

Trabajos Originales:

**DETECCIÓN DE *Candida albicans*. EN LESIONES DE LEUCOPLASIA VELLOSA BUCAL DE UN GRUPO DE PACIENTES VENEZOLANOS VIH+**

**Recibido para publicación: 13/04/2009**

**Aceptado para publicación: 13/05/2009**

**Xiomara González <sup>1</sup>, Maria Correnti <sup>2</sup>, Helen Rivera, Marianella Perrone**

1. Estudiante Postgraduado del Programa de Medicina Bucal
2. Profesor Asociado, Jefe del Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular, Instituto de Investigaciones Odontológicas Dr. Raul Vincentelli, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.
3. Profesora Titular, Directora del Instituto de Investigaciones Odontológicas, Jefe del Laboratorio de Patología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.
4. Profesor Titular Instituto de Investigaciones Odontológicas Dr. Raul Vincentelli, Universidad Central de Venezuela.

**Título corto:** Detección de Candida en Leucoplasia Velloso Oral

**Dirección de correspondencia:** Dra María Correnti. Mcorrentip .

Fax: 00582126053796 Teléfono: 00582126053796

**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de la infección por *Candida albicans* en lesiones de Leucoplasia Velloso Bucal (LVB) en un grupo de pacientes VIH+ en una muestra de la población venezolana. Para ello se evaluaron 21 pacientes adultos VIH+, con lesiones clínicas de Leucoplasia Velloso Bucal, 11 con terapia antiretroviral y 10 sin terapia, y 10 pacientes adultos VIH- con lesiones hiperqueratósicas de la mucosa oral provenientes del Centro para la Atención de Pacientes con Enfermedades Infectocontagiosas de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. Los pacientes fueron examinados clínicamente para la detección de lesiones presentes en la mucosa oral, confirmándose el diagnóstico con el estudio histopatológico. La infección por *C. albicans* se determinó mediante biopsias de las lesiones para su estudio histopatológico empleando dos técnicas diferentes, coloración de Pass y método de Grocott, y cultivo microbiológico en medio Agar Sabouraud. Resultados: En pacientes VIH+ según los distintos métodos empleados se pudo observar que mediante el cultivo en Agar Sabouraud 6/21 (29%) de los pacientes fueron positivos y 15/21 (71%) fueron negativos. Con respecto a la coloración de Grocott, todos los 21 pacientes fueron positivos, mientras que con la coloración de PAS, 17/21 (81%) de los pacientes fueron positivos y 4/21 (19%) fueron negativos. En el caso de los pacientes VIH- con leucoplasia bucal, 1/10 (10%) resultó positivo mediante el cultivo en Agar Sabouraud y 9/10 (90%) fueron negativos. Mediante la coloración de Grocott todos los pacientes (10) fueron negativos para la presencia del hongo, e iguales resultados fueron obtenidos con la coloración de PAS.

Conclusión: Se observó una mayor prevalencia de la infección por *C. albicans* en pacientes VIH+ lo que demuestra que la presencia del hongo, constituye un factor fuertemente asociado a los pacientes con LVB.

**Palabras clave:** Leucoplasia Velloso Bucal, *Candida albicans*, Virus de Inmunodeficiencia Humana.

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of *Candida albicans* infection in Oral Hairy Leukoplakia (OHL) in Venezuelan HIV+ population. We evaluated 21 HIV+ adults patients with the clinical diagnosis of OHL, 11 under antiretroviral therapy, 10 without and 10 HIV negative adults with hyperkeratotic lesions on the oral mucosa as a control group, from the Center of Infectious diseases, Faculty of Dentistry, Central University of Venezuela. All patients were clinically examined and definitive histopathological diagnosis was made. *C. albicans* was detected by two different histochemical methods: PAS and Grocott and microbiological culture using Agar Sabouraud medium. The results demonstrated that 6/21 (29%) patients were positive by microbiological culture and 15/21 (71%) were negative. All the patients were positive by Grocott special stain while 17/21 (81%) were positive using PAS. In the control group, 1 patient was positive by culture and 9/10 (90%) were negative. Additionally, all the patients were negative by Grocott and PAS. In conclusion, we observed a higher prevalence of *C. albicans* infection in HIV+ patients, suggesting that the presence of this microorganism may constitute an associated factor in OHL.

