

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRIA EN MEDICINA ESTOMATOLOGICA

**“DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA* EN  
PACIENTES CON LESIONES LEUCOPLASICAS DE CAVIDAD BUCAL”**

Trabajo Especial presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela por la  
Od. Gina Paola Varón Scovino  
Para optar al título de:  
*Magíster Scientiarum* en Medicina Estomatológica.

Caracas, 17 de Noviembre de 2004.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRIA EN MEDICINA ESTOMATOLOGICA

**“DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA* EN  
PACIENTES CON LESIONES LEUCOPLASICAS DE CAVIDAD BUCAL”**

Tesista: Gina Paola Varon Scovino.

Tutora: Janet Lazarde Lunar.

Caracas, 17 de Noviembre de 2004.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRIA EN MEDICINA ESTOMATOLOGICA

**“DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA* EN  
PACIENTES CON LESIONES LEUCOPLASICAS DE CAVIDAD BUCAL”**

Tesista: Gina Paola Varon Scovino.

Tutora: Janet Lazarde Lunar.

Caracas, 17 de Noviembre de 2004.

## **DEDICATORIA:**

A mi esposo César por su amor y apoyo incondicional, a mis padres por enseñarme que la constancia y dedicación son el secreto para alcanzar el éxito en las metas propuestas, y a ti pequeño ángel que estas esperando pacientemente en algún rinconcito del cielo por venir a llenar nuestras vidas.

## **AGRADECIMIENTOS:**

- Personal Docente del Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología U.C.V
- Personal del Laboratorio de Histopatología Bucal “Dr. Pedro Tinoco”
- Personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología U.C.V.
- Personal del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
- A mi familia y amigos por estimular siempre la culminación de este trabajo.
- A mis compañeros de cohorte: Alejandra, Iriana y Alven, con quienes fue una experiencia agradable y única la realización de esta Maestría.
- A nuestras madrinas de promoción Dra. Janet Lazarde y María Victoria Lugo, quienes siempre estuvieron dispuestas a escucharnos y brindarnos su amistad.

## TABLA DE CONTENIDO

### INTRODUCCION

<b>I.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION</b>	<b>3</b>
1.-FACTORES ETIOLOGICOS DE LA LEUCOPLASIA	5
2.-EPIDEMIOLOGIA	10
PREDILECCION POR GÉNERO	10
PREDILECCION SEGÚN EDAD	11
FRECUENCIA DE APARICION	11
LOCALIZACIÓN ANATOMICA	12
3.-CARACTERISTICAS CLINICAS	12
4.-DIAGNOSTICO DE LA LEUCOPLASIA BUCAL	17
5.-CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS	19
6.-FACTORES DE RIESGO PARA LA TRANSFORMACION MALIGNA	22
7.-TRATAMIENTO DE LA LEUCOPLASIA BUCAL	28
8.- <i>CANDIDA</i> sp	34
CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS	35
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA</i> sp EN CAVIDAD BUCAL	41
ECOLOGIA	58
PATOGENESIS	59

<b>II.-OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION</b>	<b>73</b>
1.-OBJETIVO GENERAL	73
2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS	74
<b>III.-MATERIALES Y METODOS</b>	<b>75</b>
1-EQUIPOS DE LABORATORIO	75
2.-MATERIALES DE LABORATORIO	75
3.-MATERIAL BIOLOGICO	76
4.-MEDIOS DE CULTIVO	77
5.-RECURSOS HUMANOS	80
<b>IV.-METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION</b>	<b>81</b>
1.-SELECCIÓN DE LA POBLACION	81
2.-ANALISIS CLÍNICO	82
3.-ANALISIS MICROBIOLOGICO	83
4.-ANALISIS HISTOPATOLOGICO	94
<b>V.-RESULTADOS</b>	<b>103</b>
<b>VI.-DISCUSION</b>	<b>135</b>
<b>VIII.-CONCLUSIONES</b>	<b>161</b>
<b>VIII.-RECOMENDACIONES</b>	<b>164</b>
<b>IX.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>165</b>
<b>X.-ANEXOS</b>	<b>228</b>

## TABLA DE GRAFICOS

### **Gráfico N° 1**

Distribución de pacientes con Leucoplasia y Grupo Control según género	104
---	-----

### **Grafico N° 2**

Distribución de pacientes con Leucoplasia según grupo etáreo	105
--	-----

### **Grafico N° 3**

Distribución de la población según número de lesiones observadas en cavidad bucal	106
--	-----

### **Grafico N° 4**

Distribución de pacientes según tipo de Leucoplasia observada en cavidad bucal	107
---	-----

### **Grafico N° 5**

Distribución del tipo de Leucoplasia de acuerdo a la localización en cavidad bucal	109
---	-----

### **Grafico N° 6**

Distribución de pacientes con Leucoplasia según factores etiológicos	110
---	-----

### **Grafico N° 7a**

Distribución de los cambios histopatológicos epiteliales observados en las lesiones leucoplásicas estudiadas	112
---	-----

**Grafico N° 7b**

Distribución de los cambios histopatológicos epiteliales  
observados en las muestras del grupo control 113

**Grafico N° 8**

Aislamientos de levaduras a partir de muestras obtenidas por  
enjuague bucal 114

**Grafico N° 9**

Cuantificación de levaduras en muestras por enjuague bucal. 116

**Grafico N° 10**

Frecuencia de especies aisladas a partir de enjuague oral en  
pacientes con Leucoplasia 118

**Grafico N° 11**

Aislamiento de levaduras obtenidas por raspado de Leucoplasias  
y mucosa sana 120

**Grafico N° 12**

Especies de levaduras aisladas por raspado de lesiones  
Leucoplásicas y mucosa sana 122

**Grafico N° 13**

Distribución de Leucoplasias con presencia de levaduras  
empleando técnicas de coloración, comparación con el  
grupo control 125

**Grafico N° 14a**

Distribución de los estratos titulares invadidos por levaduras  
empleando coloración de PAS 128

**Grafico N° 14b**

Distribución de los estratos titulares invadidos por levaduras  
empleando coloración de GROCCOT 128

**Grafico N° 15**

Distribución de Leucoplasias PAS y GROCCOT positivas de  
acuerdo a su localización en cavidad bucal 130

**Grafico N° 16**

Relacion entre la presencia tisular de estructuras fúngicas y los  
resultados histopatológicos de las lesiones leucoplásicas 132

## LISTA DE TABLAS

### **Tabla Nº I**

Distribución de pacientes según tipo de Leucoplasia. 108

### **Tabla Nº II**

Aislamiento de levaduras por enjuague bucal de pacientes con Leucoplasia y grupo control. 116

### **Tabla Nº III**

Relacion entre hábito tabáquico y uso de prótesis, con la presencia de levaduras en cavidad bucal. 119

### **Tabla Nº IV**

Distribución de los aislamientos obtenidos por raspado según el tipo de Leucoplasia. 121

### **Tabla Nº V**

Serotipos de C.albicans identificados según tipo de Leucoplasia. 123

### **Tabla Nº VI**

Distribución de Leucoplasias PAS y Groccot positivas de acuerdo al tipo clínico de lesión. 126

### **Tabla Nº VII**

Distribución de Leucoplasias PAS y Groccot positivas de acuerdo a su localización en cavidad bucal. 130

**Tabla N° VIII**

Relación entre la presencia tisular de estructuras fúngicas y los resultados histopatológicos de las lesiones leucoplásicas. 133

**Tabla N° IX**

Correlación de los aislamientos de levaduras por estudio micológico e histopatológico. 134

## RESUMEN

Microorganismos levaduriformes han sido aislados en alta proporción en casos de Leucoplasia. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la prevalencia de *Candida* sp en una muestra de 30 pacientes que acudieron al Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la U.C.V. con diagnóstico de Leucoplasia bucal, y 15 pacientes sin alteraciones patológicas en la mucosa bucal que integraron el grupo control. En todos los pacientes se realizó un examen clínico y se tomaron muestras de enjuague bucal concentrado, raspado y biopsias para lograr el aislamiento de levaduras, identificación de especies y serotipos de *Candida albicans*. El enjuague demostró la presencia de *Candida* en cavidad bucal en un 60% de los pacientes con Leucoplasia y solo en un 13% de los pacientes del grupo control, siendo *C.albicans* la especie mas frecuente. Por técnica de raspado solo se logró un 26,47% aislamientos de levaduras, siendo *C.albicans* serotipo A la especie más identificada. Otras especies como *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Candida lipolytica* y *Rodhotorula glutinis*, fueron determinadas con la utilización del sistema API 20C AUX. A través de técnicas de coloración especiales para hongos, se pudieron identificar elementos fúngicos en las capas superficiales del epitelio en 16 muestras de tejido utilizando PAS y en 17 muestras con la tinción de Grocott. La presencia tisular de levaduras en

lesiones Leucoplásicas fue independiente de los cambios epiteliales presentes.

## INTRODUCCION

El cáncer en cavidad bucal es frecuentemente precedido por lesiones y condiciones consideradas precancerosas. La lesión precancerosa más común es la Leucoplasia.

La asociación de Leucoplasia con microorganismos levaduriformes que habitan en cavidad bucal, ha sido estudiada por muchos años, e incluso se ha planteado que especies de *Candida* pueden inducir cambios displásicos en los tejidos alterados que invaden.

El Working Group on Oral Cancer and Precancer recomienda la investigación extensa de la historia natural de las condiciones precancerosas en cavidad bucal. Establecen que el desarrollo de estrategias para su manejo depende de una comprensión clara de su patogénesis.

Para aportar mayores conocimientos sobre el comportamiento y características de la Leucoplasia nos proponemos determinar la frecuencia de infección de estas lesiones por especies de *Candida* mediante técnicas histoquímicas y micológicas, además de asociar su presencia con reportes

histopatológicos de cambios displásicos en el epitelio de muestras tomadas de pacientes con esta condición.

## I.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

El término Leucoplasia proviene de las palabras griegas “Leuco” blanco y “Plakos” placa; fue propuesto por Ernest Schwimmer en 1977.

Esta lesión fue descrita por primera vez en el año 1851 por Sir James Paget quien la asoció con el uso del tabaco y le dio el nombre de “Parche del fumador”. <sup>(1)</sup> Desde que James Paget estableciera el concepto de leucoqueratosis, relacionándolo con el hábito de fumar, distintos conceptos se han utilizado para definir la Leucoplasia en cavidad bucal.

En 1978 la OMS la define como “una placa blanca situada sobre la mucosa bucal que no puede ser eliminada mediante raspado ni clasificada como ninguna otra enfermedad diagnosticable.” <sup>(2)</sup>

Un Seminario Internacional sobre Leucoplasias bucales y lesiones relacionadas con hábitos tabáquicos, decide introducir criterios etiológicos restrictivos en su definición, y considerar Leucoplasia a toda placa blanca que no se desprende por raspado y no se puede confundir clínica ni patológicamente con ninguna otra enfermedad o asociarla con algún agente químico o físico, a excepción del tabaco. <sup>(3)</sup>

Shafer y cols (1986) <sup>(4)</sup>, determinan que la Leucoplasia no es una lesión exclusiva de la cavidad bucal, también puede aparecer a nivel de la vulva, cuello uterino, vejiga urinaria, pelvis renal y vías respiratorias superiores.

Para Mayo de 1994 el grupo colaborador de la OMS para el estudio de lesiones blancas bucales reunido en Suecia reafirma el concepto de Leucoplasia como una lesión predominantemente blanca que no puede ser caracterizada como ninguna otra lesión definida. Descartan como Leucoplasia lesiones friccionales, asociadas a traumatismos o irritación crónica, restauraciones dentales y con el habito de mordedura de carrillos o labios. Sin embargo, acotan que cuando se presenta una asociación de factores químicos y físicos como agentes causales, es difícil evaluar cual es el agente etiológico específico y la posibilidad de una asociación coincidental no puede ser descartada, por lo que en estos casos si será descrita y considerada como una Leucoplasia. <sup>(5)</sup>

Leucoplasia es solo un término clínico, sin connotación histopatológica. No se asocia con ninguna característica histológica en relación con la presencia o ausencia de atípia celular o algún tipo de displasia. <sup>(3, 6,7)</sup>

## 1.- FACTORES ETIOLOGICOS DE LA LEUCOPLASIA.

El desarrollo de esta lesión se asocia a factores extrínsecos como el hábito tabáquico, el alcohol, y con el uso frecuente de enjuagues bucales y pastas dentales que poseen sanguinarina en su composición química. También ciertos factores intrínsecos como la presencia del Virus Papiloma Humano (VPH), la infección por *Candida*, así como deficiencias de ciertos elementos y compuestos como hierro, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y vitamina A, han sido citados como factores predisponentes al desarrollo de esta entidad clínica.

El hábito de fumar el más importante factor etiológico en el desarrollo de la Leucoplasia bucal, <sup>(8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18)</sup> e incluso se ha sugerido que este, condiciona el sitio anatómico de desarrollo de la lesión Leucoplásica. Shepman y cols <sup>(8)</sup>, reportan que en pacientes fumadores las lesiones leucoplasicas se presentan principalmente en piso de boca y mucosa interna de carrillo, mientras que en pacientes no fumadores las lesiones blanquecinas se presentan con mayor incidencia en los bordes laterales de la lengua.

Al revisar la relación existente entre el hábito de fumar y el desarrollo de Leucoplasia, encontramos que muchos de los componentes químicos del

tabaco, así como sus productos finales de combustión, son sustancias irritantes capaces de producir alteraciones leucoplásicas en la mucosa bucal.

(4)

Los productos de combustión del tabaco y el calor producido no son los únicos factores implicados, también se incluyen los materiales que se extraen del tabaco, cuando se masca <sup>(9, 10)</sup>, o como el caso del rapé, colocado sobre la mucosa húmeda. <sup>(11)</sup>

La nicotina afecta la circulación periférica de los tejidos, produciendo una importante vasoconstricción de las mucosas, lo que disminuye el aporte de elementos reparadores que se encuentran en la sangre hacia el tejido bucal, y por consiguiente disminuye su capacidad de cicatrización. <sup>(12)</sup>

El humo del tabaco provoca una disminución de la inmunidad celular y humoral, en particular de la actividad quimiotáctica y fagocitaria de los leucocitos, reduce el potencial de óxido reducción del ecosistema bucal favoreciendo la proliferación de bacterias anaerobias, alterando por lo tanto la microbiota bucal. <sup>(12, 13, 14,15)</sup>

Estudios descriptivos han demostrado una alta frecuencia de Leucoplasia entre fumadores <sup>(13, 14, 15, 16, 17,18)</sup>; la disminución de la incidencia

de estas lesiones reportada después de la suspensión del hábito, <sup>(17, 18,19, 20, 21, 22)</sup> confirma su papel como factor etiológico predisponente.

Banoczy y Rigo (1991) <sup>(23)</sup>, establecieron que la incidencia de lesiones leucoplásicas entre fumadores fue de un 3,73% y en individuos no fumadores de 0,26%.

El papel del alcohol como factor etiológico en el desarrollo de la Leucoplasia o lesiones en cavidad bucal todavía es cuestionable. <sup>(24)</sup> Las personas que consumen con frecuencia grandes cantidades de alcohol también son por lo general fumadores, de tal manera que es difícil establecer los efectos del alcohol por sí sólo. <sup>(25)</sup> Sin embargo, se han sugerido algunos mecanismos ejercidos por el alcohol sobre la mucosa que explican su acción en el desarrollo de lesiones pre-malignas y la inducción de cambios carcinogénicos en estas lesiones.

Se ha reportado que el alcohol actúa directamente sobre la mucosa bucal afectando la homeostasis de las células epiteliales, es decir alterando sus procesos de autorregulación <sup>(26)</sup>, induce cambios en la estructura del tejido, y estudios recientes reportan un incremento de la permeabilidad de la barrera mucosa, lo que favorece la penetración de carcinógenos específicos en la mucosa bucal. <sup>(27, 28,29)</sup>

Adicionalmente, se ha asociado el uso de pastas dentales y enjuagues bucales que contienen extracto de sanguinarina con el desarrollo de lesiones leucoplásicas. Damm y cols (1999) observaron lesiones leucoplásicas a nivel de la encía vestibular maxilar y en la unión mucogingival de pacientes que no reportaban hábito tabáquico, ni abuso de alcohol, pero si historia de uso de productos Viadent<sup>®</sup>.<sup>(30)</sup>

La Leucoplasia se consideraba una complicación característica de los pacientes que padecían de Sífilis terciaria<sup>(4)</sup>, sin embargo, hoy en día se observa poco, producto del tratamiento antimicrobiano específico que hace que los pacientes curen en las primeras etapas de la enfermedad sin desarrollar mayores complicaciones.

Los factores nutricionales son de gran importancia en el mantenimiento de la integridad de las mucosas. Las deficiencias de vitamina A y Betacaroteno, han traído como consecuencia que se produzca la queratinización de ciertas estructuras epiteliales, en particular de glándulas y mucosa respiratoria.<sup>(4, 7)</sup>

Un estudio realizado en la India demostró que en pacientes con Leucoplasias en cavidad bucal, los niveles en suero de vitamina A, B<sub>12</sub>, C, y

Ácido fólico se encontraban disminuidos en comparación con el grupo control sano. <sup>(31, 32)</sup>

En cuanto a otros factores asociados, se puede evidenciar por técnicas de biología molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa) la presencia del Virus Papiloma Humano tipo 16 y 18 en estas lesiones. La incidencia del VPH podría contribuir con una posible alteración oncogénica. <sup>(33, 34, 35, 36)</sup>

Se ha reportado que las Leucoplasias pueden estar asociadas con infección crónica de la mucosa bucal por especies de *Candida*.<sup>(37)</sup> *Candida* sp, es un hongo oportunista que puede causar enfermedad en el hospedero si se alteran los mecanismos homeostáticos normales. <sup>(38)</sup>

Se piensa que la infección por *Candida* no se inicia por si sola, sino que debe haber una alteración previa en el tejido y este hongo aprovecha una respuesta celular disminuida para invadir e infectar el tejido. <sup>(39, 40)</sup>

## **2.- EPIDEMIOLOGIA DE LA LEUCOPLASIA BUCAL.**

### **PREDILECCION POR GÉNERO**

En los primeros estudios sobre Leucoplasias a nivel mundial <sup>(41,42)</sup>, se observó que la presencia de esta lesión en el género femenino era muy baja o casi inexistente, presentándose con mayor frecuencia en el género masculino. Sin embargo, estudios posteriores han revelado una tendencia al incremento de estos porcentajes. <sup>(43, 44)</sup>

En trabajos realizados en Venezuela por Tinoco y Salazar (1986), se observó que la incidencia de la Leucoplasia en el género femenino era de un 59% del total de 343 casos estudiados, mientras que en el género masculino la incidencia era de un 41%. <sup>(45)</sup>

Fonseca y col (1992), en un estudio de 55 pacientes que presentaban lesiones Leucoplásicas en la región Zuliana, reportaron 21 casos en el género masculino (38%) y 34 en el género femenino (62%), concluyendo estos autores, que la frecuencia de Leucoplasias en el género femenino es mayor con respecto al género masculino. <sup>(46)</sup>

## **PREDILECCION SEGUN EDAD**

La Leucoplasia es una entidad que ocurre principalmente en la edad adulta entre la quinta, sexta y séptima décadas de la vida <sup>(47, 48, 49)</sup>; sin embargo, los factores etiológicos que han sido referidos con anterioridad pueden determinar su presentación a edades más tempranas.

En Venezuela, los estudios sobre Leucoplasia coinciden en describir la cuarta, quinta, y sexta décadas de vida como el periodo de edad donde se observa una mayor incidencia, pero no se descarta su aparición en adultos jóvenes. <sup>(35, 45, 46)</sup>

## **FRECUENCIA DE APARICION**

La Leucoplasia es considerada como la lesión premaligna o potencialmente maligna que se observa con mayor frecuencia en la mucosa bucal. <sup>(53)</sup> Diferentes trabajos sobre prevalencia de lesiones en la cavidad bucal arrojaron resultados entre un 1,3% y 3,6% de Leucoplasias con respecto a otras entidades clínicas, este porcentaje indica que esta patología en esta zona anatómica es relativamente frecuente. <sup>(23, 50, 51)</sup>

Bouquot y col (1986), reportaron en un estudio de 3.783 lesiones de la mucosa bucal, un 21% de lesiones queratósicas, siendo la Leucoplasia la mas común de todas las lesiones diagnosticadas con un 85,5%. <sup>(52)</sup>

En 1992, Fonseca y col en relación con 55 pacientes con lesiones leucoplásicasla evaluados, determinaron una prevalencia de 13 casos de Leucoplasias por cada 1.000 personas. <sup>(46)</sup>

## **LOCALIZACIÓN ANATOMICA**

La mayoría de las Leucoplasias en cavidad bucal se presentan en tres sitios principales: borde bermejo del labio, mucosa bucal y mucosa del reborde residual en pacientes edéntulos. <sup>(33, 34, 52)</sup> En menor proporción, otros lugares de aparición son: triángulos retromolares, lengua, tuberosidad maxilar, e incluso paladar. <sup>(35)</sup>

## **3.- CARACTERISTICAS CLINICAS**

Se describen varias formas clínicas que van desde máculas blancas, o placas lisas, rugosas, hasta placas papilomatosas, nodulares con fisuras e inclusive pueden observarse máculas eritematosas. Las lesiones pueden ser solitarias o múltiples, con borde indistinguible o muy bien demarcados. <sup>(46)</sup>

Atendiendo a diversos criterios establecidos la Leucoplasia puede ser clasificada: <sup>(3, 6)</sup>

- Según un criterio etiológico.

Asociada al hábito de fumar. En pacientes fumadores de cigarrillo, pipa o tabaco, se ha asociado el hábito como el factor etiológico desencadenante en la aparición de lesiones leucoplásicas <sup>(55)</sup>, utilizando el término de lesión blanquecina inducida por tabaco.

Idiopática, en los casos que se presenta en pacientes no fumadores, donde no es posible asociar la aparición de la lesión con un factor específico desencadenante.

Se ha considerado que placas blanquecinas asociadas a una causa local identificable diferente al hábito de fumar, como las queratosis friccionales o las lesiones por hábitos de mordedura de carrillos no deben ser definidas como Leucoplasias. <sup>(5)</sup>

- Según criterio clínico.

Leucoplasia homogénea cuando se observa clínicamente una lesión blanquecina y uniforme, de consistencia firme, poco espesor, de superficie lisa o áspera. <sup>(56)</sup> Cabe destacar que la incidencia de displasia epitelial y transformación maligna es muy baja en este subtipo clínico. <sup>(6)</sup>

La Leucoplasia no homogénea es una placa blanca que puede alternar con otras zonas rojas y/o con una superficie irregular, nodular o exofística. El término no-homogéneo hace referencia al color y la textura de la lesión básicamente. Las leucoplasias no-homogéneas frecuentemente se asocian con síntomas leves en el paciente, como dolor localizado o molestias en la zona, en oposición a las lesiones homogéneas que no se asocian con sintomatología alguna. Presentan una mayor incidencia de displasia epitelial y mayor riesgo a la transformación maligna que el subtipo homogéneo. <sup>(57)</sup>

Ha sido definida como Eritroleucoplasia cuando la lesión alterna zonas blancas con zonas rojas en su presentación clínica, o Leucoplasia nodular cuando se observan nódulos sobre una base eritematosa. <sup>(58)</sup> Tanto el término Eritroleucoplasia como el de Leucoplasia nodular sustituyen al de Leucoplasia moteada.

Un nuevo tipo en estudio es la Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (LVP) que fue descrita por primera vez en 1985 por Hansen y cols <sup>(59)</sup>, reportándola como una lesión con una alta posibilidad de transformación maligna. <sup>(60, 61)</sup> Se inicia como una Leucoplasia homogénea unífol, persistente, con un patrón de crecimiento progresivo; adquiriendo en poco tiempo una superficie con múltiples proyecciones papilares, o verrugosas; algunas veces se observan áreas eritematosas. Su distribución es multifocal o generalizada, y los sitios de mayor riesgo de aparición son la mucosa bucal, lengua y encía. <sup>(62, 63)</sup>

Este subtipo de Leucoplasia presenta resistencia al tratamiento, bien sea la excisión simple o empleando laser, alta recurrencia y un alto potencial de transformación maligna. <sup>(64)</sup>

Aunque la LVP ha sido descrita como una entidad de etiología desconocida, Hansen y cols (1989) <sup>(59)</sup>, y Zakrewska y cols (1996) <sup>(61)</sup>, la asociaron con el uso del tabaco y el betel en un 62% y 70% de los pacientes estudiados respectivamente.

Sin embargo, la incidencia del habito tabáquico es muy baja en la mayoría de los pacientes quienes presentan la lesión. En 1997, Silverman y Gorsky <sup>(65)</sup>, reportaron que de un grupo de estudio de 54 pacientes con LVP

solamente un 31% tenía hábito tabáquico. Bagan y col (2003) <sup>(66)</sup>, señalan igualmente que de un estudio de 30 casos la incidencia del hábito tabáquico fue menor de 23%.

Se ha reportado en estudios recientes el aislamiento del ADN del Virus Papiloma Humano tipo 16 y 18 de lesiones de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa, por lo que se sugiere el papel etiológico que pudiera ejercer el VPH en la evolución maligna de este subtipo clínico. <sup>(67, 68)</sup> Es posible que este virus promueva la progresión de la enfermedad causando ruptura de los reguladores del ciclo celular. <sup>(64)</sup>

- Según el criterio histopatológico.

Se utiliza el parámetro histopatológico de grado de displasia epitelial para clasificar las Leucoplasias en cavidad bucal.

La displasia epitelial es un término usado para describir cambios histopatológicos crónicos y progresivos.

Se describen la Leucoplasia sin displasia y la Leucoplasia con displasia.

De acuerdo con los cambios celulares y del tejido se han establecido tres grados de displasia: leve, moderada y severa.

#### **4.- DIAGNÓSTICO DE LA LEUCOPLASIA BUCAL**

Cuando al examen bucal se observa una lesión en mucosa con apariencia blanquecina que no puede ser diagnosticada claramente como Liquen plano reticular o tipo placa, Nevus Blanco Esponjoso, Lupus Discoide Eritematoso, lesiones friccionales, Leucoplasia Velloso, Leucoedema, o como ninguna otra enfermedad, se establece el diagnóstico provisional de Leucoplasia.

El manejo de la Leucoplasia esta dirigido a la eliminación de los posibles factores causales, incluyendo el hábito tabáquico. Un intervalo de 2-4 semanas es considerado un periodo de tiempo aceptable para observar la regresión o desaparición de las lesiones blanquecinas, después de haber establecido el diagnóstico provisional y haber eliminado los posibles factores etiológicos. <sup>(5)</sup> Si las lesiones persisten, o en ausencia de factores etiológicos identificables, se procede a realizar biopsia para estudio histopatológico, cuyo resultado permitirá establecer el diagnóstico definitivo.

La Tinción con Azul de Toluidina ha sido utilizada en el diagnóstico de lesiones leucoplásicas, es un procedimiento diagnóstico simple que demarca áreas sospechosas de malignidad o displasia, por lo que se ha determinado que posee una alta sensibilidad en la detección de lesiones bucales malignas, es una técnica valiosa para la evaluación de lesiones de alto riesgo como la Leucoplasia, y para el diagnóstico de carcinomas invasivos.<sup>(69)</sup> Esta prueba orienta en la selección del sitio óptimo para la biopsia diagnóstica<sup>(70)</sup>, sin embargo debe ser utilizada como un método de diagnóstico complementario.

El citodiagnóstico, también llamado examen citológico o simplemente citología, es el diagnóstico morfológico basado en los caracteres microscópicos de las células y componentes extracelulares desprendidos de los órganos espontáneamente u obtenidos por procedimientos que, en general, son menos invasivos que la biopsia.<sup>(71)</sup> La citología en la cavidad bucal es un auxiliar en el diagnóstico de algunas lesiones principalmente malignas, sin llegar a ser un sustituto de la biopsia, sin embargo es útil en el diagnóstico temprano de neoplasias malignas de la cavidad bucal o para seleccionar el sitio más apropiado para la toma de la biopsia.<sup>(72)</sup> En los extendidos, se valora el tamaño y morfología de las células, considerándose criterios de malignidad la aparición de células anaplásicas en el frotis, estas

células se caracterizan por variaciones en su tamaño y modificaciones estructurales en cuanto al tamaño del citoplasma y el núcleo.

Los primeros estudios de citología exfoliativa en Leucoplasia fueron realizados en 1951, por Montgomery y Haam <sup>(73)</sup>, para determinar la transformación de las leucoplasias bucales.

Sin embargo en la actualidad, la utilización de este método diagnóstico es controversial. Se refiere que es poca la eficacia de la citología exfoliativa en el diagnóstico de malignidad de Leucoplasias, pues la cantidad de capas córneas pueden impedir que emerjan las células displásicas, pudiéndose así reportar resultados falsos negativos, por lo que es indispensable complementar el estudio citológico con el estudio histológico. <sup>(74,75)</sup>

## **5.- CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS**

Los cambios histopatológicos en la Leucoplasia pueden variar desde Atrofia del epitelio a Hiperplasia epitelial, Acantosis, con o sin Hiperqueratosis. La capa de queratina puede consistir en ortoqueratina, paraqueratina o una combinación de ambas. <sup>(4,7)</sup>

Pindborg y col (1980) <sup>(76)</sup>, plantearon que los cambios más comúnmente observados en el epitelio de lesiones leucoplásicas son hiperqueratosis y un engrosamiento del epitelio o Acantosis.

En el tejido conjuntivo adyacente se presentan cambios en la microvascularización y/o incremento en el número de linfocitos sub-epiteliales, células plasmáticas, y células de Langerhans. <sup>(77)</sup>

Dentro de la diversidad de cuadros histopatológicos en las Leucoplasias bucales, se distinguen dos modelos bases: las Leucoplasias sin rasgos de displasia en el epitelio o “Leucoplasia Benigna” y las “Leucoplasias Displásicas”. <sup>(77, 78)</sup>

El término displasia describe un crecimiento epitelial desordenado, refiere cambios crónicos, progresivos y desórdenes premalignos de la mucosa bucal. <sup>(79, 80)</sup> Los cambios comienzan en la capa basal y suprabasal del epitelio y se extienden superficialmente en él. <sup>(79,80)</sup>

La displasia epitelial se caracteriza por alteraciones tisulares y variaciones en el número celular, lo que revela una alteración en la maduración celular del epitelio, y un incremento de la actividad proliferativa suprabasal. <sup>(81)</sup>

Se establecen tres grados de displasia epitelial según la extensión en el tejido de los cambios celulares, pudiendo ser clasificada en Displasia epitelial leve cuando los cambios o alteraciones se limitan a la capa basal y suprabasal; Displasia epitelial moderada si los cambios involucran la capa basal hasta la porción media de la capa espinosa y Displasia epitelial severa cuando las alteraciones se extienden desde la capa basal hasta un nivel por encima de la porción media del epitelio. Cuando las alteraciones involucran todo el grosor del epitelio se usa el término de carcinoma in situ. <sup>(4, 33)</sup>

El diagnóstico y evaluación de la displasia epitelial de la mucosa bucal se puede basar en muchos casos en una interpretación subjetiva que varía según el patólogo observador <sup>(82)</sup>, por lo que se ha sugerido el uso de marcadores de proliferación celular; como la expresión de la proteína p53, antígeno Ki-67 y la evaluación de la expresión del syndecan-1; para lograr establecer criterios diagnósticos más objetivos. <sup>(83, 84)</sup>

Se ha establecido que una acumulación de alteraciones genéticas y moleculares inicia cambios fenotípicos que pueden ser reconocidos histológicamente en el tejido, y que están asociados con alteración de la diferenciación y de la proliferación celular. <sup>(85)</sup>

El Centro de colaboración para lesiones precancerosas de la OMS estableció que el índice de transformación maligna de las lesiones leucoplásicas es variable, y citan cifras que van del 3 al 30%. Destacan que la displasia severa conlleva un índice más alto de transformación maligna. <sup>(2)</sup>

Las lesiones leucoplásicas son consideradas lesiones premalignas, porque tienen mayor potencial de cambios celulares carcinomatosos que el tejido mucoso normal. <sup>(86)</sup>

Fishman y col (1982) <sup>(87)</sup>, evaluaron el concepto de premalignidad bucal, destacando la definición de lesión premaligna de la OMS: “Tejido morfológicamente alterado en el cual el cáncer puede ocurrir con mas probabilidad que en la contraparte normal”, por lo que la conducta actual frente a estas lesiones clínicas es su diagnóstico histopatológico y la ejecución de un tratamiento oportuno, asumiendo así el carácter premaligno de la lesión.

