodo múltiples mecanismos de resistencia fueron combinados en el 75% de los aislamientos exhibiendo altos niveles de resistencia al fluconazol. Los resultados del estudio podrían ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias para resolver el problema de resistencia a sí como nuevos tratamientos para esta condición. ⁴

El citocromo P-450 del lanosterol de la 14 α demetilasa de *Candida* está envuelto en un importante paso en la biosíntesis de ergosterol desde que la 14 α desmetilasa es el agente blanco de los agentes antifúngicos del grupo azol, esta enzima está potencialmente en pro de las alteraciones que la llevan a la resistencia a estos agentes. Entre ellos un decremento en la afinidad de dicha enzima para estos agentes es posible en el estudio de Sanglard en un grupo de aislamientos de *Candida albicans* de pacientes con SIDA donde transportadores para el flujo del fármaco jugaron un papel importante en la resistencia de *C. albicans* para los antifúngicos de tipo azol. Además se analizó los cambios en la afinidad de la enzima para estos antifúngicos Una de las estrategias consistió en la expresión funcional en *Saccharomyces cerevisiae* de los genes de *Candida albicans* que codifican la enzima de una secuencia de aislamientos clínicos provenientes de pacientes que fueron designados. Esta selección la cuál fue acoplada con un test derivada de los azoles como el fluconazol, ketoconazol e itraconazol, facilitó la detección de mutaciones en genes diferentes clonados para la enzimas, quienes sus productos fueron afectados en su afinidad por los derivados azólicos. Esta selección facilitó la obtención de 5 diferentes mutaciones en la clonación de genes de la enzima los cuáles se relacionaron con la recurrencia de la resistencia de aislamientos clínicos de *C.albicans*. Las mutaciones fueron seguidas: con la sustitución de la glicina en la posición



129 con la alanina y otros aminoácidos. El sitio directo de la mutagénesis de un desordenado gen para la enzima 14 α desmetilasa fue ejecutado para estimar el efecto de cada una de las mutaciones sobre la resistencia de cada una de estas. Cada mutación individual con la excepción de un gen tuvieron un efecto medido en la afinidad de la enzima blanco para derivados específicos azólicos. Esto especula que las mutaciones específicas pueden combinar con el efecto de transportadores de flujo de los fármacos en los aislamientos clínicos el cuál contribuye a los diferentes patrones y pasos que incrementa en la resistencia de los derivados azólicos.

Los derivados azólicos inhiben la CYP51A1 por interactuar con la parte del doblez de la molécula de la enzima desmetilasa. Esto es creible que el desordenado átomo de nitrógeno del anillo azólico (N3 en imidazol o N4 en derivados) para la porción de hierro en la sexta posición coordinada. El bloqueo de esta posición, la cual es requerida para activar el oxígeno para la hidroxilación de grupo 14 α metil de lanosterol, previene la iniciación de la hidroxilación de la reacción. La estructura lipofílica y orientación estereoquímica de la N-1 cadena lateral de los derivados azólicos juegan un papel importante no solo en la afinidad de estos agentes antifúngicos para sus blancos como también para su selectividad. Los derivados también se ajustan en la CYP51A1 del sustrato depositado, aceptado normalmente en el lanosterol como sustrato. ¿Como las mutaciones descritas en el CYP51A podrían tener alteraciones en la afinidad de los azoles? Existen dos posibilidades 1) el aminoácido afectado por la mutación esta en contacto directo con alguna parte del azol y esta substitución resulta en un menor eficiencia de unión del azol con la proteína mutada. 2) la substitución del aminoácido desplazado en la estructura tridimensional arreglada (α hélices o β plegadas) importantes para el enlace óptimo de la molécula de azol y



también sus resultados en la reducción de la afinidad de la proteína mutada para los azoles.⁵⁵

Calabrasc identificó una adicional resistencia de los genes de *C.albicans*, transfectando a *Saccharomyces cerevisiae* con el archivo genético de *C.albicans* faltando el gen que codifica ABC (ATP ligando de tipo cassette) siendo este un transportador. Entre los genes obtenidos de *C.albicans* un nuevo gen es aislado y se le denominó *FLU1* mostrando similitud con *CaMDR1* es un facilitador mayor de los transportadores para el flujo del fármaco. La disrupción del gen *FLU1* de *C.albicans* mostró un ligero efecto en la susceptibilidad de la cepa. Además *FLU1* demostró no ser requerido para el desarrollo de resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos.¹¹

Las infecciones causadas por la levadura *Candida albicans* es una de las más frecuentes y oportunistas en pacientes con el VIH. El amplio uso de fármacos antifúngicos han permitido el desarrollo de resistencia al fármaco, creando un mayor problema en el tratamiento de infecciones por levaduras en pacientes con SIDA y otros individuos inmunocomprometidos, varios mecanismos moleculares que contribuyen a la resistencia de la droga han sido identificados. En *C. albicans*, la habilidad morfológica para el cambio de células levaduriformes (blastoconidias) a forma filamentosa (seudomicelio) es un factor importante de virulencia la cuál contribuye a la diseminación de *Candida* en los tejidos del hospedero y el cuál promueve la infección y la invasión. Una correlación positiva entre el nivel de resistencia al fármaco y la habilidad para formar seudomicelio en la presencia de fármacos de tipo azol han sido identificadas. Debajo de las condiciones del seudomicelio en la presencia de un fármaco azólico, los aislamientos clínicos resistentes forman seudomicelio, donde las levaduras susceptibles no lo forman. Esta fue una



correlación observada en una muestra al azar de una población de aislamientos susceptibles y resistentes y es independiente de los mecanismos de resistencia .²⁶

2.5. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

La infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida HIV en niños produce un amplio espectro de enfermedades y una evolución clínica variable. El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida SIDA representa el extremo más grave del espectro clínico. La definición actual de vigilancia para el SIDA de los Centros por Diseases Control and Prevention (CDC) es la que rige. Los pacientes que reúnen el criterio del CDC deben ser comunicados al sector de salud pública. En muchos estados debe comunicarse la infección por VIH. Los CDC han establecido un sistema de clasificación pediátrico para niños menores de 13 años que nacieron de mujeres infectadas por HIV o que se saben que están infectados por HIV.³⁵

2.5.1 ETIOLOGÍA

El SIDA es causado por retrovirus RNA citopáticos, específicamente el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1(HIV-1) y, con menor frecuencia, HIV-2 más común en África que en Estados Unidos. El VIH es particularmente tóxico para linfocitos CD4 T helper y otras células tales como los macrófagos que tienen receptores CD4. Se desconoce el papel de los factores o la desnutrición en la historia natural de la infección por VIH. La



principal proteína vírica externa del VIH es gp120 una proteína glicosilada asociada a la gp41. La heterogeneidad de gp 120 es inmunodominante para los anticuerpos. En esta molécula se halla el lugar para la unión a los CD4. Se ha identificado otros receptores secundarios entre ellos la molécula receptora de la fusión CXCR-4 RANTES que actúa como co-receptor para la fijación del VIH a los linfocitos. ³⁵

2.5.2 EPIDEMIOLOGIA

Actualmente los modos predominantes de transmisión del VIH son los siguientes: 1) contacto sexual 2) exposición percútanea o mucosa a agujas u otros objetos punzantes contaminados y 3) transmisión madre-hijo antes del nacimiento o en ese momento.

El SIDA en los niños la mayoría han nacido en familias en los cuales uno o ambos padres están infectados por VIH. El resto incluye a pacientes con hemofilia u otros trastornos de la coagulación, que recibieron sangre, sus factores o componentes de la coagulación contaminados. Algunos han sido infectados por abuso sexual.

Se estima que el factor de riesgo para un lactante hijo de una madre HIV se encuentra entre un 13 y 39%, La infección puede ser a través de in útero o a través del parto. ³⁵



2.5.3 PATOGENIA E HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

2.5.3.1 REPLICACIÓN VIRAL Y DESTRUCCIÓN LINFOCITARIA

La infección por VIH es proceso crónico que implica una producción elevada y constante de nuevos viriones, acompañado de la consecuente destrucción de linfocitos T de tipo CD⁺4 (efecto citopático). Esta destrucción celular es compensada con una producción aumentada de linfocitos CD⁺4 durante varios años, hasta que las reservas se agotan, desembocando finalmente en una depleción de estos linfocitos, que origina inmunodeficiencia, en vista de que éstas células coordinan la respuesta inmune del organismo. El evento cardinal en la progresión a enfermedad es la replicación viral, mientras que el evento determinante del desarrollo de inmunodeficiencia es la destrucción celular linfocitaria.²

La replicación viral tiene como característica principal el ser imperfecta. La transcriptasa, reversa es la enzima que produce copia del material genético RNA-DNA viral, comete un error de copia en cada genoma que lee, de tal manera que a través de múltiples ciclos se generan poblaciones de virus semejantes pero a su vez diferente de sus ancestros. Los nuevos virus pueden tener características distintas:

- A)**Cambiar su tropismo:** (Afinidad por grupos celulares específicos), diseminando la infección a otras poblaciones celulares.
- B)**Cambiar antigenicidad,** escapando de la vigilancia y el control del sistema inmune.
- c)**Origina variantes resistentes** a medicamentos antirretrovirales.
- D)**Ser no infectantes** (defectuosas), de tal manera que desaparecen al no poder replicar.²



A las diferentes variantes presentes en un individuo se le denomina cuasiespecies y son básicas para la producción de la enfermedad. Las variantes tienen presentes en la mayoría de los individuos al principio de la enfermedad el tropismo por macrófagos, lo que les da ventaja de permanecer por largo tiempo y "escondarse" del sistema inmune, mientras que cuando existe un cambio por tropismo a linfocitos T, se facilita la infección y destrucción del sistema linfocitario y se incrementa claramente los efectos citopáticos.²

El hospedero participa activamente en la selección de diversos receptores y co-receptores para el virus, así como la constantes de variantes que se escapan de la respuesta inmune generada. Dentro de los co-receptores virales de mayor importancia se encuentran con los receptores de quimiocinas, entre los que se destacan CCR5 para cepas con tropismo para macrófagos y CXCR4 par aquellas con tropismo por linfocitos T. La respuesta inmune generada por el hospedero es variada pero se considera la más importante es la citotoxicidad mediada por linfocitos T de tipo CD⁸⁺(linfocitos T citotóxicos). La generación de una respuesta citotóxica adecuada depende de la presencia CD⁴⁺, por lo tanto que la disminución de estas células afecta de manera importante la capacidad del organismo de luchar contra el virus.²



2.5.3.2 HISTORIA NATURAL

La interacción de los mecanismos arriba mencionados desencadena la evolución natural del proceso infeccioso por VIH-I. La historia natural de la infección por este virus se puede dividir en los siguientes estadios:

a) Transmisión viral

El modo de transmisión o adquisición del virus se refleja en la velocidad de progresión de la enfermedad; así el tiempo promedio desde la aparición de anticuerpos hasta el desarrollo del SIDA es de cerca de 7 años para aquellos que adquirieron la infección por transfusión y de 8 a 12 años para quienes se infectaron por relación homosexual, de acuerdo a la definición de los CDC. En 1987, siendo un poco menor se usa el criterio de <200 células CD^+4/ml , mencionada en la definición de 1993.²

b) Infección primaria

Implica no solo la adquisición de la infección viral sino las manifestaciones asociadas de replicación viral inicial. Pocas veces se detecta en población abierta. La presencia durante la infección primaria se asocia a la progresión rápida de la enfermedad. La sintomatología generalmente se presenta de 2 a 4 semanas después de la adquisición de la infección, pero a veces el periodo de incubación puede ser de hasta 10 meses. Las principales manifestaciones son: fiebre, crecimiento ganglionar, hepatoesplenomegalia, mialgias y artralgias, así como linfopenia, especialmente de linfocitos CD^+4 y altos niveles de carga viral (CV).²



C) Aparición anticuerpos (seroconversión)

Se refiere al desarrollo y detección de anticuerpos en contra del virus en suero (serología positiva). Ocurre generalmente de tres a 12 semanas después del evento de transmisión, aunque más del 95 % de los pacientes los presentan dentro de los primeros 6 meses. Al periodo que la serología es negativa en un paciente infectado se le conoce como periodo de ventana.²

D) Periodo estable inicia ("SETPOINT")

Ocurre generalmente seis meses después de la transmisión del VIH, implica la estabilización de la CV y de la cuenta de linfocitos CD⁺4 como consecuencia de la respuesta inmune y de la virulencia de la cepa viral adquirida. Los niveles de CV principalmente y también los de las células CD⁺4 en este periodo, correlacionan fuertemente con pronóstico de desarrollo de SIDA en los siguientes 6 años.²

E) Infección sintomática

Es el periodo considerado antes de la latencia, en el cual se encuentra una constante actividad viral y un equilibrio entre destrucción y producción celular (10^9 CD⁺4 por día.). Puede haber linfadenopatía persistente generalizada debido a que en los ganglios linfáticos donde se establece el principal reservorio del virus. Aun cuando la CV en este periodo permanece estable con variaciones menores a 1 log 10, el valor absoluto determina el grado de reducción progresiva de células CD⁺4 (30 a 90 células /ml por año).²



F) Infección sintomática temprana

Incluye manifestaciones clínicas que no sustentan la definición de SIDA, que se presentan como consecuencia de la destrucción de células CD4 y el inicio de la inmunodeficiencia.²

G) Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

Es la consecuencia de la destrucción de linfocitos CD4 y la presencia de inmunodeficiencia adquirida manifestada por infecciones oportunistas y neoplasias secundarias.²

H) Infección avanzada

Se presenta en pacientes con $59 <$ células generalmente fallecen como consecuencia de condiciones relacionadas al VIH.²

2.5.3.3 MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones de la infección por el VIH son muy variables entre lactantes, niños adolescentes. Los primeros síntomas pueden ser útiles del tipo de adenopatías y hepatoesplenomegalia o inespecíficos como el retraso de crecimiento, diarrea crónica. Entre los síntomas presentes con mayor frecuencia en los niños que en los adultos infectados por el VIH se encuentran las infecciones bacterianas de repetición la tumefacción crónica de la parotida y la neumonitis intersticial linfocitaria y un deterioro neurológico de comienzo precoz.⁵



2.5.3.4 TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL

Las decisiones sobre el tratamiento antiretrovirico de los pacientes pediátricos infectados por el VIH dependen de la magnitud de la replicación viral del recuento y del porcentaje de CD4⁺ y de las condiciones clínicas.

Las antiretrovirales registrados hasta 1998 se dividen según su capacidad para inhibir las enzimas transcriptasa inversa o proteasa del VIH. Los inhibidores de proteasa se subdividen a su vez en inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos (ITIN) e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos. Entre los primeros se encuentra la timidina (estaduvina d4t) y ZDV o AZT que es la Zidovudina, alcanzan buenas concentraciones en células muy activas. Mientras que DDI (dideoxiinosina), lamivudina 3TC y la didesoxitocina (ddC) son más activas en reposo. Los ITINN delavirdina, efavirenz y nevirapina actúan en otras fases de la transcripción inversa que no intervienen los ITIN. Los inhibidores de la proteasa como el ritonavir, nelfinavir, indinavir y saquinavir son fármacos potentes, activos en distintas fases de la replicación del virus y que evitan la acumulación de viriones infectivos antes de que estos abandonen las células infectadas.⁵

2.6 MANIFESTACIONES BUCALES DE VIH/SIDA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

De acuerdo a diferentes estudios reportados en la literatura las manifestaciones bucales en pacientes pediátricos se han reflejado en diferentes porcentajes esto en relación al lugar de procedencia, área geográfica, grupo étnico, nivel de inmunosupresión y factores de riesgo de



los pacientes pediátricos. Así lo señala en su estudio de Kohng Kunthian y cols donde 45 niños con VIH/SIDA entre 6 y 84 meses fueron examinados de cavidad bucal en febrero del 2000 en el Norte de Tailandia. En cual se reporta que el estado general de 23 pacientes fueron catalogados como sintomáticos 6 como ligeramente sintomáticos y 7 como medianamente sintomáticos y 9 como severamente sintomáticos.. De los cuales 48.9% o sea (22 pacientes) presentaron lesiones bucales. La lesión bucal más común en estos 22 pacientes fue candidosis eritemetosa(8pacientes) , después de leucoplasia vellosa (3 pacientes), herpes severo en cavidad bucal (1 paciente) , lengua geográfica (3 pacientes) . Vale la pena remarcar que 15 pacientes (33.3%) recibieron terapia antiretroviral (AZT + DDI). Ocho de estos pacientes con medicamentos manifestaron lesiones bucales comparadas con los 14 de 30 pacientes sin tratamiento que no marca significación en el estudio³⁴.

