
Evaluación ultraestructural del *Pneumocystis carinii*.

David Parada D.¹, Eduardo Caleiras¹, Rosa M. Farías C.²,
Saudy Escorihuela-García¹, Jorge García Tamayo¹.

¹Unidad de Investigación, Instituto de Anatomía Patológica
Dr. J. O'Daly y ²Departamento de Medicina Interna.
Hospital Universitario de Caracas. Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Ultraestructura, *Pneumocystis carinii*, neumonía.

Resumen. El *Pneumocystis carinii* (PNC) continúa siendo un reto ya que su taxonomía no ha sido completamente dilucidada. El PNC pareciera ser una quimera con características de parásito y de hongo. El objetivo del presente trabajo es estudiar por medio del microscopio electrónico de transmisión los diferentes estadios presentes en el PNC y correlacionar estos hallazgos con la información bibliográfica para contribuir a su posible clasificación taxonómica. El estadio trófico fue la forma más frecuentemente encontrada en el espacio alveolar y estuvo constituida por organismos que variaron tanto en forma como en tamaño, llegando a medir de 6 a 20 micras. Los quistes podían ser redondos u ovals, con diámetros que oscilaron entre 4 a 12 micras, en su interior se observó un número máximo de cuatro cuerpos intraquisticos, limitados individualmente por membrana celular y con conexiones entre la membrana de distintas estructuras intraquisticas e inclusive, uniones entre éstas y la membrana celular interna del quiste. Nuestro estudio ultraestructural coincide con otros hallazgos que ubican a este interesante microorganismo patógeno dentro del reino de los hongos, probablemente relacionándolo con los Ascomicetos no gemantes.

An Ultrastructural evaluation of *Pneumocystis carinii*.

Invest Clin 1998; 39(4) : 293-306.

Key words: *Pneumocystis carinii*, ultrastructure, neumonia.

Abstract. The *Pneumocystis carinii* (PNC) is a challenge, because its taxonomy has not been completely explained. PNC seems to be a chimera with fungal and parasitic characteristics. The objective of the present study is to analyze the different stages observed in PNC using transmission elec-

tron microscopy in order to correlate them with bibliographic reports regarding a possible taxonomic classification. The trophic stage was the form most frequently encountered in alveolar spaces and their organisms varying in size and shape from 6 to 20 microns. Cyst were round or oval, with diameters ranging between 4 and 12 microns, showing four intracystic bodies were individually limited by a membrane. Connections between the membrane of intracystic bodies and junctions between them and the inner cell membrane of the cyst wall were also observed. Our ultrastructural findings appear to be in agreement with several reports which considered PNC among the fungi, most likely related them to the non-gemating *Ascomycetes*.

Recibido: 28-11-97. Aceptado: 16-4-98.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del *Pneumocystis carinii* (PNC) como el agente causal de neumonías ha producido un profundo interés en este microorganismo (1). Cuando el Dr. Carlos Chagas en el año de 1909 consideró al microorganismo conocido ahora como PNC como parte del ciclo del *Trypanosoma cruzi* (2), se complicó la interpretación taxonómica actual del mismo. El PNC parece ser una quimera entre hongo y parásito; parásito con cápsula de hongo (3, 4), u hongo con esporas móviles (1, 3), que responde a las drogas antiparasitarias pero no a las antimicóticas (5).

El objetivo del presente trabajo es estudiar por medio del microscopio electrónico de transmisión los diferentes estadios presentes en el *Pneumocystis carinii* en pacientes autopsiados HIV (+) con diagnóstico de SIDA, y correlacionar los hallazgos ultraestructurales con la información bibliográfica actual para

contribuir a su posible clasificación taxonómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

De un total de 62 autopsias con diagnóstico de SIDA realizadas desde el mes de Enero 1995 hasta el mes de Julio de 1996, en el Instituto Anatomopatológico J. O'Daly de la Universidad Central de Venezuela (UCV), se pudo obtener en 45 de ellas (72,58%) muestras de ambos pulmones que se procesaron para ser estudiados con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión.

Del material de pulmón fijado con formalina amortiguada a pH 7.0, se tomaron muestras las cuales fueron deshidratadas con alcoholes a concentraciones crecientes (70, 80, 90, 100%) e incluidas en parafina; posteriormente se obtuvieron cortes de 4 a 6 μm los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H-E) e impregnación de plata (Grocott). En aquellos casos en los cuales se observó con H-E exudado al-

veolar eosinofílico, engrosamiento de los septos alveolares e infiltrado inflamatorio mononuclear y/o cuando se detectó la presencia de quistes de *Pneumocystis carinii* con la impregnación de Grocott, se regresó al material fijado en formol amortiguado y se tomaron muestras de las áreas correspondientes a los cortes del material incluido en parafina las cuales fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión.