## **6.- FACTORES DE RIESGO PARA LA TRANSFORMACION MALIGNA**

La Leucoplasia es considerada la más frecuente lesión premaligna de la cavidad bucal. <sup>(52, 53, 54, 76, 88, 89, 90, 91)</sup> Se han reportado varias características

como parámetros de riesgo para la transformación maligna de estas lesiones en cavidad bucal.

Tal como lo establecen Tinoco y col (1986), Fonseca y col (1992), Shepman y col (1988) y Van der Waal y col (1997), las mujeres parecen tener mayor riesgo a la transformación maligna de las lesiones leucoplásicas que los hombres. <sup>(45, 46, 53, 79)</sup>

El tiempo de evolución de la lesión en boca y la identificación del factor etiológico, son también dos aspectos a considerar en la transformación maligna de las Leucoplasias. Las lesiones de larga data tienen mayor riesgo de transformación maligna que los casos de reciente aparición. Muchos autores han señalado que la frecuencia de cambios carcinomatosos en leucoplasias bucales varía entre 1,4 y 36% durante periodos de observación que van desde 1 a 30 años. <sup>(57, 92)</sup>

Tanto el hábito de fumar como el alcoholismo se consideran como factores de riesgo en la carcinogénesis bucal. <sup>(93, 94, 95, 96, 97, 98)</sup> El tabaco posee muchos compuestos dañinos y carcinógenos como las nitrosaminas <sup>(99)</sup>; otro constituyente importante es la nicotina, la cual aun cuando no es considerada como un elemento carcinógeno, es citotóxica y puede actuar

como un co-factor en la carcinogenesis bucal, potenciando el efecto de los carcinógenos contenidos en el cigarrillo y el tabaco. <sup>(100)</sup>

Algunos de los metabolitos del alcohol como el acetaldehído y superóxido son mutagénicos y citotóxicos. <sup>(101)</sup> El alcohol y el tabaco tienen un efecto sinérgico en la carcinogénesis bucal, se ha referido que el alcohol altera localmente la permeabilidad de las membranas mucosas favoreciendo la penetración de los elementos carcinogénicos contenidos en el tabaco y el cigarrillo hacia el tejido bucal. <sup>(102)</sup> Estos argumentos demuestran el alto riesgo de transformación maligna que presentan las Leucoplasias asociadas al alcohol y al hábito tabáquico.

A pesar de que el hábito tabáquico es considerado como un potente factor de transformación maligna, las Leucoplasias que no tienen un agente causal identificado, y las Leucoplasias idiopáticas no asociadas con el tabaquismo, han sido reportadas como altamente susceptibles al desarrollo de carcinomas de células escamosas. <sup>(57, 79)</sup>

La localización anatómica de las lesiones también puede alertar sobre el posible riesgo de transformación maligna de las Leucoplasias. <sup>(47, 103)</sup> Presentan mayor riesgo de transformación maligna las lesiones ubicadas en el piso de la boca y superficie ventral de la lengua, zonas consideradas como

de alto riesgo, asociadas histopatológicamente con la presencia de displasias severas. <sup>(104)</sup>

Se ha reportado que las lesiones premalignas ubicadas en sitios de alto riesgo son genéticamente diferentes a las lesiones premalignas ubicadas en zonas reportadas como de bajo riesgo para la transformación maligna. Los sitios de alto riesgo presentan perfiles genéticos asociados con la progresión de carcinomas bucales. <sup>(103)</sup>

Al hacer referencia al tipo de Leucoplasia se ha determinado que las lesiones clínicamente identificadas como no-homogéneas poseen un alto riesgo de transformación maligna, en oposición a las formas clínicas homogéneas. <sup>(54, 105, 104)</sup>

Silverman y col (1984), encontraron que un 64% de los carcinomas desarrollados de Leucoplasias tenían su origen en el tipo de Leucoplasia no homogéneo. <sup>(57)</sup>

Gupta y col (1984), refirieron una alta incidencia del cáncer bucal a partir de lesiones que presentaban la apariencia clínica de Leucoplasia nodular. De un total de 19 lesiones cancerígenas bucales, 14 (74%) fueron precedidas por Leucoplasia nodular. <sup>(24)</sup>

La observación de displasia epitelial ha sido señalada como el principal indicador histopatológico de potencial maligno. <sup>(81)</sup> El riesgo al desarrollo de Carcinoma espinocelular es mucho mayor en displasias moderadas o severas, que en displasias leves o hiperplasias. <sup>(49, 80)</sup> Sin embargo, se ha reportado la transformación maligna en lesiones con ausencia de displasia epitelial. <sup>(2, 6, 91, 105)</sup>

Actualmente se piensa que la presencia de displasia en una lesión bucal solo determina el riesgo que estadísticamente posee esta lesión para que se produzca en ella una transformación maligna, es un marcador histopatológico de pre-malignidad, pero no puede usarse como elemento indicador seguro de cambios malignos. <sup>(106)</sup> Se recomienda el uso de marcadores biológicos para lograr mayor objetividad en cuanto al posible riesgo de transformación maligna de una lesión leucoplásica.

Los antecedentes familiares y personales de Cáncer <sup>(107)</sup>, la presencia de displasia epitelial y el uso de marcadores como el cromosoma polisomal, la sobre-expresión de la proteína p53 y el antígeno ki-67, la pérdida de heterocigosidad del cromosoma (LOH) 3p y 9p, y la baja expresión de moléculas de adhesión (integrinas, caderinas, y sindecan-1), han sido en combinación indicadores confiables del riesgo de transformación de una lesión bucal en Carcinoma de células escamosas. <sup>(103, 108, 109)</sup>

Los marcadores de proliferación celular de expresión aumentada determinan la marcada actividad proliferativa celular de las Leucoplasias en las que el carcinoma se esta desarrollando. <sup>(84)</sup>

Recientemente se ha reportado que los cambios moleculares en el ADN celular de lesiones potencialmente malignas, basadas en la evaluación de la medida del contenido del ADN nuclear permiten detectar si estas lesiones son verdaderamente potencialmente malignas. <sup>(110, 111)</sup>

Se ha demostrado la presencia de *Candida* en el tejido como un potencial indicador de transformación maligna. <sup>(112)</sup>

En 1993, Gao estudió lesiones leucoplásicas donde se había detectado la presencia de *Candida* evaluando la proliferación celular. En este estudio se pudo evidenciar una alta actividad mitótica, elevada síntesis de ADN celular y aumento del grosor del epitelio; características que hacen de esta condición patológica asociada a la presencia de la levadura, una lesión con alto poder de malignidad. <sup>(113)</sup>

## 7. TRATAMIENTO DE LA LEUCOPLASIA

El tratamiento de la leucoplasia se divide en un tratamiento que puede ser sistémico o tópico y un tratamiento quirúrgico.

El tratamiento sistémico ha implicado la utilización de retinoides, betacaroteno, vitamina E y vitamina C, en un tratamiento definido como quimioprevención.

Este tratamiento ha favorecido la regresión de Leucoplasias bucales; pero se ha informado la recurrencia luego de la suspensión de la administración de los agentes de quimioprevención. Sería prematuro pensar en la Quimioprevención como una estrategia de rutina en la prevención del cáncer bucal. <sup>(114)</sup>

La vitamina A modula el crecimiento y la diferenciación celular, su deficiencia aumenta el riesgo a la carcinogénesis. <sup>(115)</sup> Bajos niveles de vitamina A se han asociado a un riesgo incrementado al desarrollo de cáncer de pulmón, colon, próstata, faringe, laringe y esófago.

Kaugars y col (1994) documentaron sucesos clínicos con betacaroteno solos o en combinación con otros antioxidantes en el tratamiento de la

Leucoplasia. <sup>(116)</sup> La administración oral de betacaroteno combinada con vitamina A; y betacaroteno mas vitamina C, han demostrado favorecer la remision de Leucoplasias e inhibir el desarrollo de nuevas lesiones. <sup>(117)</sup>

La vitamina E o Alfa-Tocoferol (AT), es un antioxidante efectivo que posee un importante rol en la protección de membranas celulares. Benner y col (1993) <sup>(118)</sup>, evaluaron la administración de 800 UI de AT/día por 24 meses en 43 pacientes con Leucoplasias, reportando que en 20 de ellos hubo una respuesta clínica favorable.

Un estudio realizado en el año 2000 por Sawant y col, plantea que la vitamina E sola o en combinación con la vitamina C juega un papel importante en la inhibición del crecimiento celular en lesiones neoplásicas. <sup>(119)</sup>

El uso de antioxidantes en el tratamiento de la Leucoplasia bucal es prometedor, sin embargo el caso a tratar debe ser previamente seleccionado. Esta indicado en aquellos pacientes con mayor riesgo de transformación maligna (fumadores, alcohólicos, desnutridos), en casos de Leucoplasias sin displasia o displasia leve; y en casos de recurrencias posteriores al tratamiento quirúrgico. <sup>(120)</sup>

No se indica su uso en el manejo de Leucoplasias con displasia moderada y severa, y siempre se debe estudiar histopatológicamente la lesión antes de instaurar un tratamiento de quimiopreención. <sup>(120)</sup>

Estudios clínicos recientes confirman una alta efectividad de la Terapia Fotodinámica también llamada Fotodinamicoterapia en el tratamiento sistémico de lesiones premalignas de la cavidad bucal. <sup>(61, 121, 122, 123, 124)</sup>

Esta modalidad de tratamiento consiste en la aplicación sistémica o tópica de una sustancia quimiosensibilizante que es selectivamente retenida por los tejidos neoplásicos y tejidos del sistema retículo endotelial. Esta sustancia expuesta a un láser de argón de una longitud de onda de 630  $\mu\text{m}$ , cataliza una reacción fotoquímica que libera radicales de oxígeno libres citotóxicos, responsables de la muerte celular y por tanto de la necrosis tumoral. <sup>(123)</sup>

Una desaparición completa de lesiones leucoplásicas a la inspección visual se observó en 10 pacientes de un grupo de 12 tratados con terapia Fotodinámica aplicando tópicamente ácido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA). <sup>(124)</sup>

La terapia fotodinámica presenta algunas ventajas que le hacen ser superior a los métodos de tratamiento clásico. Es una técnica no invasiva,

produce excelentes efectos estéticos, constituye una posibilidad de tratamiento en presentaciones múltiples o generalizadas, y no produce efectos tóxicos. (61, 121, 122, 123, 124,125)

En cuanto al tratamiento tópico, se ha observado que el uso de la vitamina A o Ácido retinoico o tretinoína, presenta efectos limitados en el control de la Leucoplasia Bucal. Un estudio realizado por Epstein y col (1999)<sup>(126)</sup>, reportó remisión clínica parcial (27%), y recurrencias (40%) posteriores a la suspensión del tratamiento.

Gorsky y col (2002)<sup>(127)</sup>, plantean que el uso tópico de la vitamina A tiene mayor valor en el control de la progresión o avance de estas lesiones, más que en su eliminación; por lo que pudiera utilizarse en lesiones altamente recurrentes.

Por otra parte la Bleomicina también se ha empleado tópicamente mezclada con dimetilsulfoxido sobre la superficie de la lesión diariamente por un periodo de tiempo de 15 días consecutivos. Evaluaciones clínicas de este tratamiento han referido disminución en el espesor, tamaño e incluso completa resolución de la Leucoplasia, y baja posibilidad de transformación maligna. (128, 129)

Epstein y col (1998) <sup>(129)</sup>, señalan que el tratamiento tópico con bleomicina puede prevenir la progresión de leucoplasias a displasias o carcinoma, pero se requieren estudios sobre su efecto en lesiones con displasia, y una evaluación de sus efectos a largo plazo. Sin embargo se ha sugerido su utilización en lesiones multifocales o localizadas, o en zonas complejas para la cirugía.

El tratamiento quirúrgico de la Leucoplasia involucra el uso de cirugía convencional y la utilización de la cirugía laser. <sup>(130, 131)</sup>

En un estudio realizado en el año 2001 por Saito y col, en el cual se hizo un seguimiento de lesiones tratadas con eliminación quirúrgica por un periodo de 4 años, se reportó que el porcentaje de transformación maligna a carcinoma de células escamosas a partir de lesiones leucoplásicas, fué mas bajo en pacientes que recibieron como tratamiento la eliminación quirúrgica de la lesión, que en aquellos en quienes se realizaron otras modalidades de tratamiento. <sup>(130)</sup>

La Cirugía Láser representa otra modalidad de tratamiento en los casos de Leucoplasia bucal, este tratamiento ofrece varias ventajas; como la posibilidad de remoción de extensas áreas de lesión, es un procedimiento con mínimas complicaciones post-operatorias, hay mínimo dolor, edema y

sangrado, y se ha reportado poca posibilidad de recurrencia en lesiones tratadas con esta técnica quirúrgica. Su inconveniente es que no permite el estudio del tejido removido. <sup>(131)</sup>

En 1993, Lamey estableció que el tratamiento de las lesiones leucoplásicas debiera ser orientado en base a los resultados histopatológicos obtenidos. En los casos de Leucoplasia sin displasia o displasia leve, el tratamiento incluiría un tratamiento sistémico, evaluación clínica periódica y una biopsia a los 3 meses en caso de progresar la lesión, aparecer cambios clínicos o síntomas en el paciente. En los casos de Leucoplasia con displasia moderada o severa, sería conveniente la eliminación quirúrgica convencional o usando láser y practicar controles periódicos. <sup>(132)</sup>

Todos los pacientes con lesiones leucoplásicas luego de haberseles instaurado su tratamiento, deberían ser evaluados por un largo periodo de tiempo, probablemente de por vida, con intervalos de 6 -12 meses; con la finalidad de detectar recurrencias en estados iniciales. <sup>(53, 132, 133)</sup>

## **8. *Candida* sp**

Hongo imperfecto o mitospórico, pertenecen al Phyla *Deuteromycota*, su reproducción sexual se desconoce. <sup>(134)</sup>

El género *Candida* comprende más de 150 especies. Los microorganismos del género *Candida* son miembros de la microbiota normal de tracto digestivo, las vías respiratorias, el área vaginal y la cavidad bucal. <sup>(135)</sup>

Se ha estimado que entre un 40-60% de personas sanas presentan este hongo como integrante normal de su microbiota bucal. <sup>(136, 137, 138)</sup>

El porcentaje de individuos colonizados aumenta y disminuye con la edad. La mayor colonización se observa en niños con edades comprendidas entre una semana de vida y dieciseis meses; y en la vejez, asociada a la presencia de prótesis dentales y xerostomia. La colonización en cavidad bucal también sufre variaciones diarias con un mayor número de células fúngicas a primeras horas de la mañana y a las últimas horas de la tarde. <sup>(139, 140)</sup>

*Candida albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en la cavidad bucal, otras especies aisladas son *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* y más recientemente *Candida dublinensis*. También se han aislado de la cavidad bucal otros hongos levaduriformes como *Rodhotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>(141, 142, 143)</sup>

Sin embargo *C.albicans* parece ser la especie con mayor potencial patógeno, algunos autores estiman que esto se debe a su capacidad de adherencia y colonización, producción de enzimas y por las interacciones con las defensas del hospedero.<sup>(144, 145)</sup>

## **CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DEL HONGO**

*Candida* es un hongo que tiene un dimorfismo especial, puede presentar crecimiento levaduriforme y filamentoso simultáneamente.<sup>(146, 147)</sup>

Las levaduras son células eucarióticas, que se reproducen asexualmente por gemación, mecanismo que consiste en la producción de un brote o yema en un punto de la superficie de la blastospora.<sup>(146)</sup>

A medida que la célula hija aumenta de tamaño, el núcleo de la célula madre se divide, y uno de los núcleos, junto con los orgánulos citoplasmáticos se trasladan a la célula hija, quien se separa por medio de la formación de tabiques de división. <sup>(146)</sup>

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares que puede estar dividida por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Crecen continuamente por extensión apical. <sup>(147)</sup>

*Candida* sp posee factores de virulencia como: a) la capacidad de adherencia a células epiteliales y endoteliales, b) producción de enzimas hidrolíticas, c) transición dimórfica (conversión morfogénica de la forma levaduriforme a la forma micelial), d) variabilidad antigénica, y e) adhesión a sustratos biológicos inertes e inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero. <sup>(148)</sup>

Los principales componentes de la pared celular de *C.albicans* son polimeros de glucosa (glucan) y N-acetil glucosamina (quitina) y polimeros de manosa (manan) covalentemente asociados con proteínas (manoproteínas).

(146, 149)

El glucano y la quitina están asociados con la rigidez estructural, y las manoproteínas están implicadas en la adherencia a los tejidos del hospedero, y son diferentes en su expresión, secreción y localización dentro de la estructura de la pared. <sup>(146)</sup>

Estudios recientes han demostrado que además de los residuos de manosa, glucosa y N-acetil glucosamina hay presencia de galactosa, N-acetil-galactosamina, fucosa, ácido siálico y dos azúcares aún no identificados. Estos carbohidratos complejos se han considerado como constituyentes vitales en la vida del microorganismo, proveen energía, poseen un papel estructural, y se cree que podrían desempeñar importantes funciones en la interacción del hongo con las células y el tejido del hospedero. <sup>(150)</sup>

La pared celular de este hongo posee un espesor de 125-300  $\mu\text{m}$  y está formada por varias capas, cuyos componentes se han podido caracterizar inmunológicamente. En la fase levaduriforme, las capas externas de esta estructura están compuestas por proteínas, lípidos y manano, las capas intermedias están compuestas por beta 1-3 glucano y quitina y la capa más interna principalmente por manano y proteínas. En la fase micelial, se mantiene el número de capas pero se observan variaciones

cuantitativas, disminuyendo el espesor de la mayoría de ellas con excepción de la capa compuesta por quitina y proteínas. <sup>(149)</sup>

Poca información se tiene sobre la composición protéica de la pared celular de otras especies *no-albicans*. Sin embargo, se han reportado diferencias en las funciones mediadas por la pared celular, tales como adhesión e inmunomodulación entre especies de *Candida*. <sup>(151)</sup>

Por lo que se piensa existen similitudes y diferencias entre la composición de la pared celular de especies *no-albicans* y *C.albicans*. <sup>(152)</sup>

Hansenclever y Michell (1961) determinaron diferencias a nivel antigénico entre las mismas especies de *C.albicans*, describiendo dos serotipos A y B. <sup>(153)</sup>

La causa de esta diferenciación serológica se le atribuye a los polisacáridos, marcadores antigénicos de la pared celular presentes solamente en el serotipo A. <sup>(154)</sup> El serotipo A es antigénicamente más complejo que el B, posee antígenos específicos, además de presentar los antígenos comunes a B. <sup>(155)</sup> Se ha establecido que la distribución de los serotipos A y B puede variar dependiendo del origen geográfico de los aislamientos. <sup>(156, 157)</sup>

En Europa el serotipo A es el que predomina en los aislamientos clínicos <sup>(158)</sup>, mientras que en América y África el serotipo B se observa con mayor frecuencia. <sup>(156)</sup>

El serotipo A ha sido aislado en personas sin síntomas clínicos de candidiasis, de aislamientos orales, digestivos y respiratorios. Los pacientes inmunocomprometidos parecen tener una probabilidad dos veces mayor que otros pacientes o personas sanas de estar colonizados o infectados con el serotipo B. <sup>(159, 160)</sup>

Se ha producido una asociación de prevalencia del serotipo B de *C.albicans* en muestras provenientes de pacientes homosexuales VIH positivos. <sup>(161, 162)</sup> El serotipo B se ha observado a partir de aislamientos vaginales, cutáneos, en pacientes con Candidiasis Pseudomembranosa, principalmente en pacientes oncológicos. Se ha visto un incremento en la prevalencia de este serotipo en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana. <sup>(159, 160, 161, 162)</sup>

Estos serotipos difieren en sus habilidades para adherirse a las células epiteliales y para infectar pacientes con diferentes estados inmunológicos. El serotipo B posee mayor capacidad de adhesión e invasión a las células

epiteliales y superficies acrílicas. <sup>(163)</sup> Se ha demostrado que el serotipo B parece ser mas resistente a algunos antifúngicos como 5-fluorocitosina y diversos azoles (Fluconazol y Ketoconazol), mientras que el serotipo A posee mayor sensibilidad a la acción de los azoles, lo que favorece su utilización terapéutica. <sup>(164, 165)</sup>

## **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CANDIDA* sp EN CAVIDAD BUCAL**

### **Métodos de Aislamiento**

#### 1. Frotis.

Esto puede hacerse por hisopado, frotando con un hisopo de algodón estéril suavemente sobre la superficie del tejido que presenta la lesión y posteriormente inoculando la muestra en un medio de cultivo. O empleando una espátula metálica que permite por raspado tomar una muestra, lo que constituye un frotis citológico. Este método permite la observación e identificación de levaduras por observación directa o posterior a la fijación y coloración (Papanicolau) del material.

El frotis es un procedimiento simple de realizar, pero no permite la cuantificación de la infección por *Candida*.

#### 2. Enjuague Bucal Concentrado.

Utilizando 10 ml de solución salina el paciente realiza un enjuague vigoroso por 60 segundos. La solución es concentrada por centrifugación y un volumen conocido, es inoculado en un medio de agar. Después de 24-48

horas de incubación a 37°C, el crecimiento es evaluado en base al número de colonias, y expresado como unidades formadoras de colonias por ml de enjuague (UFC/ml).<sup>(166)</sup>

De acuerdo al crecimiento observado se puede cuantificar la presencia de levaduras en cavidad bucal.

La identificación de 1 a 10 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de saliva (UFC/ml) es considerado como un crecimiento Muy Escaso. De 11 a 100 UFC/ml el crecimiento es Escaso, de 101 a 1.000 UFC/ml un crecimiento Moderado, de 1.001 a 10.000 UFC/ml un crecimiento Abundante, y más de 10.000 UFC/ml un crecimiento Muy abundante.<sup>(166, 167)</sup>

Las concentraciones de *Candida* en portadores sanos, sin condiciones patológicas orales varia entre 300 a 800 unidades formadoras de colonias por ml de saliva, estas son muy inferiores a las concentraciones halladas en personas que padecen distintas formas de Candidiasis; con recuentos superiores a 20.000 UFC/ ml; se han reportado variaciones diurnas con máximos al amanecer y al anochecer.<sup>(168)</sup>

La cuantificación de *Candida*, es ventajosa clínicamente ya que permite diferenciar entre los niveles aceptados de portadores de *Candida* y la presencia de infección. <sup>(170, 171)</sup>

La desventaja de este método de aislamiento es que no permite localizar sitios específicos de infección.

### 3. Cultivo por impresión.

Este método de aislamiento utiliza una almohadilla estéril de tamaño específico embebida en un caldo de Sabouraud. <sup>(171)</sup>

Se coloca sobre la mucosa o la superficie interna de la prótesis, por un periodo de tiempo de 30 segundos, y se traslada a un medio de cultivo apropiado. <sup>(171)</sup>

### 4. Biopsias tisulares.

El estudio microscópico de los hongos en las secciones histológicas constituye el elemento diagnóstico más importante. <sup>(172)</sup>

En las infecciones de la mucosa bucal, *Candida* se localiza en las capas más superficiales del epitelio. El micelio solo invade las capas queratinizadas y granular, nunca todo el espesor. <sup>(173)</sup>

La observación de elementos fúngicos en la secciones de la muestra es posible mediante la utilización de coloraciones especiales como la de Plata de Metamina (Groccot) y del Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Sus reacciones se basan en la oxidación crómica o periódica de los grupos hidroxilos a aldehídos de los polisacáridos de la pared celular fúngica, los cuales reaccionan con el reactivo de Schiff para teñir las hifas de rosa-rojo, y con el reactivo de plata para producir un depósito negro en las hifas. <sup>(174)</sup>

La técnica de PAS tiende a dar una mayor coloración de fondo; mientras que la técnica de Groccot presenta como desventaja que la reacción celular de fondo esta oscurecida. <sup>(174)</sup>

Se ha sugerido la utilizacion de una contra coloración de hematoxilina y eosina para teñir la reacción celular de fondo. <sup>(175)</sup>

La observación de invasión tisular por hifas de *Candida*, en las preparaciones histoquímicas, son el indicador más seguro de infección. <sup>(176, 177)</sup> Sin embargo es imposible mediante este método diagnóstico la identificación de las especies involucradas.

### **Medios de Cultivo**

*Candida* crece bien en medios de cultivo con Agar Peptona-Glucosa (dextrosa), o Peptona-Maltosa. El medio más frecuentemente usado para el aislamiento de *Candida* es Agar Dextrosa Sabouraud. <sup>(178)</sup> Se le incorporan distintos tipos de antimicrobianos como cloranfenicol, penicilina, estreptomycinina o ciprofloxacina, con la finalidad de evitar el crecimiento de flora bacteriana comensal. El medio se incuba aeróbicamente a 37°C por 24-48 horas.

La siembra de las muestras clínicas en medios de cultivo específicos es el método más utilizado para la detección de levaduras, permite la identificación de especies una vez aislado el hongo. Su mayor desventaja es la incapacidad para generar resultados antes de 24 horas. <sup>(179, 180)</sup>

Sobre la superficie del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud, las colonias de *Candida* son de color crema, convexas, lisas, redondas, y brillantes y con olor a levadura.

Se ha podido detectar más de una especie de *Candida* a partir de muestras provenientes de la cavidad bucal de un mismo paciente. <sup>(181)</sup>

Las especies de *Candida* no pueden ser diferenciadas sobre la base del aspecto de sus colonias, que crecen sobre la superficie de los medios de cultivo comúnmente empleados. Se sugiere el uso de medios y/o pruebas diferenciales adicionales para la identificación de especies de este microorganismo.

Los medios diferenciales se clasifican en fluorogénicos, cuando las enzimas del hongo degradan componentes del medio que producen compuestos fluorescentes, y cromogénicos, cuando la actividad enzimática del hongo se detecta porque se producen colonias con un color característico. Los más utilizados son los medios cromogénicos porque no necesitan luz ultravioleta para la observación de las colonias, y porque permiten la identificación de un mayor número de especies que los medios fluorogénicos. <sup>(181)</sup> Estos sustratos enzimáticos pueden emplearse luego del

aislamiento de las levaduras en un medio convencional, o como medios de aislamiento primario. <sup>(182)</sup>

Utilizando un medio de Agar basado en un substrato cromogénico, es posible la identificación rápida de especies de *Candida* luego de 24-48 horas de incubación según el color de las colonias. <sup>(183)</sup>

Las principales ventajas de estos medios son la rápida identificación de microorganismos en una muestra, y el reconocimiento o identificación polifungica, es decir la identificación de una mezcla de microorganismos cuyas colonias presentan características similares.

Medios no comerciales como el Agar Pagano-Levin, permite la diferenciación de *C.albicans* con otras especies. *C.albicans* produce colonias pálidas, mientras que otras especies exhiben grados variables de coloración rosa. <sup>(184)</sup>

Existe una gran variedad de medios de cultivo cromógenos comercializados entre ellos: el CHROMagar *Candida*, CHROMagar Company, Francia o Chromoalbicans Agar- Biolife Italiana, Italia; Albicans ID y *Candida* ID-bioMerieux, Francia; que permiten una identificación presuntiva

de *C.albicans* mediante la observación del color y textura de las colonias aisladas en estos medios solidos. <sup>(184)</sup>

El Chromalbicans Agar es un medio selectivo en el que las colonias de *C.albicans* producen un pigmento de color azul que no aparece en las colonias del resto de las especies de interes medico. <sup>(185)</sup>

El CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, Francia) es un medio diferencial cromogénico usado para el aislamiento e identificación presuntiva de especies de *Candida* de acuerdo con el color de las colonias. <sup>(186)</sup>

Después de 24-48 horas de incubación en algunos de estos medios *C.albicans* crece formando colonias lisas verdes, *C.tropicalis las origina lisas azules*, y *C.krusei, rugosas y rosas*. <sup>(187, 188, 189)</sup>

Se ha reportado una especificidad de 95% de identificación para CHROMagar *Candida*, cercano al 100% de los medios convencionales. <sup>(190)</sup>

El Agar Albicans ID (Biomeriux, Basingstoke, UK), emplea una mezcla cromógena que permite visualizar de forma rápida y certera las colonias pertenecientes a *C.albicans* y otras especies como *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*,

*C.guilliermondii* o *C.kefyr*. Se ha reportado una sensibilidad de 98,35% y una especificidad de 99,7% <sup>(191, 192, 193, 194)</sup>

En otros medios como el Fluoroplate (Merck, Damstadt, Germany), las colonias de *C.albicans* dan una fluorescencia blanca al iluminarlas con luz ultravioleta. La necesidad de utilizar una lámpara UV para visualizar metabolitos fluorescentes aumenta los costos de esta prueba. <sup>(195)</sup>

### **Identificación de especies de *Candida***

Generalmente la identificación de especies de *Candida* se realiza en base a las características morfológicas y fisiológicas de la levadura aislada.

#### **1. Criterio Morfológico.**

##### **Examen Directo.**

Se fundamenta en la observación microscópica directa de la muestra tomada mediante raspado de la lesión a estudiar. Esta se coloca y se fija sobre un porta-objeto, se puede observar directamente al microscopio de luz, o utilizar tinciones rápidas como la tinta china, el blanco de calcoflúor, KOH, o coloración de Gram. <sup>(196)</sup>

Este método de aislamiento permite la identificación morfológica de *Candida*, por observación de las células fúngicas (blastosporas con o sin hifas), permite observar la diferenciación entre la forma levaduriforme y la forma de hifa.

Con la técnica de tinción de Gram las levaduras se observan de color morado; y con la técnica de PAS, las hifas PAS positivas se colorean rojo intenso. <sup>(175)</sup>

La apariencia microscópica es similar en las especies de *Candida*, todas son levaduras Gram positivas, su forma puede variar de ovoide a elongada o esférica, con brotes. Los principales inconvenientes de la observación microscópica están relacionados con incapacidad para la diferenciación de especies. <sup>(179)</sup>

Producción de Tubos Germinales también conocida como prueba de Filamentización en suero. Es el método de laboratorio estándar que junto con la formación de clamidosporas se utilizan para identificar *C.albicans*.

La prueba involucra la inducción de formación de tubos germinales a partir de levaduras cultivadas en suero.

Esta prueba consiste en realizar una suspensión en 0,5 ml de suero humano con una colonia procedente de un cultivo. El suero conteniendo el inóculo se incuba en la estufa a 37°C por 2-3 horas.

Pasado este lapso de tiempo el tubo germinal se observara con el microscopio como una extensión filamentosa de la célula levaduriforme o como un apéndice elongado que crece hacia fuera y tiene aproximadamente la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula levaduriforme.

(134, 197)

No se debe confundir el tubo germinal producido por *C.albicans* con la estructura que presenta *C.tropicalis*, que no es un tubo germinal sino el comienzo de la formación de la pseudohifa, en la cual se observa una constricción característica en su punto de origen. <sup>(198)</sup>

El problema que posee esta técnica de identificación es que un 5% de los aislamientos de *C.albicans* no producen tubo germinativo, además producirse falsos positivos en especies como *C.tropicalis* y *C.parapsilosis*.

Producción de Clamidosporas, en contraste con otras especies *C.albicans* presenta tendencia a formar estructuras grandes de pared gruesa, en el extremo terminal o intercalar de las hifas tabicadas, denominadas

clamidosporas, cuando se cultivan en un medio de Agar Bilis y/o Agar Harina de maíz. <sup>(141, 146)</sup>

La producción de clamidosporas es característica de *C.albicans*, pero también puede ser identificada si se forman cúmulos compactos de blastoconidios, a intervalos regulares a lo largo de las hifas. <sup>(199, 200, 201)</sup>

En algunos casos es posible realizar una identificación de especie sobre la base de la morfología y disposición de los blastoconidios. *C.tropicalis* tiende a formar un pequeño número de blastoconidios separados ampliamente, individuales o en pequeños cúmulos a lo largo de las hifas. La observación de colonias en forma de arañas, con formación de hifas gigantes, sugiere a *C.parapsilosis*. <sup>(199, 200, 201)</sup>

El desarrollo de pruebas de identificación presuntiva para *C.albicans*, como la filamentización y la producción de clamidosporas, han permitido reducir el costo e incluso el tiempo de identificación, al hacer innecesarios ensayos bioquímicos posteriores al aislamiento clínico.

Sin embargo en aquellos casos en los que se hace difícil obtener una identificación a partir de patrones de crecimiento en Agar Harina de Maíz o

Agar bilis y suero, se necesitan pruebas de fermentación de carbohidratos o asimilación para la identificación final de la especie.<sup>(174)</sup>

## **2. Criterio Fisiológico.**

Se basa en la capacidad de asimilación y fermentación de hidratos de carbono por parte de las diferentes especies de *Candida*.

### Asimilación de Carbohidratos.

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen las levaduras de asimilar un hidrato de carbono o un nitrato específico como única fuente de carbono o nitrógeno, respectivamente.