**Keyword:** Oral Hairy Leukoplakia, *Candida albicans*, Human Immunodeficiency Virus.

### INTRODUCCION

La Candidiasis bucal es la infección oportunistica mas frecuente encontrada en individuos infectados por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).(1-3) Algunos estudios han demostrado que el conteje de linfocitos T CD4 puede ser usado como un indicador de la progresión de esta patología (4,5).

La ocurrencia de la enfermedad está asociada con un conteje de Linfocitos T CD4 menor de 200cel/mm<sup>3</sup> y una alta carga viral permite la progresión de esta. (1,6)

El curso tan prolongado de la infección por VIH predispone a los pacientes a sufrir episodios recurrentes de Candidiasis que puede incrementarse en frecuencia y severidad con la progresión de la enfermedad por VIH. (7)

El uso de la terapia antirretroviral mediante la combinación de una serie de fármacos algunos de incorporación reciente, para el tratamiento de la infección por VIH/SIDA, ha originado un cambio drástico de la enfermedad en los países desarrollados, mejorando la calidad de vida del paciente, mediante la disminución de la frecuencia de infecciones oportunisticas y retrasando la evolución de la enfermedad (8) Sin embargo, la infección por *Candida spp* continúa siendo la lesión bucal más frecuente asociada a la infección por VIH.

Investigaciones previas realizadas en Venezuela (9) demostraron que la Candidiasis Oral Pseudomembranosa fue la infección oportunistica más frecuente en nuestro país, seguida por

la Leucoplasia Velloso, Leucoplasia Bucal e Hiperpigmentación Melánica, observándose una alta carga viral asociada a la presencia de lesiones, independientemente del conteo de células CD4+.

La LVB representa una condición relativamente frecuente en pacientes VIH+ asociada con VEB, cuya presencia tiene un elevado valor pronóstico, por lo que es considerada un importante marcador de inmunodeficiencia, especialmente en la infección por VIH, ya que aproximadamente el 10% de los individuos que la padecen presentan SIDA en el momento del diagnóstico de la lesión, y el 20% la padecerá en los siguientes 8 meses al mismo (10).

Con respecto a su agente causal, VEB es un miembro de la familia Herpesviridae, subfamilia Gammaherpesvirinae, que infecta linfocitos y células epiteliales. Los estudios de seroprevalencia de VEB indican que más del 90% de la población mundial presentan anticuerpos para VEB, siendo este el agente etiológico de enfermedades malignas que incluyen linfoma de Burkitt's y carcinoma nasofaríngeo, Linfoma de células B, entidades caracterizadas por una infección latente de VEB y proliferación celular. (11,12) .Adicionalmente existen reportes en la literatura que han demostrado una asociación de *C albicans* en lesiones de LVB (13,14).

Considerando que existen reportes en la literatura donde se ha observado la asociación de *Candida albicans*. en lesiones de LVB, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de la infección por este hongo en lesiones de Leucoplasia Velloso Bucal en un grupo de pacientes VIH+ en una muestra de la población venezolana.

## MATERIAL Y METODOS

En la presente investigación se incluyeron 21 pacientes adultos VIH+, con lesiones clínicas de Leucoplasia Velloso Bucal, 11 bajo terapia antirretroviral y 10 sin terapia, y 10 pacientes adultos VIH- con lesiones hiperqueratósicas de la mucosa bucal, provenientes del Centro para la Atención de Pacientes con Enfermedades Infectocontagiosas de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. Se excluyeron de este estudio pacientes con lesiones blancas previamente diagnosticadas como liquen plano bucal .