Del material pulmonar fijado se tomaron entre 10 a 15 fragmentos de $1 \times 1 \text{ mm}^3$ aproximadamente, los cuales se procesaron utilizando el siguiente procedimiento: el material se lavó durante 24 horas a temperatura de 4°C en una solución de buffer cacodilato pH 7.2, posteriormente el material fue post-fijado en tetraóxido de osmio al 2% durante 1 min 30 seg (tiempo fraccionado a 30 seg) en un horno de microondas de 800 Watt de salida, con poder 1. El tiempo fraccionado fue debido al poder de generar calor en presencia del Osmio. El lavado subsiguiente y la deshidratación del material se llevó a cabo en el mismo horno de microondas de la siguiente forma: lavado con agua destilada con poder 1 durante 15 seg; deshidratación con alcoholes crecientes a partir de 50% hasta 100%, durante 20 seg a poder 1 en cada paso. Posteriormente se realizaron 2 cambios de 20 min cada uno en óxido de propileno y la infiltración se realizó colocando las muestras en mezclas de epon-araldita con óxido de propileno en proporción 1:3, 1:1, 3:1 durante dos

horas y finalmente 24 horas en la resina constituida por epon-araldita. Los fragmentos de tejido se incluyeron finalmente en un molde de silicona y se dejaron polimerizar con epon-araldita con acelerador (DMP X30) a 60 grados durante 48 horas. Los cortes semi-finos de $1 \mu\text{m}$ se realizaron con un ultramicrotomo, Porter Blum MT-2 y fueron teñidos con azul de toluidina para luego seleccionar las muestras y las regiones de interés y hacer los cortes ultrafinos a ser examinados con el microscopio electrónico. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y finalmente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi modelo H 500 operado con 85 Kv. de aceleración y las fotografías se tomaron con aumentos entre 3000 y 20000 X.

RESULTADOS

En 45 (72,58%) autopsias de pacientes HIV (+) enfermos de SIDA se obtuvo material para estudio histológico, histoquímico y ultraestructural. Las edades de los pacientes estuvieron entre 18 y 63 años con una edad promedio de 36, 94 años. Treinta y nueve pacientes fueron masculinos y 6 femeninos. En 11 casos, todos del sexo masculino, se pudo evidenciar con hematoxilina-eosina la presencia de exudado eosinófilo espumoso alveolar, engrosamiento difuso de los septos alveolares e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario, con la impregnación de Grocott se pudo demostrar la

presencia de estructuras redondeadas de 5 a 7 μm de diámetro con una zona más oscura en la pared, lo que representó estructuras quísticas del *Pneumocystis carinii* (Fig. 1).

Los hallazgos ultraestructurales estuvieron basados en la observación de los casos en los que el estudio de microscopía de luz, tanto con hematoxilina-eosina e histoquímica habían demostrado la presencia de cambios histológicos característicos de infección por PNC, así como la presencia de estructuras quísticas.

Estadio Trófico

Fueron las formas parasitarias más frecuentemente encontradas en el espacio alveolar y estuvieron constituidas por organismos que variaron tanto en forma como en tamaño (Fig. 2). Las estructuras unicelulares pequeñas midieron de 1 a 3 micras y mostraron ser redondas u ovals con un citoplasma claramente definido; la membrana plasmática midió 25 nm y estaba constituida por una porción interna delgada electrondensa y una región externa electronlucente y en la superficie celular se vieron proyecciones citoplasmáticas. En el interior de estos organismos pequeños se pudo evidenciar la presencia de un núcleo recubierto por una membrana, generalmente dispuesto hacia la periferia del citoplasma donde se observaron gránulos electrodensos, estructuras semejante a retículo endoplasmático rugoso (RER) y vacuolas de lípidos (Fig. 3). Estas formas gracias a su apariencia relativamente

densa fueron identificadas en microfotografías electrónicas con aumentos que variaron entre 10000 x a 20000 x. El segundo tipo de forma trófica fue la grande llegando a medir entre 4 a 8 micras. Se observaron complejas estructuras de apariencia vacía ubicadas en los alvéolos acompañadas de escasa cantidad de fibrina y de restos celulares (Fig. 2); la configuración morfológica fue difícil de precisar, ya que en su superficie estos organismos presentaron innumerables proyecciones túbulo-membranosas (PTM), más numerosas que en las formas pequeñas, ya descritas, mostrando además irregulares protrusiones e invaginaciones de la membrana celular lo que impidió determinar adecuadamente su forma. El citoplasma era menos electrondenso que en las formas pequeñas, mostró una apariencia vacía, con algunos gránulos de glucógeno, escasas vacuolas de lípidos y estructuras semejantes a RER; no se observaron estructuras semejantes a mitocondrias. El núcleo se encontró dispuesto hacia la periferia, adosado, en la mayoría de los casos a la membrana citoplasmática. El número y la apariencia de las formas tróficas observadas fue similar en cada uno de los casos evaluados. A mayor aumento se pudo distinguir claramente como ciertas zonas las PTM de las formas tróficas se plegaban formando estructuras complejas y de grosores variables, las cuales en los cortes transversales mostraban apariencias tubulares y concéntricas, con una porción central electrondensa