Esta condición depende de factores de permeabilidad de la membrana y de la presencia de factores enzimáticos específicos controlados genéticamente, que induzcan la degradación de los carbohidratos.<sup>(202)</sup>

Se utilizan: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, celobiosa, rafinosa, meliobosa, eritritol, trehalosa, rafinosa e inositol.

La asimilación del hidrato de carbono descrita para especies de *Candida* puede obtenerse examinando zonas de crecimiento del hongo alrededor de discos o bien impregnando con varios azúcares el Agar. <sup>(203)</sup>

### Fermentación de Carbohidratos.

Se fundamentan en la identificación de especies según patron de fermentación de hidratos de carbono. <sup>(171)</sup>

Las pruebas de fermentación se realizan en medios de cultivo líquidos y se basan en la producción de ácido, o producción de gas. <sup>(204)</sup>

Los azúcares mas empleados son: glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, trehalosa, y lactosa al 2% y rafinosa al 4%.

La mayoría de las técnicas convencionales de identificación de *Candida* se basan en metodos bioquímicos que requieren varios dias para su interpretración y emplean colonias previamente aisladas, por lo que demandan para lograr la identificación mayor tiempo y dedicación, por lo que hoy en dia se emplean Sistemas de Identificación disponibles comercialmente, que han reducido en gran medida el tiempo utilizado en la identificación de especies de *Candida* en el laboratorio. Unos sistemas están

basados en la asimilación de carbohidratos y otros en la producción enzimática.<sup>(204)</sup>

El API-20C AUX y el API-32C (BioMérieux) son sistemas que utilizan tiras de identificación basadas en la asimilación de carbohidratos, la identificación se realiza después de 24-72 h de incubación, y permite la identificación de 24 y 38 tipos de especies de *Candida*, respectivamente.<sup>(205)</sup>

El API-20 C AUX es 96-99% tan exacto como los procedimientos convencionales<sup>(206)</sup>, es frecuentemente usado como un sistema de referencia para la identificación de *Candida*.<sup>(207)</sup>

El RapID Yest Plus System (Innovative Diagnostic Systems, Nocrass, GA, USA) es un método cualitativo que se basa en la degradación enzimática de substratos convencionales y cromogénicos. Este sistema no requiere del crecimiento de las levaduras, identifica enzimas *in situ*, los resultados de identificación se obtienen después de 4 h de inoculación.<sup>(183)</sup> Una evaluación reportó que un 94.1% de 304 levaduras fueron correctamente identificadas como especie mediante el empleo de este sistema.<sup>(208)</sup>

Otros sistemas como el Candifast utilizan reacciones de fermentación, y producción de úrea como mecanismos de reconocimiento de especies.

Existen también sistemas automatizados para la identificación de especies de *Candida*, son rápidos, y muy certeros. <sup>(209)</sup> Con ellos se obtiene mayor precisión en los resultados <sup>(210, 211)</sup>, menor tiempo requerido para la identificación de especies, economía de espacio, ahorro de materiales de laboratorio y de tiempo para el operador. <sup>(212)</sup>

Sin embargo se recomienda contar con las pruebas convencionales de identificación de levaduras, sobre todo en los casos de aislamientos clínicos donde las cepas no son comunes; asegurando así una correcta identificación. <sup>(213)</sup>

### **3. Métodos genéticos de identificación.**

Basándose en la variación genética, técnicas de identificación moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la hibridación de ADN <sup>(214)</sup> y el análisis de las diferencias del cariotipo por electroforesis <sup>(215)</sup>; es posible la identificación de especies de *Candida*. <sup>(216)</sup>

*Candida* puede ser diagnosticada directamente de una muestra clínica mediante técnicas de amplificación comerciales de ADN. Esta detección puede realizarse básicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias conservadas en todos los hongos (PCR

parafúngica) o de secuencias específicas de una especie en concreta (PCR específica).<sup>(217)</sup>

La capacidad de estas técnicas para proporcionar un diagnóstico definitivo en corto tiempo, tiene sin lugar a duda efecto positivo en el manejo del paciente.

En la medida en que el costo de estas pruebas sea menor podremos incorporarlas como exámenes de rutina diagnóstica; disfrutando de las ventajas que estas técnicas de biología molecular proporcionan en el diagnóstico clínico.

### **Serotipificación de *Candida albicans*.**

Implica la identificación en base a las características antigénicas de la pared celular de dos serotipos, A y B.

Se han utilizado para la serotipificación el método de aglutinación en lámina empleando un antisuero de conejo IF6, y la inmunofluorescencia indirecta.<sup>(218, 219)</sup>

La técnica de inmunofluorescencia utiliza antisueros monoclonales (AM B 9E, antifactor 6), que reconocen un epítipo de naturaleza polisacárida que se expresa en la pared celular de la fase levaduriforme del serotipo A de *Candida albicans* pero no del serotipo B; la reactividad se evalúa por inmunofluorescencia indirecta. <sup>(219)</sup>

Identificar el serotipo de *C.albicans* que predomina en una región o entre una población determinada además de su importancia desde el punto de vista taxonómico, tiene importancia epidemiológica y terapéutica.

## **ECOLOGÍA**

La colonización de la cavidad bucal por especies de *Candida* varía en diferentes zonas del hospedero. Alkumru y Beydemir (1992) reportaron que la tasa de colonización por *Candida* es mayor en el dorso de la lengua que en otros lugares de la cavidad bucal, por lo que sugirieron a la lengua como el reservorio primario de *C.albicans* en boca. <sup>(220)</sup>

Otros sitios de colonización frecuente de levaduras son la mucosa del paladar y la mucosa yugal <sup>(221)</sup> y se han aislado especialmente *C.albicans* del surco periodontal en un gran número de pacientes con periodontitis crónica.

<sup>(222, 223)</sup>

Investigaciones recientes han demostrado la presencia de estas levaduras en el tejido gingival. <sup>(224, 225, 226)</sup>

Como comensal de la cavidad bucal *C.albicans* se adhiere a proteínas de la saliva y a bacterias para evitar su eliminación de la zona. Se ha reportado aglutinación microscópica y macroscópica con cepas de *Streptococcus sanguis*, *S.salivarius*, *S.mutans*, *S.mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actynomyces viscosus*, *Lactobacillus* y *Porphyromonas gingivalis*. <sup>(249)</sup>

## **PATOGÉNESIS**

La presencia de especies de *Candida* como comensales en la cavidad bucal de sujetos sanos, sin Candidiasis bucal clínica, es común. <sup>(227)</sup>

En estos sujetos existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedero y el potencial invasivo de las levaduras <sup>(228)</sup>, por lo que su presencia no siempre ocasiona enfermedad.

La transformación de *Candida* sp de un estado comensal a un estado patógeno depende de factores inherentes al hospedero y factores de virulencia del hongo.

Existen aspectos locales y sistémicos en el hospedador que favorecen la colonización por *Candida*.

Los factores locales se asocian con alteraciones de la saliva, de la barrera mucosa y cambios del epitelio bucal. <sup>(229)</sup>

La mucosa bucal constituye la primera barrera contra la invasión candidiásica, todas aquellas situaciones que alteran su integridad como traumatismos, el uso de prótesis en mal estado, una higiene bucal inadecuada van a favorecer la adhesión e invasión mucosa por parte de *Candida* sp. Se van creando como consecuencia de la agresión microfisuras en el epitelio, que aumentan la permeabilidad a los antígenos y toxinas de *Candida*. <sup>(230, 231)</sup>

El principal agente inmune innato de la cavidad bucal es la saliva. El crecimiento de *Candida* esta regulado por la saliva. No solamente por los macrófagos que se encuentran en ella, sino también por las funciones de barrido mecánico que ejerce en la cavidad bucal, lo que dificulta la adhesión del hongo. La saliva también posee componentes proteicos con poder antifúngico, como las lisozimas, lactoferrina, transferrina, histatinas y defensinas <sup>(232, 233)</sup> y anticuerpos anti-*Candida* del tipo Ig A secretor que actúan inhibiendo la adhesión de *Candida* a la mucosa bucal. <sup>(234)</sup>

Las histatinas son un grupo pequeño de péptidos (Hsn-1,-3 y -5) presentes en la saliva humana, la histatina-5 posee una potente actividad antifúngica contra especies de *Candida* no albicans como: *C.tropicalis*, *C.gulliermondii*, *C.parapsilosis* y *C.krusei*.<sup>(235, 236)</sup>

Se ha reportado que la concentración de histatinas disminuye considerablemente en la saliva de los pacientes con SIDA quienes presentan Candidiasis. Esta disminución pudiera explicar porque más del 70% de estos pacientes desarrollan Candidiasis en algún momento de la enfermedad.<sup>(237)</sup>

Las defensinas son divididas en dos grandes grupos  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas, son secretadas por los neutrófilos y células epiteliales respectivamente. Ambos grupos suprimen tanto el crecimiento bacteriano como el de los hongos.<sup>(146)</sup>

Estas proteínas y péptidos contenidos en la saliva regulan el crecimiento tanto de bacterias como de hongos, y comprenden parte del sistema inmune innato.

La saliva contiene pocos polimorfonucleares neutrófilos, sin embargo su número se incrementa considerablemente en condiciones patológicas. Estos son secretados a partir de los surcos gingivales y suspendidos en la

saliva, desde donde ejercen su potente efecto contra la colonización por *Candida*, y poseen la capacidad de fagocitar y ocasionar la destrucción de levaduras. (238, 239, 240)

La proliferación de *Candida* sp en los tejidos está principalmente asociada a la neutropenia. Esto demuestra el papel de tan importante que ejercen los neutrófilos en la regulación de la invasión por parte de esta levadura.

De igual forma, un flujo salival continuo es tan importante como una barrera mucosa sana en la prevención de la colonización bucal por *Candida*. (241)

La presencia de ciertas entidades y factores que provocan la reducción del flujo salival, tales como el síndrome de Sjogren, la edad, la radioterapia local y los fármacos como: anticolinérgicos, diuréticos, antihipertensivos; van a ocasionar una disminución de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la saliva permitiendo el desarrollo del potencial patógeno del hongo. (232, 242)

Los cambios salivales cualitativos, como mayor contenido de glucosa y un pH ácido, son características que favorecen el incremento de levaduras

en cavidad bucal. El pH ácido causa una disminución en la reacción de las IgA salivales con los receptores antigénicos de las células levaduriformes (polisacáridos de la pared celular); esto favorece el crecimiento de levaduras sin regulación por parte de las IgA. <sup>(234)</sup>

Los cambios en el epitelio bucal, como hiperplasia epitelial, displasia y atipias celulares se han asociado con la presencia de *Candida*. <sup>(243)</sup>

Alteraciones hormonales, nutricionales e inmunológicas en el hospedero predisponen sistémicamente a la infección por especies de *Candida*. <sup>(229)</sup>

Las alteraciones o enfermedades endocrinas asociadas con el incremento de *Candida* sp son el hipoparatiroidismo <sup>(244)</sup>, el hipotiroidismo y la insuficiencia suprarrenal. Su presencia también se ha asociado a Diabetes <sup>(245)</sup> y enfermedades malignas, particularmente Linfomas o Leucemias <sup>(246)</sup>

En pacientes con Leucemia un número significativo de muertes se presentan como consecuencia de una fungemia por *Candida* sp, y muchos de estos casos se asocian con Candidiasis bucal previa. <sup>(247)</sup>

Las deficiencias nutricionales de hierro, ácido fólico, la hipovitaminosis A y la deficiencia de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> y C, favorecen la invasión y agresión de *Candida* al ocasionar cambios degenerativos en la mucosa bucal, que disminuyen su resistencia y aumentan su sensibilidad a la invasión. <sup>(248, 249)</sup>

Específicamente la deficiencia de hierro altera la enzima fungistática transferrina, disminuye la fagocitosis de *Candida* y deprime la inmunidad celular y humoral, además de modificar el epitelio bucal ocasionando atrofia. <sup>(250, 251)</sup>

Las dietas con alto contenido de carbohidratos le proporcionan a las especies de *Candida* metabolitos ideales para su crecimiento y adhesión a las células epiteliales. <sup>(252)</sup>

La antibioticoterapia prolongada interfiere con el balance normal de la microflora bucal, la competencia entre microorganismos bacterianos por la adherencia y la nutrición constituyen en estados de salud límites para el crecimiento y la diseminación de *Candida* sp. La reducción de los antagonistas microbianos facilita la proliferación fúngica. <sup>(146, 251)</sup>

El uso de corticoesteroides inhalados o sistémicos disminuye los mecanismos de defensa local en el tejido bucal. <sup>(253)</sup>

El uso terapéutico de quimioterapia y radioterapia en el tratamiento de lesiones malignas, se ha asociado con un incremento en el riesgo del desarrollo de entidades clínicas inducidas por *Candida* sp, se han sugerido como causas la consecuente reducción del flujo salival, lo que ocasiona disminución de la acción antifúngica de la saliva <sup>(254)</sup>, y la potenciación de los factores de virulencia del hongo. En líneas generales se produce un desbalance entre las defensas del hospedero y la virulencia de los microorganismos. Un marcado incremento en la adherencia de células levaduriformes a las células de la mucosa bucal se ha reportado en pacientes que han recibido terapia para el cáncer. <sup>(255)</sup>

En los pacientes con infección por VIH, la disminución de su inmunidad celular, la hipofunción salival asociada y la medicación que reciben son factores asociados a una alta incidencia de especies de *Candida* en cavidad bucal que dan origen a varias formas clínicas de Candidiasis. <sup>(164, 256, 257, 258)</sup>

La edad es otro factor predisponente al crecimiento exagerado de *Candida* en cavidad bucal. En pacientes geriátricos se produce una

disminución del flujo salival, debido a una hipofunción glandular como resultado de la destrucción de células acinares inducida de forma fisiológica por la edad y al tratamiento de enfermedades malignas. Esto ocasiona una disminución de la secreción de inmunoglobulina A y de los niveles de lactoferrina y transferrina en la saliva. Esta disminución de los factores inhibidores del crecimiento de *Candida* en saliva, así como la supresión de la actividad de los neutrófilos y el incremento de la adhesión de *Candida* a los queratinocitos predispone a los pacientes geriátricos al desarrollo de Candidiasis en boca. <sup>(229, 232)</sup>

El tabaco crea condiciones favorecedoras a la invasión y multiplicación de *Candida* sp. En cavidad bucal altera el pH de la saliva, reduce su potencial de oxido-reducción, la concentración de IgA, la función de los polimorfonucleares, y aumenta la queratinización epitelial. <sup>(229)</sup> Sin embargo se plantean controversias en cuanto a la relación entre tabaco y colonización por *Candida*. <sup>(260, 261)</sup>

Todos estos factores causan un desequilibrio ecológico, estableciéndose una oportunidad para que las especies comensales de *Candida* desarrollen una relación parasitaria, dando inicio a una Candidiasis. <sup>(262)</sup>

La virulencia de *Candida* se debe a factores como las adhesinas, la conversión morfogénica del microorganismo de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, la secreción de enzimas como proteasas y fosfolipasas y la inmodulación de los mecanismos de defensa del hospedero. <sup>(263, 264)</sup>

Se ha determinado que una alta actividad de fosfolipasas y producción de tubos germinales son necesarias para la colonización e infección de la cavidad bucal por *C.albicans*. <sup>(265)</sup>

Los factores de virulencia parecen estar controlados genéticamente, entre los genes conocidos para *C.albicans* se han descrito el gen de la hexosaminidasa (HEX1), varios genes de proteinasas aspárticas (SAP1-9) y un gen que le confiere la capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (INT1), estos genes se expresan en número determinado y en un momento específico. <sup>(266, 267, 268)</sup>

La adherencia es un pre-requisito para la colonización, y un paso fundamental para el establecimiento de la infección <sup>(269)</sup>, supone la presencia de receptores específicos en la célula hospedera y antígenos localizados en la pared celular del hongo <sup>(270)</sup>

Las interacciones físicas de *Candida* sp con el hospedero son a nivel de la superficie celular, y los constituyentes proteicos de la pared celular de esta levadura involucrados en la unión se han designado con el nombre de adhesinas.

Las adhesinas son unas manoproteínas de superficie que se unen a receptores que contienen carbohidratos, y es a través de ellas que se produce el reconocimiento de las células epiteliales. (271, 272)

El componente reconocido en el hospedero por el microorganismo se conoce como ligando o receptor. (271, 273)

*C.albicans* se adhiere a células epiteliales, células endoteliales, factores solubles, componentes de la matriz extracelular; como fibronectina, laminina, colágeno y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. (271)

La interacción de estas adhesinas con el hospedero tiene implicaciones directas para la patogénesis, ya que pueden modular (activar o inhibir) la respuesta inmune. (274, 275)

Las adhesinas reconocidas como responsables de la adherencia a los tejidos del hospedero son una molécula homóloga de la integrina humana CR3, que se une con los grupos arginina-glicina-acidoaspartico (RGD) de iC3b, fibrinogeno, fibronectina y laminina. Una proteína con actividad de lectina que se une con los azúcares de las células epiteliales, reconoce residuos de carbohidratos asociados a la membrana plasmática de las células del hospedero. Dos proteínas han sido descritas; las que reconocen residuos de fucosa y las que reconocen la N-acetilglucosamina en células epiteliales. También se han descrito interacciones no definidas, que involucran la enzima aspartil proteinasa o el factor 6, se desconoce el receptor en la célula epitelial del hospedero. <sup>(272, 273, 274)</sup>

Los mananos y las manoproteínas de la pared celular desarrollan una potente actividad inmunomoduladora, capaz de modificar las respuestas del sistema inmune. (Células asesinas naturales, fagocitos, inmunidad mediada por células y los mecanismos humorales). <sup>(149)</sup>

La adhesión implica la unión de las levaduras a la superficie epitelial. *C.albicans* es la especie que mejor se adhiere a las células epiteliales bucales. Les siguen *C.tropicalis* y *C.parapsilosis*. Las especies *C.krusei* y *C.guilliermondii*, muestran muy poca capacidad de adhesión. <sup>(274)</sup>

Son muchos los factores que pueden modificar la adherencia, tales como la variación del pH y la temperatura, la presencia de sustancias con acción antimicrobiana, la existencia de otros microorganismos, y la dieta. <sup>(277, 278)</sup>

La invasión de los espacios intercelulares por especies de *Candida* va a depender de la producción de tubos germinales que se transforman en largas hifas que permiten penetrar e invadir el espacio celular, así como de la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas ácidas o fosfolipasas). <sup>(279)</sup>

*Candida* sp secreta una aspartilproteínasa, que participa en la invasión tisular al degradar las proteínas de la matriz extracelular.

Una vez en el tejido, el cambio morfológico dificulta la fagocitosis y la reactividad con la IgA, la habilidad de cambiar entre diferentes fenotipos celulares representa un mecanismo de evasión a las defensas del hospedero. <sup>(280)</sup>

*Candida* sp tiene la capacidad de producir ácidos carboxílicos en presencia de carbohidratos, estos producen un pH ácido del medio que favorece la adhesión, la secreción y actividad de las enzimas hidrolíticas. <sup>(281)</sup>

El proceso de invasión es seguido por una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por el predominio de neutrófilos y la presencia de IgG, IgA, IgM, factores de complemento, linfocitos T y macrófagos. <sup>(282)</sup>

*C.albicans* es considerada la especie más virulenta por ser altamente productora de enzimas hidrolíticas, como fosfolipasa, lipasa, fosfomonoesterasa, hexosaminidasa y diferentes tipos de proteinasas. Las proteinasas y enzimas fosfolipasas son producidas principalmente por *C.albicans*. <sup>(283)</sup>

Se ha comprobado experimentalmente que *C.albicans* posee un tipo de crecimiento guiado por contacto que se denomina trigmotropismo, con esta propiedad el hongo puede evaluar la topografía de la superficie donde se encuentra y descubrir discontinuidades entre las células que le permitan penetrar en los tejidos. <sup>(146)</sup>

Microorganismos levaduriformes han sido aislados en alta proporción en casos de Leucoplasia. <sup>(136, 284)</sup> Algunos autores señalan la infección de las membranas mucosas por *Cándida* sp como la causa del desarrollo de lesiones Leucoplasicas <sup>(285)</sup>, en oposición a este planteamiento otros autores resaltan el papel que como invasores secundarios cumplen las especies de *Candida* en el desarrollo de estas lesiones. <sup>(286, 287)</sup>

De cualquier modo *Candida* ha demostrado un alto potencial de adaptación y de desarrollo en las lesiones de Leucoplasia y Liquen Plano en la cavidad bucal. <sup>(288)</sup>

Se ha reportado que *Candida* sp puede causar cambios displásicos en la mucosa bucal, mediante la producción de nitrosaminas endógenas, a partir del nitrito sodico de la saliva y ciertas aminos presentes en los alimentos. En animales se ha visto que las nitrosaminas producidas por *Candida* son capaces de inducir carcinomas bucales. <sup>(136, 289, 290)</sup>

El informe sobre Leucoplasia de la OMS (1978) establece que aún es incierta la relación entre la infección por *Candida*, la displasia epitelial y el riesgo de una futura malignidad. <sup>(2)</sup>

Actualmente las lesiones de la mucosa bucal con apariencia clínica de Leucoplasias y que presentan positividad a la presencia de *Candida* han sido definidas y clasificadas como “Leucoplasia Candidiásica” o “Candidiasis Crónica Hiperplásica”

## II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

### Objetivo General

Identificar especies del género *Candida* aisladas en lesiones Leucoplásicas de la cavidad bucal a través de estudios histopatológicos y micológicos, en un grupo de pacientes que acuden al Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la U.C.V.

### Objetivos Específicos

1. Determinar la prevalencia de las lesiones leucoplasicas estudiadas de acuerdo a género, edad, etiología, formas clinicas, localización en cavidad bucal y resultados histopatológicos.
2. Cuantificar e identificar especies de *Candida* en enjuagues bucales de pacientes con Leucoplasia y grupo control.
3. Aislar e identificar especies del Género *Candida* a partir de muestras obtenidas por raspado de la superficie de Leucoplasias.

4. Serotipificar cepas de *C.albicans* aisladas a partir de muestras clínicas obtenidas por raspado de la lesión.
  
5. Evidenciar la presencia de *Candida* sp por estudio histoquímico utilizando la tinción con ácido per-yodico de Shiff (PAS) y tinción de Groccot.
  
6. Reconocer asociación entre la presencia de estructuras fúngicas y los resultados histopatológicos de las lesiones leucoplasicas.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **EQUIPOS DE LABORATORIO**

Nevera.

Centrifuga.

Estufa a 37°C.

Autoclave.

Mechero de Bunsen.

Microscopio de luz.

#### **MATERIALES DE LABORATORIO**

Placas de Petri.

Tubos de ensayo con tapa de baquelita.

Tubos de ensayo con tapa de goma.

Gradillas de metal.

Varillas de vidrio.

Vortex.

Micropipetas de precisión.

Puntas de Micropipetas.

Asa de Platino.

Agujas de inoculación.

Laminas portaobjetos.

Laminillas cubreobjeto.

Agar Desxtrosa Sabouraud.

Agar Bilis.

Suero humano.

Tween 80.

Azul de Metileno.

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

Biopsias de pacientes con diagnóstico de Leucoplasia en cavidad bucal provenientes del Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología U.C.V.

Biopsias de la mucosa bucal de individuos sanos, no fumadores, tomadas en Servicio de Cirugía de la Facultad de Odontología U.C.V.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

### **Agar Dextrosa Sabouraud.**

Es un medio diferencial, recomendado para el cultivo y crecimiento de hongos. Para que se produzca el crecimiento selectivo de hongos sobre bacterias en las muestras a analizar se añade Cloranfenicol, 0,5 g por litro.

#### Composición por litro.

Digestivo pancreático de caseína.... 5 g.

Peptona de tejido digestivo.... 5 g.

Dextrosa.... 40 g.

Agar.... 15 g.

Ph 5.6 +/- 0,2 a 25 °C.

La peptona y el digestivo pancreático son las bases nutrientes del medio. Están suplementadas con la dextrosa, que le confiere un mejor crecimiento de los hongos.

### Preparación.

Se disolvieron 65 g de Agar en 1 litro de agua destilada, calentando y agitando hasta disolver por completo. El matraz se cerró con una doble capa de papel aluminio.

Se esterilizó en autoclave el matraz con la suspensión (para verter en las placas de petri) durante 15 min a 115°C y 15 libras (ó 1 atmósfera) de presión. En los tubos se dosificó la preparación y se cerró, se llevó al autoclave a 115°C por 15 min y 1 atmósfera de presión.

Se enfrió el contenido del matraz.

Se dosificó en placas de petri, a un volumen de 20 ml.

Los tubos una vez sacados del autoclave se dejaron solidificar, inclinándolos y dejando el medio interior en forma de pico de flauta.

El medio preparado en placa tiene una duración de 2 meses y medio a una temperatura de 4-8 °C. Los tubos y frascos tienen una caducidad de 6 meses conservados a 4-8 °C.

### Agar Harina de Maíz.

Es un medio recomendado para favorecer la formación de clamidosporas por parte de *C.albicans*.<sup>(291)</sup>

#### Composicion por litro.

Extracto de Maíz....2.0

Agar.... 15.0

pH 6.0 +/- 0.2.

Tween 80

#### Preparación.

Se suspendieron en un matraz 17g de extracto de maíz en 1 litro de agua destilada hasta disolver completamente y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Se agregó Tween 80 (polisorbato) en una concentración final de 0,02% al agar harina de maíz. Esto con la finalidad de reducir la tensión superficial y favorecer la formación optima de hifas y blastosporas.<sup>(200)</sup>

La adición de 0,001 g de azul de metileno a la preparación de Agar Harina de maiz proporciona un contraste de fondo para la observación de las características morfológicas de las levaduras. <sup>(392)</sup>

Finalmente toda la preparación se dispensó en placas de petri.

### **RECURSOS HUMANOS.**

- Personal Docente del Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología U.C.V
- Personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología U.C.V.
- Personal del Laboratorio Central de Histopatología Bucal “Dr. Pedro José Tinoco”
- Personal del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.

## IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

### **Selección de la Muestra**

Población: pacientes que acudían al Servicio de Clínica Estomatológica “Dra. Magdalena Mata de Henning” de la Facultad de Odontología U.C.V.

Se seleccionaron 45 pacientes que fueron divididos en dos grupos.

### Criterios de Inclusión

**Grupo A** (30 pacientes) que presentaron lesiones en cavidad bucal que al examen clínico fueron sugerentes de Leucoplasias. El diagnóstico de Leucoplasia se basó en el criterio sugerido por Axell y cols <sup>(3)</sup> y ajustado a la más reciente definición. <sup>(5)</sup>

### Criterios de Exclusión

Se excluyeron de este grupo pacientes que habían recibido tratamiento con esteroides y fármacos antimicrobianos durante las tres semanas anteriores a la evaluación, pacientes con historia de Candidiasis,

anemia, diabetes, VIH +, mujeres embarazadas y pacientes con lesiones clínicamente sugerentes de infección por *Candida*.

**Grupo B** (15 pacientes) este grupo estuvo conformado por pacientes sin enfermedad clínicamente detectable de la mucosa bucal; se excluyeron de este grupo portadores de prótesis bucal y/o con alguna enfermedad sistémica diagnosticada, o que se encontraban bajo terapia antimicrobiana o esteroidea, y pacientes fumadores.

### **Análisis Clínico**

El manejo de cada paciente implicó la utilización de una Historia y realización de un examen clínico bucal. (Anexo 1)

1. Entre los elementos a valorar en el Interrogatorio tenemos los siguientes:

Estado general del paciente, especialmente factores nutricionales.

Edad y sexo.

Consumo de alcohol y tabaco.

Utilización de enjuagues bucales.

Uso de Prótesis Dental.

## 2. Elementos a valorar del examen clínico.

Tipo clínico de la lesión.

Ubicación.

Extensión.

Posible relación con factores etiológicos.

Estado dental.

Presencia o no de *Candida*.

Se incluyó un Formulario de Consentimiento Informado en la Investigación Clínica; basado en la Declaración de Helsinki de la Asociación Medica Mundial. Este formulario fue firmado por cada paciente consintiendo su participación en el estudio, una vez se le explicaba el propósito de la investigación, los riesgos, molestias, y beneficios que implicaría. (Anexo 2)

### **Análisis Microbiológico**

#### Toma de la muestra para estudio Micológico

Para el estudio micológico se tomaron dos muestras clínicas con la finalidad de determinar la presencia de levaduras; aislamiento, identificación

de especies de *Candida*, así como la identificación de serotipos de *C.albicans* presentes.

### 1. Enjuague Bucal Concentrado

Se le pidió a cada paciente que realizara un enjuague vigoroso con 10 ml de agua estéril por 1 minuto, pasado el lapso de tiempo se retornó el enjuague al contenedor. Se colocó la solución proveniente del enjuague en un tubo de ensayo con tapa de goma y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min.; se descartó el sobrenadante y con una pipeta de precisión se tomo 0,1 ml del sedimento, este se sembró en una placa de petri que contenía el medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol y se incubó en la estufa a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis.

El crecimiento fue evaluado según el número de colonias observadas, y expresado como unidades de colonias de *Candida* formadas por ml de enjuague.

### 2. Toma de Muestra Clínica por raspado

Se realizó por raspado de la mucosa donde se observo la lesión. La toma de la muestra se realizó con una espátula metálica 7A estéril.

En el **grupo A** se tomó de la superficie de la lesión sospechosa de Leucoplasia.

En el **grupo B** la muestra se tomó de la superficie del paladar, mucosa interna de carrillo derecho o izquierdo.

El procedimiento realizado fue el siguiente:

\* Una muestra se tomó previo a la realización del barrido mecánico de la zona donde se encontraba la Leucoplasia, por considerar que no todas las especies de *Candida* tienen la misma capacidad de adherencia a la superficie de los tejidos.

\* Otra muestra se tomó posterior al aislamiento de la zona y barrido con solución fisiológica para disminuir la presencia de flora contaminante. Se secó con hisopos estériles.

\* Con la parte roma de una espátula 7-A se raspó la superficie de la mucosa con lesión en los pacientes del **Grupo A**, y la muestra se sembró en Agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol contenido en tubos de ensayo con tapa de baquelita. En los pacientes del **Grupo B** esta muestra se tomó

de la mucosa del carrillo izquierdo/derecho y paladar duro siguiendo el mismo procedimiento.

\* Las muestras sembradas se llevaron a la estufa a una temperatura de 35 +/- 2 °C en condiciones de aerobiosis examinándose el crecimiento a las 24 y 48 h.

\* Se realizó un subcultivo en Agar Dextrosa Sabouraud sin Cloranfenicol, con la finalidad de purificar las colonias presentes en el cultivo inicial; para ello se tomó una pequeña porción de la colonia con un asa de platino previamente esterilizada y se sembró en placas de Petri con el medio indicado anteriormente y se incubó en la estufa a 37°C por 24-48 horas en condiciones de aerobiosis.

### Procesamiento de las muestras para estudio Micológico

#### **Observación Macroscópica**

Las colonias fueron identificadas por observación directa sobre la superficie del medio de cultivo, tomando en cuenta: color, forma, y tamaño.

## **Observación Microscópica**

Se realizó el examen directo a las colonias obtenidas con la finalidad de determinar la presencia de levaduras empleando el microscopio de luz.

Para ello, se utilizó el asa de platino esterilizada directamente a la llama del mechero, para tomar una pequeña porción de la colonia, la muestra se colocó sobre una lamina porta-objeto, se adicionó una gota de tinta Parker y se cubrió con una lamina cubreobjeto, para observar al microscopio de luz a un aumento de 40X. Se pudo observar la presencia de blastosporas redondas, pseudohifas e hifas.

## **Identificación de levaduras**

Se realizaron tres tipos de pruebas:

### **1. Producción de Tubos Germinales (Filamentización en suero)**

Esta prueba consiste en realizar una suspensión de una colonia procedente de un cultivo en suero humano.

Se tomó una pequeña porción de colonia con el asa de platino previamente esterilizada y se inoculó en 0,5 ml de suero humano. Se incubó el suero conteniendo el inóculo en la estufa a 37°C por 2 horas.

Pasado este período de tiempo se tomó una muestra de la suspensión suero-levadura y se colocó sobre una lámina portaobjeto, se cubrió con una laminilla cubre-objeto, y se realizó la observación microscópica al fresco, empleando el microscopio de luz con un aumento de 10X y 40X.

## 2. Producción de Clamidosporas.

Se sembró con una aguja de inoculación previamente esterilizada una parte de la colonia en un medio agar bilis, y se incubó a 25°C por 72 horas en condiciones de aerobiosis.

Transcurrido este lapso de tiempo se tomó una muestra del medio Bilis Agar que contenía el inóculo con un asa de platino previamente esterilizada, se llevó a una lamina portaobjeto, y se cubrió el inóculo con una laminilla cubre-objeto.