A cada uno de los pacientes se le realizó una detallada historia clínica, así como una minuciosa evaluación clínica, realizada en todos los casos por el mismo examinador, siguiendo los criterios clínicos de Clearinghouse (15) Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio. Aquellos pacientes con lesiones blancas fueron seleccionados de acuerdo a los criterios de leucoplasia bucal reportados por Axell y col. (16)

Una vez realizada la evaluación clínica, se tomaron muestras para biopsia de los pacientes que presentaron lesiones en la cavidad bucal, para confirmar el diagnóstico de Leucoplasia Velloso, así como el raspado de las mismas con espátula 7A para la detección de *C albicans*. El raspado para la recolección de las muestras se realizó con la parte roma del instrumento; posteriormente las mismas fueron sembradas en medio de cultivo selectivo para el crecimiento de *C albicans* (Agar Dextrosa Sabouraud con cloranfenicol) y llevados a la estufa a una temperatura de 37°C por 48h en condiciones de aerobiosis. En los casos donde hubo crecimiento de levaduras, se tomó una pequeña porción de la colonia y se sembró en Placas de Petri con Agar Dextrosa Sabouraud s con la finalidad de lograr el crecimiento de colonias separadas en la superficie del medio para su posterior identificación. Los medios de cultivo

inoculados fueron incubados a 37°C por 24-48 horas en condiciones de aerobiosis.

Posteriormente se realizó la observación macroscópica para determinar si existían o no manifestaciones características del crecimiento de *C albicans*, incluyendo: color, forma, tamaño y consistencia de las mismas.

A partir de las colonias obtenidas se realizó un examen directo con la finalidad de observar la presencia de levaduras, empleando para ello un microscopio óptico de luz marca Leitz con lente de 40X. Una vez visualizadas las levaduras se procedió a la realización de pruebas rápidas para la identificación del hongo. Se realizaron dos tipos de pruebas rápidas: producción de tubo germinal (filamentización en suero) y producción de claminconidias.

Para la realización de la primera prueba se tomó una pequeña porción de la colonia y se sembró en 0,5 ml de suero humano, luego de lo cual se procedió a su incubación en la estufa a 37°C por 2 horas, al cabo de las cuales se tomó una muestra del mismo, se llevó a una lámina portaobjeto y se realizó la observación macroscópica al fresco. Esta es una prueba rápida para identificar *C. albicans*, ya que es la única levadura que produce tubos germinales en un tiempo corto, los cuales se observaron como extensiones de levaduras semejantes a las hifas y que usualmente se producen sin una constricción en su punto de origen.

Para la producción de claminconidias se sembró una pequeña porción de una colonia en el medio Bilis-Agar, se incubó a 28°C por 48-72 horas, posterior a lo cual se procedió a tomar un inóculo en lámina portaobjeto para su observación microscópica, evidenciándose como estructuras esféricas o redondas, de doble pared, localizadas generalmente en los extremos terminales de las hifas tabicadas y/o pseudohifas.

Se realizaron coloraciones específicas para hongos, incluyendo la coloración de PAS y método de Grocott. Se consideraron positivas las muestras al PAS cuando tomaron un color magenta (rojo púrpura,) mientras que con la coloración de Grocott los hongos se observan de color negro.

## RESULTADOS

En el presente estudio fueron evaluados 21 pacientes VIH+ con lesiones clínicas de Leucoplasia Velloso Oral, 20 de ellos pertenecían al género masculino (95%) y uno solo al femenino (5%), en edades comprendidas entre 21 y 60 años ( $45,5 \pm 12,3$ ). Adicionalmente se incluyeron 10 pacientes VIH- con lesiones hiperqueratósicas de la mucosa oral, 6 de los cuales fueron del género masculino (60%) y 4 del femenino (40%) con un promedio de edad de  $51,94 \pm 16,8$  y un rango entre 21 y 70 años de edad. Con respecto al estilo sexual en el grupo VIH+ se observó un predominio de hombres que tenían sexo con hombres 20/21 (95%), y solo 1/21 era heterosexual (5%), mientras que en el grupo VIH- todos fueron heterosexuales.