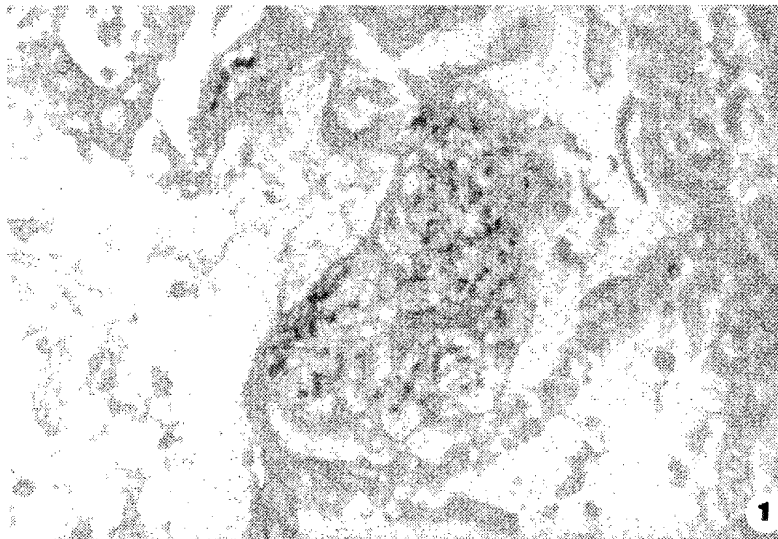


Fig. 1. Tinción de metanemina de plata (Grocott), observándose múltiples quistes de PNC, algunos muestran engrosamiento focal de la cápsula. Nótese la variabilidad de tamaño entre ellos.

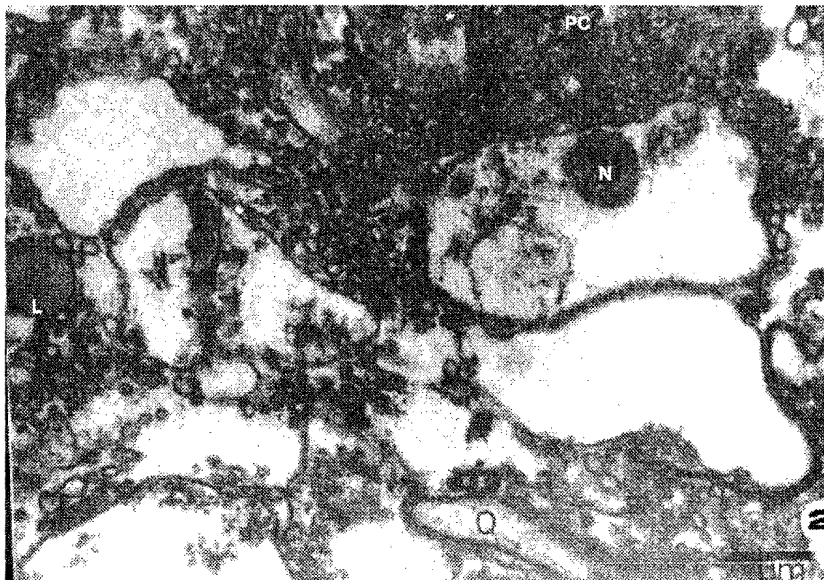


Fig. 2. Microscopía electrónica de transmisión donde se evidencian múltiples formas tróficas en diferentes estadios evolutivos, algunos con material nuclear (N), presencia de vacuolas de lípidos (L), diversas proyecciones celulares (PC) y fragmento de la pared de un quiste (Q). (*) Forma pequeña del estadio trófico. (Aumento x 15000).

sin que pudieran observarse elementos citoplasmáticos; estas proyecciones se interdigitaban con procesos similares provenientes de otras formas tróficas (Fig. 4).

Quistes

Este estadio mostró variación en la forma, las cuales podían ser redondeadas u ovales pasando por semilunares e inclusive observándose formas alargadas, con diámetros que oscilaron entre 4 a 12 micras. La pared celular midió aproximadamente 140 nm de espesor y estuvo constituida por tres capas; la más profunda, la membrana plasmática, constituida por dos porciones estrechamente adyacentes con un espesor total que varió entre 5 a 10 nm, la porción intermedia, finamente granular electronlucente con un grosor de 40 a 80 nm y por último la capa externa, electrodensa y con un espesor que varió entre 20 a 50 nm. En la mayoría de los casos, las porciones medias y externas no estuvieron claramente separadas. Se pudo evidenciar un engrosamiento polar y focal en la pared del quiste, dado principalmente por un aumento en el espesor de la capa media; este engrosamiento era independiente del tamaño y la forma del quiste (Fig. 5).