Se realizó la observación microscópica al fresco utilizando el microscopio de luz con un aumento de 10X y 40X. *C.albicans* tiene una

marcada tendencia a formar estructuras grandes de pared gruesa y refringente, que al microscopio se observan como estructuras cuyo diámetro es de 7-8 micras, ubicadas intercaladas y al extremo de las formas filamentosas.

También se observó la formación de clamidosporas y pseudohifas utilizando Agar harina de maíz-Tween 80, realizando la siembra de la porción de la colonia con aguja de inoculación previamente esterilizada sobre la superficie de la placa conteniendo el medio, realizando cortes paralelos separados por 1,25 cm en el agar, manteniendo la aguja de inoculación con una angulación de 45°, se colocó un cubreobjeto sobre la superficie del agar cubriendo la porción de las líneas de inoculación. Las placas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24-48 horas, luego se examinaron con el microscopio a través del cubreobjeto para evitar la contaminación inadvertida del objetivo en el agar.

### 3. Sistema API 20C AUX (Biomeriux)

En los casos donde las pruebas de producción de tubos germinales y/o clamidosporas arrojaron resultados negativos, se realizó la identificación de especies de *Candida* utilizando el sistema comercial API 20C AUX; la galería se compone de 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados

que permiten realizar 19 test de asimilación. Las cúpulas son inoculadas con un medio semisólido y las levaduras se reproducen solo si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Las lecturas de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene mediante un catalogo analítico que proporciona una identificación de 24 especies de *Candida* después del periodo de incubación.

Este sistema se compone de:

Galerías API 20C AUX.

Cámaras de incubación.

Ampollas de medio "C" (C médium).

Medio en suspensión.

Preparación de la galería.

Se prepararon las cámaras de incubación y se repartieron en cada cámara aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada en el fondo de los pozos con el fin de crear una atmósfera húmeda. La referencia de la cepa es escrita en cada caso en la lengüeta lateral de la cámara correspondiente.

### Preparación del inóculo

- Se tomaron 2 ml de Medio en suspensión y se preparó una suspensión de levaduras con una turbidez igual al patrón N°2 de la escala de McFarland. Para ello se tomó una pequeña porción de la colonia aislada con una aguja de inoculación previamente esterilizada.
- Con una ampolla de Medio C (C Medium) y con la micropipeta se transfirieron 2 a 4 gotas (100  $\mu$ l) de la suspensión anterior. Se homogenizó con la pipeta, evitando la formación de burbujas.

### Siembra del Inóculo

- Se llenaron las cúpulas con la suspensión obtenida en C Medium, evitando la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde del pozo. Creando un nivel horizontal o ligeramente convexo.
- Se cerraron las cámaras y se incubaron durante 48-72 horas a una temperatura de 30°C.

### Lectura de la galería

Después de 48 y 72 horas de incubación, se evidenció el crecimiento de levaduras por el grado de turbidez que se comparó con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula mas turbia que el testigo indica una reacción positiva.

En la hoja de resultados los tests están separados en grupos de tres, y se indicaron para cada uno un valor de 1,2 y 4. Sumando el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtuvieron siete cifras que constituyen el perfil numérico.

### Identificación

La identificación se hizo en cada caso comparando el perfil numérico obtenido en la hoja de resultados con la tabla que contiene los distintos perfiles numéricos para cada especie, empleando para ello el catalogo analítico API 20C AUX.

### **Serotipificación de *Candida albicans*.**

Las cepas identificadas como *C.albicans*, aisladas de los cultivos de las lesiones Leucoplásicas fueron serotipificadas empleando la técnica de aglutinación en lámina (metodo de Hasenclever y Mitchel), en el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”.

Se utilizaron cepas control de *C.albicans* A 3153 y B 3156, del Instituto Pasteur de Francia.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes de cada serotipo, inoculando conejos blancos de Nueva Zelanda por vía escapular con las cepas tipificadas de *C.albicans*. El inóculo empleado fue de  $1 \times 10^6$  cel/ml de levaduras, tratadas con formol diluidos al 1%. Los animales fueron sacrificados a las 3, 6 y 10 semanas después de inoculados.

Los inmunosueros de conejo obtenidos de cada serotipo, fueron absorbidos cada uno con su antígeno heterólogo de *C.albicans* según el procedimiento descrito por Poulain y col (1983).

Para la aglutinación en lámina los aislados identificados de *C.albicans* y las cepas tipificadas de cada serotipo, fueron diluidos 1:2 en buffer fosfato salino pH 7,2.

Las pruebas de aglutinación en lámina para la identificación de los serotipos se llevaron a cabo colocando una lámina porta-objeto de 20 µl de suero previamente absorbido y 20 µl de la levadura a estudiar. La muestra fue agitada por un minuto, y la agitación fue evaluada a nivel macroscópico y microscópico.

### **Análisis Histopatológico**

#### Toma de la muestra para estudio Histopatológico e Histoquímico

Se realizaron biopsias incisional o excisional dependiendo del tamaño de las lesiones patológicas, lesiones pequeñas de 1 cm de tamaño fueron sometidas a biopsia excisional incluyendo margenes sanos de tejido, en lesiones de mas de 1cm de tamaño que involucraban varias zonas se realizó biopsia incisional en areas eritematosas, verrucosa e induradas, bajo anestesia local, con una hoja de bisturí # 15. En el grupo control la muestra de tejido se tomó de los colgajos levantados para la extraccion de cordales retenidas. El tejido se fijó en formol al 10% para su estudio en el Laboratorio

de Histopatología Bucal “Dr Pedro Tinoco” de la Facultad de Odontología de la U.C.V.

### Procesamiento de la muestra para estudio Histopatológico

Las muestras fueron fijadas en formol al 10%, y embebidas en parafina.

Se realizaron varios cortes, unas secciones fueron teñidas con Hematoxilina Eosina; y evaluadas para determinar la presencia en el epitelio de cambios displásicos.

Se describe a continuación el procedimiento de Preparación del tejido para su posterior coloración.

1. La muestra de tejido obtenida por la biopsia se introdujo en un Urolab que contenía formol al 10%, así se logró la fijación del tejido, interrumpiendo la autólisis y estabilizando su morfología.
2. Se lavó la muestra para retirar el exceso de fijador, se deshidrató con alcohol. La deshidratación progresiva con alcohol al 70-80-90-96 y 100% tiene por finalidad extraerle totalmente al tejido el agua

que pudiera contener. Los tejidos contienen grandes cantidades de agua, tanto intra como extracelular, que debe ser eliminada y reemplazada por parafina. Se sumergió posteriormente en Xilol, sustancia solvente de la parafina que es insoluble en agua.

3. Se procedió a la Inclusión en Parafina. En un recipiente se colocó un trozo de parafina y se llevó a la estufa para fundirla. Se sacó la muestra del Xilol y se sumergió en el recipiente con la parafina fundida, sustituyendo progresivamente al Xilol, durante 3-6 horas. Luego se procedió a la inclusión definitiva. Se tomó la muestra del baño de parafina y se llevó a un recipiente fuera de la estufa y lleno de parafina fundida. Se hizo solidificar la parafina en una nevera.
4. Se hicieron cortes de 5-10 micras de espesor utilizando el Microtomo de deslizamiento. Los cortes se tomaron con un pincel y se colocaron en un recipiente con agua tibia. En este baño los cortes se estiran quedando sin dobleces o pliegues. Luego se colocaron sobre un porta-objeto untado con una mezcla de albúmina de huevo y glicerina, con la finalidad que los cortes se adhieran o peguen. Para que la unión sea más fuerte se colocó en una estufa a 37°C durante 24 horas.

### Coloración de Hematoxilina y Eosina.

1. Desparafinación en Xilol por 3 minutos.
2. Hidratación progresiva, empleando alcoholes de 98, 80 y 50 grados. Dos minutos en cada uno.
3. Agua corriente por 1 minuto.
4. Hematoxilina Acuosa por 2-3 min.
5. Se utilizó agua corriente, agua acidulada y agua amoniacal. Los pasos por agua corriente y agua acidulada son muy rápidos, en el agua amoniacal se dejó por 2-3 min., después de lo cual se lavó nuevamente con agua corriente.
6. Deshidratación creciente gradual con alcoholes de 50-80 y 98 grados 2 min cada uno.
7. Eosina alcohólica por 2 min.
8. Alcohol de 98° por 2 min., para retirar el exceso de eosina.
9. Xilol para clarificar durante 5 min.
10. Se realizó el montaje de la lámina con bálsamo de Canadá, colocando el cubreobjeto.
11. Observación al microscópico.

Este método consta de una fase inicial, en la que se colorean los núcleos celulares con la hematoxilina, y una fase ulterior de contraste

citoplasmático y de los componentes extracelulares con la eosina. Los núcleos se observan de color azul o negro, los eritrocitos naranja o rosa, y las estructuras restantes rosadas o rojo.

Las lesiones fueron histopatológicamente clasificadas como Queratosis Benignas; aquellas que presentaron varios grados de queratosis, hiperparaqueratosis o ortoparaqueratosis, con o sin acantosis y sin displasia epitelial o atipia celular.

Para la evaluación y consideración de displasia epitelial fueron usados los parámetros recomendados por la OMS (1978), que incluyen pérdida de la polaridad de las células basales, apariencia basaloide de más de una capa de células, hiperplasia de la capa de células basales, incremento de la relación núcleo-citoplasma, mamelones epiteliales en forma de gotas, estratificación epitelial irregular, incremento en el número de figuras mitóticas, pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, nucleolos agrandados, disminución de la cohesión celular, queratinización celular o de un grupo de células del estrato espinoso.

Los cambios displásicos fueron clasificados en diferentes grados de intensidad:

Displasia leve, con mínimas alteraciones displásicas confinadas en el estrato inferior epitelial, presencia de hasta dos rasgos displásicos.

Displasia moderada, los cambios displásicos ocupan los 2/3 inferiores del espesor epitelial, hasta la mitad del estrato espinoso, presencia de 2 y 4 rasgos displásicos.

Displasia severa, cuando los cambios ocupaban más de los 2/3 del espesor epitelial, pero no ocupaban completamente todo el epitelio.

En los casos de biopsias múltiples se consideraron incluidas en la investigación las de diagnóstico histopatológico más severo.

#### Procesamiento de la muestra para estudio Histoquímico

(Coloraciones para Hongos)

A otras secciones se les realizó tinción especial con ácido-periódico de Shiff y Groccot, se evaluó la incidencia de *Candida*, basándose en la presencia de hifas o pseudodihifas en la coloración del tejido.

### Coloración de PAS (Mc Manus)

1. Se eliminó la parafina de los cortes. Se tiñó en paralelo un corte de testigo positivo.
2. Se oxidó durante 5 min. con ácido periódico al 5% en agua.
3. Se enjuagó con agua y agua destilada.
4. Se dejó 15 min. en reactivo de Schiff.
5. Se enjuagó en tres baños de solución fresca de sulfito, dos minutos cada vez.
6. Se lavó durante 5-10 min. en agua corriente.
7. Se aplicó como colorante de contraste Verde Claro (0,1% en ácido acético al 0,1%) durante 5-20 seg. El color verde claro es especialmente útil cuando se buscan hongos.
8. Se deshidrató, aclaró y montó en Clarita o Permout.

Las estructuras positivas al PAS toman color margenta (rojo púrpura).

Los tejidos que permanecen mucho tiempo en formol tienden a mostrar una reacción PAS menos intensa.

### Método de Groccot

1. Se colocaron las secciones en agua destilada.
2. Posteriormente en Ácido Crómico al 5% durante 1 Hora.
3. Se lavó cuidadosamente con agua corriente.
4. Bisulfito sódico al 1% durante 1 min., para extraer cualquier residuo de ácido crómico.
5. Se lavó con agua corriente 5 min.
6. Se lavó con agua destilada cuatro veces.
7. Se dejó en contacto con la solución de trabajo de metanina a 60°C durante 1 hora, o hasta que las secciones se tornaron de color marrón-amarillento. Se lavó varias veces con agua destilada.
8. Cloruro de Oro al 0,1%.
9. Lavado en agua destilada.
10. Tiosulfato de Sodio al 2% durante 5 min. para extraer la plata no reducida.
11. Se lavó en agua corriente durante 5 min.
12. Se contrastó con la solución de trabajo de verde luz durante 30 seg.
13. Se lavó con agua corriente.
14. Se deshidrató, aclaró y montó.

Los hongos se observan de color negro, la tinción de fondo verde pálido y la mucina gris.

## **V.- RESULTADOS**

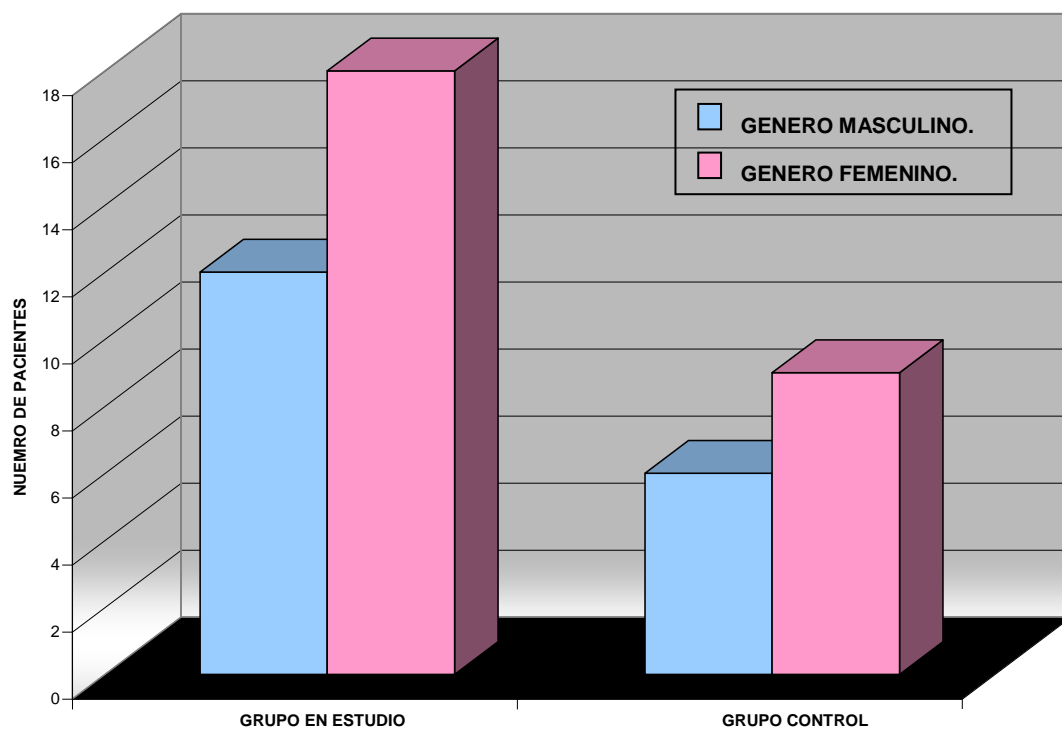
En esta investigación se consideró una muestra de 45 individuos; 30 de ellos acudían al Servicio de Clínica Estomatológica con diagnóstico de Leucoplasia; los 15 restantes quienes conformaron al grupo control asistían al Postgrado de Cirugía Bucal para la extracción de cordales, no presentaban lesión aparente.

En ambos grupos se procedió al aislamiento e identificación de levaduras a partir del raspado de las lesiones, mucosa sana, y del enjuague bucal; además de la identificación por medio de técnicas histoquímicas, que incluyeron la coloración con ácido per-yodico de Schiff y Groccot.

### **1. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON LEUCOPLASIA Y GRUPO CONTROL SEGÚN GÉNERO.**

Como se observa en el Gráfico N° 1 del total de 30 pacientes con Leucoplasia bucal 60% (18/30) correspondieron al género femenino y 40% (12/30) al género masculino; en el grupo control se observaron los mismos porcentajes 60% (9/15) para el género femenino y 40% (6/15) para el masculino.

**Gráfico N° 1**  
**Distribución de pacientes con Leucoplasia y grupo control según género.**



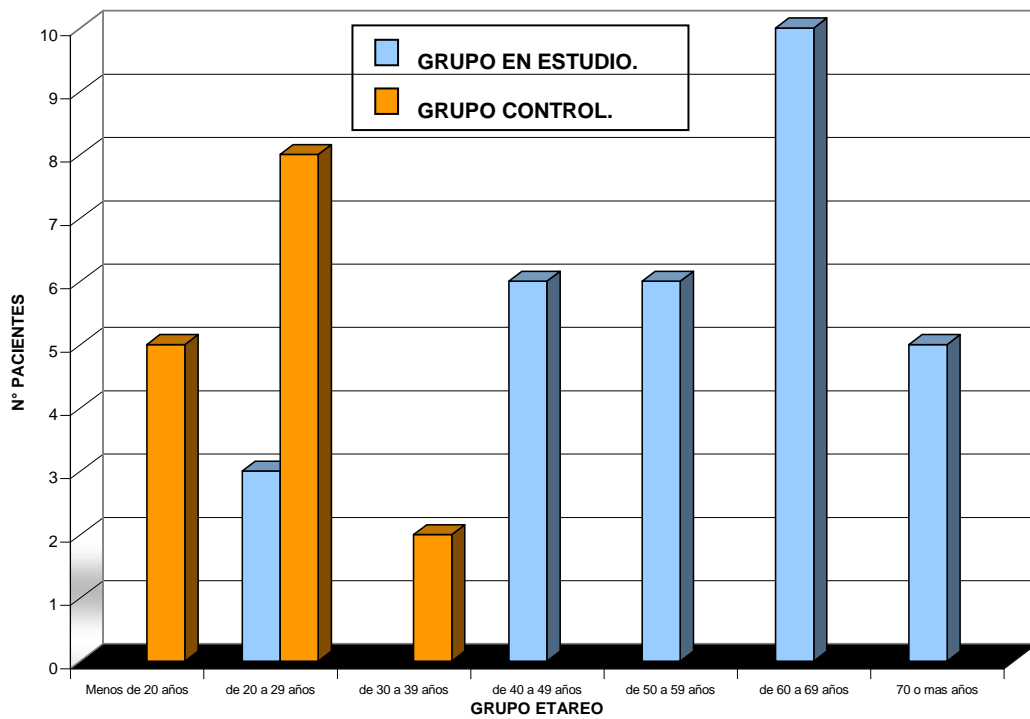
## **2. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON LEUCOPLASIA SEGÚN GRUPO ETAREO.**

La edad promedio de los pacientes con Leucoplasia Bucal fue de 57 años, con un rango de edad entre 22 y 76 años.

En el gráfico N° 2 se observa que el grupo etáreo donde se presentaron con mayor frecuencia lesiones leucoplásicas correspondió a la séptima década de la vida con un 33,33% (10/30), seguido por la quinta 20% (6/30), sexta 20% (6/30) y octava 16,67% (5/30) décadas de vida.

Mientras que el grupo control estuvo integrado en su mayoría 53,33% (8/15) por pacientes de la tercera década de vida, 33,33% (5/15) pacientes con menos de 20 años y 13,33% (2/15) de la cuarta década de vida.

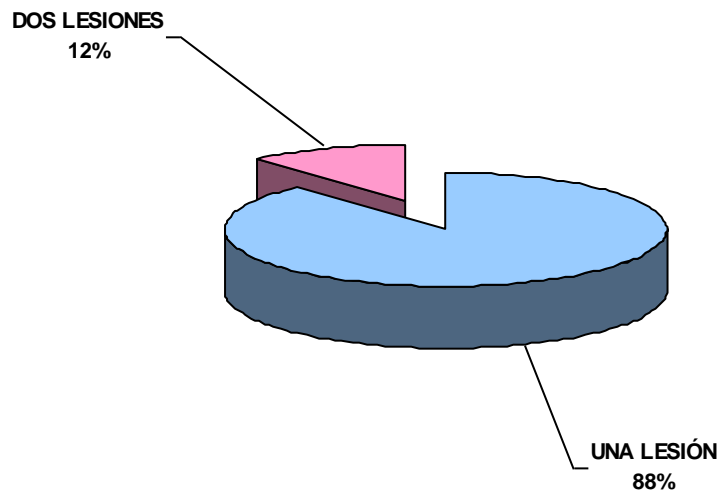
**Gráfico N° 2**  
**Distribución de pacientes con Leucoplasia según grupo etáreo.**



### 3. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN NÚMERO DE LESIONES OBSERVADAS EN CAVIDAD BUCAL.

En el Gráfico N° 3 se observa que en el 88% (26/30) de la población estudiada se analizó una única lesión leucoplásica en cavidad bucal, mientras que en el 12% (4/30) restante se estudiaron dos lesiones con localizaciones diferentes, considerándose un total de 34 lesiones.

**Gráfico N° 3.**  
**Distribución de la población según número de lesiones observadas en cavidad bucal.**

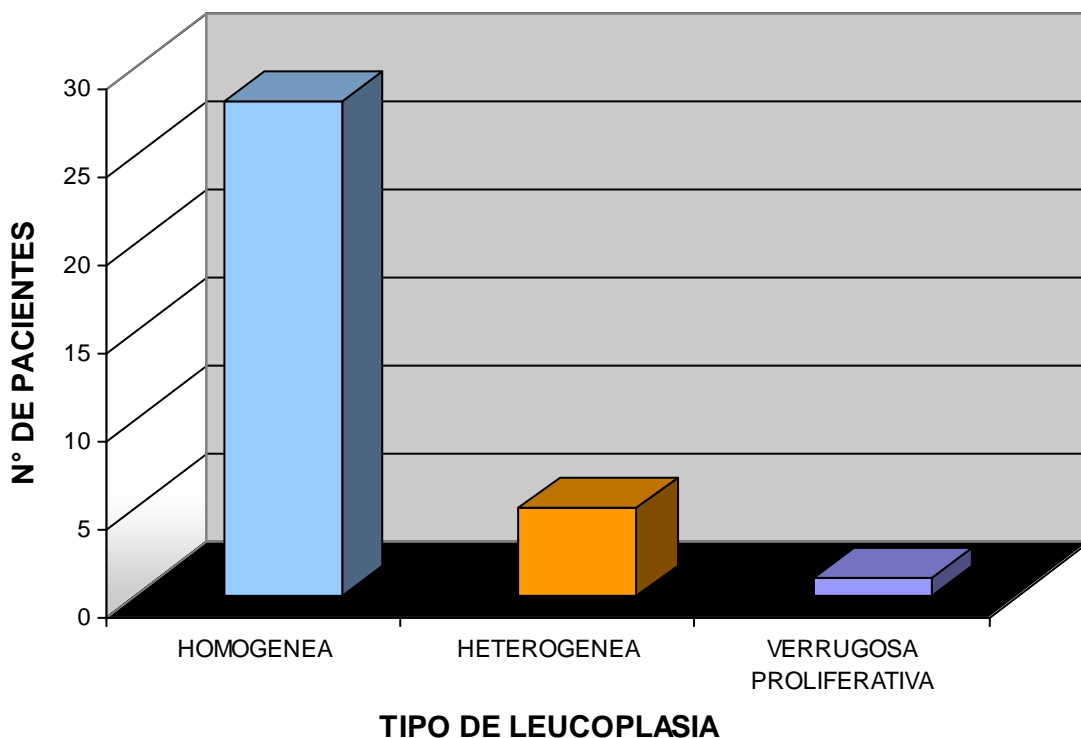


#### 4. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN TIPO CLINICO DE LEUCOPLASIA OBSERVADA EN CAVIDAD BUCAL.

El Gráfico N° 4 revela los tipos de Leucoplasia identificados en el estudio.

Así tenemos que la Leucoplasia Homogénea correspondió con un 82,35% (28/34) de los casos, Leucoplasia Heterogénea 14,71% (5/34) y un caso 2,94% (1/34) de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa que fue incluida por considerarse una presentación de interés para el estudio.

**Gráfico N° 4.**  
**Distribución de pacientes según tipo de Leucoplasia observada en cavidad bucal.**





**Fotografías N° 1 y N° 2.  
Leucoplasias Homogéneas.**

**Fotografías N° 2 y N° 3.  
Leucoplasias Heterogéneas.**

En la Tabla N° I podemos observar que entre los casos de Leucoplasia Heterogénea, el 60% (3/5) fueron eritroleucoplasias, 20% (1/5) leucoplasia nodular y 20% (1/5) exofística.

**Tabla N° I  
Distribución de pacientes según tipo de Leucoplasia.**

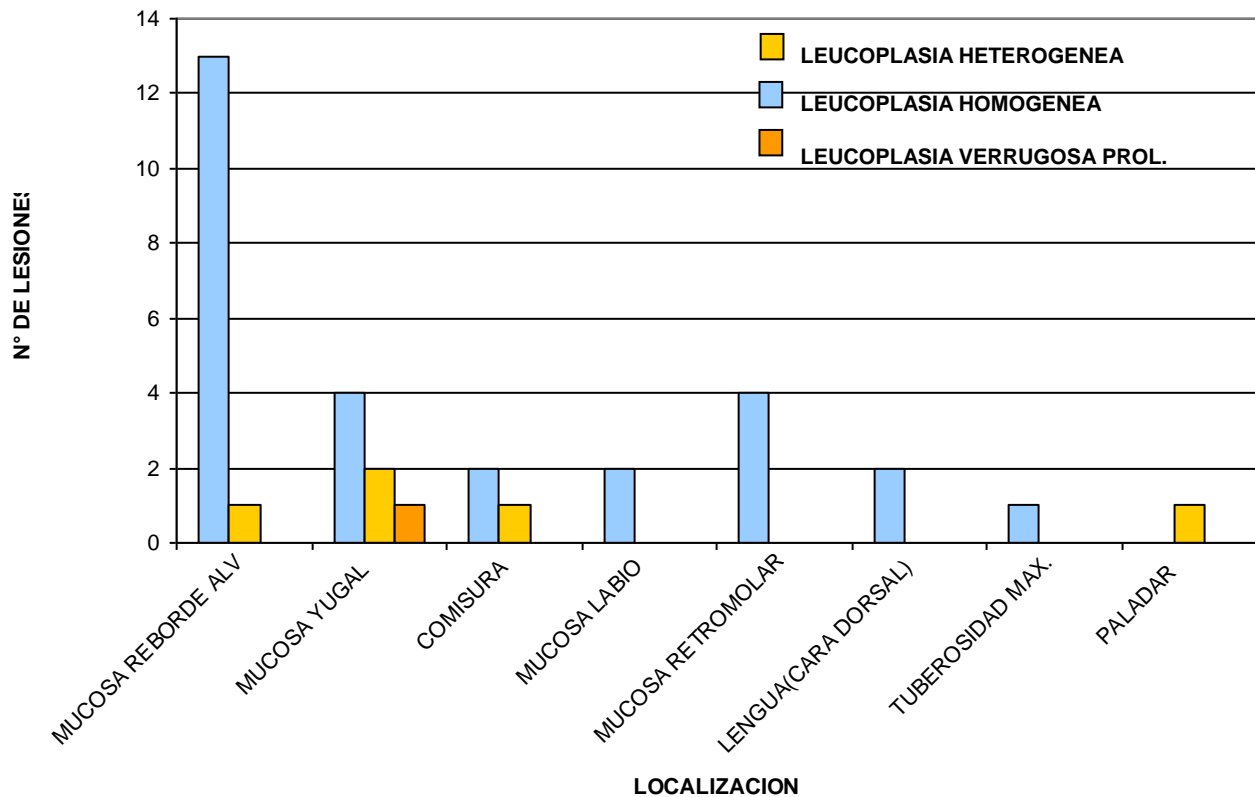
TIPO DE LEUCOPLASIA	ESTUDIO	
	n	%
HOMOGENEA	28	82,35
HETEROGENEA	5	14,71
VERRUGOSA PROLIFERANTE	1	2,94
<b>TOTAL DE LESIONES</b>	<b>34</b>	<b>100</b>

LEUCOPLASIA HETEROGENEA	ESTUDIO	
	n	%
ERITOLEUCOPLASIA	3	60
NODULAR	1	20
EXOFISTICA	1	20
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

## 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS LESIONES LEUCOPLASICAS DE ACUERDO A SU LOCALIZACIÓN EN CAVIDAD BUCAL.

La localización de la entidad en estudio correspondió a mucosa de rebordes alveolares residuales en un 41,17% (14/34), mucosa yugal 20,58% (7/34), mucosa retromolar 11,76% (4/34), comisura bucal 8,82% (3/34), mucosa del labio 5,88% (2/34), cara dorsal de lengua 5,88% (2/34) y tuberosidad maxilar 2,94% (1/34), en el gráfico N° 5 se demuestra la localización según tipo de Leucoplasia.

**Gráfico N° 5**  
**Distribución del tipo de Leucoplasia de acuerdo a la localización en cavidad bucal.**



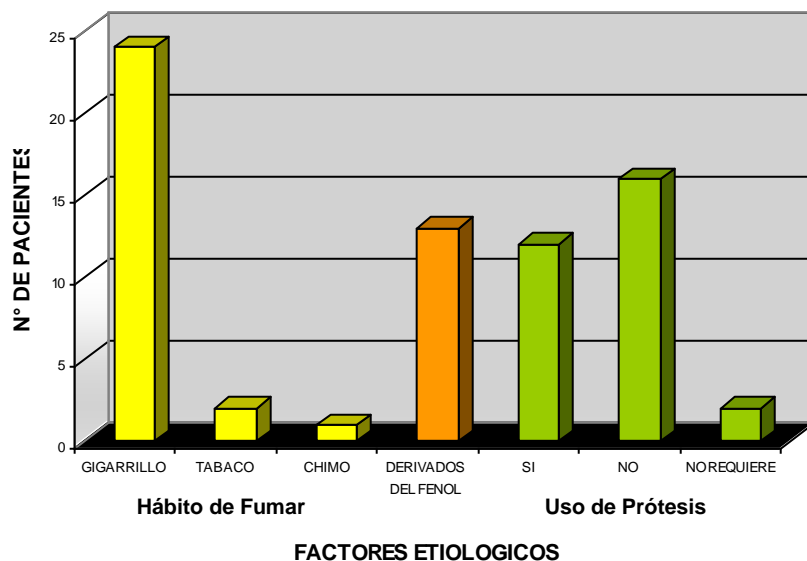
## 6. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON LEUCOPLASIA SEGÚN FACTORES ETIOLÓGICOS.

Un 90% (27/30) de los pacientes manifestaron ser fumadores. En el gráfico N° 6 podemos observar que el uso de cigarrillo fue reportado en un 77% (23/30), tabaco en un 10% (3/30) y el hábito de masticar chimó en un 3,33% (1/30) de los pacientes.

La utilización de productos derivados del fenol (Listerine®) como único enjuague bucal empleado por la población en estudio fue de 43,33% (13/30).

Asimismo se observó que eran portadores de dentaduras removibles un 36,7% (13/30) de los pacientes, 50% (15/30) no utilizaban prótesis a pesar de requerirlas y 6,66% (2/30) no las requerían por ser pacientes dentados.

**Gráfico N° 6**  
**Distribución de pacientes con Leucoplasia según factores etiológicos**



## **7. DISTRIBUCIÓN DE LOS CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EPITELIALES OBSERVADOS EN LAS LESIONES LEUCOPLÁSICAS ESTUDIADAS.**

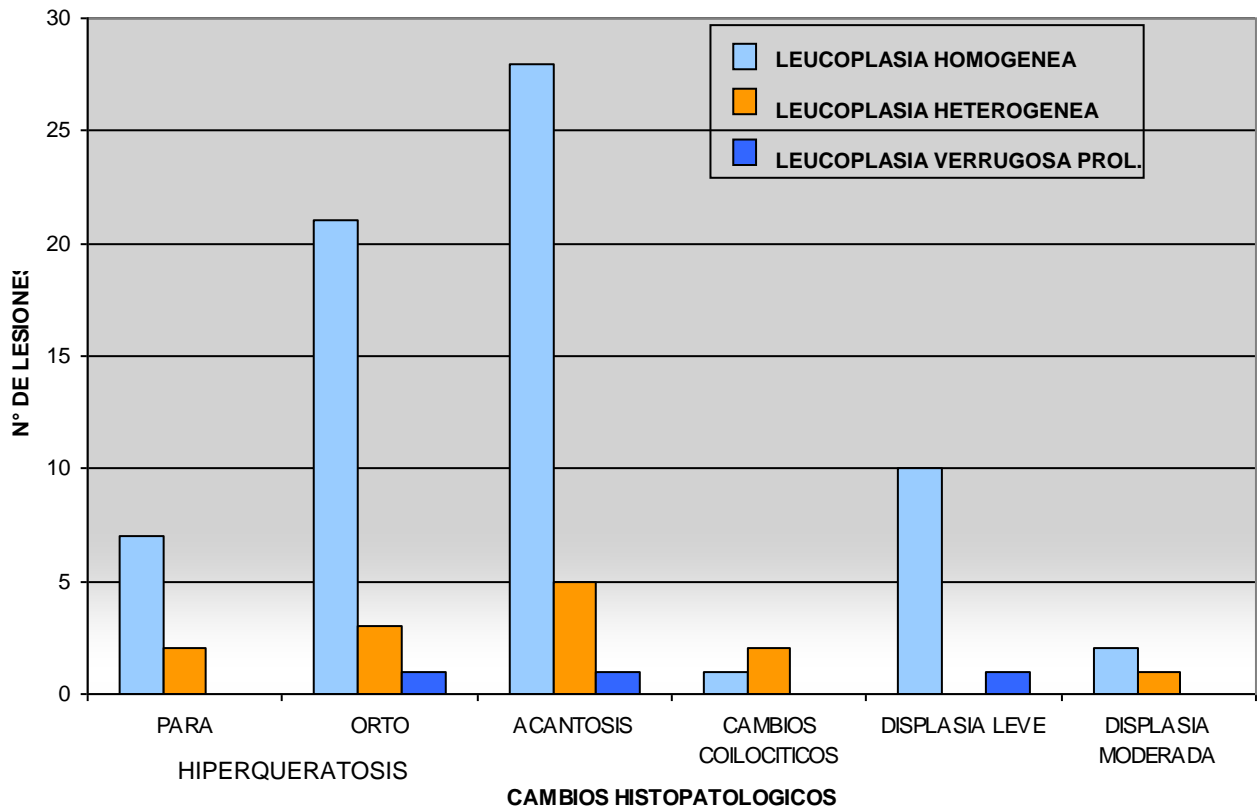
En el estudio histopatológico de las lesiones leucoplásicas se reportaron diferentes características microscópicas. Sin embargo la mayoría de las Leucoplasias fueron una combinación variable entre Hiperortoqueratosis 73,52% (25/34), Hiperparaqueratosis 24,47% (9/34) y Acantosis 100% (34/34). En el Gráfico N° 7a se describen estos cambios de acuerdo al tipo de Leucoplasia.