En relación a la distribución de los pacientes VIH+ con Leucoplasia Velloso Oral, y la localización anatómica de la lesión, se observó que 9/21 (43%) de los pacientes tenían la lesión localizada en el lado izquierdo de la lengua, 10/21 (47%) en el lado lateral derecho, 1/21 (5%) en ambos bordes laterales de la lengua y 1/21 (5%) en la mucosa oral. Referente a los pacientes VIH- con lesiones hiperqueratósicas, se observó la lesión en la mucosa del carrillo izquierdo en 3/10 (30%) de los casos, en el lado derecho en 1/10 (10%), en ambos lados en 4/10 pacientes (40%) y en 2/10 (20%), se observó tanto en la mucosa oral

como en la lengua.

El diagnóstico clínico de Leucoplasia Velloso Oral fue confirmado en todos los pacientes VIH+ mediante el estudio histopatológico observándose paraqueratosis, superficie corrugada e irregular del epitelio de superficie, células con cambios de núcleo claro, patrón de marginación periférica de cromatina, acantosis, cambios colilocíticos o células balonzadas en la capa de células espinosas. (Fig N° 1)

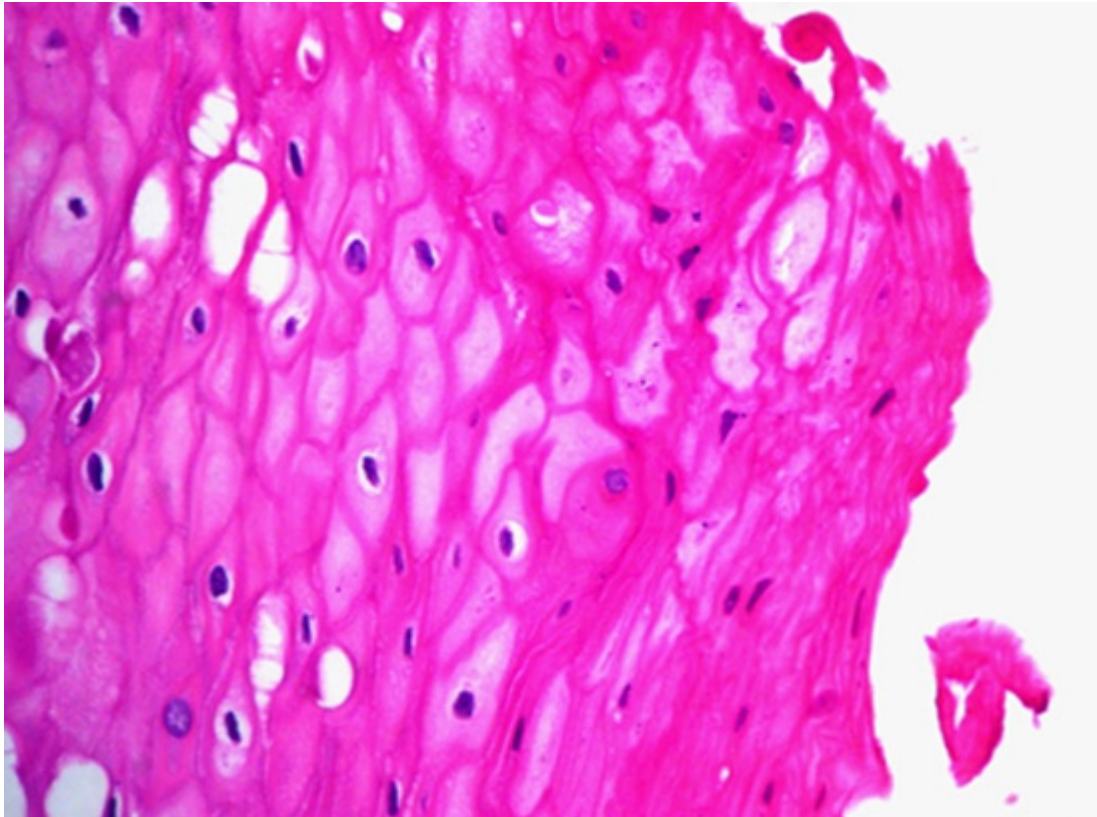


Fig 1  
Aspecto histopatológico de Leucoplasia Velloso Bucal. Hematoxilina y Eosina.  
Magn original: X 40

En el grupo de los pacientes VIH- con lesiones hiperqueratósicas de la mucosa oral, un solo caso presentó ortoqueratosis, acantosis y displasia epitelial severa, un caso fue diagnosticado como Liquen Plano Bucal, y 8 como Ortoqueratosis/ Paraqueratosis y Acantosis, cambios compatibles con queratosis friccional.

Con respecto a la positividad para *Candida* en pacientes VIH+ según los distintos métodos empleados se pudo observar que mediante el cultivo en Agar Sabouraud 6/21 (29%) de los pacientes fueron positivos y 15/21 (71%) fueron negativos. Con respecto a la coloración de Grocott, todos los 21 pacientes fueron positivos, mientras que con la coloración de PAS, 17/21 (81%) de los pacientes fueron positivos y 4/21 (19%) fueron negativos.

En el caso de los pacientes VIH- con leucoplasia bucal, 1/10 (10%) resultó positivo mediante el cultivo en Agar Sabouraud y 9/10 (90%) fueron negativos. Mediante la coloración de Grocott todos los pacientes (10) fueron negativos para la presencia del hongo, e iguales resultados fueron obtenidos con la coloración de PAS. (Figs 2 y 3)