En el interior de los quistes se observó un número máximo de cuatro cuerpos intraquísticos por corte, la forma de ellos varió entre redonda u ovalada (Figs. 6 y 7). Cada cuerpo parecía contener un núcleo, RER escaso y una estructura semejante a una mitocondria, la cual, ocasionalmente se presentaba más electron-

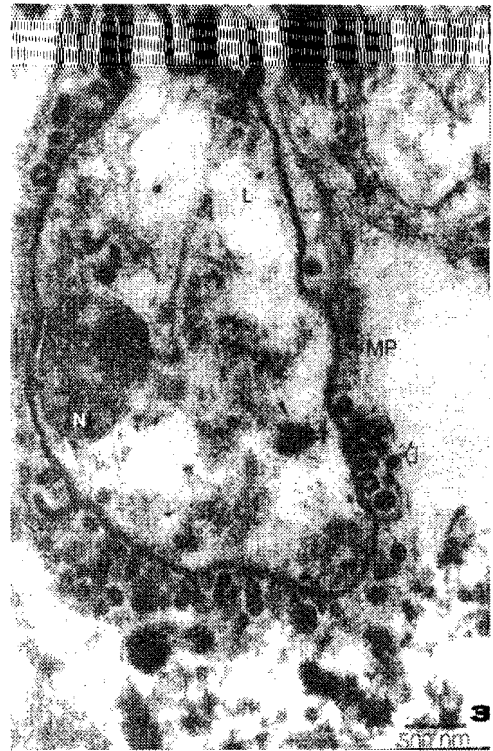


Fig. 3. Forma trófica rodeado por su membrana plasmática (MP), con presencia de proyecciones citoplasmáticas en diferentes áreas del mismo (Flechas vacías), en el interior llama la atención su núcleo (N), gránulos electron-densos (Cabeza de flechas), vacuolas de lípidos (L) y escasos ribosomas libres (*). En el margen superior derecho se demuestra un fragmento de una mitocondria (M). (Aumento x 32000).

densa. La densidad de los organismos intraquísticos varió de caso a caso. Se observó una membrana celular que envolvía individualmente cada cuerpo y se vieron conexiones entre la membrana de distintas estructuras intraquísticas e inclusive se evidenciaron uniones entre éstas

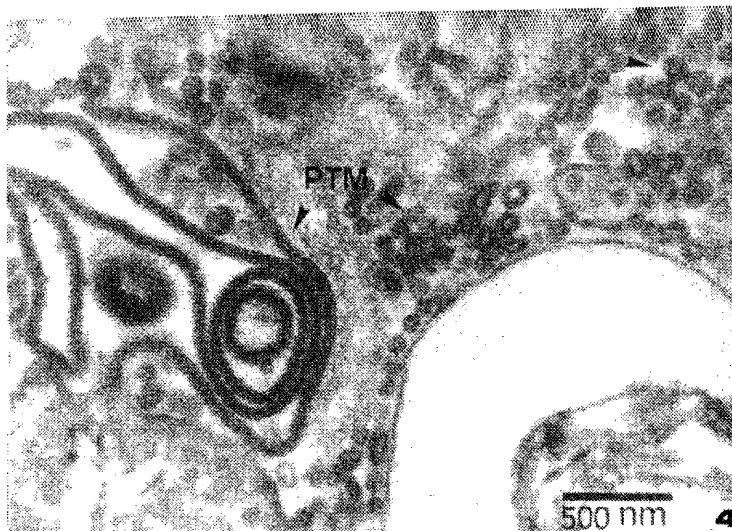


Fig. 4. Detalle de las proyecciones túbulo-membranosas (PTM), seccionadas en diferentes direcciones (Cabezas de flechas) y constituidas por los mismos elementos que conforman las membranas plasmáticas de los estadios tróficos (Aumento x 40000).