Infecciones fúngicas en individuos con VIH son asociadas con el avance de la enfermedad. En la infección pediátrica por VIH, niños sintomáticos tienen una significativa alta incidencia de candidosis clínica y persistente resistencia a los antimicóticos que los niños asintomático de VIH. HICKS 1998 determino la prevalencia mediante un estudio citológico preliminar de candidosis, en la cual la mayor parte de los niños sin estimulación salival y que habían adquirido verticalmente la enfermedad. La conclusión del estudio señala que la saliva podría reflejar si hay colonización o solamente portar el hongo., lo cual pudiera influir el desarrollo de candidosis clínica con significado en estos pacientes pediátricos inmunocomprometidos.

En el estudio de Costa en Brasil a 41 niños con diagnóstico confirmatorio de VIH, con la finalidad de determinar las lesiones bucales mas frecuentes. Los



resultados determinaron que las lesiones de tejidos blandos en estos pacientes fueron las comúnmente observadas y en un 22% la candidosis bucal fue la segunda mas observada después de la linfadenopatía cervical.¹⁴

De tal manera en el estudio realizado por Roman Fonseca y cols. señalaron que de 51 pacientes pediátricos con SIDA clínicamente estudiados por 2 años de los cuales 22 eran hombres y 29 mujeres, y cuyas edades oscilaban entre 1.8 y 11.6 años. Reportaron que la lesión bucal más frecuente fue candidosis pseudomembranosa presente en 11 de los estudiados, otras lesiones fueron patologías de glándulas salival 10 casos, 3 casos de candidosis eritematosa y 1 caso de eritema de línea gingival un solo caso de leucoplasia vellosa. Los 25 niños restantes no presentaron lesiones. Los pacientes quienes presentaron un cociente de $CD^+4/CD^+8 < 0.5$ fueron más susceptibles al desarrollo de lesiones bucales.²⁰

Por su parte Del Toro y cols cuyo estudio realizado en 28 pacientes pediátricos con HIV del Hospital de Strong Memorial New York, de los cuales el grupo de pacientes comprometidos estaba compuesto por 13 mujeres y 15 hombres cuyas edades oscilaban entre 1 año 2 meses a 13.5 años. Todos los pacientes adquirieron VIH vía materna y fueron administrados con antirretrovirales al mismo tiempo que en la reexaminación. La clasificación CDC del grupo de pacientes indico que 10 pacientes eran P-1 (asintomático) y que 18 pacientes P-2 eran (sintomáticos). El estudio revelo que 39.3% (11/28) de los pacientes tenían una lesión bucal o hallazgo relacionado con el VIH. Esto a su vez arrojó como datos que el grupo de pacientes P-2 tenían una concurrencia significativamente alta de lesiones bucales que el grupo de pacientes P-1. Por su parte en cuanto a la lesiones la más común fue la candidosis pseudomembranosa que ocurrió en 17.8%(5/28) de los pacientes 5



del grupo P2, en seguida la aparición de aftas menores ulceradas ocurrió en 7.1%(2/28)1 paciente de P1 y el otro P2, en cuanto a la inflamación parotidea represento 3.6%(1/28) y petequias bucales el 3.6% (1/28). No se encontró pacientes en este estudio con lineal gingival eritematosa, lesiones virales de tipo herpes o Epstein Barr.¹⁶

La combinación de un sistema inmune inmaduro y la supresión de la inmunidad celular en niños con HIV ofrece optimas condiciones para la rápida progresión de la enfermedad. Colonización en la boca por hongos oportunistas es una de las más comunes infecciones oportunistas observadas en niños y adultos en pacientes con VIH. *Candida albicans* es el hongo mas aislado, pero recientemente se ha aislado una nueva especie *Candida dubliniensis* ha obtenido considerable atención debido una inclusive asociación con los pacientes VIH positivos. Brown confirmo la presencia de esta nueva especie en una población de pacientes pediátricos con VIH positivos.¹⁰

Nicolataou reporto que entre niños de 2 a 12 años que fueron monitoreados por años para hallar lesiones bucales. Demostró que la candidosis eritematosa fue la lesión mas frecuente relacionada con el VIH, fue observada en diferentes estadios y algunos casos progresaron a candidosis pseudomembranosa. Una resistencia selectiva de un clon de *Candida* fue aislado en tres casos de candidosis.⁴⁷



2.6.1 REPORTE DE TRATAMIENTO ANTIMICÓTICO Y RESISTENCIA DE CANDIDOSIS BUCAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS VIH/SIDA

Marchisio reconoce la eficacia y la seguridad del fluconazol oral y el cual se evaluó en tratamiento de la candidosis bucofaringea en niños con infección por VIH. 51 niños con un promedio de 5 años fueron revisados, la candidosis bucal fue causada por *C.albicans* en 28 casos (55%). El fluconazol fue administrado con una dosis media de 3.4 mg/kg/d(con un rango de 2 a 5.6 mg/kg) con una duración promedio de 12 días (rango de 6 a 28 días) hacia el final del tratamiento 90% de los niños fueron clínicamente curados, 6% mejoraron y en 4% fallo la respuesta. *Candida* fue erradicada en 82% de los pacientes. Clínicamente la fallo ocurrió en niños con dosis de 3 mg/kg/d o menor. 2 y 4 semanas después de la terapia, clínicamente la cura fue confirmada en 88% y 82% respectivamente y tambien la erradicación en un 76%. Seis niños experimentaron efectos adversos (1 rash cutáneo, 5 elevación de enzimas hepáticas). Los datos demostraron que el fluconazol es seguro y efectivo en tratamiento de candidosis bucofaringea de pacientes VIH infectados.⁴²

Por su parte Hernández- Sampelayo reporto la eficacia y seguridad del fluconazol versus ketoconazol, que fueron evaluados en el tratamiento de 46 pacientes pediátricos con candidosis bucofaringea infectados con VIH/SIDA. Veinticuatro de los niños recibieron fluconazol oral en una dosis de 3mg/kg/d y 22 niños recibieron ketoconazol oral en una dosis de 7 mg/kg/d. El rango de tratamiento fue de 5 a 49 días. Los resultados demostraron que el fluconazol y ketoconazol tiene una eficacia y seguridad equiparable en tratamiento de candidosis bucofaringea. Pacientes tratados con fluconazol tuvieron una alta cura clínica al final de la terapia (88%) que los tratados con



ketoconazol (81%). Un caso de efectos adversos se presentó (diarrea y dolor abdominal) y otro se le suspendió el tratamiento. Siguiendo con las examinaciones a las 2 y 4 semanas post- tratamiento demostrando comparablemente una alta recaída en ambos grupos de pacientes. De los cultivos en inicio demostraron que 20 de 22 pacientes en el grupo de ketoconazol fueron infectados con *C. albicans* y 2 con *C.sp*. En el grupo con fluconazol 18 de 24 (75%) pacientes de inicio fueron infectados con *C.albicans* y cinco (22%) con *C.sp* (4 pacientes) y *Candida guilliermondi* en un solo paciente.²⁹

Hoppe determinó en su estudio que el gel de Miconazol fue significativamente superior a la nistatina en suspensión en 183 pacientes pediátricos inmunocomprometidos con una consideración a la eficacia, rapidez de cura y erradicación de levaduras de la candidosis bucofaringea. Las recaídas y efectos no ocurrieron muy frecuente en el miconazol que con la nistatina. Los resultados del estudio indican que el miconazol en gel es superior a suspensión de nistatina como tratamiento para la candidosis bucofaringea en pacientes infantes inmunocomprometidos.³²

Post tratamiento los resultados micológicos en pacientes en quienes el tratamiento falló demostró que 1 aislamiento (*Cándida glabrata*) fue aislada después del tratamiento del fluconazol y 2 pacientes persistieron *C. albicans* y *guilliermondi*). No hubo nuevos aislamientos en el grupo del ketoconazol, en el tratamiento con falla fue atribuido solo a *Candida albicans*.

Müller destaca en su estudio la transmisión de resistencia en cepas isogénicas de *Candida albicans* en pacientes de una familia con VIH, en la



cual dos niños con sintomática candidosis bucofaríngea y su madre con asintomático colonización sobre un periodo de 5 años. Estos hallazgos se determinaron por diferentes métodos epidemiológicos moleculares como la PCR. Este estudio contribuye a desarrollar el entendimiento del modo de transmisión de *C.albicans*, particularmente en niños y subrayar la importancia del monitoreo de especímenes de los miembros de familias infectados con VIH.⁴⁶

De acuerdo al tratamiento antifúngico en pacientes pediátricos uno de los fármacos empleados es el clotrimazol y a presentado resistencia en candidosis bucofaríngea como lo reporta el estudio de Rene Pelletier y cols en cual 87 cultivos aislados de candidosis orofaríngea fueron obtenidos de pacientes VIH pediátricos. De estos 56 fueron hombres y 31 mujeres con un rango de edad entre 0.4 y 14 años. Así entre los aislamientos en este estudio, 10 fueron separados de pacientes quienes llenaban la definición de resistencia clínica, 6 de estos 10 su CMI del clotrimazol fue de $>0.5\text{microg/ml}$, comparado con el resto en donde 4 de 72 aislamientos tuvieron CMI de $< 0.5\text{microg/ml}$.

También se identificaron resistencias cruzadas desarrollado entre el clotrimazol y otros azoles. En una comparación de aislamientos de este estudio por el cual el clotrimazol tenia un CMI de $>0.5\text{microg/ml}$ para otros azoles como el fluconazol la CMI fueron de $>64/\text{ml}$ y para itraconazol CMI fueron $>1\text{microg/ mol}$. Par este estudio el clotrimazol con CMI de $>$ de 0.5microg/ml siguiere una posible interpretación de un punto de rompimiento para resistencia.⁴⁸



FACTORES DE RIESGO PARA LA RESISTENCIA A LOS AZOLES EN CANDIDOSIS EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH

Maenza demostró en un estudio de casos y controles para identificar los factores de riesgo para la resistencia al fluconazol en candidosis bucofaringea en pacientes con VIH. 25 pacientes con resistencia clínica e *in vitro* al fluconazol fueron examinados junto con casos control quienes habían tenido respuesta favorable al tratamiento de candidosis y que habían sido observados por tiempos similares. Después del primer episodio de candidosis, los pacientes que habían después desarrollado resistencia tenían mas episodios de tratamiento que los pacientes del grupo control, una media de cuentas de CD⁺4 bajas y una media de periodos prolongados de terapia antifungica y sistémica. Estos datos indican que la inmunosupresión avanzada y exposición a los azoles orales son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia al fluconazol.⁴⁰

La resistencia a los azoles en la candidosis bucofaringea ha emergido como un problema entre las personas infectadas con VIH o SIDA. Especialmente aquellos con cuentas bajas de CD4 quienes previamente ha tenido recaídas de candidosis bucal y que además han tenido largos periodos de terapia antifungica supresiva. Por lo tanto en el estudio de Sharon donde 61% de los microorganismos aislados de pacientes adultos y pediátricos quienes habían recibido terapia y que presentaban clínicamente resistencia, demostró a través de laboratorio que presentaban CMI que las catalogaba como resistentes o dependiente de dosis susceptibles. En 86% de los aislamientos de los pacientes con candidosis que clínicamente respondían un azol se clasificaron como susceptibles o con dosis dependientes a ser susceptibles.



Niveles de los azoles en suero y cargas de CD⁺4 fueron importantes parámetros para estos estudios de susceptibilidad.⁵⁷

2.7 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PACIENTES PEDIÁTRICOS

La leucemia es el resultado de la proliferación de un clon de células hematopoyéticas anormales con poca diferenciación y empeorando la regulación así como una programación de muerte celular (apoptosis). La multiplicación celular en la leucemia expensas de la línea hematopoyética normal causa falla de la médula, disminución de la cuenta de células de la sangre (citopenia) y muerte como resultado de infección, sangrado o ambas. La leucemia es clasificada de acuerdo a la primera célula hematopoyética afectada (mieloide o linfoide) y si es aguda o crónica. Las principales categorías diagnósticas son leucemia mielogenica aguda o aguda no linfocitica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogénica crónica y leucemia linfocitica crónica.

La leucemia aguda es común en todas las edades, pero la LLA es más común en niños.

La etiología de las leucemias es incierta. Se sospecha de virus, exposición a radiación ionizante y otros tipos de radiación electromagnética exposición química. Anormalidades citogenéticas se han visto envuelta en varias leucemias. Un cromosoma podría suprimir genes o activar oncogenes.

La leucemia aguda usualmente presenta precipitación con falla de la médula ósea y es asociada a la anemia, infección, y sangrado. Los síntomas generales son tipo resfriado, dolor de huesos, y articulaciones causado por una maligna expansión de medula. Trombocitopenia es manifestada por



petequias y hemorragias en el paladar. También se presenta infiltración gingival.

El diagnóstico se hace por sangre periférica y biopsia de medula.⁴⁵

2.7.1 TRATAMIENTO DE CANDIDOSIS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA).

El incremento del riesgo de una infección sistémica micótica y las fatales consecuencias de diseminación de candidosis en pacientes trasplantados de medula ósea ha inspirado un estudio de profilaxis y tratamiento temprano de colonización e infección por *Candida*, en pacientes mayores de 15 años realizado por Epstein. Los resultados del estudio respaldan el potencial del fluconazol para reducir la colonización causada por *Candida albicans*, no demostró profilaxis de candidosis bucal o sistémica. Estos hallazgos y reportes de resistencia al fluconazol de especies de *Candida* y un aumento del número de casos de infección como resultado de *Candida krusei* indica la necesidad de más estudios de profilaxis en pacientes que están propensos a una neutropenia.¹⁹

WHALIN 1991 refiere que en los pacientes con leucemia aguda la disminución de secreción salival ha aumentado el número de células levaduriformes y más frecuente predisponen a la candidosis bucal.⁶⁸



A) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por alta prevalencia de candidosis bucal en el paciente VIH/SIDA y por el mismo uso repetido de antimicóticos como terapia contra esta infección oportunista, se ha presentado en algunos pacientes con resistencia al tratamiento antifúngico por lo que ¿Es posible que exista una correlación entre la dosificación y la resistencia al tratamiento antimicótico del hongo y/o se correlaciona con el estado inmunológico (linfocitos TCD 4) de paciente VIH/SIDA?

B) JUSTIFICACIÓN

La candidosis bucal es común en pacientes VIH/SIDA y se utiliza como un indicador del deterioro inmunológico de estos pacientes, aunado a la terapia con antimicóticos empleados en forma inadecuada, debido a esto presentan recidivas de la infección posiblemente por el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos o la baja susceptibilidad del microorganismo.

Por lo que es importante conocer la interacción la dosis junto con los periodos de administración del antimicótico en repercusión con la respuesta del hongo, así como el estado inmunológico en que se encuentra el paciente relacionado con la respuesta terapéutica. Por esto, es importante interpretar ambas relaciones para que permita tener un conocimiento más amplio y certero de la aplicación de los antifúngicos y evitar de esta forma su uso inadecuado, lo que repercutirá en la ausencia de cepas resistentes; y por ende en una mejor respuesta de los mismos.



C) HIPÓTESIS

La aparición de cepas resistentes en la candidosis bucal VIH/SIDA tiene relación directa entre la dosis y los periodos prolongados de aplicación del antimicótico, así como el estado inmunológico del paciente (linfocitos T CD4).

D) OBJETIVOS

Objetivo general

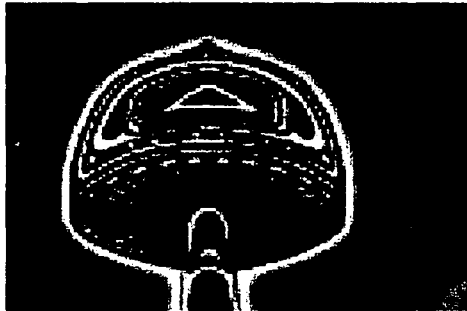
Aislar e identificar cepas y especies resistentes del género *Candida* y determinar su relación con la dosis y tiempo de administración en pacientes VIH/SIDA.

Objetivos específicos

- Conocer las especies de *Candida* (API 32 Biomeriux) involucradas en la lesión de candidosis de los pacientes pediátricos del Hospital Infantil "Federico Gómez".
- Determinar la resistencia de las especies de *Candida* aisladas de candidosis bucal "*in vivo*" e "*in vitro*" (ATB Fungus) de los pacientes pediátricos del Hospital Infantil " Federico Gómez ".
- Determinar del paciente pediátrico VIH/SIDA el estado inmunológico a partir de la cuenta de CD⁺4 y la carga viral (CV) y su relación con el aislamiento de cepas resistentes de *Candida*.
- Describir la relación de la terapia antimicótica previa al aislamiento de *Candida* con la resistencia *in vitro*.



