

11262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
SEDE CENTRO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

**“EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE COMO
INDUCTOR DE RESISTENCIA EN *Candida albicans*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A**

DR. ERIC MOISÉS FLORES RUIZ



TUTOR

DR. HUMBERTO DIAZ PONCE



COTUTORES

DRA. MARIA GUADALUPE MIRANDA NOVALES
DR. HECTOR CORTES AROLLO

México D. F. Junio del 2005

m346459



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

RESUMEN

Introducción: La radiación en mucosa oral aumenta la colonización y candidiasis oral, la respuesta a tratamiento y la erradicación de *Candida* son difíciles de alcanzar

Objetivo: Determinar si la radiación ionizante induce resistencia a antimicóticos en *Candida albicans*

Hipótesis: Después de la exposición a radiación *Candida albicans* desarrollará resistencia a polienos y/o azoles en el 25% de las cepas

Material y Métodos: Estudio prospectivo, longitudinal comparativo, en los Hospitales de Oncología y Pediatría del CMN SXXI del IMSS. Se incluyeron cepas de *Candida* obtenidas de mucosa oral en pacientes que iniciaron radioterapia, se tomaron cultivos antes, durante y al final de la radioterapia; cuando en los diferentes cultivos de un paciente se aisló *Candida albicans* se realizó Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (EGCP) para verificar se tratara de la misma cepa, y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria a polienos y azoles.

Resultados: 87 pacientes completaron el estudio, la colonización basal-final por *Candida* fue de 51 y 63%; respectivamente. En 33 pacientes *C. albicans* se aisló en los diferentes tiempos de cultivo, en 31 el cariotipo fue idéntico mediante EGCP. Al análisis de CMI: anfotericina B, 1 cepa incrementó su CMI sin llegar a ser resistente; fluconazol, 2 cepas incrementaron la CMI sin llegar a ser resistentes y 1 la disminuyó; ketoconazol e itraconazol, ninguna cepa sufrió modificaciones.

Conclusiones: 1) la radioterapia favorece la colonización en mucosas por *Candida*, 2) los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la radiación ionizante no induce resistencia a antimicóticos en *Candida albicans*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Eric Moisés Flores Ruiz
FECHA: 04-07-2017
FIRMA: [Firma]

Este trabajo esta dedicado a mi familia, Brenda, Brenda Mercedes y David, que me han tolerado y apoyado en los momentos de desesperación

Dr. Humberto Díaz Ponce quien más que mi tutor es mi amigo

Dr. Fortino Solórzano Santos, por su orientación y amistad

QFB Blanca Leños Miranda, invaluable participación en los procedimientos de laboratorio

Y a todas aquellas personas que directa o indirectamente participaron en la realización de este trabajo

INDICE

RESUMEN	1
DEDICATORIA	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVO	11
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y METODOS	12
Sitio de realización	12
Diseño	12
Universo de trabajo	12
Criterios de inclusión	12
Criterios de no inclusión	12
Criterios de eliminación	13
Variables	13
Descripción general del estudio y procedimientos	15
Tamaño de la muestra	19
Análisis estadístico	19
RESULTADOS	20
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	27
ANEXOS	33

ANTECEDENTES

Los hongos del género *Candida* son ubicuos, comensales en el ser humano y forman parte de la flora normal. La colonización por este microorganismo comienza desde las primeras semanas de vida, alcanzando tasas de colonización 15% - 45% en adultos sanos¹. *Candida* spp una levadura oportunista que en condiciones de inmunosupresión ocasiona infecciones que llegan a poner en peligro la vida del hospedero, esto se observa sujetos debilitados, en recién nacidos críticamente enfermos, y en pacientes con neutropenia en donde la incidencia de infecciones incrementa con la gravedad de la neutropenia y ante una mayor duración de la misma².

En décadas recientes se ha observado un incremento en la frecuencia de Candidiasis, lo cual se ha asociado a la existencia de diversos factores de riesgo, algunos de los cuales son: hemodiálisis que tiene una razón de momios (RM) de 18, el uso de catéteres intravasculares RM 7.2, uso previo de antibióticos de amplio espectro RM 7.2, nutrición parenteral RM 3.2, uso previo de esteroides, y quimioterapia entre otros³⁻⁶.