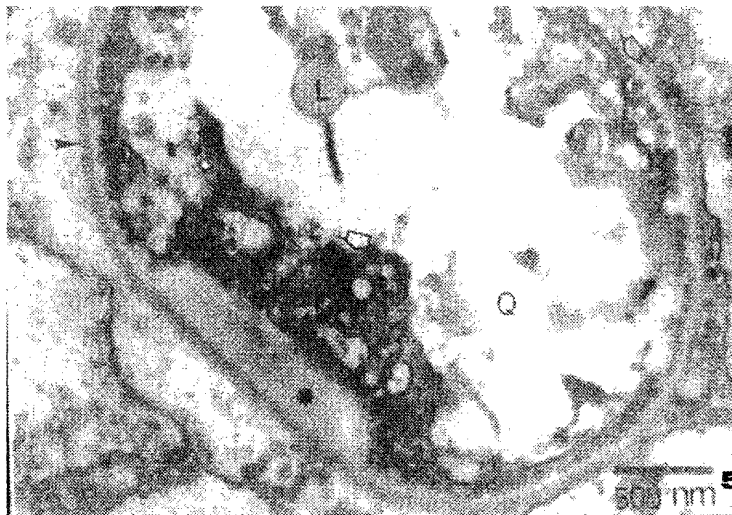
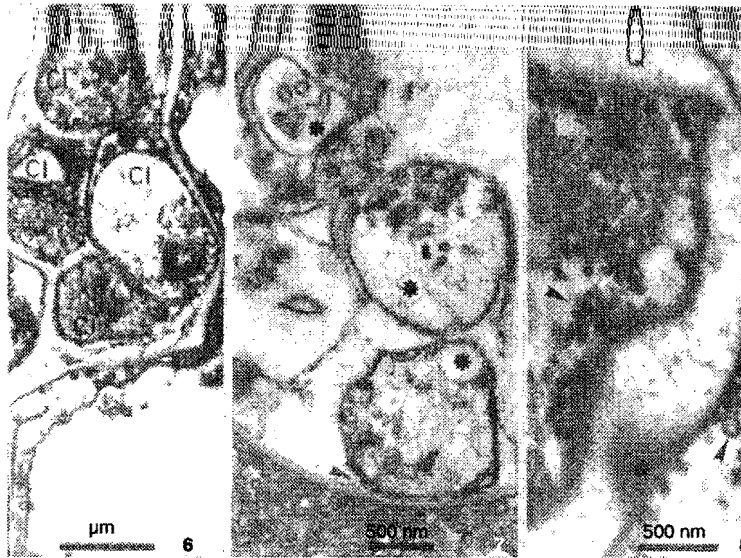


Fig. 5. Quiste característico de PNC (Q). Se demuestra la constitución de su pared (Cabeza de flechas); La zona conocida como la mancha oscura está dada por un engrosamiento focal de la porción media de la pared celular (*). En el interior del quiste se aprecian vacuolas de lípidos (L), existen así mismo proyecciones citoplasmáticas intraquisticas similares a las observadas en el exterior (Flechas vacías). (Aumento x 36000).

y diferentes puntos de la membrana celular interna del quiste (Fig. 7). En



- Fig. 6. Quiste con forma irregular, en cuyo interior se evidencian cuatro (4) cuerpos intraquísticos (CI). (Aumento x 17000).
- Fig. 7. Detalles de cuerpos intraquísticos (*) donde se demuestra el estrecho contacto entre dichas estructuras y la pared interna del quiste (Cabeza de flechas). (Aumento x 25000).
- Fig. 8. Quiste (Q) con proyecciones túbulo-membranas en su interior con características similares a las observadas en la periferia del quiste (Cabeza de flechas). Nótese la región más electrondensa de la pared quística con proyecciones (*). (Aumento x 30000).

otros quistes se observó desaparición de los cuerpos intraquísticos con presencia de cuerpos intraquísticos vacíos similares a las descritas en los estadios tróficos y rodeados de estructuras membranas tubulares (Fig. 8).

DISCUSIÓN

La primera descripción de un agente patógeno de aspecto parasitario en el tejido pulmonar humano se remonta al año de 1909 cuando Carlos Chagas encontró una forma de *Leishmania* en el espacio alveolar de cobayos así como en un lactante menor desnutrido fallecido en Bra-

sil; al estudiar morfológicamente estas formas parasitarias, Chagas concluyó que se trataban de formas sexuales del *Trypanosoma cruzi* (2). Este nuevo descubrimiento llamó la atención de otro investigador, Antonio Carinii, que decidió intercambiar material con Charles Laveran quién en aquel entonces trabajaba en el Instituto Pasteur de París. De este intercambio de material e información, se concluyó con el reconocimiento de un organismo que afecta predominantemente al pulmón y que fue bautizado por Delanõe en 1912 con el nombre de *Pneumocystis carinii* (6).

Este microorganismo continúa siendo un reto para micólogos y parasitólogos, ya que su taxonomía no ha sido completamente dilucidada. Uno de los principales problemas para el estudio de este microorganismo es la falta de cultivos celulares en los cuales el agente patógeno crezca con resultados reproducibles y confiables, por lo que muchas de sus características biológicas no han sido completamente estudiadas (7, 8). Otro problema asociado al estudio del PNC es la fuente de material biológico en esta infección, la cual ha sido a partir de ratas y/o de humanos inmunosuprimidos; cuando el exudado pulmonar proviene de estos últimos, es fuente de microorganismos asociados, de modo que al PNC se le suman una gran cantidad de otras bacterias, hongos o protozoarios presentes en condiciones de una inadecuada respuesta inmune (9). Además, la comparación de diferentes sistemas de cultivo para el PNC, plantea variaciones en el crecimiento y la dinámica propia de los cultivos, lo que hace muy difícil lograr métodos aplicados a la cuantificación del crecimiento de estos microorganismos (7, 8). Otros estudios han demostrado diferentes fracciones tanto del ADN como del ARN del PNC, esto con la finalidad de tratar de estudiar en que grupo taxonómico deberían incluirse estos enigmáticos microorganismos (10-17). Estudios recientes han permitido evidenciar una mayor similitud con los hongos que con los parásitos (3). Estos hallazgos han permitido orientar la posible clasificación taxonómi-

ca del *Pneumocystis carinii* con antecesoros filogenéticos de los grupos *Myxomycota* o *Zygomycota* considerados como hongos (9, 16). En el ciclo vital del PNC, sólo dos estadios han sido descritos en los seres humanos y en otros vertebrados: la forma trófica y el quiste. En todos nuestros casos la presencia de exudado eosinofílico acompañado de engrosamiento de los septos alveolares con grados variables de infiltrado inflamatorio mononuclear sirvieron como datos diagnósticos histológicos en la neumonía por PNC.