III. MATERIAL Y MÉTODOS





III. MATERIAL Y MÉTODO

POBLACIÓN

Pacientes pediátricos VIH/SIDA que acuden al Hospital Infantil "Federico Gómez" que manifiesten candidosis bucal.

Pacientes pediátricos inmunodeprimidos (Leucemia Linfoblástica Aguda LLA) del Hospital Infantil "Federico Gómez" que manifiesten candidosis bucal..

Pacientes pediátricos VIH negativos (clínicamente sanos) que acudan a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la UNAM sin candidosis bucal.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

10 pacientes pediátricos VIH/SIDA con candidosis bucal

10 pacientes pediátricos VIH negativos con candidosis bucal inmunodeprimidos (Leucemia Linfoblástica Aguda)

10 pacientes pediátricos VIH negativos y sin candidosis bucal (Microbiota normal)

VARIABLES DEPENDIENTES

Patrones de sensibilidad de *Candida*



VARIABLES INDEPENDIENTES

Número de linfocitos CD⁺4

Carga Viral

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

A) GRUPO DE ESTUDIO Pacientes de 1 mes de edad a los 9 años VIH/SIDA con candidosis bucal.

B) GRUPO CONTROL NEGATIVO (Leucemia Linfoblástica Aguda) Pacientes de 1 mes de edad a los 9 años de edad con candidosis VIH negativos.

C) GRUPO CONTROL NEGATIVO (pacientes clínicamente sanos) Pacientes de 1 mes de edad a los 9 años de edad sin candidosis (microbiota normal).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con lesiones diferentes a candidosis

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras mal manipuladas

Muestras contaminadas

Muestras insuficientes



MÉTODO DE CONTROL

Se llevara un control de los pacientes con su registro y datos afines a la enfermedad en una hoja de control para observar las posibles variantes de cada paciente.

Se usará una bitácora reportando los resultados de los procedimientos realizados a las muestras. Esto con la finalidad de facilitar la correlación de datos y una mejor interpretación de resultados.

MATERIAL

50 portaobjetos

50 cubreobjetos

40 cajas de petri de plástico

Hisopos estériles (culturette)

Abatelenguas

2 paquetes

1 cubrebocas

Mechero de Bunsen y encendedor

Gasas

Microscopio óptico

Tubos de ensaye estériles

Asa de siembra bacteriológica

Pipetas Pasteur



Micropipetas de 100 y 1000 microlitos

Centrífuga a 3000 r.p.m

Incubadora a 37 °C y a 30°C

Tubo de 13 X 100 mm con tapón de rosca

REACTIVOS PREPARADOS EN EL LABORATORIO

Solución de KOH al 20 %

Solución salino isotónica

Suero humano fresco

MEDIOS DE CULTIVO

Agar dextrosa Sabouraud en tubo placa

Agar harina de arroz en placa

REACTIVOS COMERCIALES

API 32 para determinación de especies(Biomeriux)

Fungus ATB antifungigrama prueba de susceptibilidad (Biomeriux)



MÉTODO DE LABORATORIO

La metodología empleada en cada una de las muestras será sistematizada. Se Realizaran las pruebas para determinar especies y susceptibilidad a los antimicóticos .

Los pasos a realizar para cada una de las muestras son :

- 1.- Toma de la muestra raspando la lesión.
- 2.- Examen directo con KOH (hidróxido de potasio)
- 3.-Sembrar en Sabouraud en placa
- 4.-Sembrar en Sabouraud tubo (cepario)
- 5.-Prueba de clamidoconidias (agar harina de arroz)
- 6.-Prueba tubo germinativo(suero sanguíneo fresco)
- 7.-Purificar cepa en sabouraud placa.
- 8.- Determinación de especie API 32 (Biomeriux)
- 9.-Pruebas de sensibilidad (Fungus ATB)

EXAMEN DIRECTO

Objetivo

Identificar en forma rápida la presencia de blastoconidias y/o pseudomicelios.

Procedimiento

- 1.-Colocar la muestra sobre un portaobjeto
- 2.-Adicionar una gota de KOH 20%.



- 3.- Colocar un cubreobjeto.
- 4.- Calentar sobre el mechero a ebullición.
- 5.- Enfriar y observar al microscopio a 40x.

Resultados

BLASTOCONIDIOS: células ovales o esféricas de 2 a 4 μm de diámetro, refringente (semejan semillas de sandía).

SEUDOMICELIOS: Formas alargadas, septadas de 1 a 2 μm de diámetro y de 8 a 14 μm de longitud.

Interpretación

Observación de abundantes blastoconidias y/o pseudomicelios . Se reportan como CANDIDOSIS.

PRIMO AISLAMIENTO

Purificación de la muestra

Resembrar una colonia característica en Agar dextrosa Sabouraud por estría cruzada

Incubar a 37° C de 24 a 48hrs

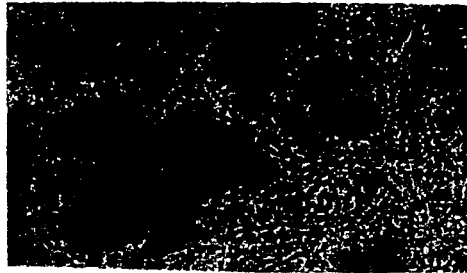
Cepario



Resembrar las colonias de las obtenidas en Sabouraud placa en tubo con tapón de rosca.

Incubación a 37°C de 24 a 48hrs.

Guardar en refrigeración entre 2-4°C.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIG.27 Examen directo con KOH de cavidad bucal donde se observan blastoconidias y pseudomicelios de *Candida*.

FORMACIÓN DEL TUBO GERMINATIVO

Objetivo

Identificación presuntiva de *Candida albicans* por prueba biológica.

Procedimiento

- 1.- Colocar 0.5ml de suero fresco humano en tubos de 13 x 100 estériles.
- 2.-Tomar con una asa bacteriológica una colonia característica y resuspenderla en suero.
- 3.- Incubar a 37°C/3hrs.



4.-Resuspender la muestra .

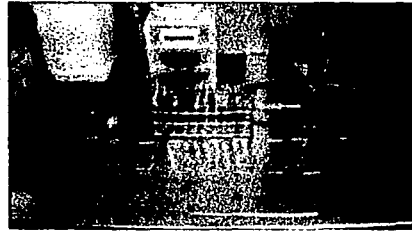
5.-Colocar una gota entre el portaobjeto y el cubreobjeto.

6.-Observar al microscopio a 40X.

a)



b)



c)



ESTERIL CON
GRADILLA DE ORIGEN

d)



FIG.28 En esta figura se observa parte del procedimiento para el tubo germinativo a) toma de una colonia de *Candida* b) Después de la incubación los tubos con suero humano fresco estos se colocan en serie en la gradilla, así como los portaobjetos para cada muestra. c) Resuspensión del suero d) Colocación de una gota de suero humano fresco para observar al microscopio.



Resultados

Estructura alargada de 0.5 a 1 micrómetro por 5 a 15 de longitud.

Interpretación

POSITIVO: Presencia de tubo germinativo.

NEGATIVO: Solo presencia de blastoconidias.

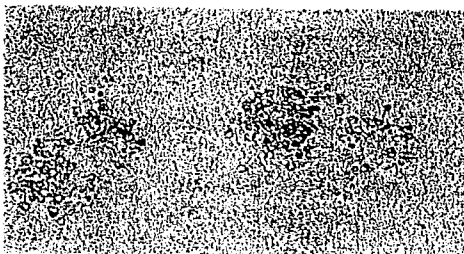


FIG. 29 Prueba de filamentación en suero positiva (*Candida albicans* produce gran cantidad de tubos germinativas a partir de las blastoconidias).



FORMACIÓN DE CLAMIDOCONIDIAS

Objetivo

Identificación confirmatoria de *Candida albicans* por prueba biológica.

Procedimiento

- 1.-Tomar una colonia característica del medio Sabouraud con una asa bacteriológica.
- 2.- Inocular en el medio de Harina de Arroz (HA) por estría cruzada.
- 3.-Incubar a temperatura ambiente de 48 a 72hrs.
- 4.-Colocar sobre el medio un cubreobjeto.
- 5.- Colocar la caja de cultivo sobre la platina del microscopio.
- 6.- Observar a 40X; solamente sobre la superficie del cubreobjeto.

Interpretación

POSITIVO: Presencia de pseudomicelios más clamidoconidias de 10 a 12 micras, intercalares o terminales.

NEGATIVO: Presencia de blastoconidias y pseudomicelios.



RESULTADOS PRELIMINARES

| | TUBO GERMINATIVO | CLAMIDOCONIDIA |
|-------------------------|------------------|----------------|
| <i>Candida albicans</i> | + | + |
| <i>Candida sp</i> | +/- | - |

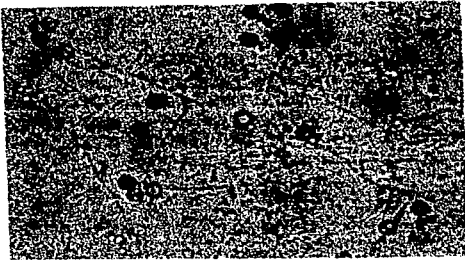


FIG.30 Cultivo en medio de harina de arroz donde se observan clamidoconidias completas de pared gruesa.



SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS ID 32 C(Biomeriux®)

Reactivos

- 25 galerías ID32C
- 25 tapas
- 25 ampollas de C medium
- 25 hojas de resultados
- Medium de Suspensión

Preparación de la galería

- Sacar la galería de su bolsa hermética.
- Quitar el deshidratante.
- Poner la tapa.
- Anotar la referencia en la lengüeta lateral.

-Preparación del Inóculo

- Abrir una ampolla de suspensión Médium (2ml) o preparar un tubo con 2ml de agua destilada sin aditivo.
- Tomar una a varias colonias idénticas del medio de aislamiento y preparar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de MacFarland.
- .Abrir una ampolla de C Médium y transferir 250microlitros de la suspensión precedente.



Inoculación de la galería

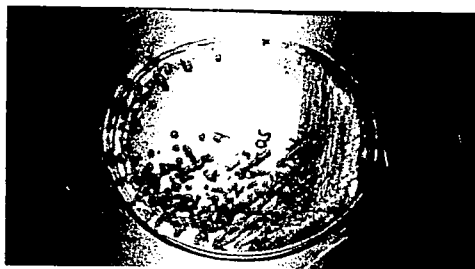
- Homogeneizar la ampolla de C Médium sambrada e inocular la galería distribuyendo 135microlitros de la suspensión por cúpula por la micropipeta.
- Colocar la tapa sobre la galería.
- Incubar a 30 °C de 24 a 48hrs.

Lectura de la galería

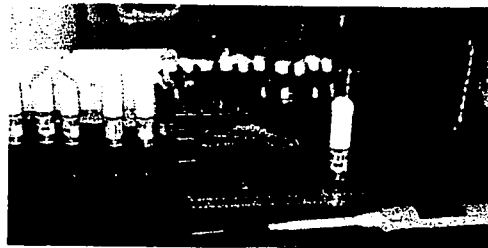
- Comparar con el control(0) y anotar todas las cúpulas que parecen con turbidez como positivos.

Identificación

- Después de la lectura visual las reacciones obtenidas se codifican en un perfil numérico
 - En la hoja de resultado de el test están separados en tres grupos y un valor 1, 2 o 4 esta indicado para cada uno: se suman en cada grupo de 3 los valores correspondientes a las reacciones positivas.
 - La identificación se obtiene con el programa de identificación introduciendo manualmente en el teclado en el perfil numérico de 10 cifras: las 4 cifras de la fila superior izquierda(1.0 a 1.B) seguidas de 4 cifras de la fila inferior izquierda 0.0 a 0.B), seguidas al final de 2 cifras de pruebas complementarias.
 - 9 grados codifica MAN, LAC, INO(1.C, 1.D, 1.E)
 - 10 grados cifra codifica GLU,SBE, GLN(O.C, O.D, O.E)
- Solo el test ESC no esta modificado y podrá ser pedido por el programado el en caso débil discriminación entre 2 especies.



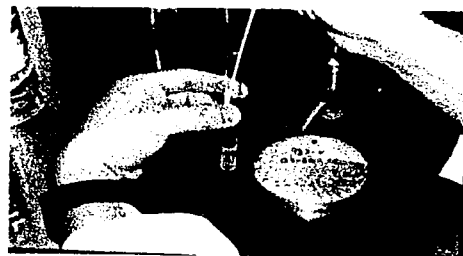
a)



b)



c)



d)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

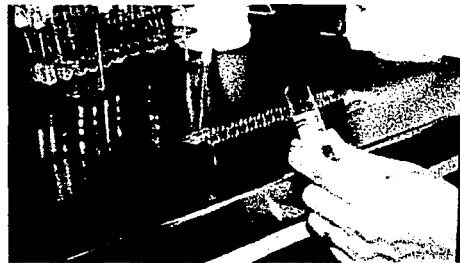


e)

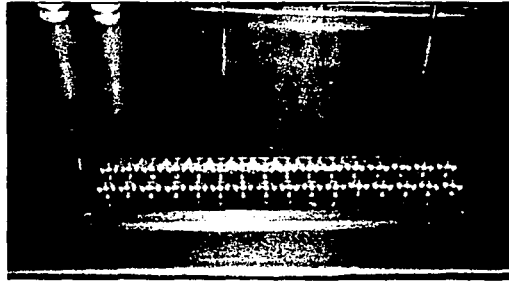
1958 COP
PATSA DE ORIGEN



f)



g)



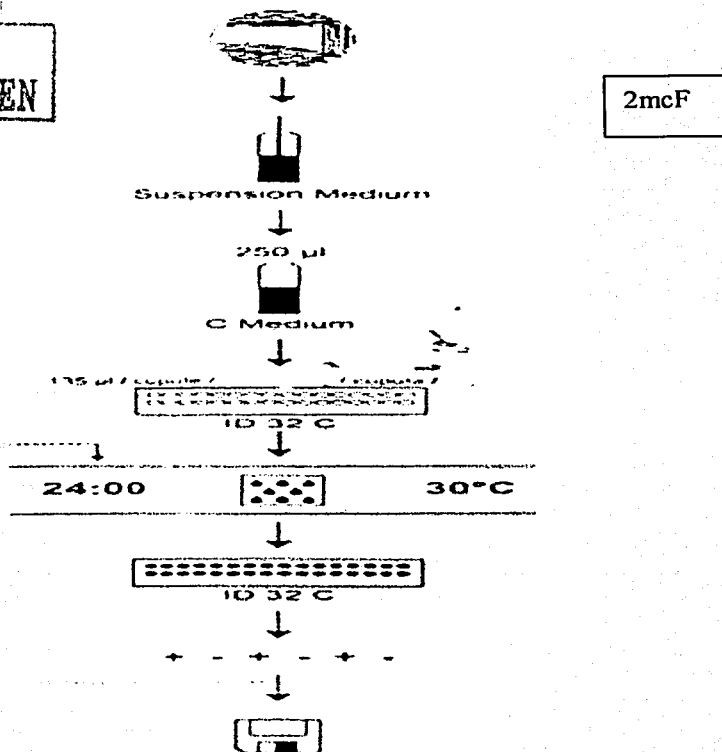
h)

FIG.31 Secuencia de la técnica de API en el laboratorio. a) Purificación de la cepa en Sabouraud placa b) Material utilizado en la prueba por API c) Toma de una colonia de *Candida*, d) Suspender la colonia en solución inyectable, e) Tomar 250 μ litros de la suspensión precedente y colocar en el C Medium, f) Resuspender con la micropipeta en el C Medium g) Colocar 135 μ litros de la suspensión del C Medium y llenar las cupulas de la galeria h) galeria completa .



Fig 32. Diagrama de la Técnica para la determinación de especies de *Candida* por el API ID 32. Tomado de la ficha técnica de API ID 32 de Biomeriux®

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





PRUEBAS SENSIBILIDAD ATB FUNGUS (Biomeriux ®)

Reactivos

- 25 galerías TB FUNGUS en embalaje individual con deshidratante.
- 25 tapas de incubación 25 ampollas ATB F Médium
- 25 hojas de resultados
- ATB F Buffer
- Suspensión Médium

Técnica

Preparación de la galería

- sacar la galería de su bolsa hermética
- quitar deshidratante y anotar el número de cepa en la lengüeta

Preparación del inóculo

- abrir una ampolla de Suspensión Médium y preparar en la ampolla una suspensión de levaduras con una turbidez equivalente al patrón 2 de Mc Farland
- Transferir 100 microlitros de esta suspensión en una ampolla de ATB F Médium utilizando una micropipeta.

Inoculación de la galería

- Homogeneizar ATB F Médium con la pipeta evitando formar burbujas.
- Inocular la primera parte de la galería, correspondiente a la 5FC (hasta el doble trazo) distribuyendo con la micropipeta 135 microlitros de ATB F médium en cada cúpula.