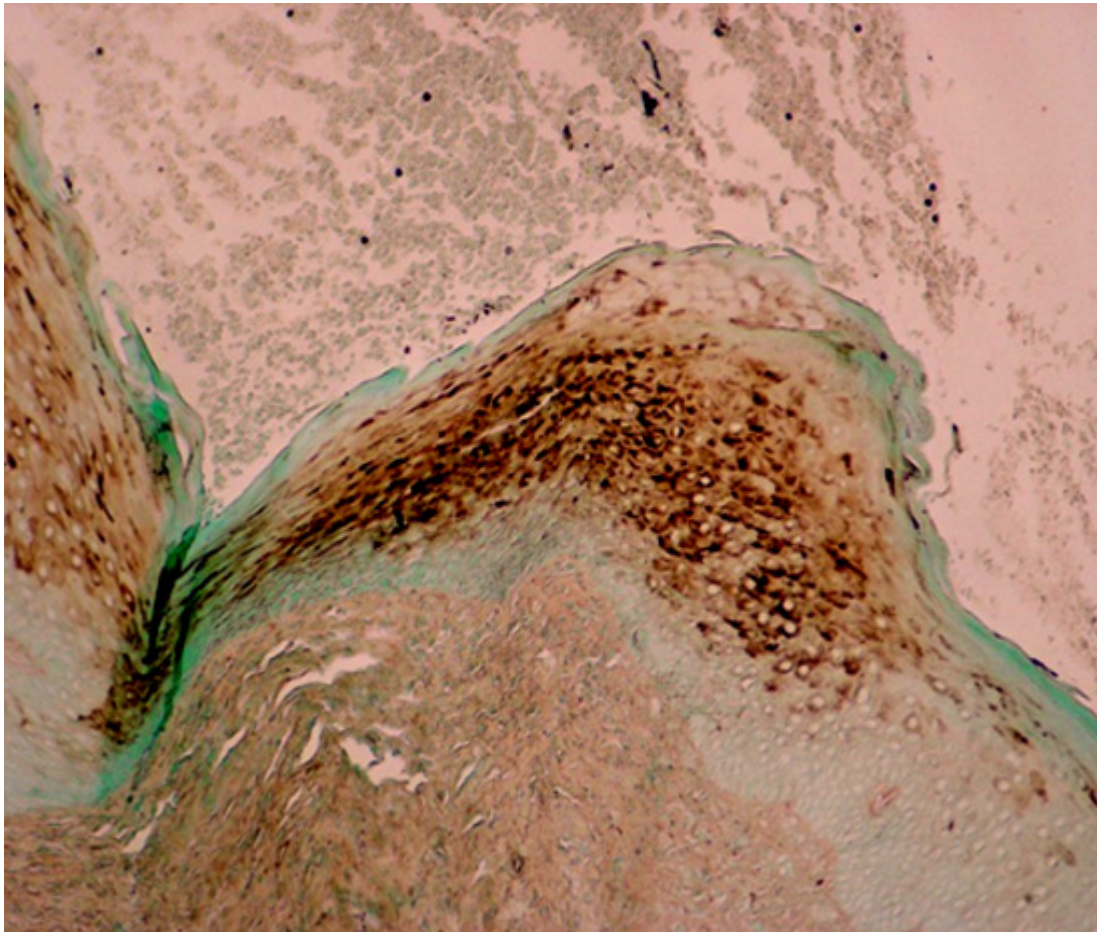


Fig 2

Imagen de LVO con coloración especial de Grocott Magn Orign X20. La imagen muestra hifas de *Candida albicans* en el epitelio de la muestra de Leucoplasia vellosa Bucal