La ultraestructura del PNC es compleja y por ello observamos múltiples divergencias en la literatura; ellas posiblemente están relacionadas con la presencia de problemas técnicos en el procesamiento de las muestras para el estudio con el microscopio electrónico, así como con la naturaleza incierta de la taxonomía del PNC lo que conlleva a interpretaciones erróneas de los hallazgos ultraestructurales (1, 18). La primera forma descrita es el estadio trófico, se le denominó también trofozoito, término usado en el supuesto de que el PNC era un parásito y por lo tanto se pensó en que la forma trófica constituía la forma metabólicamente activa del mismo (1, 4, 18). La forma trófica se caracteriza por la apariencia vacía o vacuolización citoplasmática, lo cual puede deberse al tiempo en que se realizó la fijación o puede ser debido al tipo de fijador (1, 19); durante la vacuolización, el citoplasma puede distenderse y la membrana celular puede adherirse al núcleo y producir la

imagen de una gran célula polimorfa vacía con un núcleo localizado en uno de sus extremos. El estudio ultraestructural nos ha mostrado que algunas formas tróficas se presentan como estructuras esféricas u ovals, se cree que estas son las formas jóvenes recién expulsadas de los quistes las cuales posteriormente se tornarían más grandes y pleomórficas, llegando a medir entre 2 a 10 micras (4, 20, 21). Estas formas jóvenes pudieran corresponder a las formas tróficas pequeñas observadas en el presente estudio. En el parénquima pulmonar las formas tróficas intralveolares, a menudo se observan histológicamente como una masa espumosa llenando el espacio alveolar y se pueden ver unidas a los Neumocitos tipo I; estos hallazgos fueron confirmados por nosotros. Demostramos formas tróficas con expansiones tubulares muy características aunque no parece estar muy claro cual es la distribución topográfica de ellas y el significado funcional de las mismas (4, 21), nosotros señalamos que estas proyecciones parecen originarse en diferentes puntos del cuerpo celular. Otra observación que ha producido múltiples controversias es la presencia de las estructuras túbulomembranas en la membrana de las formas tróficas, las cuales han mostrado ciertas semejanzas ultraestructurales con los mixovirus (1), o han sido interpretadas como filopodios o pseudopodia, sin embargo la ausencia de partículas alimenticias englobadas dentro de ellas parecería contradecir esta hipótesis (1, 22);

consideramos lógico que estas formaciones membranas puedan servir como estructuras de anclaje y/o de intercambio nutricional, ya que la fagocitosis aparentemente no existe en este organismo y por lo tanto la nutrición debe llevarse a cabo a partir de sustancias de bajo peso molecular (4, 22). La movilidad de los túbulos conectados con la membrana plasmática, alrededor de los trofozoítos facilitaría esta función. Nosotros no observamos la presencia de fagocitosis y por el contrario consideramos que las proyecciones túbulomembranas servirían para aumentar la superficie de absorción de este microorganismo corroborando su función principal como nutricional. Es muy probable que en el estadio trófico se produzca algún tipo de fusión binaria, algunos de nuestros hallazgos sugieren dicha posibilidad y favorecen la teoría planteada por Yoshida (4), aunque la respuesta final a este tipo de multiplicación todavía espera por adecuados medios de cultivos.

El quiste, probablemente es la forma de resistencia de este microorganismo y se encuentra en el espacio alveolar o se presenta unido a los Neumocitos tipo I (1, 4, 18, 21, 23). Histológicamente la impregnación con metanemina de plata de Grocott (24), muestra el quiste con una gruesa pared celular y una zona más oscura, característica y conocida con el nombre de mancha oscura (4, 21), este hallazgo permitió la comprobación morfológica de la presencia del PNC en todos nuestros casos. Esta mancha oscura parece