Se presentaron tres casos con cambios coilocíticos, uno correspondió a Leucoplasia Homogénea 2,94% (1/28), y dos a Leucoplasias Heterogéneas 5,88% (2/5).

No se encontraron cambios displásicos epiteliales en el 58,82% (20/34) de las lesiones; mientras que 32,35% (11/34) mostraron Displasia Leve y 8,82% (3/34) Displasia Moderada, de las cuales 85,71% (12/14) fueron Leucoplasias Homogéneas, 7,14% (1/14) Leucoplasias Heterogéneas y LVP 7,14% (1/14).

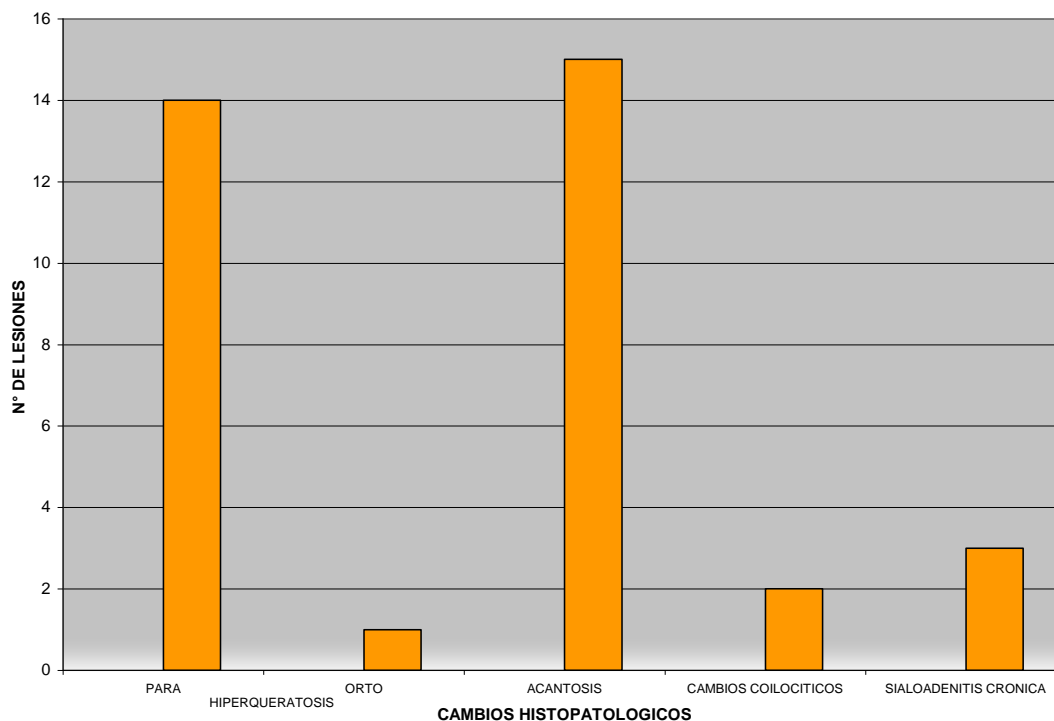
No se reportó Displasia severa, carcinoma *in situ* o carcinoma invasor en ningún caso.

**Gráfico N° 7a**  
**Distribución de los cambios histopatológicos epiteliales observados en las lesiones leucoplásicas estudiadas.**



En cuanto a las muestras del grupo control como se observa en el gráfico N° 7b se evidenciaron los siguientes hallazgos: Hiperparaqueratosis 93,33% (14/15), Hiperortoqueratosis 6,67% (1/15), Acantosis 100% (15/15), cambios coilocíticos 13,33% (2/15), y sialoadenitis crónica 20% (3/15).

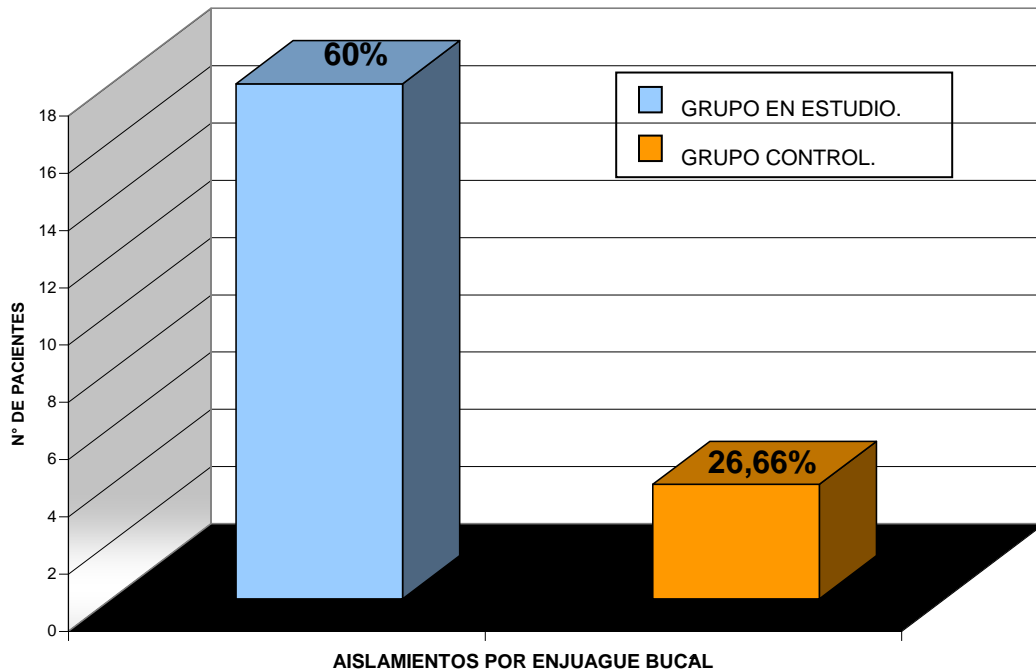
**Gráfico N° 7b**  
**Distribución de los cambios histopatológicos epiteliales**  
**observados en las muestras del grupo control.**



## **8. AISLAMIENTOS DE LEVADURAS A PARTIR DE MUESTRAS OBTENIDAS POR ENJUAGUE BUCAL.**

Como se demuestra en el gráfico N° 8, se aislaron levaduras en 60% (18/30) del total de muestras provenientes del enjuague bucal concentrado en los pacientes con Leucoplasia; y un 26,66% (4/15) de los pacientes del grupo control.

**Gráfico N° 8**  
**Aislamientos de levaduras a partir de muestras obtenidas por enjuague bucal.**



No se observó crecimiento levaduriforme de las muestras provenientes del 40% (12/30) del grupo en estudio, y del 73,33% (11/15) de las muestras del grupo control.

## **9. CUANTIFICACION (UFC/ml) DE LEVADURAS EN MUESTRAS OBTENIDAS POR ENJUAGUE BUCAL DE PACIENTES CON LEUCOPLASIA Y GRUPO CONTROL.**

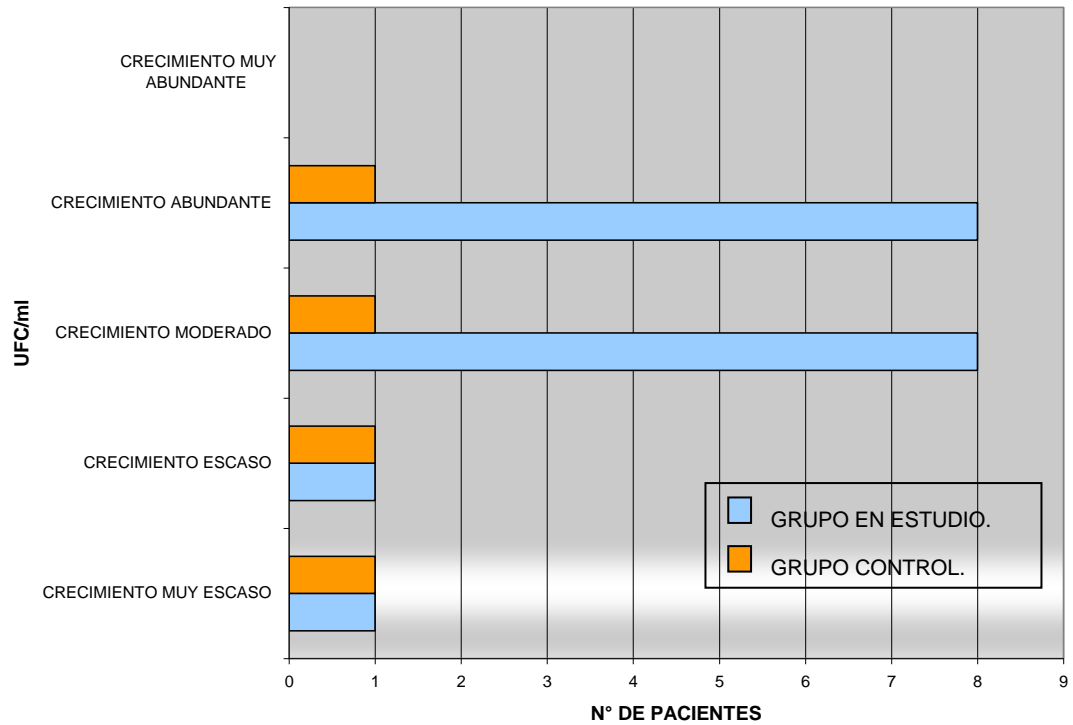
En el Gráfico N° 9 y Tabla N° II se presenta el tipo de crecimiento observado en base al número de colonias formadas (UFC) por ml de saliva en pacientes con Leucoplasia y del grupo control.

Un crecimiento moderado se observó en un 44,44 % (8/18) de los pacientes con Leucoplasia, y en igualdad de frecuencia se apreció el crecimiento abundante.

Sólo un 5,55% (2/18) de los pacientes presentaron crecimiento escaso y muy escaso respectivamente.

Con el uso del enjuague bucal, sólo el 26,66% (4/15) de los pacientes del grupo control presentaron resultados positivos al crecimiento de levaduras, distinguiéndose un crecimiento muy escaso, escaso, moderado y abundante para cada uno de los casos (25%).

**Gráfico N° 9**  
**Quantificación de levaduras en muestras por enjuague bucal.**



**Tabla N° II**  
**Quantificación de levaduras en muestras por enjuague bucal.**

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	LEUCOPLASIA		MUCOSA SANA	
	n	%	n	%
<b>ENJUAGUE</b>				
CRECIMIENTO MUY ESCASO	1	5,55	1	25
CRECIMIENTO ESCASO	1	5,55	1	25
CRECIMIENTO MODERADO	8	44,44	1	25
CRECIMIENTO ABUNDANTE	8	44,44	1	25
CRECIMIENTO MUY ABUNDANTE				
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>100</b>

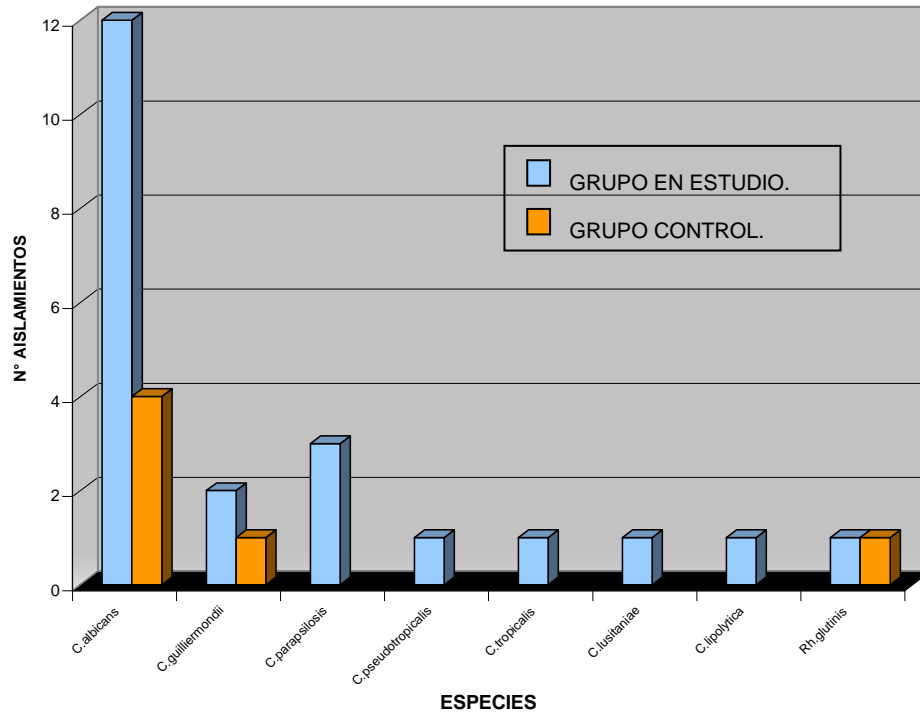
## 10.FRECUENCIA DE ESPECIES AISLADAS A PARTIR DEL ENJUAGUE BUCAL.

Del estudio de los 18 enjuagues bucales que resultaron positivos, se evidenció el crecimiento de una única especie de levaduras en el 89% (16/18), mientras que en el 11% (2/18) restante se aislaron tres especies diferentes.

Como se observa en el gráfico N° 10 *C. albicans* fue la especie más identificada con un 40% (12/18), seguida por *C. parapsilosis* 10% (3/18) y *C. guilliermondii* 6,67% (2/18).

Con una frecuencia similar de 3,33% se pudo identificar a *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica* y *Rh. glutinis*.

**Gráfico N° 10**  
**Frecuencia de especies aisladas a partir de enjuague oral en**  
**pacientes con Leucoplasia.**



En los pacientes del grupo control *C. albicans* fue la especie identificada en los cultivos positivos (4/15), una coexistencia de *C. guilliermondii* y *Rh. glutinis* se observó en un solo caso.

## 11.RELACION ENTRE HABITO TABAQUICO Y USO DE PROTESIS, CON LA PRESENCIA DE LEVADURAS EN CAVIDAD BUCAL.

En la Tabla III se observa que en 69,23% (9/13) de los pacientes en estudio portadores de prótesis dental se aislaron formas levaduriformes a partir de muestras de enjuague bucal concentrado, así como en 53,33% (8/15) de los pacientes no portadores de dentaduras y 50% (1/2) de los pacientes dentados.

Un 55,56% (15/30) de los pacientes fumadores presentaron aislamientos positivos para levaduras; y el 100% (3/3) de los pacientes sin hábito tabáquico mostraron crecimiento microbiano en su evaluación.

**Tabla Nº III**  
**Relación entre habito tabáquico y uso de prótesis, con la presencia de levaduras en cavidad bucal.**

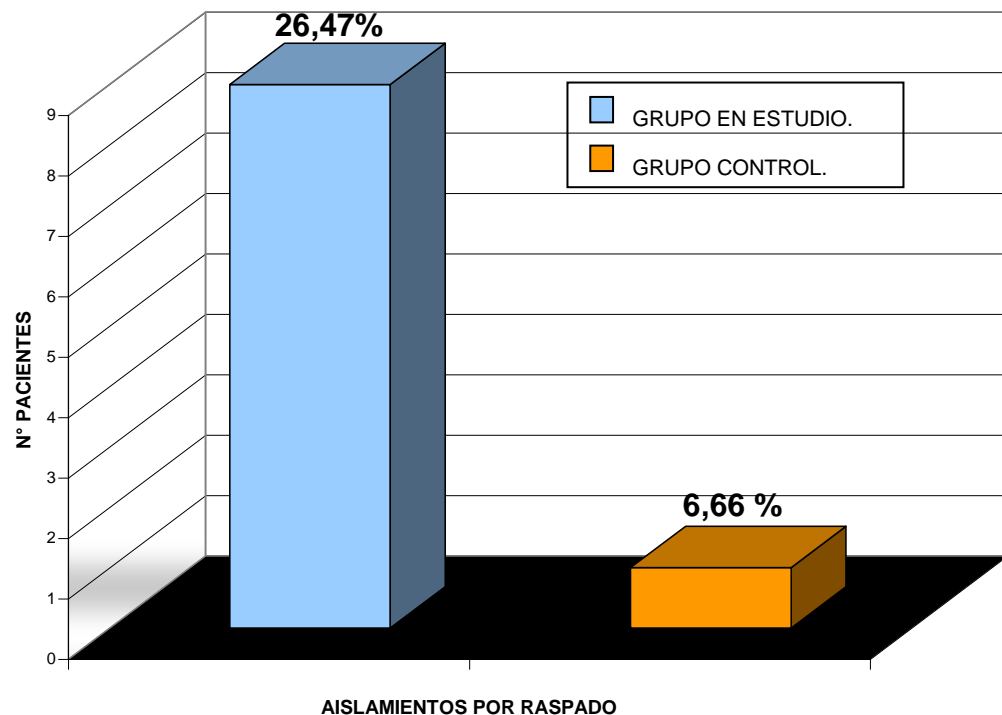
USO DE PROTESIS	PACIENTES		ENJUAGUE POSITIVO	
	n	%	n	%
SI	13	43,3	9	69,23
NO	15	50	8	53,33
NO REQUIERE	2	6,7	1	50,00
<b>TOTALES</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	

HABITO				
FUMA	27	90	15	55,55
NO FUMA	3	10	3	100,00
<b>TOTALES</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	

## 12. AISLAMIENTOS DE LEVADURAS OBTENIDOS POR RASPADO DE LEUCOPLASIAS Y MUCOSA SANA.

Como se puede ver en el Gráfico N° 11 a través del raspado de la superficie de las lesiones se aislaron levaduras en un 26,47% (9/34) de las muestras, mientras que en el grupo control se logro un solo aislamiento 6,6% (1/15).

**Gráfico N° 11**  
**Aislamientos de levaduras obtenidas por raspado de Leucoplasias y Mucosa sana.**



### 13.DISTRIBUCIÓN DE LOS AISLMIENTOS OBTENIDOS POR RASPADO SEGÚN EL TIPO DE LEUCOPLASIA.

En la Tabla N° IV se observa que en el tipo de Leucoplasia homogéneo se evidenció el mayor número de casos en los que el cultivo fue positivo para *Candida*, detectándose levaduras en un 21,42% (6/28) de los casos, mientras que en el tipo heterogéneo la presencia del hongo se pudo evidenciar en 40% (2/5) de los casos.

**Tabla N° IV**  
**Distribución de los aislamientos obtenidos por raspado según el tipo de Leucoplasia.**

	TIPO DE LEUCOPLASIA (n 34)						TOTAL	
	HOMOGENEA		HETEROGENEA		LVP			
<b>AISLAMIENTOS</b>	n	%	n	%	n	%	n	%
POSITIVOS	6	21,42	2	40	1	100	9	26,47
NEGATIVOS	22	78,57	3	60			25	73,52
TOTAL	28	100	5	100	1	100	34	100

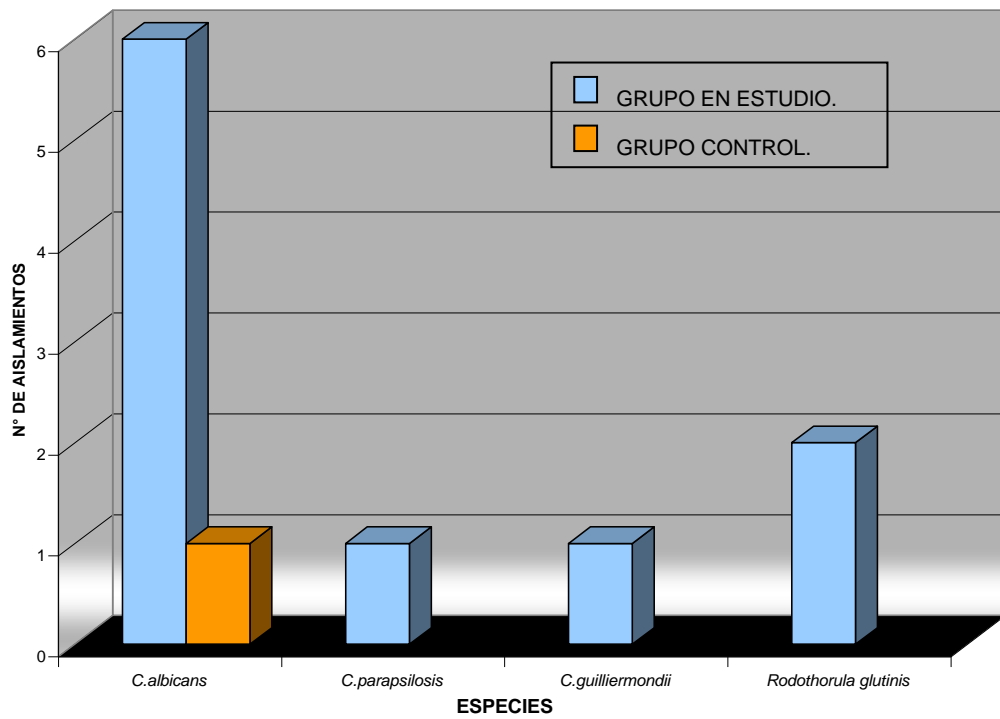
### 14.ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS POR RASPADO DE LESIONES LEUCOPLASICAS Y MUCOSA SANA.

Como se observa en el Gráfico N° 12 *C. albicans* fue la especie mas identificada 66,66% (6/9) a partir de los aislamientos del grupo de estudio,

también se identificó *C. guilliermondii*, *C.parapsilosis* y *Rodothorula glutinis* con una frecuencia similar 6,66% (1/9).

Mientras que en el grupo control la única especie aislada por raspado de la mucosa fue *C.albicans* 6,66 % (1/15).

**Gráfico N° 12**  
**Especies de levaduras aisladas por raspado de lesiones Leucoplásicas y mucosa sana.**



## 15.SEROTIPOS DE *C. albicans* IDENTIFICADOS A PARTIR DEL RASPADO DE LESIONES LEUCOPLASICAS.

La serotipificación de los 6 aislamientos de *C.albicans* correspondió en un 100% (6/6) al Serotipo A.

**Tabla N° V**  
**Serotipos de *C. albicans* identificados según tipo de Leucoplasia.**

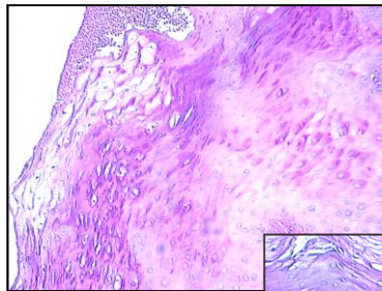
	TIPO DE LEUCOPLASIA		
	HOMOGENEA	HETEROGENEA	VERRUGOSA PROL
SEROTIPO A	4/6 (66.66%)	2/6(33.33%)	
SEROTIPO B			

## 16.DISTRIBUCIÓN DE LEUCOPLASIAS CON PRESENCIA DE LEVADURAS EMPLEANDO TECNICA DE COLORACION DE PAS Y GROCCOT.

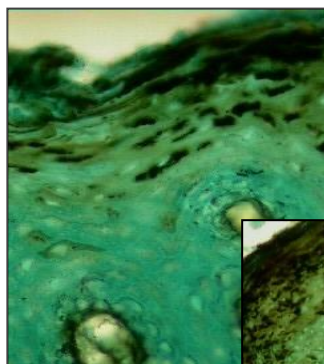
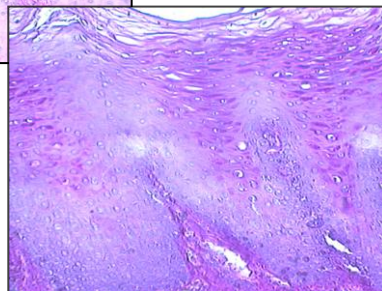
Las estructuras características de las formas fúngicas, tales como pseudohifas y/o hifas fueron observadas en las capas superficiales del epitelio entre los diferentes tipos de Leucoplasia con frecuencia variable y

con una similitud muy marcada entre las dos técnicas de coloración utilizadas.

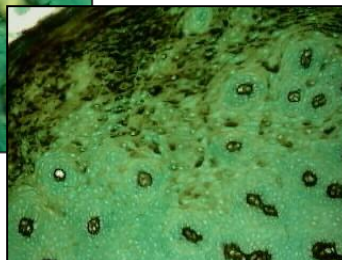
Del total de 34 Leucoplasias estudiadas histoquímicamente, como se expresa en el Gráfico N° 13, el 47,06% (16/34) de las lesiones fueron positivas a la presencia de levaduras en el epitelio empleando la técnica de coloración de PAS y 50% (17/34) al utilizar Groccot.



**Fotografías N° 5 y N° 6.  
Coloración de PAS positiva.**



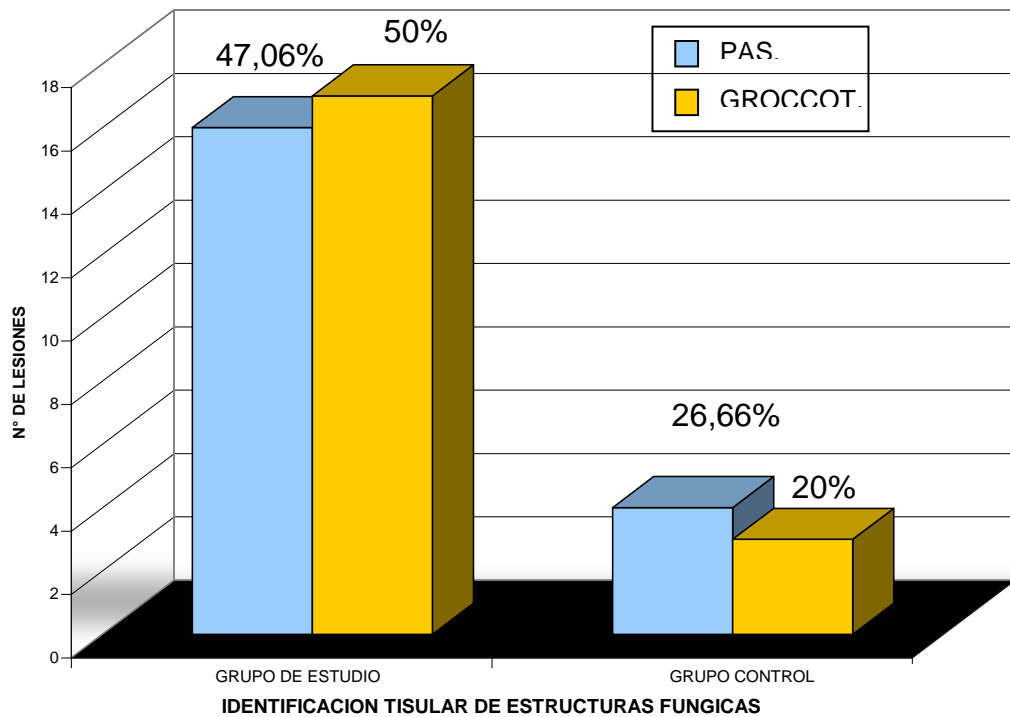
**Fotografías N° 7 y N° 8.  
Coloración de Groccot positiva.**



En las muestras del grupo control solo un 26,66% (4/15) y 20% (3/15) fueron positivas a la presencia de hifas empleando PAS y Groccot respectivamente.

**Gráfico N° 13**

**Distribución de Leucoplasias con presencia de levaduras empleando técnicas de coloración, comparación con el grupo control.**



Para el análisis estadístico utilizamos el test de comparación de Kruskal Wallis, lo que demostró una significancia importante entre ambas variables con un ( $p < 0.090$ )

## 17.DISTRIBUCIÓN DE LEUCOPLASIAS PAS Y GROCCOT POSITIVAS DE ACUERDO AL TIPO DE LESIÓN.

Cuando se revisaron los datos obtenidos por tipo de lesión como se demuestra en la Tabla N° VI, la presencia de levaduras en las 28 muestras de Leucoplasia homogénea fue de 42,85% (12/28) con el uso de PAS y 46,42% (13/28) con Groccot.

En los casos de Leucoplasia heterogénea fue de 60% (3/5) con el uso de ambas coloraciones.

Por ultimo, el caso de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa mostró presencia de estructuras fúngicas empleando también ambas tinciones.

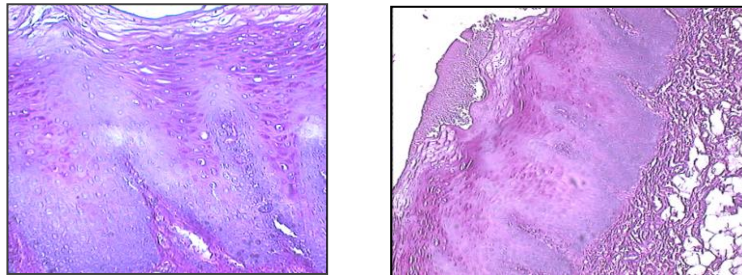
**Tabla N° VI**  
**Distribución de Leucoplasias PAS y Groccot positivas de acuerdo al tipo clínico de lesión.**

	TIPO DE LEUCOPLASIA (n 34)						TOTAL (34)		MUCOSA SANA	
	HOMOGENEA (28)		HETEROGENEA(5)		LVP (1)					
	COLORACION	n	%	n	%	n	%	n	%	
PAS	12	42,85	3	60	1	100	16	47,05	4	26.6
GROCCOT	13	46,42	3	60	1	100	17	50	3	20

## **18.DISTRIBUCIÓN DE LOS ESTRATOS TISULARES INVADIDOS POR LEVADURAS.**

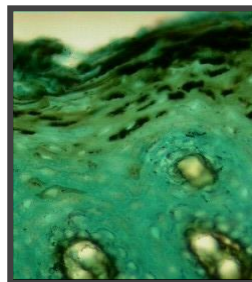
Como lo demuestran el gráfico N° 14a y N° 14b, la invasión tisular por levaduras se observó en mayor proporción en el estrato córneo del epitelio, reportándose en un 62,5% (10/16) de los casos empleando la técnica de coloración de PAS y un 47,05% (8/17) utilizando Grocott.

También se identificó la invasión simultánea del estrato córneo y granular en 18,75% (3/16) Leucoplasias empleando PAS, y 35,39% (6/17) de las muestras utilizando Grocott.