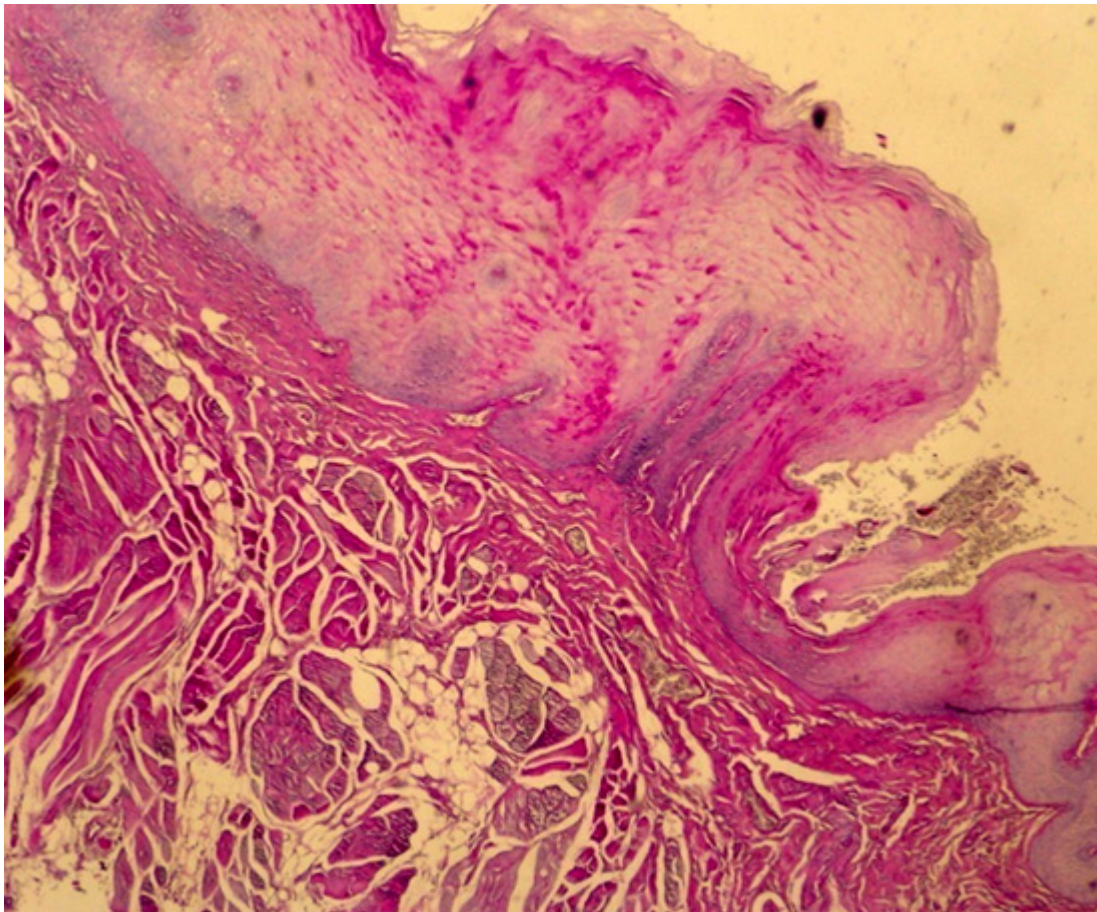


Fig 3

Detección de *Candida albicans* mediante coloración especial de PAS. Magn Origin X 20.

## DISCUSION

La capacidad de *C. albicans* de producir cambios dramáticos en la morfología celular bajo una variedad de señales microambientales ha atraído mucha atención ya que este efecto puede ser responsable de la principal contribución a la virulencia de este organismo (17). Análisis genéticos y moleculares han confirmado esta hipótesis y han demostrado que los genes que gobiernan la morfología celular son co-regulados con los genes que codifican para factores de virulencia tales como proteasas y adhesinas. (17).

Los mecanismos regulatorios de transcripción de *C. albicans* aseguran que la hifas sean producidas concomitantemente con factores de virulencia, resultando en células que se adaptan para la invasión de los tejidos en individuos inmunocomprometidos. Las hifas son capaces de ejercer fuerzas mecánicas, permitiendo la penetración de las superficies epiteliales, y produciendo daño en el endotelio, permitiendo el escape de *C. albicans* del torrente sanguíneo del hospedero. Por ello la morfogénesis de las hifas es parte integral de el mecanismo de virulencia de *C. albicans*. (17)

En la presente investigación nos planteamos como objetivo la detección de *C albicans* en

lesiones de Leucoplasia Velloso Bucal de un grupo de pacientes venezolanos VIH+ y VIH-.

La distribución de la población estudiada por género demostró que el 95% de los individuos VIH+ con LVB correspondían al género masculino y el 5% al femenino, con edades comprendidas entre 21 y 60 años. Estos resultados difieren de otras investigaciones (18), que han reportado al género femenino como el más afectado y coinciden con otros autores que refieren