estar en relación con el proceso de ruptura y salida del contenido del quiste (4). Por otro lado, Itatani (25), recientemente ha demostrado la formación de un poro en la pared del quiste a través del cual se produce la salida del material que contiene en su interior. La forma de los quistes es sumamente variable probablemente debido a los diferentes estadios evolutivos en que se encuentran los mismos (4, 18, 21). En el presente estudio evidenciamos dicha variación en la forma de las estructuras quísticas y las mismas estuvieron rodeadas por múltiples microorganismos en diversos estadios tróficos, sin embargo no observamos la presencia de poros a través de la pared de los quistes y la región conocida como la mancha oscura fue visible en lo que parecían ser diferentes estadios de maduración de las formas quísticas. La pared del quiste es teñida con una variedad de coloraciones para polisacáridos, tales como la impregnación de meta-nemina de plata (24) y la tinción de Azul de Anilina (26), la cual bajo las mismas concentraciones y condiciones es capaz de teñir tanto al *S. cerevisiae* como al *P. carinii*; esta tinción así como el calcofluor blanco (27, 28) utilizado en nuestra investigación, es muy específica para glicanos de configuración beta 1,3 los cuales son constituyentes importantes de la pared de múltiples hongos y por lo tanto también señala ciertas similitudes morfológicas y bioquímicas de la pared del quiste del PNC y las observadas en otros hongos. Desde 1994, nosotros utilizamos al

calcofluor blanco como una herramienta diagnóstica en los casos de sospecha de neumonía por PNC. Las formas maduras de los quistes presentan ocho cuerpos intraquísticos, cada uno de los cuales han sido clasificados de acuerdo a su forma en esféricos, alargados y pleomórficos (4). El número máximo de cuerpos intraquísticos en nuestro estudio fue de cuatro en cada quiste lo cual pudiera estar relacionado con sus estadios evolutivos. Diferentes trabajos han mostrado que los cuerpos intraquísticos originados en el interior del quiste, hacen contacto en algunos puntos con la porción interna de la membrana plasmática del quiste, este hallazgo ultraestructural fue encontrado en algunas estructuras quísticas del presente estudio. La implicación de este hecho está relacionada con la formación de membranas del cuerpo intraquístico el cual parece originarse a partir de dos situaciones, la más importante sería la síntesis de novo y en segundo lugar la invaginación de la membrana citoplasmática podría también contribuir a este proceso (1).

Las formas tróficas del PNC emergerían de los quistes y pudieran tratar de compararse con aquellos protozoarios que presentan esporas o formación de quistes dentro de los cuales tenemos los protozoarios del *subphylum Sarcodina*, con trofozoítos que al contrario del PNC muestran organelas citoplasmáticas más complejas, un aparato de Golgi con 2 a 5 cisternas, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias con crestas tubulares (29), estructuras

estas que no fueron observadas en el estudio ultraestructural presente; otro punto de discrepancia entre el PNC y las Sarcodinas lo constituiría la presencia inequívoca de apéndices locomotores en estas últimas, los cuales están constituidos por citoplasma hialino y contienen pequeños elementos formados en el interior de la célula como son partículas de glucógeno, ribosomas libres, vesículas, túbulos y presencia de estructuras fibrilares (18, 29), las cuales no son comparables a las estructuras túbulomembranosas ya que éstas parecen estar constituidas exclusivamente por proyecciones de la membrana celular sin que puedan evidenciarse en su interior partículas provenientes del citoplasma parasitario. Otros protozoarios comparables ultraestructuralmente con el PNC podrían ser los de la clase *Sporozoa*, pero la ausencia del complejo anterior, del anillo polar, los micronemas y un aparato de Golgi bien constituido descarta esta similitud (16, 18). Dentro del *phylum* de los *Microspora* se encuentra una clase, la *Haplosporea* (30, 31) en la cual los protozoarios no poseen conoide, sin embargo ni los estadios de plasmodio ni el de esporas de estos parásitos se asemeja estructuralmente a el PNC (30, 31).

Para concluir podemos mencionar que la infección por *Pneumocystis carinii* continúa siendo una de las principales causas de morbilidad en los pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y particularmente en los enfermos de SIDA, por lo que es necesaria-

rio incrementar las medidas profilácticas en estos pacientes las cuales pueden mejorar basadas en las contribuciones actuales sobre la biología celular del PNC. Nuestro estudio ultraestructural coincide con otros hallazgos que ubican a este interesante microorganismo patógeno dentro del reino de los hongos, probablemente relacionándolo con los *Ascomycetos* no gemantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VAVRA J., KUCERA K.: *Pneumocystis carinii* Delanoë, its Ultrastructure and Ultrastructural Affinities. *J Protozool* 1970; 17:463-483.
2. CHAGAS C.: Nova Tripanozomíaze Humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 159-218.
3. KWON-CHUNG K.J.: Phylogenetic Spectrum of Fungi that Are Pathogenic to Humans. *Clin Inf Dis* 1994; 19 Suppl 1:1-7.
4. YOSHIDA Y.: Ultrastructural Studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 1989; 1: 53-60.
5. MASUR H.: Clinical Studies of *Pneumocystis carinii* and Relationships to AIDS. *J Protozool* 1989; 36:70-74.
6. DELANOE P., DELANOE M.M.E.: Sur les Rapports des Kystes de Carini du Poumon des Rats Avec le Trypanosoma lewisi. *C R Acad Sci* 1912; 155:658-660.
7. ARMSTRONG M.Y., RICHARDS F.F.: Propagation and Purification of Rat *Pneumocystis carinii* in Short-Term Cell Culture.