-Añadir 50 microlitros (2 gotas) de ATB F Buffer en esta ampolla de ATB F para elevar su pH.

-Homogenizar

-Inocular el resto de la galería con el medio así modificado.

-Colocar una tapa sobre la galería

-Incubar 24 horas a 30 C en aerobiosis, en caso de crecimiento insuficiente, realizar una segunda lectura a la 48 horas de incubación.

Lectura de la galería e interpretación

-Colocar la galería verticalmente

-Buscar en cada cúpula la presencia de turbidez y anotarla(+): la ausencia de crecimiento de anota(-).

-En los imidazoles(MIC, ECO, KET) puede haber un crecimiento residual. En ese caso comparar con el testigo del crecimiento correspondiente (después del doble trazo) y anotar (-) cualquier crecimiento inferior a ese testigo.

-Interpretar las lecturas como se indica a continuación los antifungicos con dos concentraciones.

| Aspecto claro de las cúpulas | | Resultados | | La cepa es: |
|------------------------------|--------|------------|---|---------------|
| c | C | c | C | |
| claro | claro | - | - | S Sensible |
| turbio | claro | - | + | SI Intermedia |
| turbio | turbio | + | + | R Resistente |

segundo tiempo:

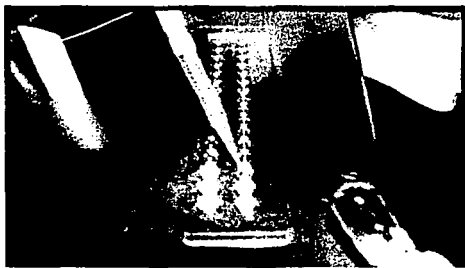
-Colocar la galería horizontalmente con el nombre a la izquierda para las CMI

-Leer las cúpulas en orden decreciente de concentraciones:



la CMI es el valor que corresponde a la última cúpula que no presenta crecimiento.

a)



b)



c)

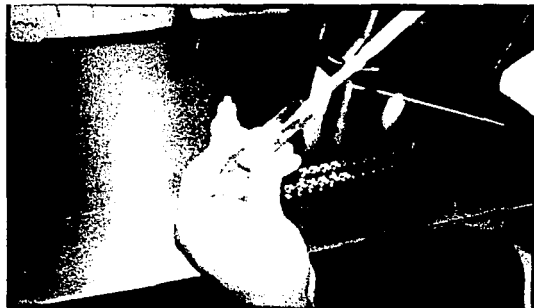
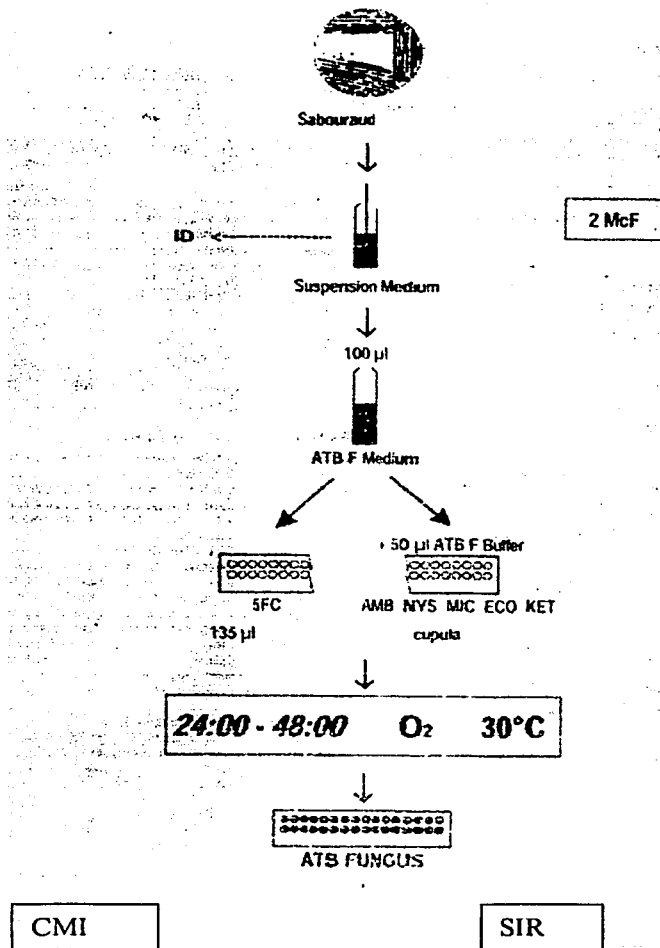
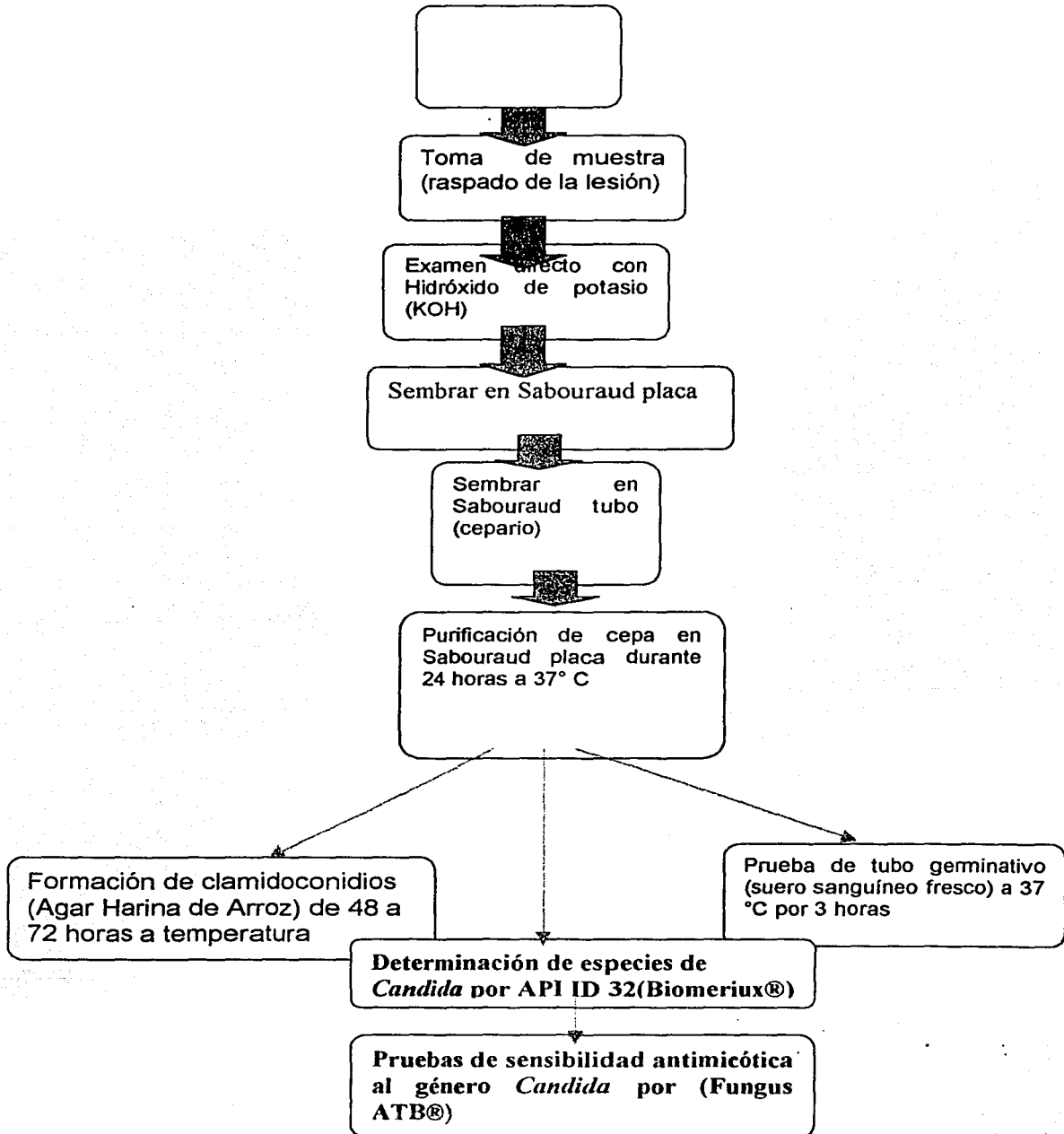


FIG.33 Representación de la parte final de la técnica en la que se observa a) El llenado de las cúpulas con la suspensión 1µtros del ATB medium que contiene ya la levadura hasta el doble trazo de la 5FC(5-Fluorocitocina) b) Colocación del buffer para elevar el pH c) Terminación del llenado de las cúpulas con el ATB Medium así modificado con el resto de la galería.



FIG. 34. Técnica de la prueba de sensibilidad Fungus ATB. Tomado de la ficha técnica del Fungus ATB de Biomerieux®.



**Diagrama de flujo del procedimiento de cada una de las muestras de *Candida***



IV. ANALISIS DE RESULTADOS

PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

Se realizaron treinta aislamientos de *Candida* de pacientes pediátricos con edades que van de un mes a nueve años. En cada uno de los grupos se realizó el aislamiento, en el grupo problema los diez aislamientos de *Candida* se realizó de lesiones de candidosis bucal en los pacientes con VIH/SIDA. Uno de los dos grupos control se constituyó de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) también con diez aislamientos de las lesiones con candidosis bucal y un grupo control que consistió en diez aislamientos de *Candida* de pacientes sanos sin candidosis bucal es decir cepas colonisantes.

A todas las cepas de *Candida* aisladas se les realizó pruebas fisiológicas de tubo germinativo (TG) y clamidoconidia (CLA) y pruebas bioquímicas (API ID32) para determinar especie.

Grupo de niños VIH/SIDA. Se obtuvieron del grupo problema 8 cepas de *Candida albicans* (80%), una cepa de *Candida tropicalis* (10%) y una cepa de *Geotrichum capitatum* (10%),

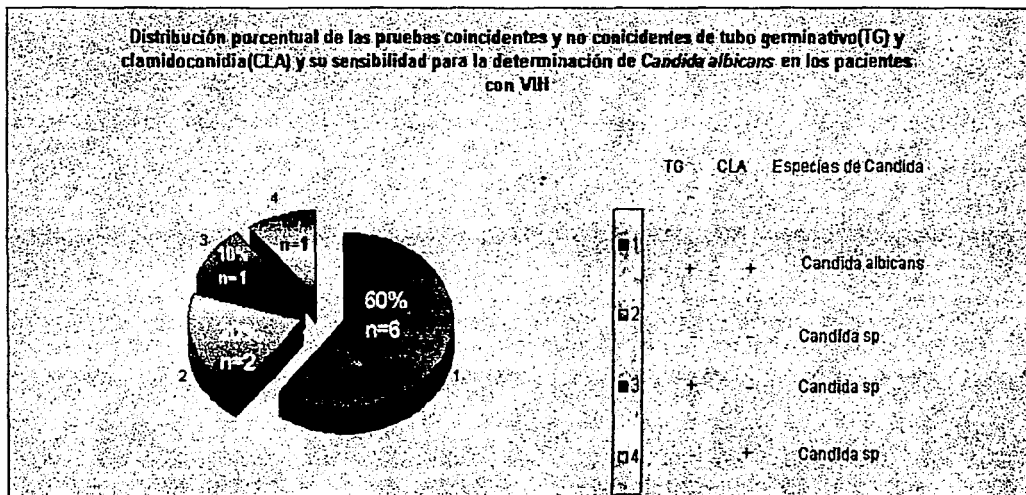
Para llegar a estos resultados se les realizó las pruebas fisiológicas de formación de tubo germinal (TG) y clamidoconidia (CLA) para la determinación de especie de *Candida* a las muestras de los niños VIH/SIDA, los resultados obtenidos con estos métodos fueron el 60% (n=6) positivos a



las pruebas conjuntas de TG (+) y (+) CLA, el 20 % (n=2) con resultados TG (-) y CLA (-) fueron *Candida sp.*, también se encontraron dos cepas que fueron una (10%) TG (+) y CLA (-) y otra (10%) con TG (-) y CLA (+) por lo que se catalogaron como *Candida sp.* (tabla 3 y Gráfica 1).

Posteriormente las pruebas confirmatorias con API ID32 reveló que el 60% de cepas de *Candida albicans* correspondieron a dicha especie en tanto que el 20% de las cepas que fueron negativas en ambas pruebas fisiológicas correspondieron a una cepa de *C. tropicalis* (10%) y a *C. capitatum* (10%). El 20% restante de las cepas en las que la prueba fisiológica fue indefinida con API ID 32 se estableció que correspondían a *Candida albicans* por lo que los resultados confirmatorios con API 32 establecen que este grupo tiene el 80 % de *C. albicans*, 10% de *C. tropicalis* y 10% de *C. capitatum* (Grafica 2).

Grafica 1





Grafica 2

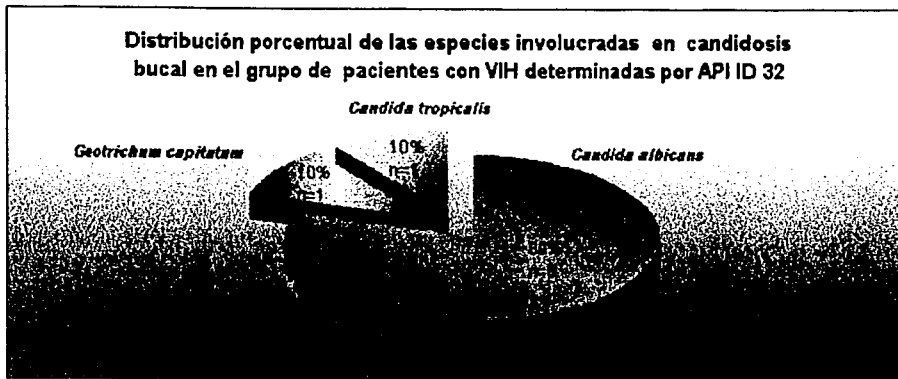




Tabla 3. Relación de las pruebas fisiológicas de tubo germinativo (TG) y clamidoconidia (CLA) con la prueba bioquímica para la determinación de especies de *Candida* de los aislamientos de pacientes pediátricos con VIH/SIDA del HIM.

| N. Paciente | Tubo germinativo | Clamidoconidia | API ID 32 | Confiability del API ID 32 (porcentaje) |
|-------------|------------------|----------------|-----------------------------|---|
| 1 | + | - | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 2 | - | - | <i>Geotrichum capitatum</i> | 99.9% |
| 3 | - | - | <i>C. tropicalis</i> | 99.6% |
| 4 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 5 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 6 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 7 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 8 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 9 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 10 | - | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |

Grupo de niños con LLA. Los resultados obtenidos en el grupo de niños con LLA (control positivo a candidosis bucal) fueron el 70% (n=7) con ambas pruebas positivas a TG (+) y CLA (+), por lo que se estableció que eran cepas de *C. albicans*. El 20% con resultados de TG (-) y CLA (-) fueron identificados como *Candida sp* y el 10% restante de los resultados con TG (+) y CLA (-) fue también identificada como *Candida sp* (Grafica 3, tabla 4).