al género masculino como el más prevalente (19). La notoria prevalencia de la infección por VIH observada en hombres puede ser debido a los altos índices de transmisión entre hombres que tienen sexo con hombres, que en nuestro estudio alcanzó la cifra del 95%, datos estos similares a los reportados por otros autores (19). En relación a la distribución de los pacientes con LVO según el rango de edad, se observó que el promedio fue similar entre el grupo VIH+ y VIH-

Con respecto a las características clínicas de la lesión, nuestros resultados coinciden con reportes previos en la literatura donde se describe a esta entidad como lesiones blancas, no removibles que se desarrollan en los bordes periféricos de la lengua, uni o bilateralmente. Su superficie puede ser plana corrugada o vellosa y usualmente aparece en pacientes con inmunosupresión severa, especialmente aquellos que viven con VIH (20,21).

Es importante resaltar que en nuestro estudio se realizaron dos tipos de tinciones especiales para determinar la presencia de *C albicans* en las lesiones de LVB, el primero de ellos fue impregnación por sales de plata, método de metelanina-nitrato de plata (Método de Grocott), y el otro el Método de PAS, con ácido periódico de Schiff. El 100% de los pacientes resultaron positivos para Grocott, evidenciándose las hifas de *C albicans* en la capa córnea. Con la técnica de PAS, se observó que la mayoría de los pacientes (81%) fue positivo para *C albicans*, sin embargo, la primera de ellas fue una técnica de una mayor sensibilidad y especificidad para la detección del hongo. Se observó una mayor prevalencia de la infección por *C albicans* en pacientes VIH+ lo que demuestra que la presencia del hongo, constituye un factor fuertemente asociado a los pacientes con LVB.