- J Protozool 1989; 36 (Suppl 1): 24-27.
8. CUSHION M.T., RUFFOLO J.J., WALZER P.D.: Analysis of the Developmental Stages of *Pneumocystis carinii*, *In Vitro*. Lab Invest 1988; 58:324-331.
 9. CUSHION M.T.: *In Vitro* Studies of *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36:45-52.
 10. FISHMAN J.A., ULLU E., ARMSTONG M.Y., RICHARDS F.F.: Organization of DNA from Rat *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):4-5.
 11. WAKEFIELD A.E., HOPKIN J.M., BURNS J., HIPKISS J.B., STEWART T.J., MOXON E.R.: Cloning of DNA from *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):5-7.
 12. WOODMANSEE D.B., LEE CH., BARTELT M.S., SHAW M.M., SMITH J.W.: Development of DNA Probes for *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):7-9.
 13. WORLEY M.A., IVEY M.H., GRAVES D.C.: Characterization and Cloning of *Pneumocystis carinii* Nucleic Acid. J Protozool. 1989; 36 (Suppl 1):9-11.
 14. CUSHION M.T., BLASE M.A., WALZER P.D.: A Method for Isolation of RNA from *Pneumocystis carinii*. J Protozool. 1989; 36 (Suppl 1):12-13.
 15. STRINGER S.A., HUDSON K., BLASE M.A., WALZER P.D., CUSHION M.T., STRINGER J.R.: Sequence from Ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* Compared to those of Four Fungi Suggests an Ascomycetous Affinity. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):14-16.
 16. WATANABE J.I., HORI H., TANABE K., NAKAMURA Y.: 5S Ribosomal Sequence of *Pneumocystis carinii* and its Phylogenetic Association with "Rhizopoda / Myxomycota / Zygomycota Group". J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):16-18.
 17. EDMAN J.C., KOVACS J.A., MASUR H., SANTI D.V., ELWOOD H.J., SOGIN M.: Ribosomal RNA Genes of *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):18-20.
 18. HAQUE A., PLATTNER S.B., COOK R.T., HART M.N.: *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as Viewed by Electron Microscopy. Am J Clin Pathol 1987; 87:504-510.
 19. GOHEEN M.P., BLUMERSHINE R., BARTLETT M.S., HULL M.T., SMITH J.W.: Improved Intracellular Morphology of *Pneumocystis carinii* from Rat Lung by Postfixation with a Mixture of Potassium Ferrocyanide and Osmium Tetroxide. Biotechnic & Histochemistry. 1992; 67: 140-148.
 20. GUTIERREZ Y.: The Biology of *Pneumocystis carinii*. Sem Diagn Pathol. 1989; 6:203-211.
 21. BEDROSSIAN C.W.: Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*: A review of Internal and Surface Characteristics. Sem Diagn Pathol 1989; 6: 212-237.
 22. MURPHY M.J., PIFER L.L., HUGHES W.T.: *Pneumocystis*

- carinii* In Vitro. A Study by Scanning Electron Microscopy. Am J Pathol 1977; 86:387-394.
23. BARTON E.G., CAMPBELL W.G.: Further Observations on the Ultrastructure of *Pneumocystis*. Arch Pathol. 1967; 83:527-526.
 24. GROCOTT R.G.: A Stain for Fungus in Tissue Sections and Smears Using Gomori's Methenamine Silver Nitrate Technic. Am J Clin Pathol 1955; 256:975-979.
 25. ITATANI C.A.: Ultrastructural Demonstration of a Pore in the Cyst Wall of *Pneumocystis carinii*. J Parasitol 1994; 80:644-648.
 26. MATSUMOTO Y., MATSUDA S., TEGOSHI T.: Yeast Glucan in the Cyst Wall of *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36 (Suppl 1):21-22.
 27. ALLERBERGER F., PRIOR C., NIEDERWIESER D., DIERICH M.: Calcofluor White Staining in the Identification of *Pneumocystis carinii*. Pneumol 1992; 46:158-159.
 28. COTE F., OUAKFAOUI S., ASSELIN A.: Detection of Beta-Glucanase Activity on Various Beta 1,3 and Beta 1,4 after Native Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Electrophor. 1991; 12:69-74.
 29. BOWERS B., KORN E.D.: The Fine Structure of *Acanthamoeba Castellanii*. The Trophozoite. J Cell Biol. 1968; 39:95-111.
 30. PERKINS F.O.: Electron Microscope Studies of Sporulation in the Oyster Pathogen, *Minchinia Costalis* (Sporozoa: Haplosporida). J Parasitol 1969; 55: 897-920.
 31. ROSENFELD A., BUCHANAN L., CHAPMAN G.B.: Comparison of the Fine Structure of Spores of Three Species in *Minchinia* (*Haplosporida*, *Haplosporodiidae*). J Parasitol 1969; 55: 921-941.