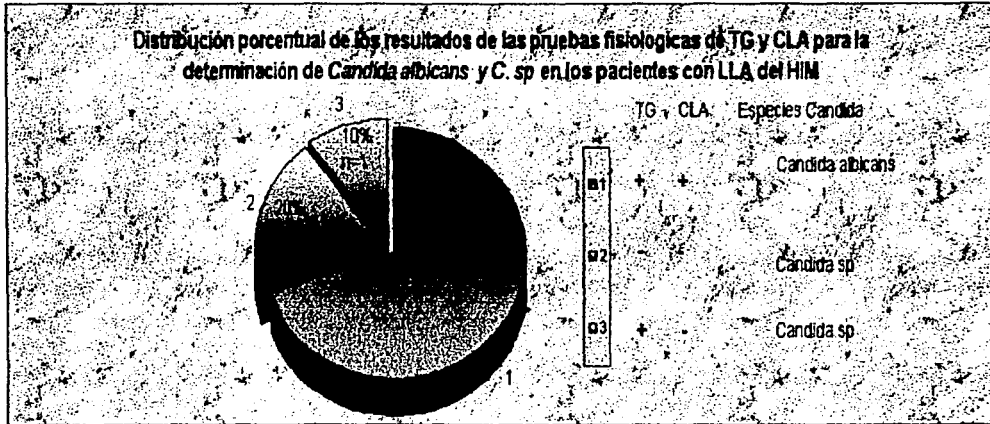
**Grafica 3**



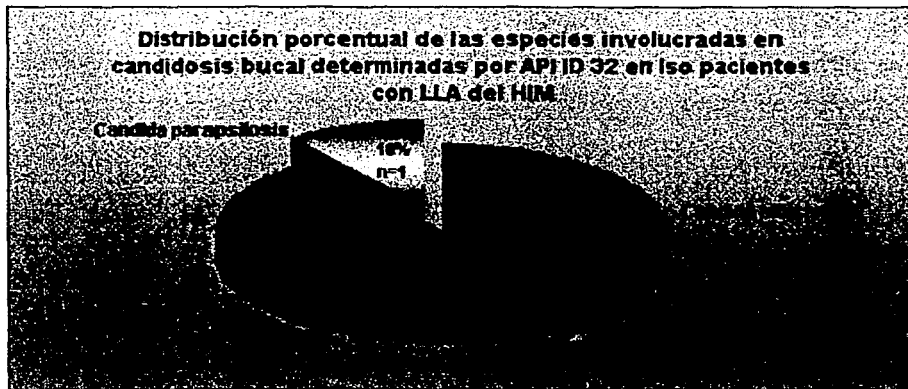
Tabla 4. Relación de las pruebas fisiológicas de tubo germinativo (TG) y clamidoconidia (CLA) con la prueba bioquímica API ID 32 para la determinación de especies de *Candida* de los aislamientos de pacientes pediátricos con LLA del HIM.

| N. paciente | Tubo germinativo | Clamidoconidia | API ID 32 | Confiabilidad del API ID 32 (porcentaje) |
|-------------|------------------|----------------|------------------------|--|
| 1 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 2 | - | - | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 3 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 4 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 5 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 6 | - | - | <i>C. parapsilosis</i> | 87.6% |
| 7 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 8 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 9 | + | - | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 10 | + | + | <i>C. albicans</i> | 97.5% |

La prueba bioquímica confirmatoria con API ID 32 realizada a las cepas aisladas de los niños con LLA, reveló que del 70% de las cepas de *Candida* establecidas como especie *albicans*, solo seis fueron realmente *C. albicans* (60%, n=6) y el 10% (n=1) fue *C. parapsilosis*. Del 30% de las cepas en estudio que fueron dos cepas negativas a ambas pruebas fisiológicas y la otra positiva a TG y negativa a CLA con la prueba bioquímica se obtuvo la especie de las tres cepas que correspondió a *Candida albicans*. De tal manera que en este grupo *C. albicans* predominó en un 90% (Grafica 4).



Grafica 4





Grupo de niños sanos. En relación con los aislamientos de las cepas de *Candida* obtenidas de niños sanos sin lesión candidosica, las pruebas fisiológicas determinaron que el 80% (n=8) fue positivo a TG(+) y CLA(+) identificando a *C. albicans*. El 20% de las pruebas de las especies en este grupo con resultados de TG (+) y CLA(-) fueron determinadas también como *Candida sp* (Grafica 5 y Tabla 5).

Grafica 5

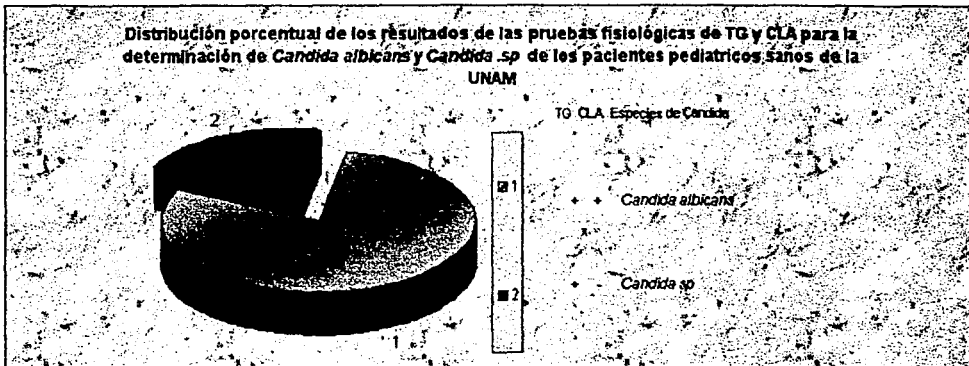




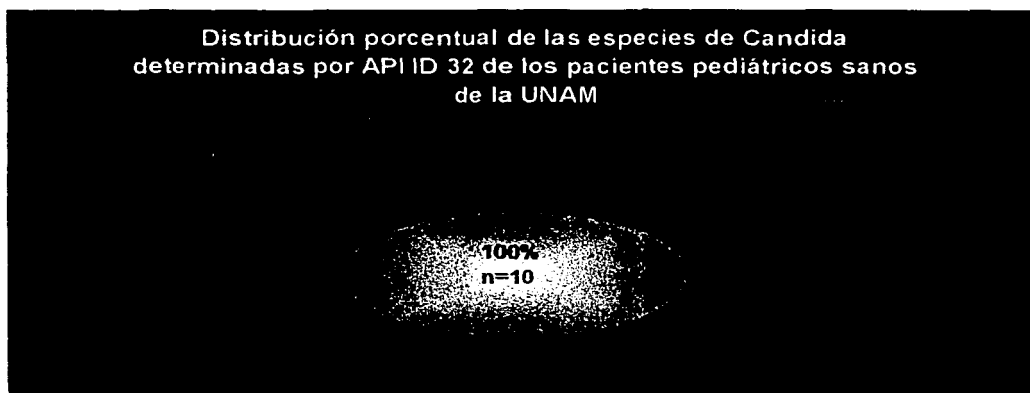
Tabla 5. Relación de las pruebas fisiológicas de tubo germinativo (TG) y clamidoconidia (CLA) con la prueba bioquímica de API ID 32 para la determinación de especies de *Candida* en el grupo de pacientes pediátricos sanos de la UNAM

| N. Paciente | Tubo germinativo | Clamidoconidia | API ID 32 | Confiabilidad del API ID 32 (porcentaje) |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|---|
| 1 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 2 | + | - | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 3 | + | - | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 4 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 5 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 6 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.95 |
| 7 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 8 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 9 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |
| 10 | + | + | <i>C. albicans</i> | 99.9% |



Con API ID 32 se corroboró que el 100% (n=10) de las cepas aisladas de los niños sanos se identificaron como *Candida albicans* (Gráfica 6).

Gráfica 6



PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICÓTICOS

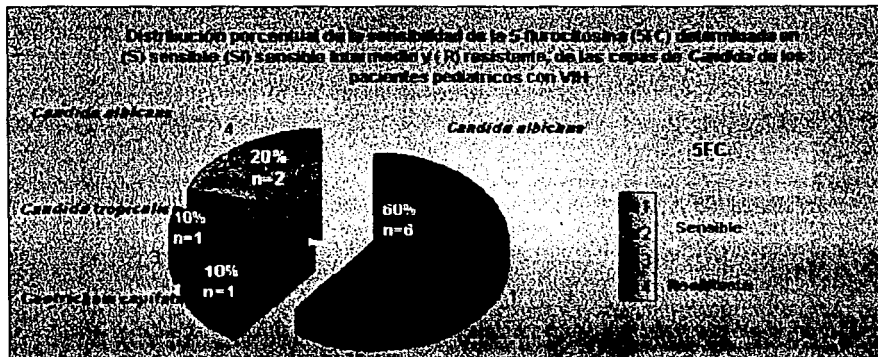
Con respecto a las pruebas de susceptibilidad a los 6 antimicóticos utilizados in vitro realizadas a los tres grupos se encontraron los siguientes resultados. Es importante hacer incapié que ningún niño VIH/SIDA y de los sanos participantes en el estudio tenía antecedentes de terapia antimicótica previa, en tanto que algunos niños con LIA si presentaron historia de tratamiento antimicótico.



5-Fluorocitosina

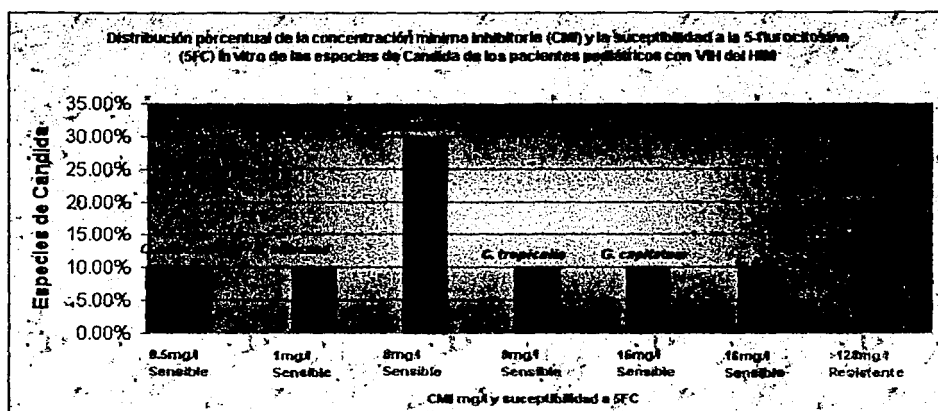
Grupo de pacientes VIH/SIDA. La susceptibilidad de las cepas de *Candida* a la 5-fluorocitosina (5FC) in vitro por ATB Fungus determinó que el 80% de los aislamientos fueron sensibles a este antimicótico de los cuales correspondió el 60% (n=6) a *C. albicans*, el 10% (n=1) a *C. tropicalis* y el 10% restante (n=1) a *G. capitatum*, el 20 % de las especies restantes fueron resistentes, de las cuales las especies involucradas fueron *C. albicans* (n=2; Grafica 7). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para 5-fluorocitosina in vitro de las cepas de *Candida* en este grupo de estudio tuvo un rango de 0.5mg/L a 16mg/L, se encontró que el 70% de las especies de *C. albicans* (n=7) y el 10 % (n=1) de *C. tropicalis* presentaron susceptibilidad con una CMI de 8 mg/L y para *G. capitatum* 10% (n=1) su CMI fue a 16 mg/L, Los rangos que se emplean en la prueba de susceptibilidad a la 5- fluorocitocina abarca de 0.05 mg/L a 32 mg/L, por lo que todas estas especies están dentro del rango de sensibilidad. El 20 % restante de las cepas presentaron un CMI > 128 mg/L interpretándose en los resultados como resistentes a la 5- fluorocitocina (Grafica 8).

Grafica 7





Grafica 8

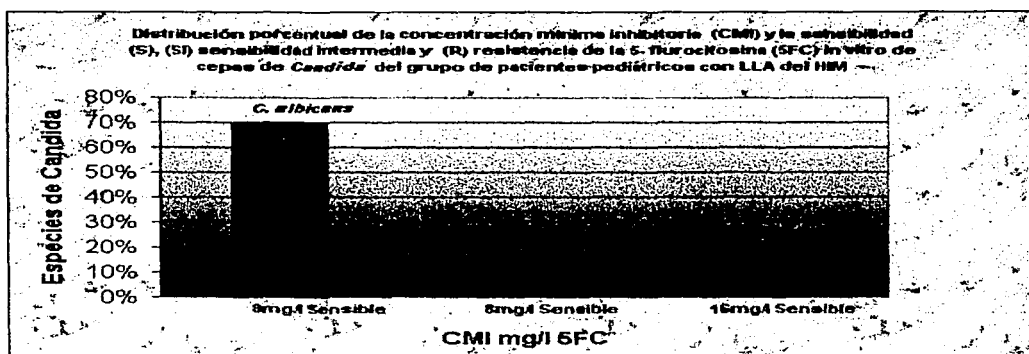


Grupo de niños con LLA. En este grupo las cepas aisladas presentaron susceptibilidad in vitro a la 5- fluorocitosina encontrando que 9 cepas de *C. albicans* (90%) fueron sensibles y la única cepa de *C. parapsilosis* (10%) también presentó susceptibilidad al mismo antimicótico. En cuanto a la CMI de este grupo a la 5 fluorocitosina in vitro tuvo un rango de 8 mg/L hasta 16 mg/L que se interpreta como sensibles al antimicótico. El 80 % de las especies sensibles en 8mg/L fueron *C. albicans* y 10 % *C. tropicalis*, la otra cepa de *C. albicans* (10%) fue sensible a la concentración de 16 mg/L como CMI (Grafica 9).

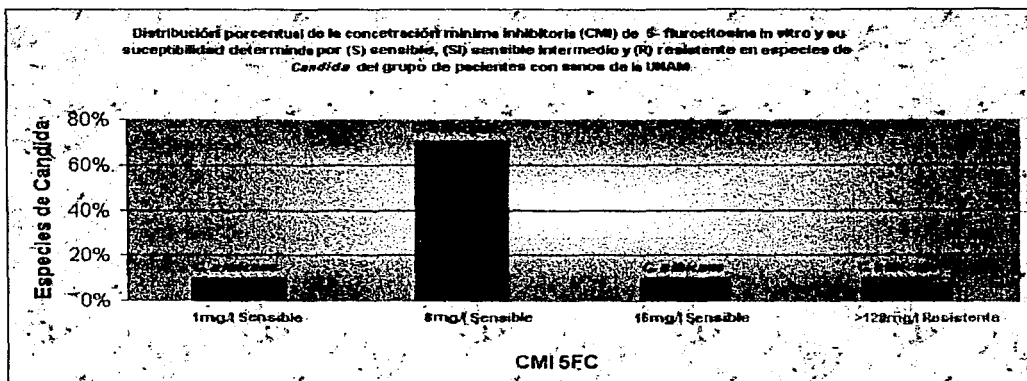


Grupo de niños sanos. Las cepas de *Candida albicans* aisladas de estos niños presentaron sensibilidad a la 5 fluorocitosina in vitro en un 90 %, siendo la CMI entre un rango de 1 mg/L – 16 mg/L y el 10 % (n=1) fue resistente a la 5 fluorocitosina con una CMI > 128 mg (Grafica 10).

Grafica 9



Grafica 10



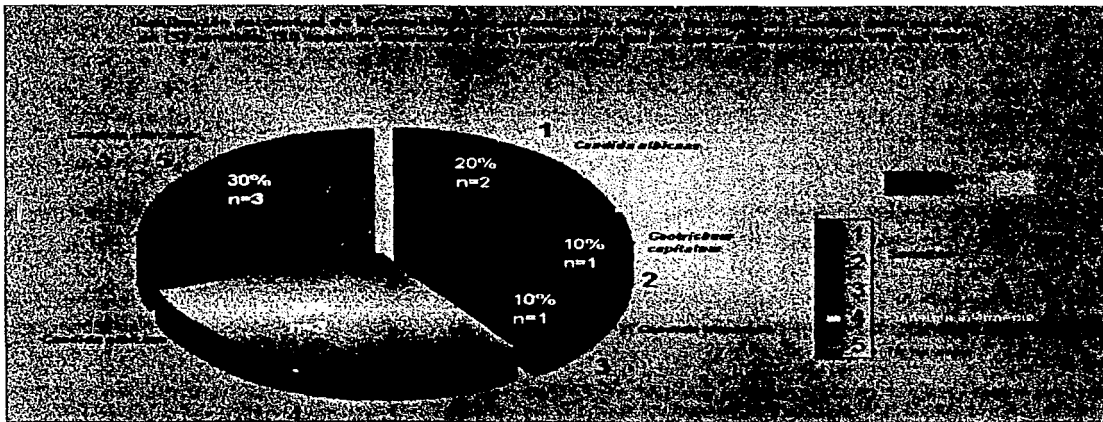


Azoles

Grupo de niños VIH/SIDA. La susceptibilidad a los azoles "in vitro" de las cepas de *Candida* obtenidas de este grupo tuvieron los siguientes resultados:

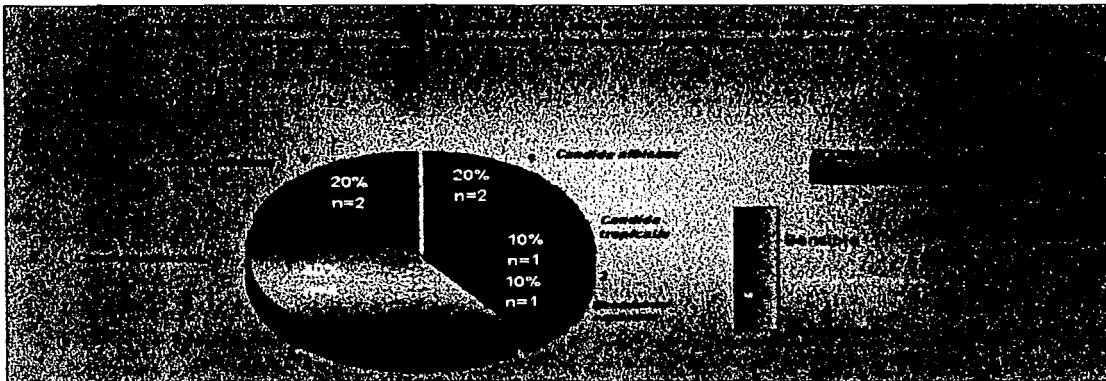
- ▣ **Miconazol;** el 40% de las cepas fueron sensibles (S) siendo 2 cepas de *C. albicans*, una de *C. tropicalis* y una de *G. Capitatum*, el 30% tuvieron sensibilidad intermedia (SI) interviniendo especies de *C. albicans* y 30 % fueron resistentes correspondiendo a *C. albicans* (Grafica 11).
- ▣ **Econazol;** la susceptibilidad de las especies de *Candida* a este anitmicótico fue sensible en el 40%, de sensibilidad intermedia 40% y resistentes el 20% (Grafica12¹⁴).
- ▣ **Ketoconazol;** de las cepas de *Candida* el 40% fueron sensibles, con sensibilidad intermedia fue el 40% y el 20% resultaron resistentes (Grafica 13¹⁷).