## Bibliografía

1. Matee ML, Scheutz F, Moshy J. Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians. *Oral Dis.* 2008; 6:106-111.
2. Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM et al. Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Disease.* 2000; B:151-160.
3. Kamiru NH, Naidoo S. Oral HIV lesion and oral health behavior of HIV-positive patients attending the Queen Elizabeth II Hospital, Maseru, Lesotho. *South African Dental J.* 2002; 57:479-482.
4. Schuman P, Ohmit SE, Sobel JD, Mayer KH, Greene V, Rompalo A, et al. Oral lesions among women living with or at risk for HIV infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Am J Med.* 1998; 104:559-564.
5. Greenspan D, Komarof E, Redford M, Phelan JA, Navazash M, Alves ME et al. Oral



- mucosal lesions and HIV viral load in the Womens Interagency HIV Study (WHIS). *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 25:44-50.
6. Campo J, Del Romero J, castilla J, García S, Rodríguez C, Bascones A. Oral candidiasis is a clinical marker related to viral load. CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31:5-10.
  7. Poederly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients; evidence for two patterns of recurrence. *J Infect Dis*. 1993; 168:463-466.
  8. Aquino-García SI, Rivas MA, Ceballos-Salobreña A, Acosta Gio AE, Gaitán Cepeda LA. Short communication: oral lesions in HIV/AIDS patients undergoing HAART including efavirenz. *AIDS Res Hum Retrovirus* 2008; 24:815-20.
  9. Bravo I, Correnti M, Escalona L, Perrone M, Brito A, Tovar V, Rivera H. Prevalencia de lesiones bucales en pacientes VIH+ , relación con contaje de células CD4+ y carga viral en una población Venezolana. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:33-9.
  10. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves ME, MacPhail LA, Mulligan R, Greenspan JS. Incidence of oral lesions in HIV-1 infected women: reduction with HAART. *J Dent Res* 2004; 83: 145-150.
  11. Cohen JL. Epstein Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; 343:481-492.
  12. Young LS, Rickinson A. Epstein Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:757-768.
  13. Diaz EP, Rocha ML, Silva Junior A, Spyrides KS, Ferreira SM, Polignano GA. Oral hairy leukoplakia and cytopathologic features of a subclinical phase. *Am J Clin Pathol*. 2000;114:395-401.
  14. Pineri E, Omlie J, Pambuccian S, Koutlas IG. Oral Hairy leukoplakia in HIV-Negative patients: Report of 10 cases. *Int J Surg Pathol*. 2008; 25.
  15. Clearinghouse EC. On oral problems related to HIV infection and WHO Collaborating Center on Oral Manifestation of the Immunodeficiency Virus. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. *J Oral Pathol Med* 1993;22:289-91.
  16. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco related lesions: conclusions of an international symposium held in Upsala, Sweeden, May 18-21 1994. International Collaborative group on oral white lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:49-54.
  17. Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*. 2005; 59:113-33.
  18. Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian

study population. J Oral Pathol Med 2001; 30:22-8.

19. Khongkuntian P, Grote M, Isaratanan W, Piyaworawong S, Reichart PA. Oral manifestation in HIV-positive adults from Northern Thailand. J Oral Pathol Med 2001; 30: 220-3.

20. Eversole LR, Jacobsen P, Stone C, Freckleton V. Oral condyloma planus (hairy leukoplakia) among homosexual men: a clinicopathologic study of 36 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 61:249-55.

21. Greenspan J, Greenspan D. Oral hairy leukoplakia :diagnosis and management. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 67:396-403.