**Fotografías N° 9 y 10.**

**Invasión del estrato córneo y granuloso empleando coloración de PAS.**

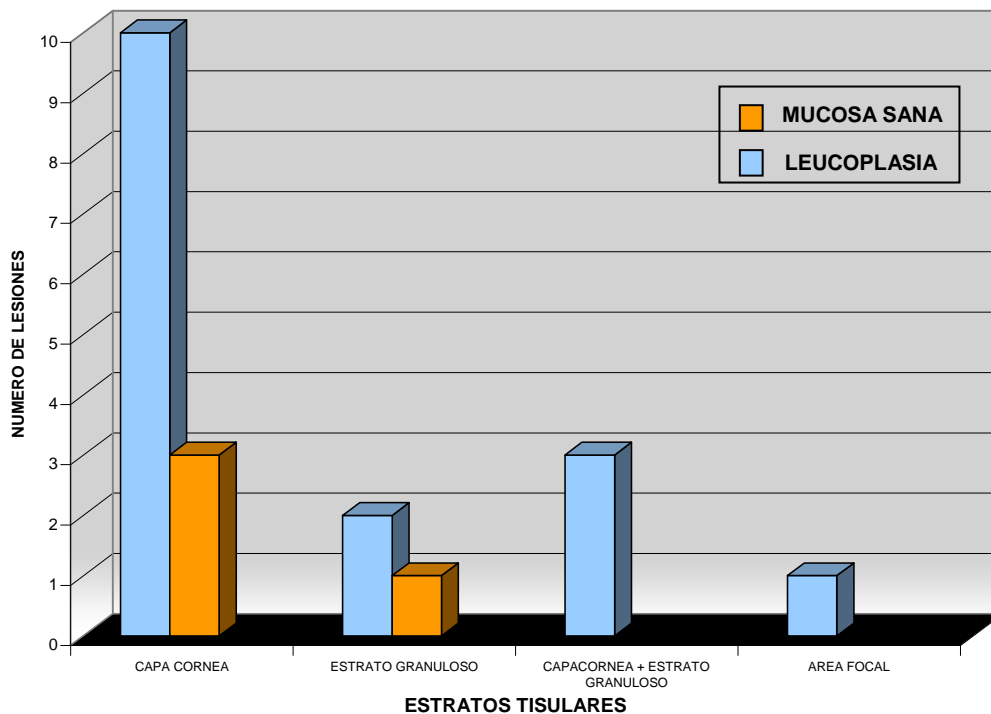


**Fotografía N° 11.**

**Invasión del estrato córneo empleando coloración de Grocott.**

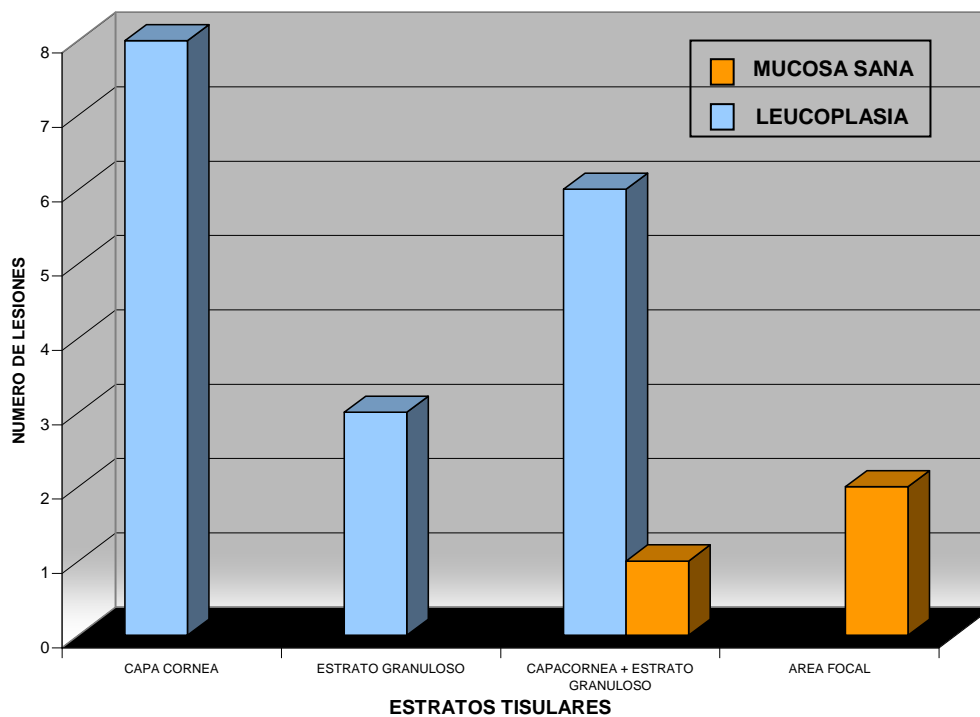
**Gráfico N° 14a**

**Distribución de los estratos titulares invadidos por levaduras empleando coloración de PAS.**



**Gráfico N° 14b**

**Distribución de los estratos tisulares invadidos por levaduras empleando coloración de GROCCOT.**



## **19. DISTRIBUCIÓN DE LEUCOPLASIAS PAS Y GROCCOT POSITIVAS DE ACUERDO A SU LOCALIZACIÓN EN CAVIDAD BUCAL.**

En el gráfico N° 15 se observa que las lesiones leucoplásicas en las que se identificaron estructuras fúngicas presentaron como localizaciones principales la mucosa de los rebordes residuales y mucosa yugal para las dos técnicas de coloraciones.

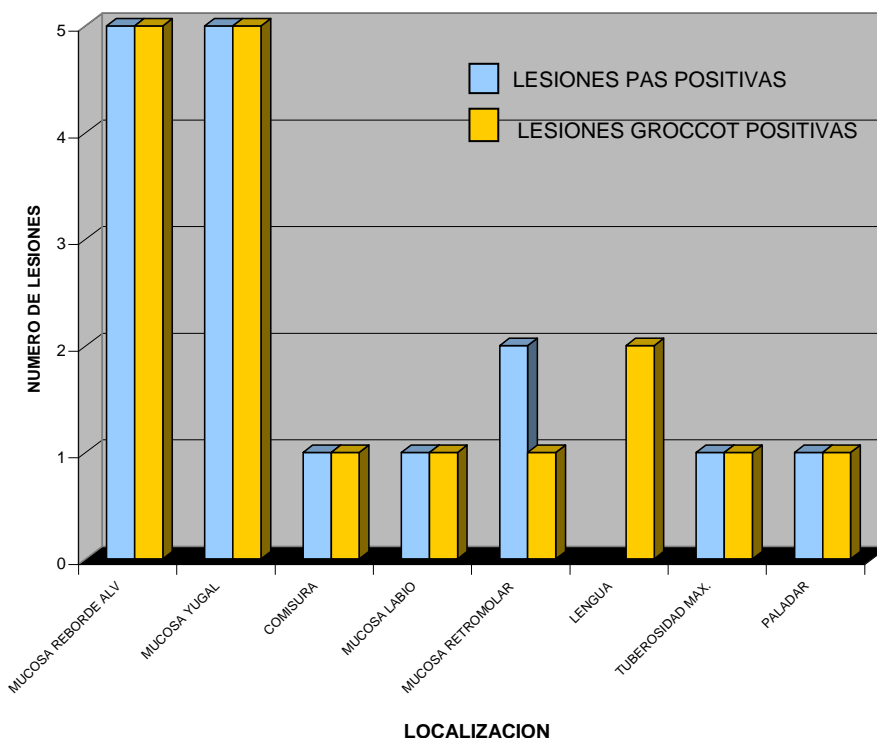
Lo que representa según la Tabla N° VII el 31,25% (5/16) de la muestras positivas a PAS y el 29,41% (5/17) a Groccot.

Seguida por la mucosa retromolar 12,50% (2/16) utilizando PAS y Lengua 11,76% (2/17) empleando Groccot.

Otras localizaciones menos frecuentes fueron comisura, mucosa del labio, tuberosidad maxilar y paladar, localizaciones que representaron el 6,25% (1/16) de las muestras positivas con PAS y el 5,88% (1/17) con Groccot.

**Gráfico N° 15**

**Distribución de Leucoplasias PAS y Groccot positivas de acuerdo a su localización en cavidad bucal.**



**Tabla N° VII**

**Distribución de Leucoplasias PAS y Groccot positivas de acuerdo a su localización en cavidad bucal.**

LOCALIZACIÓN	PAS		GROCCOT	
	n	%	n	%
MUCOSA REBORDE ALV	5	31,25	5	29,41
MUCOSA YUGAL	5	31,25	5	29,41
COMISURA	1	6,25	1	5,88
MUCOSA LABIO	1	6,25	1	5,88
MUCOSA RETROMOLAR	2	12,50	1	5,88
LENGUA			2	11,76
TUBEROSIDAD MAX.	1	6,25	1	5,88
PALADAR	1	6,25	1	5,88
<b>TOTAL DE LESIONES</b>	<b>16</b>	<b>100,00</b>	<b>17</b>	<b>100,00</b>

## **20.RELACION ENTRE LA PRESENCIA TISULAR DE ESTRUCTURAS FUNGICAS Y LOS RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS DE LAS LESIONES LEUCOPLASICAS.**

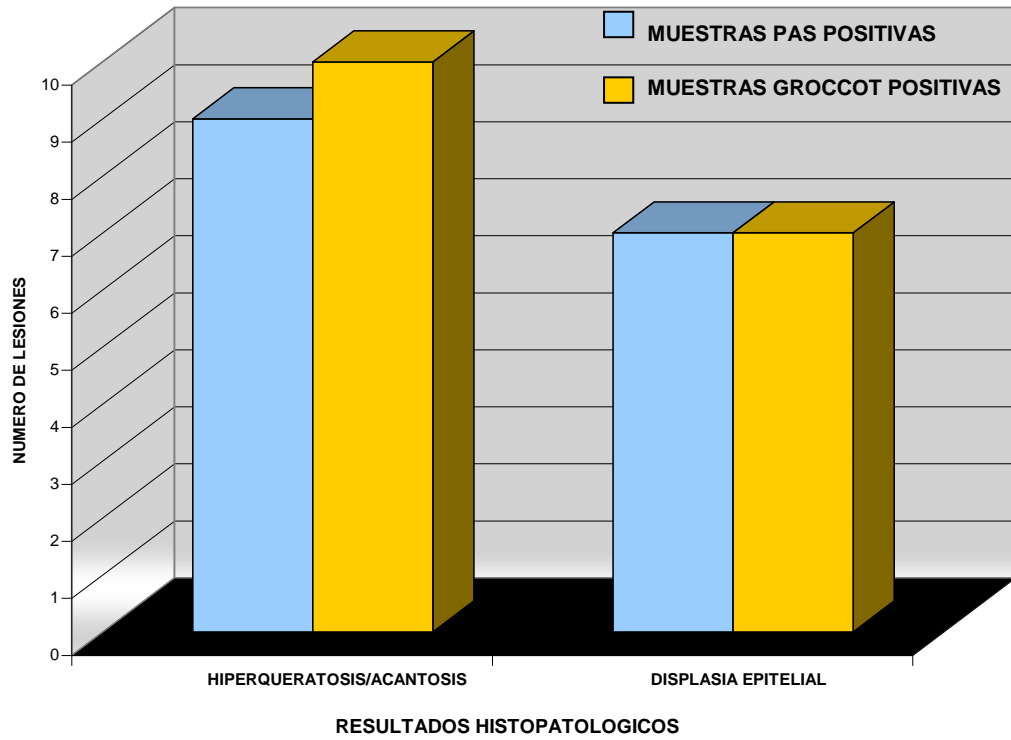
El 58,82% (20/34) del total de Leucoplasias en estudio resulto ser una combinación variable de hiperqueratosis y acantosis, solo un 41,17% (14/34) reporto displasia epitelial.

Como se observa en el gráfico N° 16 y la tabla N° VIII, del total de lesiones PAS positivas un 56,25% (9/16) fueron lesiones con reportes histológicos de hiperqueratosis y acantosis, mientras que un 43,75% (7/16) demostraron correlación entre cambios displásicos e invasión del tejido por levaduras.

Con la técnica de coloración de Groccot un 58,82% (10/17) de las muestras presentaron cambios epiteliales benignos, mientras que un 45,29% (7/17) reportó cambios displásicos.

**Gráfico N° 16**

**Relación entre la presencia tisular de estructuras fúngicas y los resultados histopatológicos de las lesiones leucoplásicas.**



**Tabla N° VIII**

**Relación entre la presencia tisular de estructuras fúngicas y los resultados histopatológicos de las lesiones leucoplásicas.**

COLORACIONES	RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS				TOTALES	
	HIPERQUERATOSIS-ACANTOSIS		DISPLASIA EPITELIAL		n	%
	n	%	n	%		
PAS	9	56,25	7	43,75	16	47,05
GROCCOT	10	58,82	7	45,29	17	50,00

Se aplico un test de comparación de muestras no paramétricas de Kruskal Wallis no obteniendo una diferencia importante entre las dos variables estudiadas con una ( $p < 0.01$ ). Son muestras homogéneas que no determinan diferencias significativas o importantes. Lo que refiere que la presencia tisular de levaduras en lesiones leucoplásicas es independiente de los cambios epiteliales presentes.

## **21. CORRELACION DE LOS AISLAMIENTOS DE LEVADURAS EN LEUCOPLASIAS OBTENIDOS POR ESTUDIO MICOLOGICO E HISTOPATOLOGICO.**

Como se evidencia en la tabla N° IX se lograron 60% (18/30) de aislamientos de levaduras a partir de muestras de enjuague bucal concentrado realizado a los pacientes con Leucoplasia.

En solo un 26,47% (9/34) de los raspados efectuados a la superficie de las lesiones se pudo observar crecimientos levaduriformes.

Un 47,05% (16/34) y 50% (17/34) de las muestras de Leucoplasia fueron positivas a la observación tisular de estructuras fúngicas empleando las técnicas de coloración PAS y Groccot respectivamente.

**Tabla Nº IX**  
**Correlación de los aislamientos de levaduras por estudio micológico e histopatológico.**

ESTUDIO	TOTAL	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO				ESTUDIO HISTOQUÍMICO			
		ENJUAGUE (n=30)		RASPADO(n=34)		PAS(n=34)		GROCCOT(n=34)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
LUECOPLASIA	34	18	60,00	9	26,47	16	47,05	17	50,00
MUCOSA SANA	15	4	26,66	1	6,66	4	26,66	3	20,00

Se aplicó un test de Fisher con una ( $p < 0,05$ ) para muestras no paramétricas en donde se demuestra la significancia estadística entre el método de enjuague y raspado, también se aplicó un test de Fisher dando así una diferencia estadísticamente significativa entre el estudio micológico y la técnica histológica con una ( $p < 0,09$ ).

## VI.- DISCUSION

Leucoplasia es un término clínico que se utiliza para describir toda placa blanquecina que se observa en cavidad bucal o incluso en otras mucosas, como vulva, cuello uterino, vejiga urinaria, pelvis renal y vías respiratorias superiores, y no puede ser identificada como ninguna otra entidad, como Liquen plano reticular o tipo placa, Nevus Blanco Esponjoso, Lupus Discoide Eritematoso, Lesiones friccionales, Leucoplasia Velloso, o Leucoedema. (2, 3, 4, 5)

Este término no posee connotación histopatológica, se han reportado una variedad de características histológicas que alternan desde cambios leves en el epitelio hasta cambios displásicos, razón por la cual siempre debe ser indicado el estudio microscópico de una muestra de lesión. (3, 6, 7)

El principal agente etiológico es el hábito de fumar, además se han incluido la ingesta de alcohol, el uso de pastas dentales y enjuagues bucales en cuya composición hay sanguinarina; algunas deficiencias vitamínicas, y en los últimos años ha sido posible detectar a través de técnicas de Biología Molecular la presencia del Virus Papiloma Humano en estas lesiones. (8-40)

Varios estudios han evaluado la infección crónica de lesiones leucoplásicas por especies de *Candida* <sup>(284, 286, 287, 293)</sup>, y se ha sugerido su presencia en el tejido como potencial indicador de transformación maligna.  
(112)

En el presente trabajo se utilizaron técnicas micológicas e histoquímicas para evidenciar la presencia e infección por *Candida* de lesiones leucoplásicas, correlacionando su identificación con lesiones de alto potencial maligno.

La población en estudio en relación con la presencia de lesiones leucoplásicas mostró las siguientes características: el género femenino (60%) presentó mayor incidencia de Leucoplasia bucal en comparación con el masculino (40%).

Anteriormente la incidencia de esta lesión se relacionaba en alto porcentaje con el género masculino <sup>(4, 294, 295, 296)</sup>, sin embargo a nivel mundial esta correlación ha ido disminuyendo, en Suecia la proporción hombre/mujer varió de 5:1 en 1976 <sup>(297)</sup> a 2,5:1 en 1990. <sup>(298)</sup>

Actualmente la incidencia de Leucoplasia en mujeres ha ido incrementándose <sup>(7,34,48,299)</sup>, específicamente si hacemos referencia en nuestro país, donde estudios realizados por Tinoco y Salazar (1986), Fonseca y col (1992) y Lugo (2001) reportaron una ocurrencia del 59%, 62% y 57% respectivamente, concluyendo que en Venezuela la frecuencia de estas lesiones es mayor en el género femenino <sup>(35,45,46)</sup>

Durante los últimos años se ha determinado un incremento del hábito tabáquico en las mujeres lo que pudiera explicar la alta incidencia de Leucoplasias en este género <sup>(47)</sup>. Además de ello las mujeres prestan mayor atención al cuidado de la salud bucal, acuden con mayor frecuencia a los servicios de atención odontológica, siendo posible el diagnóstico de la lesión, razones que pudieran explicar el alto porcentaje de reportes.

Ha sido señalado en la literatura un intervalo entre 40-70 años como el periodo donde la Leucoplasia se diagnostica más frecuentemente. En nuestra muestra el grupo etareo más afectado fue ubicado en la séptima década de la vida con un 33,33%, estos valores coinciden con investigaciones realizadas por Seoane y col (1996); y Bagan y col (1993), en las cuales se ha encontrado la máxima incidencia de Leucoplasias bucales en el segmento de edades entre los 60-70 años (séptima década de vida), representando el 40% de los casos. <sup>(300,301)</sup>

Como lo demuestran los resultados obtenidos la Leucoplasia es una entidad clínica con alta incidencia a aparecer en la edad avanzada, a partir de la séptima década de vida, en pacientes considerados por la Organización Mundial de la Salud y el Proyecto de ley Orgánica para la Protección de Personas Mayores en Venezuela como “Adultos Mayores”. La explicación a esta situación pudiera basarse en el hecho de que los pacientes de la tercera edad presentan generalmente antecedentes de hábitos, y factores negativos como deficiencias vitamínicas propias de alteraciones nutricionales, acumuladas por muchos años que actúan sobre un organismo en regresión. Además en estos pacientes se presentan cambios bucales asociados al proceso de envejecimiento, como la atrofia del epitelio superficial, haciéndose la mucosa más sensible a las influencias externas como irritación mecánica, química y/o microbiana, siendo altamente susceptible al desarrollo de procesos crónicos como la Leucoplasia. <sup>(302, 303)</sup>

El hábito tabáquico también en la población juvenil ha inducido la presencia de estas lesiones a edades muy tempranas <sup>(304)</sup>; en nuestra población dos casos se presentaron a los 22 y 27 años, asociadas a pacientes fumadores desde la adolescencia.

Las lesiones fueron categorizadas en homogéneas y no homogéneas en base a su apariencia clínica según la última revisión hecha por la

Organización Mundial de la Salud en 1994, obteniéndose mayor proporción de lesiones homogéneas (82,35%), que heterogéneas (14,71%). Esta frecuencia coincide con la obtenida por Scheifele y col (2003) en donde de una muestra de 68 Leucoplasias, la mayor proporción (86,8%) fueron homogéneas, mientras que las lesiones de tipo no homogéneas se reportaron con menor frecuencia (13,2%).<sup>(305)</sup> Entre las lesiones heterogéneas encontradas en nuestra investigación, la eritroleucoplasia fue el subtipo más común (60%).

Se han considerado la mucosa bucal, labio inferior, y lengua como los asentamientos de preferencia para las Leucoplasias en cavidad bucal. En nuestro estudio la mayor incidencia se observó a nivel de las mucosas de rebordes alveolares residuales, coincidiendo con los resultados obtenidos por Bouquot y Gorlin (1986), Lugo (2001), Onofre y col (1997), estudios en los que el 75% de las Leucoplasias fueron observadas en esta localización.<sup>(35, 52, 90)</sup> Otros lugares de ubicación fueron la mucosa yugal, mucosa retromolar, comisura bucal, mucosa del labio, lengua, y un solo caso en paladar.

Los casos con diagnóstico de Leucoplasia heterogénea se observaron en mucosa yugal principalmente (40%), también a nivel de comisura, mucosa de reborde alveolar y paladar (20%). El caso de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa coincidió con lo expuesto por Zakrzewska y col (1996), Batsakis

y Suarez (1999), y Navarro y col (2004) en relación con la presencia de esta lesión en una paciente de edad avanzada y bilateralmente a nivel de la mucosa bucal. <sup>(61,306, 307)</sup> Además de la mucosa bucal, se reportan a la lengua y encía como las zonas de mayor riesgo para la aparición de la lesión.

Al evaluar los factores etiológicos, el hábito de fumar demostró como en otros estudios realizados <sup>(8, 308, 309, 310)</sup> su influencia directa como el más importante factor inductor de Leucoplasias bucales, al ser referido como hábito en sus diversas formas en un 90% de los pacientes.

Cuando hacemos la asociación entre el hábito de fumar y cambios displásicos en el tejido, podemos apreciar que los casos de pacientes que no presentaron este hábito tampoco reportaron características displásicas en el tejido en su estudio microscópico, mientras que los casos reportados con displasia se observaron en pacientes con el hábito de fumar y tabaco específicamente, corroborando lo expuesto por Ali y col (2004) quienes señalan que la prevalencia de las lesiones y su severidad histológica se incrementan según la duración y frecuencia del hábito. <sup>(311)</sup>

Los enjuagues bucales así como también la utilización de pastas dentales y enjuagues que presentan en su composición sanguinarina son

considerados como factores etiológicos. <sup>(312, 313, 314)</sup> Se ha demostrado que el alcohol empleado en las preparaciones ya sea como disolvente de otros ingredientes, como conservante activo o por sus propiedades antisépticas en un contenido igual o mayor al 25% puede actuar por un mecanismo local como inductor de lesiones hiperqueratósicas en la mucosa bucal. <sup>(315)</sup>

En nuestro estudio un 43,33% de la población hizo referencia al uso de enjuagues bucales derivados del fenol (Listerine<sup>®</sup>).

Aun cuando diversas investigaciones <sup>(316, 317, 318)</sup> no han podido establecer una relación directa entre el uso de enjuague bucal y el desarrollo de cáncer a partir de la inducción de lesiones queratósicas; Winn (2001) demostró que una cuarta parte de los casos de cáncer en hombres y la mitad de los diagnosticados en las mujeres estudiados no eran atribuibles al abuso del tabaco ni al alcohol, por lo que este autor llegó a considerar el uso de enjuagues bucales como un factor de riesgo potencial. <sup>(319)</sup>

Dos cuartas partes de la población, correspondientes al 15% (2/13) de los pacientes con hábito de enjuague bucal no reportaron hábito tabaquico, ni consumo de alcohol, por lo que hay que considerar la utilización de enjuague bucal como un posible factor etiológico de las lesiones observadas.

Actualmente existe una tendencia a la comercialización de productos que contienen cantidades relativamente bajas de alcohol y a la formulación de enjuagues sin alcohol para prevenir su posible efecto local, también se sugiere evitar la utilización de preparaciones que contengan sanguinarina en su composición hasta tanto el riesgo de transformación de lesiones queratósicas en lesiones malignas sea totalmente confirmado. <sup>(320, 331)</sup>

En cuanto al uso de aditamentos dentales, 50% de la población no utilizaba prótesis a pesar de requerirlas, 36,7% eran portadores de dentaduras removibles y un 6,66% de los pacientes con Leucoplasia eran dentados, por lo que se pudiera hacer una asociación estadísticamente significativa entre la ausencia dental y la Leucoplasia, tal y como lo señala Lugo (2001) en su estudio, refiriendo que las Leucoplasias se presentan mayormente en pacientes parcial y totalmente edéntulos. Esto hace pensar que en los pacientes edéntulos totales o parciales, existe una mayor exposición de las mucosas a factores externos e internos inductores de lesión.

En el paciente con diagnóstico clínico de LVP no se encontró asociación de la lesión con el hábito de fumar, no pudiéndose determinar un agente causal, en este caso era necesario la evaluación y asociación con el Virus Papiloma Humano.

Al estudiar las distintas características histopatológicas de las Leucoplasias hemos encontrado en consonancia con otros autores <sup>(6, 76)</sup>, la presencia de hiperqueratosis y acantosis como las más frecuentes, observando un patrón de hiperortoqueratosis que en nuestra serie constituyó un 73,52% de los casos, en oposición a un 24,47% de hiperparaqueratosis.

Esta tendencia coincide con los estudios de Bagan (1985) y se opone a los resultados de Seoane (1996) donde se obtuvo un alto porcentaje de hiperparaqueratosis, y se propuso la significación estadística entre este patrón de queratinización alterado y la presencia de displasia en el epitelio de las Leucoplasias. <sup>(300, 301)</sup>

Sobre la presencia de Displasia Epitelial, solo un 41,17% de las lesiones en estudio mostraron cambios displásicos entre leves y moderados; no se encontraron casos con displasia severa o carcinoma in situ.

Aun cuando diversos autores, entre ellos Banóczy y Csiba (1976), Williams (1990), Bouquot (1991), Speight-Morgan (1993), Schepman y col (1998) <sup>(54, 79, 104, 322, 323)</sup> han reportado que la presencia de displasia epitelial esta correlacionada con las formas heterogéneas de Leucoplasia, hemos observado como también los casos de lesiones homogéneas pueden exhibir

características displásicas. En nuestro estudio sólo un 7,14% (1/14) de Leucoplasias heterogéneas reportaron displasia moderada, mientras que un 85,17% (12/14) de las muestras con reportes displasicos fueron lesiones homogéneas.

Aunque es una condición poco común, en nuestro trabajo las lesiones con displasia epitelial se presentaron clínicamente como Leucoplasias homogéneas. Este resultado se apoya en los obtenidos en el 2003 por Jaber y col, quienes obtuvieron un 50% de displasias epiteliales en Leucoplasias homogéneas, mientras que 45% se presentaron en lesiones heterogéneas.  
(324)

Varios microorganismos se han asociado con Leucoplasias bucales. Se ha encontrado una alta asociación de *Candida* con estas lesiones premalignas de la cavidad bucal.

Algunos autores definen este grupo de Leucoplasias como “Candida-Leucoplasia” o “Candidiasis crónica hiperplásica”.<sup>(325)</sup>

En este estudio se investigó la presencia de levaduras en cavidad bucal, empleando la técnica de enjuague bucal concentrado, lográndose

aislar estos microorganismos en el 60% de los casos a partir de las muestras tomadas al grupo de pacientes con Leucoplasia, y en 22,66% de los casos del grupo control. Un valor inferior a 31,7% (13/35) de casos positivos de detección de levaduras fue reportado por Liperhide en su estudio de 35 Leucoplasias, y de 24,2% (23/95) en el grupo control.

El porcentaje de aislamientos del grupo control se acerca al de Odds (1988) quien en una revisión encontró que la prevalencia de levaduras en la saliva de pacientes “normales” sin ninguna alteración patológica fue de 37%.  
(227)

Como ha sido señalado por otros autores <sup>(326, 327, 328)</sup> la presencia de especies de *Candida* en cavidad bucal es un hallazgo muy habitual y no necesariamente su presencia está asociada con su papel patógeno. Según Lynch (1994) las especies de *Candida* pueden ser identificadas como parte de la flora comensal en cavidad bucal en un 41% de la población sana. <sup>(326)</sup>

Al cuantificar el crecimiento de levaduras en base a Unidades Formadoras de Colonias por mililitros de enjuague (UFC/ml) obtuvimos crecimientos abundantes y moderados como formas predominantes en el grupo de estudio, y crecimiento muy escaso, escaso, moderado y abundante

en los cuatro casos positivos del grupo control. Estas variaciones específicamente en el grupo de pacientes considerados como sanos demuestra que la estimación numérica de la densidad bucal de *Candida* posee un valor limitado, coincidiendo con el planteamiento de Ribero y col (2003) quienes demostraron que personas sanas pueden tolerar altas concentraciones de *Candida* sp sin padecer enfermedad, mientras que en personas debilitadas recuentos más bajos de estos microorganismos pueden precipitarla. <sup>(329)</sup>

Nuestros valores de crecimientos moderados y abundantes en pacientes con Leucoplasia, coinciden con valores elevados obtenidos en investigaciones realizadas por Grant y col (2001); McCullough y col (2002), quienes plantearon que estos recuentos se corresponden con altas concentraciones del hongo a nivel de membranas alteradas. <sup>(330, 331)</sup>

Si buscamos la asociación entre los aislamientos con crecimientos abundantes y la identificación posterior del hongo en el tejido podemos notar que hay una correlación entre aislamientos positivos e identificación tisular de 8:5 para los crecimientos abundantes y de 8:6 para los crecimientos moderados, por lo que se pudiera afirmar que en pacientes con alguna patología es de esperar que haya una alta cuantificación de levaduras en cavidad bucal tal y como lo plantean Grant y col (2001), pero no

necesariamente un alto recuento de levaduras en boca va a determinar infección fúngica en el tejido. En este estudio, se obtuvieron casos de recuentos abundantes de levaduras en muestras obtenidas de enjuagues bucales de pacientes a quienes no se les identificó la presencia de hongos a nivel tisular. Sin embargo en pacientes con alteraciones de las mucosas, la presencia del hongo como comensal podría representar un factor de riesgo para la invasión tisular.

Al identificar las especies encontradas *C. albicans* fue la mas frecuente (40%); seguida por *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*, y en menor proporción: *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica* y *Rhodotorula glutinis*, coincidiendo con Samaranayake y Macfarlane (1990) y Lewis y col (1991) quienes reportaron que en cavidad bucal de sujetos donde se han aislado especies de *Candida*, *C.albicans* comprende entre un 60-70% de los aislamientos, y las otras especies una menor proporción. <sup>(334, 335)</sup>

La identificación de *Rhodotorula glutinis* constituye un echo inusual, al ser reconocida como una especie de poco aislamiento en boca, incluso Stenderup (1990) señala que no se le conoce como causa de infección en cavidad bucal. <sup>(336)</sup>

Al buscar la asociación entre el uso de prótesis y el aislamiento de levaduras de cavidad bucal, o evaluar el papel de estos aditamentos como factores favorecedores de colonización, no encontramos una influencia significativa, vemos que en un 69,23% (9/13) de los pacientes portadores de prótesis fue posible determinar la presencia de levaduras en muestras obtenidas por enjuague bucal, en 53,33% (8/15) de los pacientes no portadores se obtuvo el mismo resultado y en los pacientes con Leucoplasia que no utilizaban aditamentos bucales por ser pacientes dentados obtuvimos un 50% (1/2) de positividad al aislamiento de levaduras.

Por tal razón esta condición en nuestro estudio aunque fue un factor que predispone a la presencia de levaduras no fue determinante, hecho que se demuestra al haber obtenido aislamientos en altos porcentajes también en pacientes dentados y no portadores de prótesis.

Valores distintos a los de este estudio fueron reportados por Narhi y col (1993), quienes demostraron que el uso de dentaduras puede aumentar la frecuencia de levaduras en cavidad bucal, al detectar estos microorganismos en 19% del total de pacientes con dientes naturales, y en 73% de pacientes portadores de prótesis. <sup>(332)</sup>

Al evaluar el rol condicionante que tiene el hábito de fumar en la colonización de cavidad bucal por levaduras, encontramos casos positivos tanto en pacientes no fumadores como en fumadores.

En 1983, Arendorf y Walker reportaron que el hábito tabáquico favorecía el crecimiento de *Candida* como consecuencia de la pérdida del equilibrio en el microambiente bucal por acción del calor y los componentes del humo del tabaco. Sin embargo, Bastian y Reade (1982); y Coleman y col (1976), señalaron que aun cuando el hábito de fumar tabaco altera el pH de la saliva y su potencial de oxido reducción, la prevalencia de *Candida* era similar en la boca de fumadores y no fumadores. <sup>(259, 260, 328)</sup>

En nuestro estudio la incidencia de levaduras en pacientes fumadores fue considerable (55%), y total en los pacientes no fumadores (100%), por lo que la condición de fumador no fue un factor determinante para la presencia de levaduras en boca.

Para determinar la presencia de levaduras tanto en las lesiones leucoplásicas como en las muestras de mucosa sana empleamos dos técnicas diagnosticas de laboratorio; la toma de muestra y cultivo de ésta y la biopsia.

El cultivo se obtuvo previo raspado de la superficie de las lesiones, este procedimiento permitió el aislamiento de levaduras solo en un 26,47% de las Leucoplasias estudiadas, esta incidencia de *Candida* fue baja si la comparamos con resultados obtenidos por Jepsen y Whinter (1965); quienes la aislaron en una proporción superior al 56%.<sup>(37)</sup>

La frecuencia de aislamientos en las Leucoplasias de tipo homogéneo fue de un 21,42%, en los heterogéneos un 40%, y en el único caso de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa fue del 100%. Vemos como la identificación de levaduras por raspado fue mayor en los tipos heterogéneos.