Grafica 11

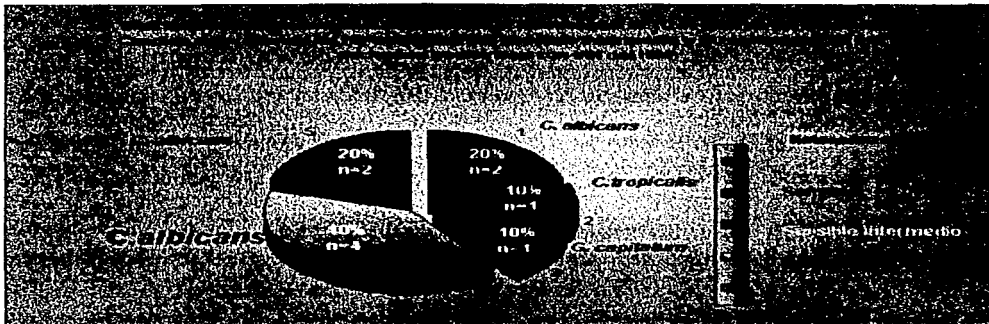




Grafica 12



Grafica 13





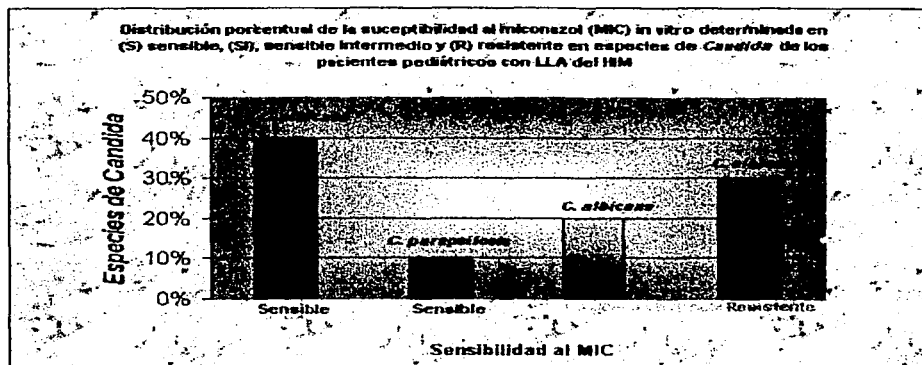
Grupo de niños con LLA. Los resultados en este grupo fueron:

▣ **Miconazol;** las cepas de *C. albicans* obtenidas de pacientes con LLA se encontró que la susceptibilidad a este antimicótico fue del 50% sensible correspondiendo a cuatro especies de *C. albicans* y una de *C. parapsilosis*, el 20 % de *C. albicans* presentó sensibilidad intermedia y el 30 % restante resultaron resistentes siendo *C. albicans* (Grafica 14).

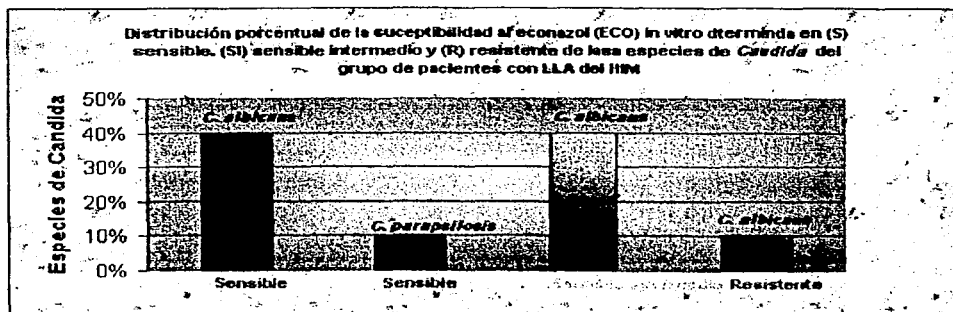
▣ **Econazol;** el 50% de las cepas de *Candida* fueron sensibles, el 40% tuvo sensibilidad intermedia y el 10 % fueron de cepas resistentes (Grafica15)

▣ **Ketoconazol;** el comportamiento de las cepas de *Candida* fue muy parecido en todos los azoles, con este antimicótico el 50% de las cepas de *Candida* fueron sensibles, el 40% tuvo sensibilidad intermedia y el 10 % fueron de cepas resistentes (Grafica16)

Grafica 14

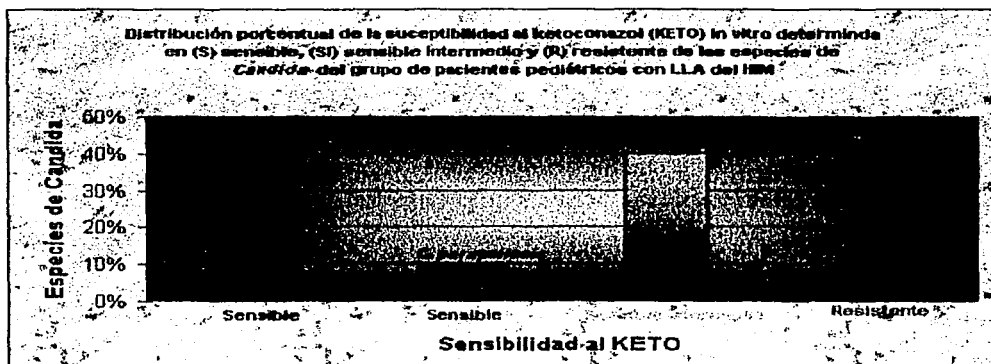


Grafica 15





Grafica 16

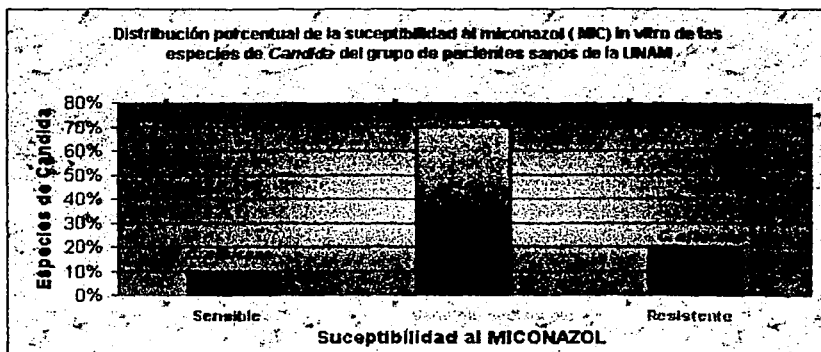


Grupo de niños sanos

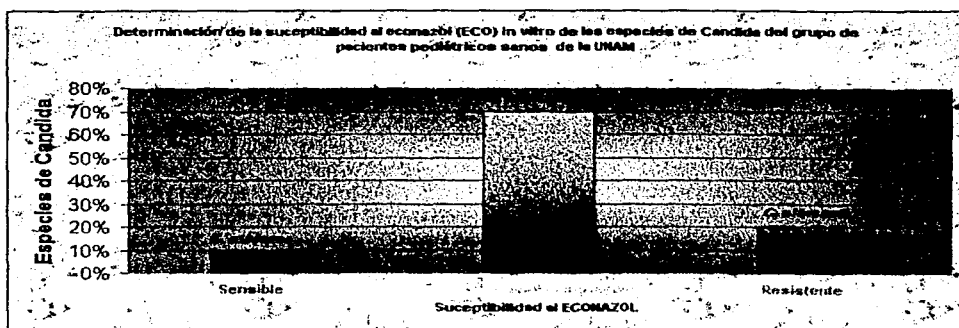
- ▣ **Miconazol** En cuanto a las cepas de *Candida* de pacientes sanos la susceptibilidad fue de 10% sensible que fue de *C.albicans*, el 70% sensible intermedio y 20% resistente siendo ambas especies de *C.albicans* (Grafica 17).
- ▣ **Econazol**; Para el grupo de cepas de *Candida* en pacientes sanos el 10 % fueron sensibles, 70% sensibles intermedias y 20 % resistentes (Grafica 18).
- ▣ **Ketoconazol**; para el grupo de cepas de los pacientes sanos la sensibilidad fue del 10% de cepas sensibles, 70% de cepas con susceptibilidad intermedia y 20% resistentes (Grafica 19).



Grafica 17

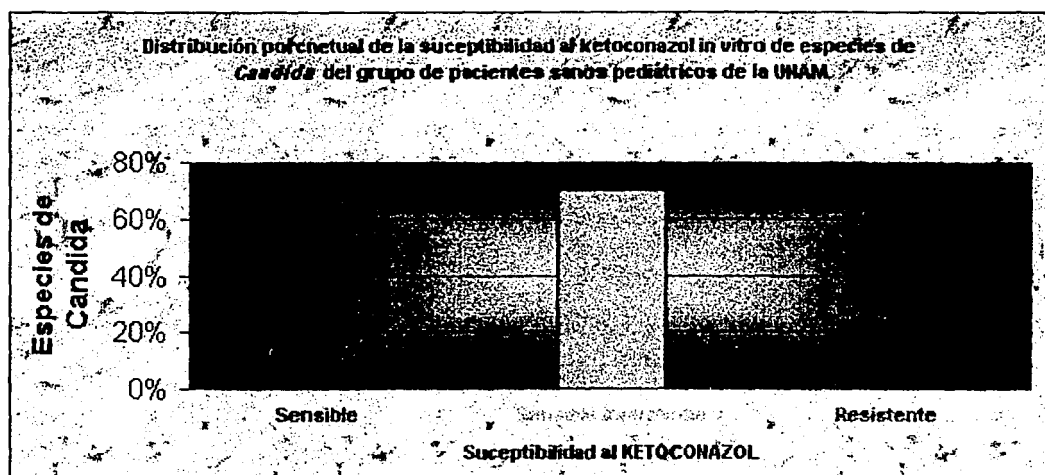


Grafica 18





Grafica 19



Anfotericina B "*in vitro*".

El comportamiento que todas las especies de *Candida* obtenidas de los tres grupos de estudio tuvieron con la anfotericina B fue con una sensibilidad del 100% a una CMI de 1mg/L. Por lo que se puede inferir que sigue siendo el antimicótico de elección para las micosis recurrentes y resistentes a los tratamientos convencionales.

Nistatina "*in vitro*"

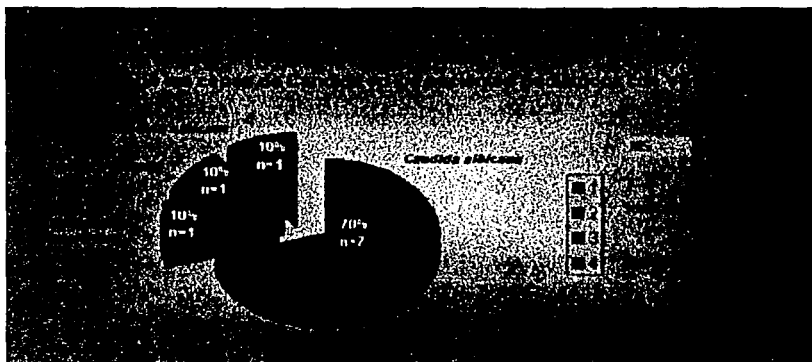
Grupo de niños con VIH/SIDA. Dentro de la susceptibilidad a la nistatina las especies de *Candida* fueron el 90 % sensibles al antimicótico y 10% resistentes (Grafica 20).



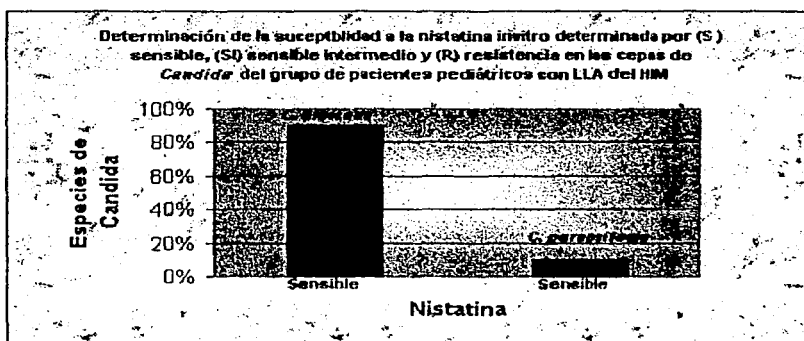
Grupo de niños con LLA. En este grupo las especies de *Candida* fueron sensibles a la nistatina en el 100% (Grafica21).

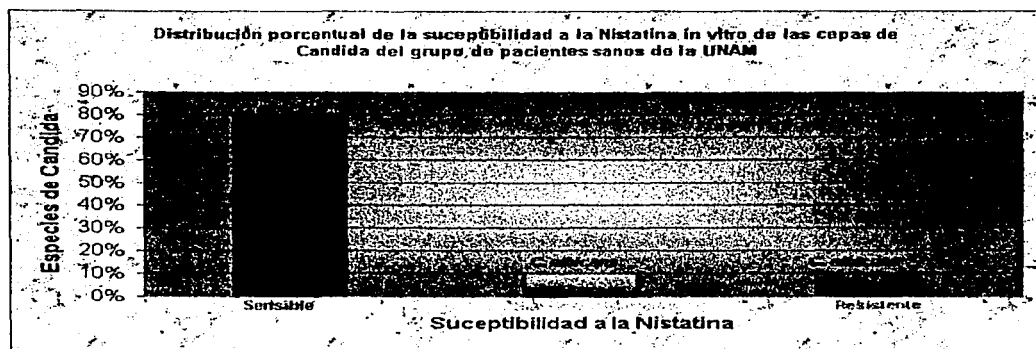
Grupo de pacientes sanos. Las especies de *Candida* obtenidas de los niños sanos fueron sensibles al antimicótico in vitro en el 80%, 10 % con sensibilidad intermedia y 10 % fueron resistentes (Grafica 22).

Grafica 20



Grafica 21



**Grafica 22**

Conteo de Linfocitos CD4 y carga viral

Como datos complementarios para el grupo de pacientes VIH/SIDA se incluyeron la cuenta de CD4 y la carga viral, datos que fueron obtenidos a través de los expedientes de los pacientes. Los niños presentaron conteo de linfocitos CD4 de 45 a 838 y carga viral de 75,000 hasta 250,000 copias (tabla 3).

Los resultados harían pensar que aquellos pacientes con una baja cuenta de linfocitos CD4 y carga viral alta serían más propensos a desarrollar cepas resistentes a los antimicóticos en general, pero la regla se rompe ya que encontramos pacientes con estas condiciones cuyas cepas son sensibles a los antimicóticos, y pacientes con conteo de CD4 regularmente altos para este tipo de pacientes con cuenta viral baja relativamente cuyas cepas fueron resistentes a los azoles y a la 5-fluoricitosina (tabla 6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TABLA 6. Relación de pacientes pediátricos con VIH del grupo control positivo a candidosis bucal y la susceptibilidad a los antimicóticos in vitro de los aislamientos de *Candida*

| No de niño. | E D A D | S E X O | Especie de <i>Candida</i> | Antimicóticos Empleados ^a | | | | | | | | Cuenta de Linfocitos. CD4% | | Carga viral Copias | Tratar Antimic previo |
|-------------|---------|---------|---------------------------|--------------------------------------|--------|-----|--------|-----|-----|-----|------|----------------------------|-------------|--------------------|-----------------------|
| | | | | 5FC | | ANB | | NIS | MIC | EKO | KETO | % | No. células | | |
| | | | | CMI | (mg/l) | CMI | (mg/l) | | | | | | | | |
| 1(3) | 0.5 | F | <i>C. albicans</i> | R | >128 | S | 1 | S | R | R | R | 23 | 838 | 75,000 | Ningur |
| 2(4) | 1 | F | <i>G capitatum</i> | S | 16 | S | 1 | S | S | S | S | NO | NO | NO | Ningur |
| 3(7) | 2 | F | <i>C. tropicalis</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | 28 | 1132 | 4,740 | Ningur |
| 4(8) | 1 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | R | S | S | S | NO | NO | 175,000 | Ningur |
| 5(9) | 3 | M | <i>C. albicans</i> | S | 16 | S | 1 | S | S | S | S | 27 | 357 | 250,000 | Ningur |
| 6(10) | 4 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI | 7 | 45 | NO | Ningur |
| 7(14) | 2 | M | <i>C. albicans</i> | S | 1 | S | 1 | S | SI | SI | SI | 14 | 552 | 249,000 | Ningur |
| 8(15) | 1 | F | <i>C. albicans</i> | S | 0.5 | S | 1 | S | R | SI | SI | 13 | 444 | NO | Ningur |
| 9(16) | 0.4 | M | <i>C. albicans</i> | R | >128 | S | 1 | S | SI | SI | SI | 11 | 62 | NO | Ningur |
| 10(17) | 8 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | R | R | R | 5 | 69 | NO | Ningur |

^a Los resultados de susceptibilidad son expresadas en : Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Sensible (S), Sensible Intermedia (SI) y Resistente ®. Los antimicóticos son 5-Fluocitosina (5FC), Anfotericina B (AMB), Nistatina (NIS), Miconazol (MIC), Econazol (ECO) y Ketoconazol (KETO).