El incremento observado en la frecuencia de infecciones por *Candida* es consistente, en Estados Unidos de Norte América (EUNA) entre 1980 y 1990 la tasa de infecciones nosocomiales por hongos incrementó de 2.0 a 3.8 / 1000 egresos⁹, en el Hospital Pediátrico Mott's de la Universidad de Michigan la tasa de candidemia nosocomial incremento entre 1989 y 1993 de 0.12 a 0.276 / 1000 días-paciente³; la frecuencia en las tasas de infección dentro de los hospitales puede variar de acuerdo al tipo de pacientes y servicios, son más elevadas en unidades de terapia intensiva, Rangel-Frausto y cols. en los años de 1993 a 1995 mediante un estudio multicéntrico en EUA reportaron una tasa de candidemia de 9.82 casos x 1000 ingresos en unidades de cuidados intensivos neonatales mientras que en unidades quirúrgicas de cuidados intensivos la tasa fue de

12.29 x 1000 ingresos¹⁰. En el Hospital de Pediatría CMN S XXI IMSS en el año 2000 la tasa de infecciones por *Candida* en hemocultivo fue de 10.12 x 1000 egresos¹¹.

A la par del incremento en la frecuencia de candidiasis ha emergido el problema de resistencia a antimicóticos, que se ha asociado al uso continuo o prolongado de terapia antifúngica como profilaxis o tratamiento; se ha observado con mayor frecuencia en infecciones nosocomiales y en algunos grupos de pacientes como son los infectados por el virus de inmunodeficiencia humana y pacientes con cáncer. En las diferentes series reportadas el valor de corte en la concentración mínima inhibitoria (CMI) para resistencia a antifúngicos varía, pero la tendencia común es hacia el incremento en las CMI para los antifúngicos probados¹²⁻²¹.

Los antifúngicos que se utilizan con mayor frecuencia en el tratamiento de las infecciones por hongos pertenecen al grupo de los polienos y azoles; los agentes más utilizados en el grupo de los polienos son la anfotericina B y la nistatina; la primera constituye la piedra angular del tratamiento de todas las micosis sistémicas, la segunda se utiliza en micosis de tipo superficial. El mecanismo de acción se lleva a cabo a nivel de membrana celular estableciendo enlaces con el ergosterol (principal esteroide de la membrana celular de los hongos) formando poros en la membrana celular, alterando la permeabilidad de la misma y ocasionando el vaciamiento del contenido citosólico del hongo. En el grupo de los azoles los fármacos utilizados con mayor frecuencia son el ketoconazol (imidazol), fluconazol e itraconazol (triazoles), su mecanismo de acción es a nivel de la membrana celular bloqueando la transformación del lanosterol en ergosterol por inhibición de la enzima 14 α -desmetilasa dependiente del citocromo P-450, esto conduce a cambios en la permeabilidad celular e inhibición del crecimiento²²⁻²³.

Se han descrito dos mecanismos por los cuales *C. albicans* adquiere resistencia a los polienos: (1) resistencia fenotípica: que se presenta durante la incubación continua de *C. albicans* en presencia de anfotericina B, alterando los β -glucanos de la pared impidiendo

la penetración del fármaco a la membrana del hongo para ejercer su acción fungicida, este tipo de resistencia no se hereda a células hijas; (2) resistencia genotípica: se habla de mutantes con alteraciones en la composición de lípidos de la membrana plasmática con menor contenido de ergosterol en la membrana disminuyendo el blanco de unión de la anfotericina, se ha encontrado mutación en un solo gen que altera la biosíntesis del esterol, las células hijas pueden heredar este tipo de resistencia²⁴⁻²⁶. Para los azoles se ha mencionado como causa de resistencia una disminución de la afinidad de los fármacos por la esterol desmetilasa p450 de los hongos, ó bien una mayor actividad o sobre expresión de la enzima mencionada, lo que origina un incremento del contenido de ergosterol que se asocia a una menor permeabilidad de la pared o membrana celular de los hongos que disminuye el paso de los azoles, a lo anterior se han asociado mutaciones en los genes *ERG11* y *THR1*; otro mecanismo de importancia involucrado en la resistencia a los azoles es el de flujo activo con el cual se expelen moléculas tóxicas fuera de la célula fúngica, dos sistemas actúan a este nivel: (1°) proteínas pertenecientes a la súper familia facilitadora (*BEN*), y (2°) ATP-binding cassette (*MDR*, *CDR1-5*, *HST6*, *YCF1*, y *ELF1*)²⁴⁻²⁶.