Esto se relaciona con resultados obtenidos por Ambika y col (1984), quienes obtuvieron una frecuencia de aislamientos de levaduras de 83% en los casos de Leucoplasias heterogéneas, y Roed y Peterson (1970); quienes observaron que fueron las Leucoplasias anteriormente definidas como moteadas, los sitios de mayor incidencia de infección por *Candida* sp.<sup>(287, 337)</sup>

Al identificar las especies obtenidas de los cultivos por raspado de las lesiones encontramos que *C.albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia (66,66%). La presencia dominante de esta especie en

Leucoplasias bucales es confirmada por otros autores. Para Krogh y col (1987) representó un 82% de los aislamientos, y para Vidas y col (1988) *C.albicans* estuvo presente en 67,9% de los pacientes con Leucoplasia bucal. <sup>(293, 338)</sup>

Esto demuestra tal y como lo señala Hostetter (1996) que entre todas las especies de *Candida*, *C. albicans* es sin duda alguna la que presenta mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales bucales. <sup>(266)</sup>

Otras especies encontradas fueron *C. guilliermondii*, *Rodothorula* sp no pigmentada, y un caso en el que coexistieron *C. pseudotropicalis* y *Rodothorula glutinis*.

En mucosa sana del grupo control solo un caso fue positivo al aislamiento e identificación de *C.albicans*.

Estos resultados permiten determinar que el aislamiento de levaduras en pacientes con leucoplasia (26,47%) es superior al aislamiento de levaduras en mucosas aparentemente sanas (7%).

Sin embargo la presencia de levaduras en ambos grupos demuestra que, tanto la mucosa sana, como la mucosa con alguna alteración o condición patológica pueden estar colonizadas por especies de *Candida*.

La serotipificación de *C.albicans* a partir de las muestras obtenidas por raspado de las lesiones determinó un predominio del serotipo A (100%) con respecto al serotipo B que no fue identificado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores, quienes reafirman una alta incidencia de este serotipo en lesiones leucoplásicas. Lipperheide y col (1996), identificaron a *C.albicans* serotipo A como la especie mas frecuente, al encontrarse presente en un 76% de las Leucoplasias estudiadas. <sup>(288)</sup> Williams y col (2000) determinaron un 79% de aislamientos del serotipo A en Candidiasis crónica hiperplásicas (CCH) y un 83% en otras lesiones bucales. <sup>(339)</sup>

Barturen y col (1996), identificaron serotipos mediante inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo monoclonal B9E, y observaron que 307 de 357 aislamientos bucales pertenecieron al serotipo A (86%), este fue el serotipo predominante en las personas sanas con o sin prótesis dentaria (90%) y en pacientes con estomatitis subprótesica, mientras que el serotipo B se observó con mayor frecuencia en aislamientos

vaginales, cutáneos y en pacientes con candidemia o con candidiasis pseudomembranosa bucal. <sup>(340)</sup>

El estudio de los serotipos de *C.albicans* posee un interés además de epidemiológico, terapéutico, ha permitido obtener mayor conocimiento en relación a la sensibilidad antifúngica de esta especie.

Un estudio realizado por Mendoza y col (1994), con antifúngicos como el Ketoconazol, Itraconazol y Bifonazol, demostraron una mayor sensibilidad del serotipo A con respecto al B ante el uso de los imidazoles (Ketoconazol y Bifonazol), así como otras especies de *Candida*, con excepción de *C.guilliermondii* que mostró resistencia al Bifonazol. <sup>(341)</sup>

Estos conocimientos nos orientan en la utilización de un tratamiento antifúngico tópico en aquellas lesiones en las que se demuestra la presencia de levaduras.

La invasión fúngica de las capas queratinizadas del epitelio fue evidente en 47,06% (16/34) de 34 Leucoplasias biopsiadas empleando la técnica de coloración de PAS; y en 50% (17/34) de las muestras empleando

coloración de Groccot, ambas técnicas mostraron similar sensibilidad en la detección de formas levaduriformes en el tejido.

Estos porcentajes se encuentran dentro del rango de 7-50% establecido por Daftary y col (1972), Banoczy (1982), Kroht y col (1987), como la proporción de casos de Leucoplasia que presentaran estructuras levaduriformes en su constitución, una vez evaluadas.

La incidencia de estructuras fúngicas en nuestra investigación es considerablemente significativa y similar a la obtenida por Jepsen y Whinter (1965); Roed Peterson y col (1970); quienes identificaron *Candida* sp en 54,2%, y 61,9% casos de Leucoplasia respectivamente. <sup>(37, 287)</sup>

Los elementos fúngicos, PAS y Groccot positivos, fueron exclusivamente observados en las capas superficiales del epitelio, en la capa córnea y estrato granuloso, resultados similares fueron obtenidos por Dorko y col (2001) <sup>(112)</sup>

La mayoría de los estudios señalan la presencia de infección por *Candida* en los tipos heterogéneos de Leucoplasias bucales, en nuestra investigación un 60% de las formas heterogéneas de la lesión reveló la

presencia de levaduras independientemente de la coloración utilizada, mientras que un 42,85% de las muestras homogéneas mostró similares resultados con PAS y 46,42% con Groccot.

Estos resultados demuestran que todas las lesiones leucoplásicas pueden estar infectadas por especies de *Candida*, y como lo señala Aguirre (2002) todas aquellas condiciones en las que se altere la integridad de la mucosa son igualmente susceptibles a la adhesión e invasión mucosa por especies de *Candida*,<sup>(229)</sup> sin embargo en los tipos heterogéneos esta susceptibilidad es mayor.

Estructuras fúngicas también fueron identificadas en 26,6% (4/15) de las muestras de mucosa sana del grupo control empleando PAS y en 20% (3/15) utilizando Groccot. Estos valores coinciden con los de Rindum y col (1994), quienes encontraron hifas en 4-47% histopatologías de individuos bucalmente sanos, demostrándose que la presencia o identificación de levaduras en el tejido no puede ser considerado un signo inequívoco de infección.

La presencia variable de *Candida* en algunos casos de Leucoplasia y su aparente ausencia en otros, sugiere una invasión fúngica secundaria a

una lesión hiperplásica existente, este planteamiento ha sido sugerido por algunos otros autores como; Jepsen y Whinter (1965), Renstrup (1970) y Roed-Peterson (1970), Lipperheide y col (1996), y Spolidorio y col (2003).  
(286, 287,342)

Sin embargo otros estudios demuestran que cuando *Candida sp* invade las capas superficiales del epitelio se produce una reacción hiperplásica epitelial, considerada como una respuesta celular al microorganismo patógeno.<sup>(343, 344)</sup>

Jennings y Mac Donald (1990), observaron un 66% de incremento en el porcentaje del espesor epitelial en 10 pacientes con Candidiasis atrófica crónica en comparación con la población normal.<sup>(345)</sup>

Es difícil distinguir clínicamente entre las formas de Candidiasis crónica hiperplásica y las diferentes presentaciones de Leucoplasia. Sitheeque y Samaranayake (2003) señalan que la Candidiasis crónica hiperplásica se diferencia de la Leucoplasia cuando una terapia antimicótica resuelve por completo la lesión.<sup>(346)</sup>

Al evaluar la asociación entre presencia de estructuras fúngicas y los resultados histopatológicos de las lesiones estudiadas, encontramos que de la 16 muestras PAS positivas 56,25% (9/16) presentaron resultados histopatológicos de hiperqueratosis y acantosis, mientras que 43,75% (7/16) reportaron características displásicas. De las 17 muestras Grocott positivas 58,82% (10/17) fueron reportadas histológicamente como queratosis benignas, mientras que 41,17% (7/17) fueron displasias.

Se observa una relación importante entre la presencia de cambios displásicos y la confirmación histológica de *Candida* en el epitelio, así como la incidencia en lesiones con reportes histopatológicos benignos, sin mostrar considerable tendencia a uno de los dos posibles resultados.

Estos resultados contrastan con los de Barret y col (1998) quienes establecen una asociación estadísticamente significativa entre infección fúngica y displasia epitelial, después de evaluar 718 lesiones con reportes histopatológicos de hiperqueratosis benigna y encontrar que solo 2,8% (20/718) mostraban presencia del hongo, mientras que de los 597 casos con displasia epitelial un 12,22% (73/597) reportaban infección fúngica. <sup>(347)</sup>

La importancia de la infección por *C. albicans* radica en la consideración del posible rol de esta levadura como inductora de la transformación maligna de las Leucoplasias.

Se ha demostrado que la presencia de *Candida* sp le confiere una condición potencial de malignidad a los tejidos en los que se identifica, al poseer propiedades importantes en el desarrollo de condiciones patológicas y cambios premalignos. Krog y col (1987 y 1990), y Read y col (1990), Nagy y col (1998) han demostrado el papel inductor de *Candida* en el cancer bucal, dada su comprobada capacidad para producir carcinógenos químicos muy potentes. (289, 290, 348, 349)

Se ha sugerido la capacidad que posee esta levadura de producir nitrosaminas endógenas, a partir del nitrito sódico de la saliva y ciertas aminas presentes en los alimentos. (173)

Goldenberg y col (1997) valoraron la frecuencia y serotipos de *C.albicans* aislados de pacientes portadores de carcinoma epidermoide en la mucosa bucal, demostrando que el 51,1% de los cultivos presentaban colonias de hongos. *C.albicans* serotipo A representó el 21.1% de estos aislamientos, con alta producción de proteinasas y producción intermedia de fosfolipasas, esto determinó su alta virulencia. (350)

Estudios realizados por Gao (1996) demostraron la marcada positividad de la proteína p53 en células de lesiones leucoplásicas con presencia de *Candida* que histopatológicamente reportaban displasia epitelial, esto revela el potencial que como lesión premaligna arrojan las lesiones con esta condición. <sup>(351)</sup>

Por estudios microbiológicos de muestras obtenidas por raspado de la lesión se logró el aislamiento de *Candida* sp en 26,47% (9/34) de las lesiones, mientras que por estudio histoquímico fueron identificadas en 47,05% (16/34) de las muestras empleando coloración de PAS y en 50% (17/34) utilizando Grocott.

Los resultados obtenidos demuestran que el raspado aún cuando es uno de los métodos mas utilizados, no es superior en sensibilidad al uso de la histoquímica para la detección de estructuras levaduriformes en el tejido. Sin embargo su uso se justificaría por lo accesible y económico del procedimiento.

Estos resultados se apoyan con el bajo crecimiento de levaduras obtenido por Dahlen y cols (1982), argumentando lo difícil de obtener una adecuada muestra de membranas mucosas, especialmente en casos de

infecciones crónicas donde el agente infeccioso ha penetrado la superficie epitelial. <sup>(167)</sup>

Al utilizar la técnica de enjuague en pacientes con Leucoplasia, se obtuvo un 60% (18/30) de aislamientos de *Candida* sp, de los cuales 61,11% (11/18) coincidieron con la identificación del hongo por técnicas histoquímicas. Por ello el uso de enjuague bucal se justifica para la evaluación de esta patología.

En solo 3 pacientes hubo aislamientos por enjuague pero no se identificó en el tejido, es decir se trató de pacientes portadores sin infección, y en 3 casos fue posible la identificación en tejido, pero no en enjuague.

Al igual que lo señalan Samaranayakee y col (1986), el enjuague bucal concentrado demostró ser una técnica de aislamiento muy simple de realizar, con una alta sensibilidad, y superior al raspado en lo que a cuantificación de levaduras se refiere. <sup>(352)</sup>

Sin embargo el estudio histoquímico de muestras de lesiones leucoplásicas constituye el método mas sensible y específico en la identificación de hifas o pseudohifas en el tejido.

## VII.- CONCLUSIONES

La lesiones leucoplásicas en cavidad bucal se presentan con mayor frecuencia en pacientes del sexo femenino, según la edad pueden aparecer desde la segunda hasta la octava década de vida, siendo la séptima la de mayor incidencia.

El principal factor etiológico asociado con el desarrollo de estas lesiones en la presente investigación correspondió al hábito de fumar.

El tipo de Leucoplasia homogénea se observo en mayor proporción en comparación con las presentaciones heterogéneas.

Las zonas mas frecuentes de localización de estas lesiones son la mucosa de rebordes residuales, mucosa yugal y retromolar.

La mayoría de las Leucoplasias fueron desde el punto de vista histopatológico una combinación variable de hiperqueratosis y acantosis, sin embargo también se presentó un porcentaje considerable de displasia epitelial.

De los aislamientos de *Candida* sp en pacientes con Leucoplasia obtenidas por enjuague bucal predominó el criterio de crecimiento moderado y abundante, mientras que el grupo control no se pudo establecer diferencias significativas en la cuantificación. *C.albicans* fue la especie fúngica más identificada a partir de los aislamientos del grupo en estudio y control.

De muestras obtenidas por raspado superficial de las lesiones se aislaron especies de *Candida* en proporciones moderadas. Siendo *C.albicans*, *C.parapsilosis* y *Rh glutinis* los hongos identificados en estos aislamientos.

*C.albicans* serotipo A fue la especie que se identificó con mayor frecuencia en las lesiones queratóticas.

Los elementos miceliales de *C.albicans* fueron observados en las capas queratinizadas del epitelio en algunos casos de Leucoplasia bucal utilizando coloraciones especiales para hongos.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la identificación fúngica y los resultados histopatológicos de Leucoplasias sin Displasia y Leucoplasias con Displasia.

Las dos técnicas de coloración utilizadas en este estudio (PAS y Grocott), mostraron sensibilidad en la detección de formas levaduriformes en el tejido.

*Candida sp* se reconoce como microorganismo invasor de algunas lesiones leucoplasicas en cavidad bucal.

## VIII.-RECOMENDACIONES

Se sugiere que la evaluación histopatológica de muestras de mucosa bucal con diagnóstico clínico de Leucoplasia incluya el uso de técnicas de coloraciones especiales para hongos, pudiéndose identificar la posible presencia de levaduras en la lesión, reorientando el diagnóstico, el pronóstico y el futuro plan de tratamiento del paciente, así como la investigación futura del uso tópico de antimicóticos en lesiones leucoplásicas en las que se evidencie la presencia de estructuras fúngicas, lo que permitirá evaluar la respuesta al tratamiento y la consideración del posible rol etiológico de la levadura en el desarrollo de la lesión.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hobaek A. Leokoplakia Oris. Act Odontol Scand 1946; 7:61.
2. World Health Organization Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of Leukoplakia and related lesions: and aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978; 46:518-39.
3. Axell T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. Community Dent Oral Epidemiol 1984; 12: 145-54.
4. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Tratado de Patología Bucal. Tercera ed. Edit. Interamericana. Mexico, DF. 1986
5. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, Waal van der I, and an International Collaborative Group on Oral White Lesions, Oral white lesions whit special reference to precancerous and tobacco-related lesion: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21, 1994. Journal of Oral Pathology and Medicine, 1996; 25:49-54.

6. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij y Smeele L.E. Oral Leukoplakia. A clinicopathological Review. Oral Oncol. 1997; 33:291-301.
7. Regezi y Sciuba. Patología Bucal. Correlaciones Clinicopatológicas. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana. México 2000.
8. Schepman KP, Bezemer PD, Van der Meij EH, Smeele LE, Van der Waal I. Tobacco usage in relation to the anatomical site of oral leukoplakia. Oral Diseases 2001; 7: 25-27.
9. Winn DE. Relationship between tobacco use and oral and dental disease in the U.S. Tobacco and oral disease; strategies for dental professional interventions. Iowa City, 2000.
10. Walsh P, Epstein J. The oral effects of smokeless tobacco. J Can Den Assoc 2000; 66: 22-5.
11. Kaughars g., Brand R., Chan W., Carcase-Ediboro P. Evaluation of risk factors in smokeless tobacco-associated oral lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991; 72: 326-31.

12. Jiménez. Cigarrillo y Enfermedad Periodontal, Sociedad Venezolana de Periodontología. Venezuela Odontológica. Órgano Divulgativo del Colegio de Odontólogos de Venezuela. 2000; 53 (2).
13. Seow WK., Thong YH, Nelson RD., Macfarlane GD, Herberg MC. Nicotine induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils inflammation. J Oral Pathol Med 1994; 2: 119-127.
14. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular in production of human gingival fibroblast in vitro. J Periodontol 1995; 62(12): 1056-1064.
15. Qandil R, Sandhu HS, Matthews DC. Tobacco smoking and periodontal diseases. Cant Dent Assoc 1997; 63: 187-192.
16. Baric JM, Alman JE, Feldman RS, Chauncey HH. Influence of cigarette, pipe and cigar smoking, removable partial dentures and age on oral Leukoplakia. Oral Surg 1982; 54:424-9.
17. Banoczy J, Guintner Z, Dombi C. Tobacco Use and Oral Leukoplakia. Journal of Dental Education. 2001. 65(4):322-327.

18. Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci.* 2003 Oct; 326(4):179-82.
19. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg* 1977; 5:69-75.
20. Roed-Petersen B. Effect on oral leukoplakia of reducing or ceasing tobacco smoking. *Acta Derm Venereol* 1982; 62:164-67.
21. Gupta PC, Metha FS, Pindborg JJ, et al. Intervention study for primary prevention of oral cancer among 36,000 Indian tobacco users. *Lancet* 1986; 211:1235-9.
22. Chad Martin G, Brown JP, Eifler CW, Houston GD. Oral Leukoplakia status six weeks after cessation of smokeless tobacco use. *J Am Dent Assoc* 1999; 130:945-54.
23. Banoczy J, Rigo O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19:265-7.

24. Gupta P. Epidemiologic study of the association between alcohol habits and oral leukoplakia. *Community Dental Oral Epidemiology*, 1984;12:47-50.
25. Kaughars G, Brandt R, Chan W, Carcaise-Edinboro P. Evaluation of risk factors in smokeless tobacco-associated oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 326-31.
26. Axford SE, Ogden GR, Stewart AM et al. Fluid phase endocytosis within buccal mucosal cells of alcohol misusers. *Oral Oncol* 1999; 35: 86-92.
27. Murrah VA, Gilchrist EP, Moyer MP. Attenuation of the natural course. *J Oral Pathol Med*. 1998; 19:170-6.
28. Du X, Squier CA, Kremer MJ et al. Penetration of N-nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 80-85.
29. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Diseases* 2001; 7: 349-354.

30. Damm D, Curran A, White D, Drummond F, Ky L, Miss J. Leukoplakia of the maxillary vestibule-an association with Viadent? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 87: 61-6.
31. Ramaswamy G, Rao V, Kumaraswamy S y Anantha N. Serum vitamin's status in oral leukoplakias. Oral Oncology 1996; 32B, 120-122.
32. Theaker H, Porter SR, Fleming KA. Oral epithelial dysplasia in vitamina B12 deficiency. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 67: 81-3.
33. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral Maxillofacial Pathology. Philadelphia. WB Saunders, 1995
34. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea. Harcourt Brace de España. Madrid, 1998.
35. Lugo MV. Detección de Virus papiloma humano y expresión de la proteína p53 en Leucoplasias de la cavidad bucal. Trabajo especial de grado. 2001.

36. Lugo MV. Lesiones Blancas de la mucosa bucal. Acta Odontológica Venezolana. 2000, 38:71-72.
37. Jepsen A, Winther JE. Mycotic infection in oral leukoplakia. Acta Odont Scand 1965; 23:239-256.
38. Mata M. La prótesis odontológica en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. Trabajo de Ascenso Fac. de Odontología UCV. 1993
39. Oksala E. Factors predisposing to oral yeasts infections. Act Odontol Scand. 1990; 48-71.
40. Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. Br Dent J. 1988; 185 (8):830-84.
41. Renstrup G. Leukoplakia of the oral cavity. Acta Odont Scand .1958; 16:99-111.

42. Shafer WG, Waldron AA. A Clinical and histopathological study of oral leukoplakia. Surg Gynecol Obstet 1961; 112:411-420.
43. Shafer WG, Waldron CA. A clinical and histopathological study of oral Leukoplakia. Surg Gynecol Obstet. 1991; 112-411
44. Femopase F, Binagui M, Lopez S, Gandolfo M, Lafrandi E. Comparative study of oral lichen planus and leukoplakia in two Argentina populations. Act Odont Latinoamer 1997; 10 (2): 89-99.
45. Tinoco PJ, Salazar N. Análisis Histopatológico y Epidemiológico de 343 casos de Leucoplasia Bucal (Venezuela). Acta Odontológica Venezolana 1986; 2-3:137-162.
46. Fonseca N, Morales CC, Rivera H. Estudio de leucoplasias en region Zuliana, Maracaibo. Act Odont Vzlna 1992; 15-21.
47. Shafer y Waldron. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral Leukoplakias. Cancer. 1975; 36: 1386-1392.

48. Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hanhn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma a leukoplakia cohort in Taiwan. Br J Cancer 2000; 82 (11): 1871-4.
49. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. Clin Cancer Res 2000; 6: 1702-10.
50. Axell T. Ocurrente of Leukoplakia and some other oral white lesions among 2033 adults Swedish people comunita. Community Dent Oral Epidemiol 1987; 15: 46-51.
51. Banoczy J, Tamas D. Oral Leukoplakia. Occurrence of orale leukoplakia and lichen planus in diabetes mellitus. J Oral Pathol Med. 1992; 21: 364-6.
52. Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus and other oral keratoses in 23616 white Americans over the age of 35 years. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 61: 373-381.
53. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij y Smeele L.E. (1997) Oral Leukoplakia. A clinicopathological Review. Oral Oncol. 33:291-301.

54. Bouquot JE. Reviewing oral leukoplakia: clinical concepts for the 1990s. JADA 1991; 122: 80-82.
55. Andersson G, Kazemi E, Curvall M. The influence of cigarette consumption and smoking machine yields of tar and nicotine uptake and oral mucosal lesions in smokers. Oral Pathol Med 1997; 26:117-23.
56. Grant McIntyre and Oliver R. Update on Precancerous lesions. Dent Update 1999; 26: 382-386.
57. Silverman Jr S, Gorsky M, Lozada F. Oral Leukoplakia and malignant transformation: a follow up study of 257 patients. Cancer 1984; 53:563-568.
58. Gupta PC, Bhonsle RB, Murti PR, Daftari DL, Metha IS and Pindborg JJ. An epidemiologia assessment of cancer risk in oral precancerous lesions in India with special reference to nodular leukoplakia. Cancer 1989; 63: 2247-2252.

59. Hansen LS, Olsen JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia: a long term study of 30 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 285-98.
60. Kannan R, Bijur GN, Mallery SR, et al. Transforming growth factor-alpha overexpression in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:69-74.
61. Zakrewska JM, Lopez V, Speight P, Hopper C. Proliferative verrucous leukoplakia: a report of ten cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 396-401.
62. Fettig A, Pogrel MA, Silverman S et al. Proliferative verrucous leukoplakia of the gingival. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90:723-30.
63. Saito T, Sugiura C, Hirai A et al. High malignant transformation rate of widespread multiple oral Leukoplakias. *Oral Dis* 1999; 5: 15-9.

64. Ghazali N, Bakri MM, Zain RB. Aggressive, multifocal oral verrucous leukoplakia: proliferative verrucous leukoplakia or not? *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 383-92.
65. Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84 (2): 154-7.
66. Bagan J, Jimenez Y, Sanchis J, Poveda R, Milian M, Murillo J, Scully C. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 379-82.
67. Palefsky JM, Silverman S Jr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 193-7.
68. Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, et al. Mutated and wild type p53 expression and HVP integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83: 471-7.

69. Warnakulasuriya K, Jonson N. Sensitivity and specificity of OraScan toluidine blue mouthrinse in the detection of oral cancer and precancer. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 97-103.
70. Epstein J, Scully C, Spinelly J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 160-3.
71. Calanche I., Rivas CG., Manual de histopatología básica para odontólogos. Universidad de los Andes. Consejo de publicaciones. Mérida-Venezuela 2002.
72. Guerrero F., Toranzo J., Melendez J., Reyez J., Estudio comparativo entre biopsia y citología exfoliativa en lesiones malignas de cavidad oral. *Revista ADM Volumen LIII*, marzo-abril 1996, N° 2, Pag. 86-89.
73. Montgomery PW, Haam E von. A study of the exfoliative cytology of oral leukoplakia. *J Dent Res* 1951; 30: 260-264.
74. Banoczy J, Rigo O, Comparative cytologic and histologic studies in oral Leucoplakia. *Acta cytologica* 1976, Vol. 20, Nro. 4, pp. 308-312.

75. Ramaesh T, Medius B, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric análisis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1998; 27: 83-86.
76. Pindborg, Reibel J, Roe-Petersen B, Metha. Tobacco induced changes in oral Leukoplakia epithelium. Cancer 1980; 45: 2330-2336.
77. Brufan C, Canteras M, Armijo M. Correlación clínico-histológica de las Leucoplasias. Actas Dermo-Sif. 1986; 4:173-80.
78. Burkhardt A. Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. J Oral Pathol 1985; 14:751-78.
79. Schepman KP, Van der Meij EH, Smeele LE, van de Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients whit oral leukoplakia from the Netherlands. Oral Oncol 1988; 34: 270-275.

80. Lumerman H, Freedman P, Kerper S. Oral epithelial dysplasia and development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 321-9.
81. Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH et al. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 198-200.
82. Brothwell DJ, Lewis DW, Bradley G, Leong I, Jordan rck, Mock D y Leake JL. Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2003; 31: 300-5.
83. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 513-21
84. Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MYP. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous

fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol* 2000; 36: 353-359.

85. Gonzalez-Moles MA, Ruiz Avila I, Rodríguez-Archilia A, Martínez-Lara I. Suprabasal expresión of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck* 2000; 22: 658-61.

86. Jahanbani J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. *Oral Diseases* 2003; 9: 302-304.

87. Fischman S, Ulmansky M, Sela J, Bab I, Dan G. Correlative clinico pathological evaluation of oral premalignancy. *J Oral Pathology* 1982; 11: 283-9.

88. Alfonso W, Sposto MR, Scully C et al. Oral Carcinoma and potentially malignant lesions in Brazil. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994; 30B: 142.

89. Frame JW. The management of oral premalignant lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992; 30:71.

90. Onofre MA, Sposto MR, Navarro CM, Motta MESFM, Turatti E, Almeida RT. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis. *Oral Diseases*. 1997; 3, 148-152.
91. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):47-62.
92. Burkhardt A. Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. *J Oral Pathol* 1985; 14: 751-78.
93. Talamini R. Cancer of the oral cavity and pharynx in nonsmokers who drink alcohol and in nondrinkers who smoke tobacco. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90 (24):1901-3.
94. Visscher JG. Epidemiology of cancer of the lip in the Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34(5):421-6.
95. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988, 48: 3282-3287.

96. Whright AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer. *Oral Oncol* 1998; 34: 441-477.
97. Hindle I, Downer MC, Moles DR et al. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol* 2000; 36: 328-333.
98. Mackenzie J, Ah-See K, Thakkar N et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology. *Oral Oncol* 2000; 36: 387-389.
99. Murrah VA, Gilchrist EP, Moyer MP. Morphologic and growth effects of tobacco-associated chemical carcinogens and smokeless tobacco extracts on human oral epithelial cells in cultura. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 323-332.
100. Chen YP, Johnson GK, Squier CA. Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 251-5.

101. Wight AJ, Orden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer. *Oral Oncology* 1998; 34: 441-447.
  
102. Du X, squier CA, Kremer Mj, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of etanol and nicotina. *J Oral Pathol Med* 2000; 28: 80-85.
  
103. Zhang L; Cheung KJ, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R, Epstein J, Le ND, Rosin MP. Increased Genetic Damage in Oral Leukoplakia from high risk sites. *Cancer* 2001; 91(11):2148-2155.
  
104. Banoczy and Csiba A. Ocurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42:766-774.
  
105. Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, Mckenna SM, Kee F. Pontentially malignant oral lesions in Northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Diseases* 2001; 7: 18-24.

106. Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22:246-56.
107. Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Fair MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families? *Oral Oncol* 1996; 32B: 63-7.
108. Jiang WW, Fujii H, Shirai T, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. *Cancer* 2001; 92: 2349-56.
109. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 513-21.
110. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32:251-6.
111. Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA

ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344:1270-1278.

112. Dorko E, Zibrin M, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Tkacikova L. The histopathological characterization of oral *Candida* leukoplakias. *Folia Microbiol (Praha)* 2001, 46(5):447-51.

113. Gao Y. Cell proliferation in oral candidal leukoplakia. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1993; Jan; 28(1): 35-7.

114. Rodríguez VC, Moss MS, Tuowaine H. Oral Cancer in the UK: to screen or not to screen. *Oral Oncology* 1998; 34: 454-465.

115. Lotan R. Mechanisms of action of retinoids. *Cancer* 1986; 38: 113-116.

116. Kaugars GE, Silverman A. A Clinical trial of antioxidant supplements in treatment of oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994; 78:462-68.

117. Stich HF, Rosin M, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Krishnan M. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with Beta-Carotene and with Beta-Carotene plus vitamin A. *Int J Cancer* 1988; 42:195-199;.
118. Benner SE, Lippman. Regression of oral leukoplakia with alpha tocopherol: a community clinical oncology program chemoprevention study. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 84: 44-7.
119. Sawant SS, Kandarkar SV. Role of vitamins C and E as chemopreventive agents in the hamster cheek pouch treated with the oral carcinogen-DMBA. *OralDis* 2000 Jul; 6(4):241-7.
120. Kaugars GE, Silverman S Jr, Lovas JG, Thompson JS, Brandt RB, Singh VN. Use of antioxidant supplements in the treatment of human oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Jan; 81(1): 5-14.
121. Tsai JC, Chiang CP, Chen HM, Huang SB, Wang CW, Lee MI, Hsu YC, Chen CT, Tsai T. Photodynamic Therapy of oral dysplasia with topical

5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med.* 2004; 34(1):18-24.

122. Fan KF, Hooper C, Speight PM. Photodynamic therapy using aminolevulinic acid for pre-malignant and malignant lesions of oral cavity. *Cancer* 1996; 78:1374-83.

123. Grant WE, Hooper C, Speight PM. Photodynamic therapy of malignant and premalignant lesions in patients with field cancerization of the oral cavity. *J Laryngol Oncol* 1993; 107:1140-5.

124. Sieron A, Adamek M, Kawczyk-Krupka A, Mazur S, Ilewicz L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:330-6.

125. Grant WE, Hopper C, Speight PM. Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Cancer* 1997; 71:937-42.

126. Epstein JB, Gorsky M. Topical application of vitamin A to oral leukoplakia: A clinical case series. *Cancer*. 1999 Sep 15; 86(6):921-7.
127. Gorsky M, Epstein JB. The effect of retinoids on premalignant oral lesions: focus on topical therapy. *Cancer*. 2002 Sep 15; 95(6): 1258-64.
128. Wong F, Epstein J, Millner A. Treatment of oral leukoplakia with topical bleomycin. A pilot study. *Cancer* 1989 Jul 15; 64(2):361-5.
129. Epstein JB, Gorsky M, Wong FL, Millner A. Topical bleomycin for the treatment of dysplastic oral leukoplakia. *Cancer*. 1998 Aug 15; 83(4):629-34.
130. Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notani K, Totsuka Y, Shindoh M, Fukuda H. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: with respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001Feb;30(1):49-53.
131. Ishii J, Fujita K, Komori T. Laser surgery as a treatment for oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2003 Dec; 39(8):759-69.

132. Lamey PJ. Management options in potentially malignant oral epithelial lesions. *Comunita Dental Health* 1993; 10: 53-62.
133. Van der Waal. The diagnosis and treatment of precancerous lesions. *FDI World*. 1995; 4 (2):6-9.
134. Joklik, Willett, Amos. *Zinsser Microbiología*. 18 ed. Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 1986, pp 1335-1336.
135. Prescott L M, Harley J P, Klein D A. *Microbiología*. McGraw Hill Interamericana de España. 1999..
136. Rindum J.L, Stenderup y Holmstrup P. Indentification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:406-12.
137. Lamey PJ, Samaranayake LP. Oral Candidosis: I Clinicopathological aspects. *Dent Update* 1988; 15:227-231.

138. Hauman, C.H.; Thompson, I.O.; Theunissen, F.; Wolfaart, P. Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons. *Oral Surg Med Pathol* 1993; 76: 570-572.
139. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger, ENHER L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 1999; 78(4): 857-868.
140. Contreras I, Ponton J, Quindos G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain *Clin Infect Dis* 1994; 18: 480-481.
141. Lazarde J, Mazzali de Ilja R, Perrone M. Estudio sobre la transmisión de *Candida albicans* entre parejas conyugales. *Acta Odont Venez* 1990; 28(1):41-5.
142. Ellepola AN, Samaranayake LP. The in vitro post-antifungal effect of nystatin on *Candida* species of oral origin. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(3):112-6.
143. Llop A, Valdes-Dapena MM, Zuazo JL. *Microbiología y parasitología médica*. La Habana. Ciencias Médicas; 2001.