TABLA 7. Relación de pacientes pediátricos del grupo control positivo a candidosis bucal pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda LLA y la sensibilidad a los antimicóticos *in vitro* de especies de *Candida*

| PACIENTES No | EDAD | S E X O | Especies de <i>Candida</i> | Antimicóticos (ATB FUNGUS) | | | | | | | | Tratamiento antimicótico previo |
|-----------------|------|------------------|----------------------------------|----------------------------|----|-----------|---|-----|-----|-----|------|---------------------------------------|
| | | | | 5FC | | AMB | | NIS | MIC | ECO | KETO | |
| | | | | CMI(mg/l) | | CMI(mg/l) | | | | | | |
| 1 | 4 | M | <i>C. albicans</i> | S | 16 | S | 1 | S | R | R | R | Ninguno |
| 2 | 1 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | R | SI | SI | Ninguno |
| 3 | 3 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | NISTATINA |
| 4 | 7 | F | <i>C. albicans</i> | S | 16 | S | 1 | S | SI | SI | SI | FLUCONAZOL |
| 5 | 7 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI | Ninguno |
| 6 | 7 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | Ninguno |
| 7 | 4 | M | <i>C. parapsilosis</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | Ninguno |
| 8 | 4 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | Anfotericina B |
| 9 | 1 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S | NISTATINA |
| 10 | 2 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | R | SI | SI | Ninguno |

^a La sensibilidad a los 6 antimicóticos 5-Fluocitosina (5FC), Anfotericina B (AMB), Nistatina (NIS), Miconazol (MIC), Econazol (ECO) y Ketoconazol (KETO) se expresa como S sensible, SI sensibilidad intermedia y R resistencia. Únicamente para 5-Fluocitosina y Anfotericina B se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/l.



Tabla 8. Relación de los pacientes sanos del grupo control negativo a candidosis bucal con la sensibilidad a los antifúngicos de los aislamientos de *Candida* (colonización).

| PACIENTES No | EDAD | SEXO | Especies de <i>Candida</i> | Antimicóticos (ATB FUNGUS) | | | | NIS | MIC | ECO | KETO |
|--------------|------|------|----------------------------|----------------------------|------|----------------|---|-----|-----|-----|------|
| | | | | 5FC CMI (mg/l) | | AMB CMI (mg/l) | | | | | |
| 1 | 2 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 2 | 5 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 3 | 2 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | S | S | S |
| 4 | 4 | F | <i>C. albicans</i> | S | 16 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 5 | 4 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 6 | 3 | M | <i>C. albicans</i> | R | >128 | S | 1 | S | R | R | R |
| 7 | 6 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 8 | 6 | M | <i>C. albicans</i> | S | 2 | S | 1 | S | SI | SI | SI |
| 9 | 7 | F | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | R | R | R | R |
| 10 | 4 | M | <i>C. albicans</i> | S | 8 | S | 1 | S1 | S1 | S1 | S1 |

* La sensibilidad a los 6 antimicóticos 5-Fluocitosina (5FC), Anfotericina B (AMB), Nistatina (NIS), Miconazol (MIC), Econazol (ECO) y Ketoconazol (KETO) se expresa como S sensible, SI sensibilidad intermedia y R resistencia. Únicamente para 5-Fluocitosina y Anfotericina B se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/l.



V. DISCUSIÓN

Las pruebas fisiológicas de tubo germinativo y clamidoconidia que se han empleado para la identificación de *Candida albicans* y *sp*, por mucho tiempo se han considerado confiables, ya que estas pruebas cuando ambas resultan positivas son indicativas de que la especie de *Candida* es *albicans*.^{3, 8, 36} Situación que no en todos los casos resulta confiable como se dio en este estudio. Esto se presentó cuando una de las dos pruebas fue negativa ya que al ser confirmadas por el API ID32 el resultado indicaba una *Candida albicans* y no *sp* como se creía a partir de las pruebas fisiológicas. Pero cuando ambas pruebas resultaban positivas y al ser diagnosticadas por API ID 32 si resultaban siempre ser *Candida albicans* como lo indicaban las pruebas fisiológicas.

En el caso del grupo de VIH/SIDA de las 10 cepas aisladas de *Candida* con las ambas pruebas fisiológicas positivas se encontraron 6 cepas diagnosticadas como *Candida albicans*, con ambas pruebas negativas tuvieron 2 cepas correspondiendo a *Candida sp*, 1 cepa con resultados de clamidoconidia positiva y tubo germinativo negativo diagnosticada como *Candida albicans* y otra cepa con resultados de clamidoconidia negativa y tubo positivo se diagnosticó como *Candida sp*. Por tal motivo para establecer y confirmar los diagnósticos de las identificadas y no identificadas se les aplicó el APIID 32, discrepando únicamente en el diagnóstico de la prueba fisiológica negativa a clamidoconidia y tubo germinativo positivo que había sido identificada como *sp*, que resultó ser por API ID 32 una *Candida albicans*. Con esta prueba se obtuvieron en forma confiable 8 cepas de *Candida albicans* (80%), una cepa de *Candida tropicalis* (10%) y una cepa de *Geotrichum capitatum* (10%; Gráficas 1 y 2)



En el caso de los niños con LLA se encontraron 7 cepas positivas a ambas pruebas fisiológicas diagnosticadas como *Candida albicans*. Y que fueron confirmadas por API ID 32 como *albicans*. En aquellas en las que ambas pruebas fisiológicas resultaban negativas se diagnosticaba como *Candida sp*, pero que al ser confirmadas por API ID 32 el resultado fue discrepante en una cepa ya que resulto ser *Candida albicans* y la otras si confirmo ser una *Candida parapsilosis*. Y con respecto a la cepa cuyo resultado negativo a clamidoconidia y positivo al tubo germinativo resulto ser *Candida albicans* por la prueba bioquímica del API ID32. Estos resultados nos indican que es necesario e importante aplicarles a todas las cepas de *Candida* sean *albicans* o no las pruebas bioquímicas, principalmente por el tipo de terapia antimicótica que se debe aplicar en cada caso.

Lo anterior obedece a que la candidosis bucal es la manifestación más común y frecuente que se presenta en pacientes con VIH/SIDA e inmudeprimidos (LLA) por otro tipo de enfermedad, destacando la tipo pseudomembranosa aguda.^{20,34} En este tipo de candidosis bucal se encuentra un fuerte predominio de especies de *Candida* de tipo *albicans* seguida por *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guillermoundi*, *C.tropicalis* ^{32,42,67.} en este estudio además de identificar *C. albicans* se encontraron *G. capitatum*, *C. tropicales* y *C. parapsilopsis* (Tablas 3 y 4). En tanto que en el grupo de niños sanos el 100% de las cepas correspondieron a *C. albicans*, esto puede hacer pensar que la inmunodepresión por la que atraviesan este tipo de pacientes sin importar la enfermedad favorece la instalación y colonización de otras especies de *Candida*, no así en los niños sanos en los que *Candida albicans* predomina dentro de la microbiota bucal.^{3, 8} como se presentó en los resultados del estudio.



Dentro de los aislamientos en el grupo de VIH se obtuvo un hallazgo importante el cual por diagnóstico clínico parecía ser una candidosis bucal pero que al examen directo resulto un hongo filamentoso y que por morfología fue un *Geotrichum sp* y al ser confirmado por el API ID 32 resulto ser un *Geotrichum capitatum*. Por lo cual resalta la importancia del examen directo y la confirmación de especies por pruebas bioquímicas.

Estos resultados son de suma importancia por el surgimiento de especies resistentes a los tratamientos antimicóticos debido a que los pacientes son sometidos a tratamientos repetitivos sin contemplar dosis ni tiempo de administración. En las pruebas de susceptibilidad a los antimicóticos utilizados "in vitro" aplicas a las especies de *Candida* por medio del ATB fungus el cual contiene seis antimicóticos que fueron nistatina, azoles (miconazol, econazol, ketoconazol), anfotericina B y 5 fluorocitocina a los tres grupos de estudio. Se encontró sensibilidad a estos antimicótico en CMI de 0.5 a 16 mg/L hasta resistencia a dosis de > 128 mg/L. Existen reportes de resistencia al clotrimazol por *Candida albicans* aisladas de pacientes VIH/SIDA⁴⁸. En otros estudios realizados a pacientes pediátricos con candidosis susceptible a clotrimazol se encontraron cepas resistentes a una CMI de 8 µg/L en donde sensibilidad al clotrimazol "in vitro" tenía una CMI de 0.05 µg/L, además con esta dosis se producía resistencia cruzada a otros azoles como el fluconazol e itraconazol un dato relevante en este estudio fue que los aislamientos que habian tenido un CMI mayor al 0.05 al clotrimazol se les tuvo que administrar anfotericina B para una mejor respuesta.⁴⁸

Walmsley⁶⁷ en su estudio encontró que el 61 % de las especies de *Candida* obtenidas de pacientes VIH/SIDA pediátricos y adultos con antecedentes de terapia de tipo azol eran clínicamente resistentes y al ser estudiadas las



cepas "*in vitro*" tuvieron una CMI que los clasificaba como resistentes y otras como dosis susceptible dependiente "*in vitro*". Para el fluconazol en este estudio la CMI considerada como resistente "*in vitro*" fue de 264 mg/L y para el itraconazol, se encontró dosis susceptible de CMI de 0.24 hasta 5mg/l.⁶⁷ En estudios clínicos con lesiones de candidosis en los que se administró nistatina, miconazol, ketoconazol para establecer el éxito o fracaso de los tratamientos antimicóticos en forma clínica en los pacientes pediátricos VIH/SIDA con predominio de *C albicans*. Clínicamente la mejor respuesta fue al miconazol en suspensión oral que la nistatina y estableció que el mejor tratamiento es a base de fluconazol oral.^{9, 29, 32, 42} Situación que no se presentó en este estudio debido a que en el grupo de pacientes pediátricos con VIH/SIDA las cepas de *Candida* tuvieron resistencia a los azoles "*in vitro*" en un 30 % con el miconazol, 20 % para el Econazol y 20 % para el ketoconazol interviniendo la especie *C. albicans* en todas las resistencias a los azoles, la sensibilidad intermedia fue de 30 % de las especies para el miconazol, 40% de las especies para el econazol y 40 % de las especies para el ketoconazol.

El 40 % de las especies fueron sensible a los tres azoles, en tanto que el 100% de las cepas fueron sensibles a los polienos como lo es la anfotericina B "*in vitro*" con una CMI de 1mg/L, en el caso de la nistatina que fue el otro polieno se encontró que el 90 % de las especies de *Candida* fueron sensibles y el 10% resistentes destacando esta última una cepa de *C. albicans*. Los reportes que existen al respecto solo hacen mención a la resistencia clínica a los polienos y esto es al tipo de presentación que se aplique, ya que los que tienen presentación en gel tienen un mejor efecto, esto es debido al tiempo que están en contacto con las mucosas³². Con respecto a la 5 fluorocitosina los resultados obtenidos en el grupo de niños VIH/SIDA se encontró que el



20 % de las cepas fueron resistentes con un CMI mayor de 128 mg/L (Tabla 6). Este antimicótico tiene la ventaja de actuar directamente con el ADN del hongo, pero presenta serias desventajas y esto es debido a que si se administra como único antimicótico ocasiona el desarrollo de resistencia al mismo, por lo que se recomienda el uso de éste fármaco con un azol (fungistático)²¹, facilitando de esta manera la destrucción de las cepas colonizantes, el grave problema que se presenta que los tratamientos antimicóticos son muy caros y el mal empleo y administración de estos puede perjudicar al paciente en lugar de beneficiarlo y hacer de un buen fungicida un antimicótico ineficiente. En este estudio las cepas resistentes a los azoles, nistatina y 5 fluorocitocina aisladas de los pacientes del grupo de VIH/SIDA no habían recibido tratamiento antimicótico previo de tal manera que este factor no repercutió en la resistencia que presentaron. Pero si existen reportes de estudios donde las dosis prolongadas en la terapia con fluconazol generó resistencia a este antimicótico en pacientes con VIH/SIDA.⁴⁰

En el grupo de paciente con LLA las cepas de *Candida* aisladas presentaron resistencia a los azoles (miconazol, ketoconazol y econazol) "in vitro" y para la anfotericina B, la 5 fluorocitosina y la nistatina "in vitro" fueron sensibles todas las especies de *Candida* (Tabla 7). Algunos de estos niños tuvieron antecedentes de terapia antimicótica, tal hecho hizo pensar que las cepas resistentes corresponderían a estos casos, lo cuál no sucedió ya que aquellos a los que se les aislaron las cepas resistentes no tuvieron terapia previa.



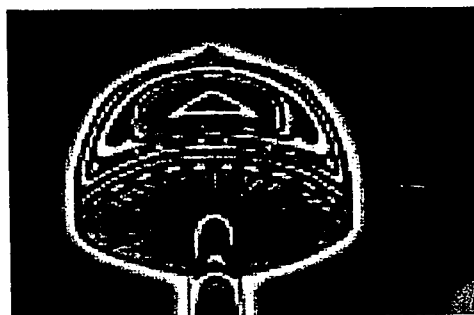
En cuanto al grupo de niños sanos, en los aislamientos de cepas de *Candida* se encontraron 4 cepas de *Candida albicans* con resistencia a los azoles y a la 5 fluorocitosina (Tabla 8). De igual manera este grupo de niños no habían recibido tratamiento antimicótico previo debido a que clínicamente no presentaban lesión candidosica, ni tampoco tenían antecedentes de haberla presentado, lo que llama la atención el hallazgo de encontrar cepas con resistencia "in vitro" a la 5 fluorocitosina y a los azoles. Estos resultados pueden indicar que no importa el estado de inmunodrepsión para encontrar casos de cepas con resistencia a la terapia antimicótica como se observa en el caso de los niños sanos de donde se obtuvieron cepas resistentes.

Otro factor que se podría relacionar para entender el comportamiento de las cepas de *Candida* es el estado de inmunocompromiso que tiene el paciente VIH/SIDA como sería la carga viral y el conteo de linfocitos CD4 ya que existen reportes en donde demuestran que cuentas de CD4 bajas y carga viral alta es un factor de riesgo de resistencia aunado al tratamiento antimicótico previo.⁴⁰ Situación que no concuerda con el presente estudio por los resultados obtenidos. Debido a que en este estudio no resultó de forma constante que la cuenta baja de linfocitos CD4 y la carga viral alta fueran factores de riesgo para la resistencia como se aprecia en la tabla 6 y el tratamiento antimicótico previo no influyó en el desarrollo de la resistencia a los antimicóticos "in vitro".

Esto da pauta para que todo profesionista en el área de la salud entienda y comprenda que la administración de un antimicótico en dosis y tiempo no es un juego y que el mal manejo de éstos puede repercutir en problemas serios.