144. Totti MAG, Jorge AOC, Santos EB, Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. *J Oral Path Med* 1996; 25: 308-310.
145. Almeida OP y Scully C. Fungal infections of the mouth. *Braz J Oral Sci.* 2002, 1 (1):19-26.
146. Liébana Ureña. *Microbiología Oral* 2da edi. MacGraw-Hill Interamericana. España 2002.
147. Torres JM, Palacio A, Guarro J, Negróni R, Pereiro M. *Micología Médica*. Editorial Masson, Barcelona 1994.
148. Cutler J. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 1991; 45:187-218.
149. Chaffin WL; López-Ribot JL; Casanova M; Gozalbo D; Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 130-180.

150. Lopez-Ribot JL, Martinez JP, Monteagudo C, Alloush HM, Mattioli NV, Chaffin WL. Evidence for the presence of complex carbohydrates in *Candida albicans* cell wall glycoproteins. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16:23-26.
151. Bendel CM, Hostetter MK. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Clin Invest* 1993; 92: 1840-1849.
152. Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Revankar SG, Patterson TF. Cell wall proteinaceous components in isolates of *Candida albicans* and non-*albicans* species from HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 125-130.
153. Hasenclever HF and Mitchell WO. Antigenic studies of *Candida*. Observations of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1961; 82: 570-573.
154. Mercure S, Senechal S, Auger P, Lemay G, Montplaisir S. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34(9): 2106-2112.

155. Perurena MR, Martinez G, Fernandez CM, Leal MM. *Candida albicans* serotipo B en pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana. Rev Cubana Med Trop 2001; 53(3):222-3.
156. Brawner DL, Anderson and Yuen KY. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood cultura isolates. J Clin Microbiol 1992; 30: 149-153.
157. Miyakawa Y, Kuribayashi K, Kagaya K, Suzuki T, Nakase T, Fukazawa Y. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1992; 60:2493-2499.
158. Burgos A, Bicandi J, Fernandez-Rodriguez M, Punton J, Cisterna R, Quindos G. 1992. Correlacion entre los serotipos A y B de *C.albicans* y su sensibilidad a la anfotericina B y 5-fluorocitosina. Rev Esc Quimioterap. 5:79-85.
159. Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from non-hospitalized normal carriers immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1989; 27: 1335-1341.

160. Samaranayake LP and Holmstrup P. Oral Candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med.* 1989; 27: 554-564.
161. Torssander J, Chryssanthou E, Petrini B. Increased prevalence of oral *Candida albicans* serotype B in homosexual men: a comparative and longitudinal study in HIV-infected and HIV-negative patients. *Mycoses* 1996; 39: 353-356.
162. Ceballos A, Gaitan LA, Ruesga MT, Ceballos L, Quindos G. Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con SIDA sometida a terapia antirretroviral altamente activa. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:141-145.
163. Kennedy MJ, Johnson AM, Voiz PA, Neely AN, Yencey RJ. Virulence and adhesive properties of serotype A and B of *Candida albicans* isolated from pediatric born patients. *J Med Microbiol* 1992; 36:428-436.
164. Korting HC, Ollert M, Georgii A, Froschl M. In vitro susceptibility and byotypes of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2626-2631.

165. Velegraki A. In vitro susceptibility to itroconazole and fluconazole of switch phenotypes of *Candida albicans* serotypes A nad B isolates from immunocrompromised hosts. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 83-85.
166. Slots J, Taubman M. *Contemporary Oral Microbiology and Inmunology*. Mosby-Year Book, Inc 1 ed, St. Louis-USA 1992.
167. Dahlén G, Linde A, Moller A, Ohman A. A retrospective study of microbiologic samples from oral mucosal lesions. *Oral Surg* 1982, 53:250-255.
168. Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 475-476.
169. Burket. *Medicina bucal. Diagnostico y tratamiento* 6<sup>ta</sup> ed. México. Interamericana; 1973. p 83-91.
170. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal population in health and disease. *Br Dent J* 1979; 147: 267-272.

171. Silverman J, Migliorati J, Epstein L, Samaranayake LP. Laboratory diagnosis of oral candidosis. In Samaranayake LP, MacFarlane TW, eds. Oral Candidosis London, pp 213-237. 1990.
172. Bascones Martinez A, Matanso P. Infecciones orofaciales. Madrid: ediciones Avances Médico-Dentales. 1994.
173. Phillip Marsh, Martin M. Oral Microbiology. Edición Wright. 1999.
174. Koneman, Allen, Bowell, Janda, Sommers, Winn. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España.1992.
175. Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Histopathology of mycotic diseases. Chicago, Year book Medical Publisher, 1980.
176. Aguirre JM. Candidiasis Oral. Gac Med Bilbao 1992; 89:169-171.
177. Delgado W; Aguirre JM. Las micosis orales en la era del sida. Rev Iberoam Micol 1997; 14:14-22.

178. Odds FC. Sabouraud agar. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 355-359.
179. Ponton J. Diagnóstico Microbiológico. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 25-29.
180. Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB. Duration of incubation of fungal cultures. *J Clin Micol* 1996; 34:1583-1585.
181. MacFarlane TW. Ecology and epidemiology of *Candida*. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW eds. *Oral Candidosis* Butterworth: London, 1990.
182. Freydiere AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeast. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 85-89.
183. Ponton J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol*. 2002. 19:25-29.

184. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Williamson MI. Comparison of Sabouraud's dextrose and Pagano-Levin agar media for the detection and isolation of yeast from oral samples. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 162-164.
185. Carrillo-Muñoz AJ, Quindos G, Cardenas CD, Alonso R, Arevalo P, Brio S, Madariaga L. Evaluacion del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 105-108.
186. Bauters TG, Nelis HJ. Comparison of Chromogenic and Fluorogenic Membrana Filtration methods for detection of four *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (5): 1838-1839.
187. Beighton D, Ludford R, Clark DT. Use of CHROMagar Candida médium for isolation of yeast from dental samples. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3025-3027.
188. San Millan R, Ribacoba L, Ponton J, Quindos G. Evaluation of CHROMagar Candida medium for *Candida* identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:153-158.

189. Baumgartner C, Freydiere A-M, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates, *J Clin Microbiol* 1996; 34: 454-456.
190. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo R, Hernandez JM, Marin P, Tallero E, Mira J. Identificación de levaduras de interes clinico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 131-135.
191. Quindos G, alonso-Vargas R, Helou S, arechavala A, Martin-Manzuelos E, Negroni R. Evaluacion micologica de un nuevo medio de cultivo cromogeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interes medico *Rev Iberoam micol* 2001; 18:23-28.
192. Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Pelloux H, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Evaluation of Candida ID a new chromogenic médium for fungi isolation *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 129.
193. Lipperheide V, Andraka L, Ponton J, Quindos G. Evaluation of Albicans IDR plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. *Mycoses* 1993; 36:417-420.

194. Godoy P, Almeida LP, Lopez A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogenico Albicans ID Rev Iberoam Micol 2001; 18: 197-199.
195. Quindos G, San Millan R, Bikandi J, Ponton J. Utilidad de las placas de agar Fluoroplate Candida para la identificación rápida de *Candida albicans*. Enf Infec Microbiol Clin 1996.
196. Ponton J, Garcia ME, Lopez Medrano R. Diagnostico basado en métodos independientes del cultivo. En: Peman J, Martin Mazuelos E, Rubio MC (Eds) Guía practica de identificación y diagnostico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001, 141-1421.
197. Shepherd, MG. Fungi and parasites in the oral cavity. En: Slots J, Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Mosby-Year Book, Inc 1 ed St. Louis-USA 1992; pp. 373-376.
198. Panizo M, Reviakina V y Bellorin E. Dificultades en la identificación de levaduras aisladas de pacientes oncologicos. Boletín SVM 2000; 20(20); 104-107.

199. Dolant CT et al. Atlas of Clinical Mycology. Chicago, American Society of clinical Pathologists, 1976.
200. Koneman EW, Roberts GD. Practical Laboratory Mycology, 3rd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1985.
201. Dolant CT. A practical approach to identification of yeast-like organisms. Am J Clin Pathol 1971; 55: 580-590.
202. Lodder J. The Yeast. A taxonomic study. 3<sup>th</sup> Edition. American Elsevier Publishing Company. 1988. pp 34-113.
203. Di Menna ME. A search for pathogenic species of yeast in New Zealand soils. J Clin Microbiol 1955; 16: 54-62.
204. Williams DW, Lewis MAO. (2000) Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Diseases. 6:3-11.

205. Fenn JP, Segal H, Barland B. Comparison of updated Vitek yeast biochemical card and API-20C AUX yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1184-1187.
206. Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the modified API-20C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 565-569.
207. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 27-36.
208. Kitch TT, Jacobs MR, McGinnis R. Ability of Rapad Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeasts within 5 h. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1069-1071.
209. Land GA, Salking IF, El-Zaatari M et al. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 718-722.
210. Gari-Toussaint M, Delpech D, Pagliardini G, Le Fichoux Y. Adaptation de ATB fungus a la determination de la sensibilité des levaduras au

fluconazole. Comparación avec les concentrations minimales inhibitrices et las resultants therapeutiques. Journal de Micology Medicale. 1996; 6 (2): 72-75.

211. Land G, Stotler R, Staneck J. Update and evaluation of the Automicrobic Yeast Identification System. Journal of clinical Microbiology. 1984; 20: 649-652.

212. Santiago A, Angulo E, Pabon R, Aceituno H, Almenara G. Diagnostico diferencial de levaduras mediante método automatizado. Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiologia. 1997; 17(2):62-64.

213. Bukonja AM, Maldonado BM, Reviankina V, Dolande ME. Estudio comparativo entre el sistema ID 32C y el metodo convencional para la identificación de levaduras de interes clinico. Boletín Sociedad Venezolana de Microbiologia 1997; 17(2): 65-68.

214. Matthews R, Burnie J. Assessment of DNA fingerprinting for rapad identification of outbreaks of systemic candidiasis. Br Med J 1989; 298: 354-357.

215. Monod M, Porchet S, Baudraz-Rosselet F et al. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic análisis of their chromosomes. *J Med Microbiol* 1990; 32: 123-129.
216. Carrillo, Muñoz, Brio CD, Cardenas. Infecciones fúngicas superficiales por levaduras y sertaconazol. *Dermatol. Peru.* 2002; 12 (3):198-210.
217. Torres Marissa. Diagnostico de infecciones con técnicas de biología molecular. *Boletín de la Escuela de Medicina de la Pontifica Universidad Catolica de Chile.* 1997; 26 (3).
218. Brawner DL. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. *J Clin Microbiol* 1991; 29(5): 1020-1025.
219. Barturen B, Bikandi J, San Millan R, Moragues D, Regulez P, Quindos G, Ponton J. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. *Microbiology* 1995; 141: 1535-1543.

220. Alkumru y Beydemir. The prevalence of *Candida albicans* incomplete denture and removable partial denture wearers: a comparative study. *J Marmara Univ Dent Fac.* 1992; 1(3): 218-222.
221. Arendorf TM, Walker. The prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 1-10.
222. Dahlen G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 42-46.
223. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard G-K et al. Yeast in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 860-864.
224. Gonzalez S, Lobos I, Guajardo A et al. Yeast in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1987; 58: 119-124.
225. Odden K, Schenick K, Koppang HS et al. Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. *J Oral Pathol* 1994; 23: 178-183.

226. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases* 2004; 10: 106-112.
227. Odds FC. *Candida and candidosis*. London, Bailliere-Tindall, 1988.
228. Sykes LM; Coogan MM. Yeast counts as measure of host resistance in dental patients. *J of the DASA*. 1997; 52: 19-23.
229. Aguirre JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:17-21.
230. Bascones A, Manso FJ. Infecciones orofaciales, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Avances, 1994:188-216.
231. Música BC, Glick M. Revisión de las infecciones fúngicas orales y su tratamiento. *Arch Odontostomatol* 1996; 12:90-102.
232. Tanida T, Ueta E, Tobiume A, Hamada T, Rao O, Osaka T. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 328-35.

233. Ueta E, Tanida T, Doi S, Osaki T. Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. J Lab Clin Med. 2000; 136: 66-73.
234. Bikandi J, Moragues MD, Quindos G, Polonelli L, Ponton J. Influence of environmental pH on the reactivity of *Candida albicans* with salivary IgA. J Dent Res 2000; 79(6): 1439-1442.
235. Nikawa H, Jin H, Fukushima H, Makihira S y Hamada T. Antifungal activity of histatin-5 againsts non-*albicans Candida* species. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 250-252.
236. Edgerton M, Koshlukova SE, Araujo MW, Patel RC, Dong J, Bruenn JA. Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3310-6.
237. Mandel ID, Barr CE, Turgeon L. Longitudinal study of parotis saliva in HIV-1 infection. J Oral Pathol Med 1992; 21: 209-213.

238. Ueta E, Osaka T, Moneda K, Yamamoto T, Umazume M. Influence of inductive chemoradiotherapy on salivary polymorphonuclear leukocyte functions in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 418-22.
239. Ueta E, Osaka T, Moneda K, Yamamoto T. Functions of salivary polymorphonuclear leukocytes and peripheral blood polymorphonuclear leukocytes from healthy individuals and oral cancer patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:272-8.
240. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin and ICAM-1. *J Periodontol* 1998; 69: 1139-47.
241. Poirier Aldea C, Chilenos Kustner E, Ferrer Benaiges M, Lopez Lopez J, Caballero Herrera R. Importancia de los factores predisponentes en la candidiasis bucal. *Medicina Oral* 1997; 2:21-29.
242. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 71-74.

243. Delgado W, Aguirre JM. Las micosis orales en la era del Sida. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 14-22.
244. Walls AWG, Soames JV. Dental manifestations of autoimmune hypoparathyroidism. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 75:452-4.
245. Burman B, Quindos G, San Millan R et al. Distribucion de los serotipos de *Candida albicans* en aislamientos clínicos de personas inmunocompetentes e inmunosuprimidas. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 10-13.
246. Odds FC. *Candida and Candidosis*. London, Bailliere-Tindall, 1988.
247. Stinnet EA, Wright T, Rodu BK, Bradley EL. The detection of oral *Candida* in pediatric leukemia patients. *Pediat Dent* 1992; 14: 236-9.
248. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 71-4.

249. Field EA, Speechley JA, Rugían FR, Varga E, Tyldesley WR. Oral signs and symptoms in patients with undiagnosed vit B<sub>12</sub> deficiency. J Oral Pathol Med 1995; 24: 468-70.
250. Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 202-10.
251. Budtz-Jorgensen E. Etiology, patogénesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990; 48: 61-9.
252. Centeno A, Davis CP, Cohen MS, Warren MM. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun 1983; 39: 1354-1360.
253. Dubus JC, Margen C, Deschildre A y cols. Local side-effects of inhaled corticosteroids in asthmatic children. Allergy 2001; 56: 944-948.
254. Umazume M, Ueta E, Osaki T. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. J Clin Microbiol 1995; 33: 432-439.

255. Ueta E, Tanida T, Moneda K, Yamamoto T, Osaka T. Increase of Candida cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiology and Immunology* 2001; 16:243-249.
256. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73:171-180.
257. Flaitz CM, Hicks MJ. Oral Candidiasis in children with immune suppression: Clinical appearance and therapeutic considerations. *Journal of Dentistry for children*. 1999; May-June: 161-166.
258. Velegriaki A, Nicolatou O, Theodoridou M, Mostrou G, Legakis NJ. Pediatric AIDS-related linear gingival erythema: a form of erythematous candidiasis? *Oral Pathol Med* 1999; 28:178-82.
259. Bastiaan RJ, Reade PC. The prevalence of *Candida albicans* in the mouths of tobacco smokers with and without oral mucous membrane keratoses. *Oral Surg* 1982; 53 (2):148-151.
260. Coleman G, Beighton D, Chalk A, Wake S. Cigarette smoking and the Microbial Flora of the mouth. *Aust Dent J* 1976; 21: 111-118.

261. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-Oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol 1980; 25:1-10.
262. Rossie K, Guggenheimer J. Oral Candidiasis: clinical manifestations, diagnosis and treatment. Pract Periodontics Aesthet Dent. 1997; 9 (6): 635-641.
263. Ellepola AN, Samaranayake LP. Inhalational and topical steroids and oral candidiasis: a review. Oral Dis 2001; 7: 11-17.
264. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patogeno sobre las mucosas. Rev Soc Ven Microbiol 2001; 21(2).
265. Vidotto V, Yumi Koga-Ito C, Milano R, Fianchino B, Ponton J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans* Rev Iberoam Micol 1999; 16: 208-210.
266. Hostetter MK. Adhesión and morphogenesis in *Candida albicans*. Pediatr Res 1996; 39:569-573.

267. Quindos G, Ponton J. Candidiasis de la cavidad oral: etiología, patogenia y diagnóstico de laboratorio. *Medicina Oral* 1996; 1:85-95.
268. Hube B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:65-68.
269. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*: a review. *Mycoses* 1990; 33: 265-82.
270. Tronchin GD, Poulain and Vernes A. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. Evidence for modifications of the cell wall coat during adherence to human buccal epithelial cells. *Arch Microbiol* 1984; 139: 221-224.
271. Strutevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 90-97.
272. Hostetter MK. Adhesin and ligands involved in the interaction of *Candida* sp with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 29-42.

273. Panizo MM, Reviakina V. Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. Revista de la sociedad venezolana de microbiología 2001; 21(1):5-11.
274. Lopez J, Jane E, Chilenos E, Rosello X. Actualización de la candidiasis oral. Arch Odont 1997; 13(5):259-71.
275. Rodríguez J, Miranda J, Morejon H, Santana JC. Candidiasis de la mucosa bucal. Rev Cubana de Estomatol 2002; 39 (2).
276. Murria P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. Microbiología médica. Londres: Mosby, 1992:297-307.
277. Sandin RL, Rogers A, Beneke E, Fernandez M. Influence of mucosal cell origin on the in vitro adherence of *Candida albicans*. Mycopathologia 1987; 98: 111-119.
278. Biasoli M, Tosello ME, Bottai H, Cuesta C, Magaro HM. Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans* in vitro. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 46-49.

279. Canon RD, Colmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* 1995; 74: 1152-1161.
280. Soll DR, Morrow B, Srikantha Thyagarajan, Vargas Kaare N, Wertz P. Developmental and molecular biology of switching in *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 194-201.
281. Lenander-Lumikari M, Johansson I. Effect of saliva composition on growth of *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10:233-40.
282. Aguirre JM, Verdugo F, Zamacona JM, Quindos G, Ponton J. Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. *Gerodontol* 1996; 13.
283. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63:1993-1998.
284. Cawson RA. Chronic oral candidiasis and leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 22:582-591.

285. Cawson RA, Lehner T. Chronic hyperplastic candidiasis-Candidal leukoplakia. *British Journal of Dermatology*. 1968; 80:9.
286. Renstrup G. Occurrence of *Candida* in oral leukoplakias. *Acta Pathol Microbiol Scand Microbiol Immunol* 1970; 78:421-424.
287. Roed-Peterson B, Renstrup G, Pindborg JJ. *Candida* in oral leukoplakias. A histologic and exfoliative cytologic study. *Scand J Dent Res* 1970; 78:323-328.
288. Lipperheide V, Quindos G, Jiménez Y, Pontón J, Bagán-Sebastián J.V, y Aguirre M. *Candida* biotypes in patines with oral leukoplakia and lichen planus. *Mycopathologia* 1996; 134: 75-82.
289. Read MF, Scragg MA, Williams DM, Soames JV. In vivo effects of *Candida albicans* products on rat oral epithelium *J Oral Pathol Med* 1990; 19:326-9.
290. Krogh P. The role of yeast in oral cancer by means of the endogenous nitrosation. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 85-8.

291. The Oxoid Manual. E Y Bridson. United Kingdon. 1998.
292. Washington JA. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. Springer-Verlag. New Cork, USA.1981.
293. Krogh P, Holmstrup P, Vedtofte P, Pindborg JJ. (1986) Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1987; 63: 48-54.
294. Lin HC, Corbet EF, Lo Ec. Oral mucosal lesions in a adult Chinese. J Dent Res 2001; 80 (5):1486-1490.
295. Mani NJ. Preliminary report on prevalence of oral cancer and precancerous lesions among dental patients in Saudi Arabia. Community Dent Oral Med Oral Epidemiol 1986; 61 (4):247-248.
296. Reichart PA, Kohn H. Prevalence of oral leukoplakia in 1000 Berliners. Oral Dis. 1996 Dec;2(4):291-4.

297. Axell T. A prevalence study of oral mucosal lesions in adult Swedish population. *Odontol Revy* 1976; 27 (36):1-103.
298. Salonen L, Axell T, Hellden L. Ocurrente of oral mucosal lesions, the influence of tobacco habits and an estimate of treatment time in adult Swedish population. *J Oral Pathol and Med* 1990; 19(4):170-176.
299. Reichart PA, Kohn H. Prevalence or oral leukoplakia in 1000 Berliners. *Oral Dis* 1996;2(4):291-294.
300. Seoane J, Bascones A, Ortiz S, Asenjo JA. Leucoplasia Bucal: estudio histopatológico de 55 casos. *Medicina Oral* 1996; 1: 70-8.
301. Bagan JV, Vera F, Milián MA, Peñarroca M, Silvestre FJ, Sanchos JM: Leucoplasia oral: estudio clínico-patológico de 110 casos. *Arch Odontoestomatol* 1993; 3:127-37.
302. Gonzales Lopez B, Gonzalez Huidobro L, Bobadilla Diaz A. Prevalencia de Patología Bucal y de estructuras relacionadas en el paciente geriátrico de la región del estado de México. *Revista ADM* 1995; 3: 129-137.

303. Franks A, Hedegard Bjorn. *Odontologia Geriatrica*. Editorial Labor SA.1976.
304. Creath CJ, Cutre G, Bradley DH, Wright JT. Oral Leukoplakia and adolescent smokeless tobacco use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 72(1): 35-41.
305. Sheifele C, Reichart PA, Dietrich T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol* 2003; 39 (6):619-25.
306. Batsakis JG, Suarez P, El-Nagar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncology* 1999;35:354-9.
307. Navarro CM, Sposto MR, Sgavioli EM, Aparecida M. Transformacion de leucoplasia verrugosa proliferativa en carcinoma oral: diez años de seguimiento. *Med Oral* 2004; 9:229-33.
308. Shiu MN, Chen TH. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Feb; 13(1):39-45.

309. Macigo FG, Mwaniki DL, Guthua SW, Njeru EK. Influence of cigarette filters on the risk of developing oral leukoplakia in a Kenyan population. *Oral Dis.* 2001 Mar;7(2):101-5.
310. Jahanbani J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 Iranian textile workers. *Oral Dis.* 2003 Nov; 9(6):302-4.
311. Ali AA, Al-Sharabi AK, Aguirre JM, Nahas R. A study of 342 oral keratotic white lesions induced by gat chewing among 2500 Yemeni. *J Oral Pathol Med* 2004; 33 (6): 368-72.
312. Mascarenhas AK, Allen CM, Loudon J. The association between Viadent use and oral leukoplakia. *Epidemiology* 2001; 12(6): 741-3.
313. Mascarenhas AK, Allen CM, Moeschberger ML. The association between Viadent use and oral leukoplakia--results of a matched case-control study. *J Public Health Dent.* 2002; 62(3):158-62.
314. Allen CL, Loudon J, Mascarenhas AK. Sanguinaria-related leukoplakia: epidemiologic and clinicopathologic features of a recently described entity. *Gen Dent.* 2001 Nov-Dec;49(6):608-14.

315. Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaque. *Archs Oral Biol* 1996; 41: 27-34.
316. Blot WJ, Winn DM, Fraumeni JF. Oral cancer and mouthwash. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70: 251-3.
317. Mashberg A, Barsa P, Grossman ML. A study of the relationship between mouthwash use and oral and pharyngeal cancer. *J Am Dent Assoc* 1985; 110: 731-4.
318. Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Mouthwash Use and Oral Conditions in the Risk of Oral and Pharyngeal Cancer. *Cáncer Res* 1991; 51:3044-7.
319. Winn DM, Dile SR, Brown LM, Harty LC, Bravo-Otero, Fraumentti JF et al. Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. *Cáncer Causes Control* 2001; 12: 419-29.
320. Eversole LR, Eversole GM, Kopicik J. Sanguinarina-associated oral leukoplakia: comparison with other benign and dysplastic leukoplakic

- lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000; 89: 455-64.
321. Carretero Ma, Esparza G, Figuero E, Cerero R. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Medicina Oral 2004; 9:116-23.
322. Williams JL. Oral Cancer and Precancer: clinical features. Brit Dent J 1990; 168: 13-17.
323. Speight PM and Morgan PR. The natural history and pathology of oral cancer and pre-cancer. Community Dental Health 1993; 10:31-41.
324. Jaber MA, Porter SR, Speight P, Eveson JW, Scully C. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. Oral Oncology 2003; 39:589-596.
325. Lehner T. Chronic candidiasis. Br Dent 1964; 116: 539-545.
326. Lynch DP. Oral candidiasis: History, Classification, and Clinical presentation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78:189-193.

327. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26:1069-89;
328. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JRS, Newcombe RG. Tobacco smoking and denture wearing in oral candida leukoplakia. *Br Dent J* 1983; 155: 340-343.
329. Ribero R, Vidal M<sup>a</sup>C, Vidal I, Orgeira J. Utilidad de las pruebas microbiológicas, histológicas e inmunológicas en el diagnóstico de candidiasis oral. *Revista de la SMEG* 2003; 59: 672-676.
330. Grant T, Mc Intyre. Oral Candidosis. *Dent Update* 2001; 28: 132-139.
331. Mc Cullough M, Jaber M, Barret AW, Bain L, Speiht PM, Porter SR. Oral Yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology* 2002; 38: 391-393.
332. Narhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Salivary yeast, saliva and oral mucosa in the elderly. *J Dent Res* 1993; 72 (6): 1009-114.
333. Oldsen I, Stenderup A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48:11-18.

334. Samaranayake LP, Macfarlane TW. Oral Candidiasis. London, Butterworth & Co. 1990.
335. Lewis MAO, Samaranayake LP, Lamey PJ. Diagnosis and treatment of oral candidosis. *J Oral and Maxillofac Surg* 1991; 49:996-1002.
336. Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 3-10.
337. Ambika K, Shah R, Doshi JJ, Bilmoria KF. Candida in oral Leukoplakia. *Journal Indian Dent Asso* 1984; 56:63-67.
338. Vidas I, Temer K, Zuzic P. Candida albicans in leukokeratotic lesions of oral mucosa. *Acta Stomatol Croat* 1988; 84:149-53.
339. Williams DW, Wilson MJ, Potes AJC, Lewis MAO. Phenotypic characterisation of Candida albicans isolated from chronic hyperplastic candidosis. *J Med Microbiol* 2000, 49:199-202.
340. Barturen B, Quindos G, San Millan R et al. Distribución de los serotipos de Candida albicans en aislamientos clínicos de personas

inmunocompetentes e inmunosuprimidas. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 10-13.

341. Mendoza M, Russian E, Villanueva E, De Torres ED, De Albornoz MB. Sensibilidad de los serotipos A y B de *Candida albicans* y otras levaduras del género *Candida* frente a diferentes azoles. Revista Iberoamericana de Micología 1994; 11:74-76.

342. Spolidorio LC, Martins VR, Nogueira RD, Spolidorio DM. The frequency of *Candida* sp in biopsias of oral mucosal lesions. Pesqui Odontol Bras 2003 Jan-Mar; 17(1):89-93.

343. Cawson RA. Induction of epithelial hyperplasia by *Candida albicans*. Br J Dermatol 1973; 89:497-503.

344. Nagai Y, Takeshita N, Saku T. Histopathologic and ultrastructural studies of oral mucosa with candida infection. J Oral Pathol Med 1992; 21 (4): 171-5.

345. Jennings KJ, MacDonald DG. Histological, microbiological and hematological investigations in denture induced stomatitis. J Dentistry 1990; 5: 34-37.

346. Sitheequ MAM, Samaranayake LP. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidal Leukoplakia. Crit Rev Oral Biol Med 2003; 14 (4); 253-267.
347. Barret AW, Kingsmill VJ, Speight PM. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesion. Oral Diseases 1998; 4: 26-31.
348. Krogh P, Hald B, Holmstrup P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential on infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. Carcinogenesis 1987; 8: 1543-1548.
349. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. Oral Oncology 1998; 34: 304-308.
350. Goldenberg E, Kignel S, Xavier FR, Claudete RP. *Candida albicans*: Frequency and characterization in oral cancer from smokers and drinkers. Rev Iberoam Micol 1997; 14:101-103.
351. Gao Y. Aberrant p53 protein expression in oral candidal leukoplakia. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 1996; May; 31(3):182-4.

352. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol.* 1986 Aug; 15(7):386-8.

## **ANEXO 1**

### **FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

Paciente: \_\_\_\_\_ Sexo: F  M  Edad: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_ Hº Clínica: \_\_\_\_\_

#### **1. Interrogatorio.**

- 1.1 Sintomatología: No  Si   
1.2 Dolor: No  Si  Otros \_\_\_\_\_  
1.3 ¿Desde cuando? -3 m  3-6 m  6-12 m  No recuerda   
1.4 ¿Fuma? No  Si  Cantidad: \_\_\_\_\_ día. Tipo: \_\_\_\_\_ ¿Desde cuando? \_\_\_\_\_  
1.5 ¿Hábito alcohol? No  Si  Tipo: \_\_\_\_\_ ¿Desde cuando? \_\_\_\_\_  
1.6 ¿Utiliza frecuentemente colutorios? No  Si  Especificar: \_\_\_\_\_  
1.7 ¿Presenta alguna fricción crónica? No  Si  \_\_\_\_\_  
1.8 Otras enfermedades: \_\_\_\_\_  
1.9 Portador de Prótesis: \_\_\_\_\_

#### **2. Examen Clínico.**

- 2.1 Fotografías Clínicas: No  Si   
2.2 Lesiones homogéneas: No  Si   
• Localización: \_\_\_\_\_  
• Color: \_\_\_\_\_  
• Textura: \_\_\_\_\_  
2.3 Lesiones No homogéneas - nodular: No  Si   
• Localización: \_\_\_\_\_  
• Color: \_\_\_\_\_  
• Textura: \_\_\_\_\_  
2.4 Lesiones No homogéneas - eritroleucoplasia: No  Si   
• Localización: \_\_\_\_\_  
• Color: \_\_\_\_\_  
• Textura: \_\_\_\_\_  
2.5 Lesiones No homogéneas - exofística: No  Si   
• Localización: \_\_\_\_\_  
• Color: \_\_\_\_\_  
• Textura: \_\_\_\_\_

### **3. Análisis Histopatológico.**

- 3.1 Biopsia Incisional  Excisional
- 3.2 Hiperqueratosis: No  Si
- 3.3 Hiperplasia epitelial: No  Si  Atrofia Epitelial: No  Si
- 3.4 Acantosis: No  Si
- 3.5 Infiltración Inflamatoria: No  Si
- 3.6 Displasia Epitelial: No  Si  Grado L  M  S
- 3.7 Presencia de *Cándida* en tejido:
- Coloración PAS No  Si
  - Coloración de Grocott No  Si

### **4. Análisis Microbiológico.**

- 4.1 Enjuague Oral concentrado: Presencia de Colonias No  Si   
Nº: \_\_\_\_\_ UFC/ml.
- 1.2 Raspado de mucosa: Crecimiento de levaduras: No  Si
- 1.3 Pruebas rápidas:  
Tubos germinales: + \_\_\_ - \_\_\_  
Clamidosporas: + \_\_\_ - \_\_\_
- 4.4 Especie Identificada: \_\_\_\_\_

### **5. Riesgo de Malignización**

- Femenino
- + 50 años
- Hábitos tóxicos: Tabaco-Alcohol
- Localización: Suelo de boca  Borde lateral de lengua  Area retromolar   
Surco vestibular inferior  Labio inferior
- Variedad clínica no homogénea
- Largo tiempo de evolución
- Displasia
- Enfermedad favorecedora precancerosa

## **ANEXO 2**

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
CATEDRA DE CLÍNICA ESTOMATOLOGICA  
MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Basado en la Declaración de Helsinki de la Asociación Medica Mundial

Caracas, \_\_\_\_\_.

Yo, \_\_\_\_\_ portador de la cédula de identidad \_\_\_\_\_, por medio de la presente consiento someterme al procedimiento diagnóstico y quirúrgico ordenado por la **Od. Gina Paola Varón Scovino.**

Se me ha explicado que el mismo forma parte de una Investigación Clínica cuyo protocolo se denomina "**Detección e identificación de especies de *Candida* en pacientes con lesiones leucoplásicas de cavidad bucal**", su finalidad y objetivos se me han informado claramente.

Me encuentro satisfecho con estas explicaciones, las he comprendido, por lo que consiento participar libre y voluntariamente en la referida Investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma del Paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del Odontólogo