VI. CONCLUSIONES





VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir:

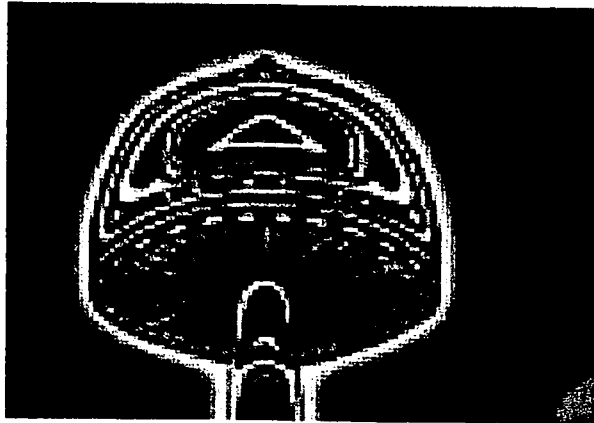
- La inmunodepresión como en el caso de los pacientes pediátricos VIH/SIDA o con LLA no es factor definitivo para el surgimiento de cepas resistentes de *Candida* a los antimicóticos "*in vitro*".
- El tratamiento antimicótico previo no es un factor preponderante para el desarrollo de resistencias "*in vitro*". Ya que en el estudio en aquellos pacientes en los que si recibieron tratamiento antimicótico no presentaron resistencias. A diferencia de la literatura la cual menciona que el factor de riesgo para la resistencia es el tratamiento antimicótico previo. Destacando que las resistencias encontradas de los aislamientos de *Candida* no tenían una historia de tratamiento antimicótico previo. Con estos resultados podríamos pensar que existen otros factores de riesgo para los aislamientos de estos pacientes que presentaron resistencia por lo que sugerimos, realizar más estudio que detallen con certeza que es lo que desencadena estos cambios de susceptibilidad. Tal vez podría ser una transmisión de una cepa resistente con historia de tratamiento antimicótico previo que de forma más precisa podría provenir de los padres o una persona que tenga contacto cercano con el paciente y con historia de tratamiento antimicóticos previos .



- El estado inmunológico de los pacientes con VIH/SIDA marcados por la cuenta de linfocitos CD4⁺ y la carga viral no influyen en desarrollo de la resistencia a los antimicóticos "in vitro" , de las cepas de *Candida albicans* y otras especies. Como si lo confirman estudios donde se menciona que la inmunosupresión marcada por una cuenta baja de CD4⁺ y carga viral alta es un factor de riesgo para la resistencia aunado al tratamiento antimicótico previo, intermitente y prologando. Para confirmar de forma mas convincente esta asevración sugerimos más estudios que confirmen este factor de riesgo para la resistencia a los antimicóticos.



VII. ANEXOS





VIII. REFERENCIAS

- 1.- Albertson. G, Nimi. M, Cannon. R and Jenkinson. H. **Multiple Efflux Mechanism Are Involved in *Candida albicans* Fluconazole Resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996: 40, 12; 2835-2841.
- 2.- Álvarez C. **Guía por la atención de paciente con infección VIH y SIDA.** 4 edición. CONASIDA, ISSTE e MISS.
- 3.-Arenas. R. **Micología Médica Ilustrada: Clínica, laboratorio y terapéutica.** Interamericana Mc Graw Hill 1993 pag 229-232.
- 4.-Asai. K, Tsuchimori. N, Okonogi, Perfect. J, Gotoh. O and Yoshida. Y. **Formation of Azole-Resistant *Candida albicans* by Mutation of Sterol 14-Demethylase P450.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999:43,5; 1163-1169.
- 5- Berhman. R, Eliegun. R y Jensai. B. **Nelson Tratado de Pediatría.** Mc Graw Hill Interamericana. 16 edición .2001. 1122-1132.
- 6.- Bernhardt. J, Herman. D, Sheridan. M and Calderone. R. **Adherence and Invasion Studies of *Candida albicans* Strains, Using in Vitro Models of Esophageal Candidiasis.** The Journal of Infectious Diseases. 2001: 184; 1170-75.
- 7.-Bille. J. **When should *Candida* Isolates be Tested for Susceptibility to Azole Antifungal Agents?** European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1997: 16, 4; 281-282.
- 8.-Bonifaz A. **Micología Médica Básica .** Méndez Editores S.A de C.V Novena edición 2000. Segunda impresión 1994. Pág.277-301.
- 9.-Boon. J M, Lafeber H. N, Mannetje A.H., van Olphen A. H. F, Smeets H.L.P and van der Vlist A.H.F. **Comparison of Ketoconazole Suspension and Nystatin in the Treatment of Newborns and Infants with Oral Candidosis.** Mycoses 1989 32(6)312-315.



- 10.-Brown D. M, Jabra-Rizk M. A, Fakler W. A, Baqui A. A and Meiller T. F. **Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV –seropositive pediatric dental patients.** Pediatric Dentistry 2000 May-Jun; 22(3):234-8.
- 11.- Calabrese. D, Bille. J, and Sanglard D. **A novel multidrug transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole.** Microbiology.2000:146;2743-2754.
- 12.-Calderone. A. R and Fonzi. W. A. **Virulence factors of *Candida albicans*.** TRENDS in Microbiology 2001: 9, 7 ; 327-335.
- 13.-Carlstedt .K, Krekmanova. L, Dahllof. G, Ericsson. B, Braathen G. and Modeer T. **Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome.** International Journal Paediatric Dentistry 1996 Jun; 6(2): 95-100.
- 14.-Costa L. R, Villena R. S , Sucasas P. S and Birman E. G. **Oral findings in paediatric AIDS: a case control study in Brazilian children.** ASDC J Dentistry Children 1998 May-Jun; 65(3):186-90.
- 15.-Darwazth A.M.G, MacFarlane T. W and Lamey P. J. **The in vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells (BEC) from diabetic and non- diabetic individuals after *in vivo* and *in vitro* application of nystatin.** Journal Oral Pathology and Medicine 1997: 26; 233-6
- 16.-Del Toro. A, R.Berkowitz, Cyril Meyerowitz, L.Frenkel. **Oral Findings in asymptomatic (P-1 and symptomatic (P-2 HIV –infected children.** Pediatric Dentistry-18:2, 1996.
- 17.-Ellepola. A. B. A and Samanrayake. L. P. **The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells.** Archives of Oral Biology 1998: 43; 879-887.
- 18.- Epstein. J. B and Polsky. B. **Oropharyngeal Candidosis: A Review of Its Clinical Spectrum and Current Therapies.** 1998:20,1; 40-57.
- 19.-Epstein J. B, Ransier A., Lunn R, Chin E, Jacobson J.J, Le N. And Reece. **Prophylaxis of candidiasis in patients with leukemia and bone marrow transplants.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics. 1996;81:291-6.



- 20.-Fonseca. R, A. Cardoso and Ivete Pomarico. **Frequency of oral manifestations in children infected with human immunodeficiency virus.** Quintessence Int 2000;31:419-422.
- 21.-Franz. R, Ruhnke. M and Morschhauser.J **Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*.** Mycoses 1999;42;453-458.
- 22.-Georgopapadakou. N. H. **Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs.** Current Opinion in Microbiology 1998: 1; 547-557.
- 23.-Goodman Gilmar. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** 9ª. Ed. México, Mc Graw Hill Interamericana,1996.
- 24.-Goyal. S and Khuller. G.K. **Structural and Functional Role of Lipids in Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*.** Lipids 1994;29,11; 793-797.
- 25.-Graybill. R. J. **The Future of Antifungal Therapy.** Clinical Infectious Diseases 1996: 22(Suppl 2); 8166-78.
- 26.-Ha. A And White. C. **Effects of azole Antifungal Drugs on the Transmission from Yeast Cells to Hyphae in Suceptible and Resistant Isolates of the Pathegenic Yeast *Candida albicans*.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 1999;43,4;763-768.
- 27.-Hannula. J, Saarela. M, Joisimies-Somer. H, Takala. A, Syrjanen. R, Kononen. E and Asikainen. S. **Oral Microbiology Immunology** 1999Jun;14(3): 176-82.
- 28.-Haynes K. **Virulence in *Candida* species.** TRENDS in Microbiology 2001: 9, 12; 591-596.
- 29.-Hernandez-Sampelayo. T and Multicentre Study Group. **Fluconazole versus Ketoconazole in the Tratment of Oropharyngeal Candidiasis in HIV-Infected Children.** European Journal Clinical Antimicrobial and Infectious Diseases. 1994: 13, 4 ; 340-344.
- 30.-Herrera. R. J, Mormeneo. S, Vanaclocha. P, Font-de Mora. J, Iranzo. M, Puertes. I and Sentadreu. R. **Structural organization of the componets of the cell wall from *Candida albicans*.** Microbiology 1994;10; 1513-1523.



- 31.-Hicks M. J, Carter A. B, Rossman S. N, Demmler G. J, Simon C. L, Cron. S. G, Flaitz .C. M, Shearer W.T and Kline M. W. **The Pediatric Infections Disease Journal. Detection of fungal organism in saliva from HIV-infected children: a preliminary cytologic analysis.** Pediatric Dentistry 1998 May-Jun;20(3):162-8.
- 32.-Hoppe. J. E and The Fungals study Group. **Treatment of oropharyngeal in immunocompetent infants: a randomized multicenter study of miconazole gel vs nystatin suspension.**1997;16, 3:288-293.
- 33.-Kauffman. C. **Role of Azoles in Antifungal Therapy.** Clinical Infectious Diseases. 1996;22, suppl 1; 8148-53.
- 34.-KohngKhutian. P, Mgrote, W. Isaratan, S.Piyaworawong y P.A. Reichart. **Oral manifestations in HIV –positive children from Northern Thailand.** J.Oral Pathol Med 2001:30: 549-52.
- 35.-Lepov. P y Mc Cracken. **Enfermedades infecciosas en pediatría.** Editorial Medica Panamericana. 22ª edición. 1992. 369-382.
- 36.-López. R, Méndez. J, Hernández. F y Castañon. R. **Micología Médica: procedimiento para el diagnostico de laboratorio.** Editorial Trillas 1995. pag. 99-107.
- 37.-Lynch D.P **Oral Candidosis, History, Classification and Clinical presentation.** Oral Surg.1994,78: 189-93.
- 38.-Lynch. D, Brihtman y Greenberg. **Medicina Bucal de Burket.** Novena Edición. Mc Graw-Hill Interamericana 1996. 63-574.
- 39.-Lyons. C and White. T. **Transcriptional Analyses of Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans*.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 2000:44, 9; 2296-2303.
- 40.-Maenza. R. J, Keruly. C. J, RichardD. Moore, Chaisson R. E, William . G M and Gallant E. J. **Risk Factors for Fluconazole –Resistant Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus- Infected Patients.** The Journal of Infectious Diseases 1996: 173; 219-25.
- 41.- Mago. N and Khuller. K. G. **Lipids of *Candida albicans*: subcellular distribution and biosynthesis.** Journal of General Microbiology 1990: 136; 993-996.



- 42.-Marchisio. P and Principi. N. **Treatment of Oropharyngeal in –HIV – Infected Children with Oral Fluconazole.** European Journal Microbiology and Infectious Diseases.1994:13, 4; 338-340.
- 43.-Marodi. L. **Local and sistemyc host defense mechanism againts Candida: immunopatology of candidal infections.** Pediatric Infectious Diseases Journal. 1997: 16; 795-801.
- 44.-Mattos-Graner R. O, de Morales. A. B, Rontani R. M and Birman. E. G. **Relation of oral yeast infection in Brazilian infants ans use of a pacifier.** ASDC Journal Dentistry Children 2001 Jan-Feb; 68(1) : 33-6,10.
- 45.-McKenna . J . **Leukemia.** Oral Surgery Oral Pathology Oral Radiology and Endodotics. 2000;89: 137-139.
- 46.-Muller. FM, Kasai. M, Francesconi. A, Brillante.B, Roden. M, Peter. J, Chanock. SJ and Walsh. TJ. **Transmission of an azole-resistant isogenic of Candida albicans among human immunodeficiency virus-infected family members with oropharyngeal candidiasis.** Journal of Microbiology 1999 Oct;37(10):3405-8.
- 47.-Nicolatau. O, Theodoridou. M, Mostrou. G, Velegraki. A and Legakis. NJ. **Oral lesions in chindren with perinatally human immunodeficiency virus infection.** Journal of Oral Pathology and Surgery 1999Feb;28(2):49-53.
- 48.-Pelletier. R, J. Peter, C.Antin, C.Gonzales, L.Wood and T.Walsh. **Emergence or Resistance ofCandida albicans to Clotrimazole in Human Immodeficiency Virus –Infected Children: In vitro and Clinical Correlations.** Journal of Clinical Microbiology.2000; Apr, 38,4: 1563-1568.
- 49.-Rex H. Jhon, Walsh. J, Sobel. J, Filler. S, Scott. G, Pappas. P, Dismukes. W and Edwards. J.E. **Practice Guidelines for the Treatment of Candidosis.** Clinical Infectious Diseases. 2000:30;662-78.
- 50.-Roitt. I, Broster. J y Male. D. **INMUNOLOGÍA.** 1991. 2da edición. Editorial Salvat. Barcelona pag. 22.1-22.10.
- 51.-Samanarayake. L. P, Hughes. A, Weetman. D. A and MacFarlane T. W. **Grot and acid production of Candida albicans in human saliva suplementes saliva with glucosa.** Journal of Oral Pathology 1986: 15; 251-254.



52.-Samanarayake. L. P, Geddes. D.A.M, Weetman. D .A and Macfarlane. **Growth and acid production of *Candida species* in carbohydrate supplemented media.** Microbios 1983 : 37; 105-115

53.-Samanarayake. L. P. **Oral Candidosis.** 1990: 21-119.

54.-Sanglard. D, Ischer.F, Calabrace.D, Magcherczik.P and Bille. J. D **ATP Binding Cassette Transporter Gene *CgCDR1* de *Candida glabrata* is involved in the Resistance of Clinical Isolates to Azole Antifungal Agents.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy 1999:43,11:2753-2765.

55.-Sanglard. D, Ischer. F, Koymans. L, and Bille. **Amino Acid Substitutions in the Cytocrome P-450 Lanosterol 14 alfa- Demethylasa (CYP51A1) from Azole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates Contribute to Resistance to Azole Antifungal Agents.**Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 1998:42,2; 241-253.

56.-Sanglard. D, Kuchler. K, Ischer. F, Pagani.J, Monod. M and Bille. J. **Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* lfrom AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transporters.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy 1995:39,11; 2378-2386.

57.-Sharon . W, King. S, McGeer A, Ye . Y and Richardson. S. **Oropharyngeal Cnadidiasis in patiets with Human Immunodeficiency Virus: Correlation of Clinical Outcome with In Vitro Resistance, Serum Azole Levels, and Immunosupression.** Clinical Infectious Diseases 2001;32:1554-61.

58.-Sheperd. M. G . **Morfogenic transformation in fungi.** In Current Topics Medical Mycology, edited by M. R Mc Ginnis 1988 Vol 2; 278.304

59- Sofia P., López-Ribot.I Kirkpatrick.W, Mcatee. R, Santillan.M, Martínez.M, Calabrase.D, Sanglard. D, and Patterson. **Prevalence of Molecular Mechanism of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients.** Antimicrobial Agents and Chemoterapy 2001:45,2676-2684.

60.-Soll D. R, Slutsky. B, MacKensy . Langtimm. C and Staebell. M **Switching systems in *Candida albicans* and their possibles roles in oral**



candidosis. In Oral Mucosal Diseases: Biology, Etiology and Therapy 1987: 52-59.

61.-Swinnw. D, Wuytack-Raes. C, Van Looveren. K and Desmet. P. **Comparative evaluation of Fungitest, Neo-Sensitabs and M27T-NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*.** Mycoses 1999: 42; 231.237.

62.-Tanida. T, Ueta. E, Tobiume. A, Hamada. T, Rao.F and Osaki. T. **Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva.** Journal of Pathology and Medicine 2001: 30; 328-35.

63.-Tornatore. M. A, Noskin. G. A, Hacek. D. M, Obias. A. A and Peterson. L. R. **Effects of Incubation Time and Buffer Concentration on In Vitro Activities of Antifungal Agents againsts *Candida albicans*.** Journal of Clinical Microbiology 1997: 35, 6 : 1473-1476.

64.-Tortorano. A. M, Viviani. M. A, Barchiesi. F, Arzeni. D, Rigoni. L. A, Cogliati. M, Compagnucci. P and Scalise. G. **Comparison of Three Methods for Testing Azole Susceptibilities of *Candida albicans* Strains Isolated Sequentially from Oral Cavities of AIDS Patients.** Journal of Clinical Microbiology 1998: 36, 6; 1578-1583.

65.-Velasco. A, Lorenzo. P, Serrano. S y Tellez. A. **Velazquez Farmacologia.** Interamericana Mc Graw Hill. 16 edición 1996. pag 998-1011.

66.-Villanueva.A, Arathoon. G. E, Gotuzzo. E, Berman. S, DiNubile.M. J and Sable. C. A. **A Randomized Double-Blind Study of Caspofungin versus Amphotericin for the Treatment of Candidal Esophagitis.** Clinical Infectious Diseases 2001: 33; 1529-35.

67.- Walmsley.S,King.S,McGeer.A,Yanna.Y,Richardson.S **Oropharyngeal Candidiasis in Patients with Human Immunodeficiency Virus: Correlation of Clinical Outcome with In Vitro Resistance, Serum Azole Levels, and Immunosuppression.**Clinical InfectiousDiseases 2001;32: 1554-61.

68.-Whalin B. Y. **Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 1991;71:689-95.



68.-Whalin B. Y. **Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 1991;71:689-95.