Además de la exposición continua se han encontrado otros factores que parecen estar asociados a la resistencia de *Candida* spp a antifúngicos, como son el uso de fármacos citotóxicos, neutropenia y el uso de antibióticos de amplio espectro²⁷. Se ha sugerido que el empleo de azoles y polienos en esquemas profilácticos puede ejercer presión de selección filogenética lo cual conduce a que sobrevivan solo las cepas resistentes a los antifúngicos utilizados²⁸.

Por otra parte existen reportes de alteración en el crecimiento de *Candida albicans* cuando hay exposición *in vitro* a radioterapia y se ha propuesto la hipótesis de inducción de levaduras mutantes, resistentes a antimicóticos, cuando estas han sido expuestas a dosis terapéuticas de radiación gamma²⁶⁻³⁰. Esta hipótesis tiene su sustento en la

observación de que en las células eucariotas la radiación ionizante produce partículas cargadas de energía capaces de romper puentes químicos y físicos mediante un proceso llamado ionización, siendo el ADN el principal blanco de la radiación alterando la integridad reproductora celular³¹, estos daños se incrementan cuando la célula expuesta se encuentra en mitosis durante la fase temprana de síntesis de ADN en el ciclo de replicación celular. Se han propuesto al menos 4 consecuencias que afectan la viabilidad reproductiva celular o de la progenie: (1)apoptosis, (2)necrosis, (3)envejecimiento acelerado y (4)diferenciación terminal; en la secuencia del ADN se ha observado que después de la exposición a radiación ionizante se encuentran ruptura de cromosomas, con mutaciones, en especial mutaciones por translocaciones³²⁻³³. Por lo tanto, como *Candida spp* es eucariota se propone que estas alteraciones en el ADN secundarias a la radiación ionizante podrían ser las responsables del desarrollo de resistencia a antifúngicos, lo cual no ha sido probado.

Con respecto a lo mencionado en el párrafo anterior, entre 1977 y 1978 Haller y col.²⁹⁻³⁰ realizaron estudios con cepas de *Candida albicans* obtenidas de mujeres con cáncer cérvico-uterino que habían sido sometidas a radioterapia con radiación gamma, ellos realizaron un experimento en el cual cultivaron las levaduras aisladas en medio con base de gelosa que contenía clotrimazol o nistatina 8 y 4 µg/ml respectivamente y no encontraron cepas resistentes. Sus resultados son discutibles ya que no se midieron diferentes concentraciones de los antifúngicos y la sensibilidad se determinó metodología no estandarizada; Actualmente el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS por sus siglas en ingles)³⁴ ha propuesto un método estandarizado para pruebas de sensibilidad en levaduras que utiliza solamente dilución en medio líquido RPMI 1640 con L-glutamina sin bicarbonato de sodio, controla el pH, la dilución de las drogas y del inóculo, la observación es a las 24–48 hrs. de incubación; todos los controles mencionados son necesarios debido a que la inestabilidad de los antimicóticos en medio

sólido y en algunos casos escasa solubilidad de los antimicóticos propician que los resultados de sensibilidad en el estudio de los autores previamente mencionados sean inadecuados de acuerdo a los estándares actuales.

En trabajos de investigación recientes se ha documentado que los pacientes con carcinoma de células escamosas en cavidad oral, desarrollan estomatitis por *Candida* asociada a la radioterapia. Esta neoplasia es la más frecuente de las que involucran la cavidad oral, en 1993 se reportaron 3500 casos en EUA, el 95% de los casos en pacientes con edad igual o mayor a 40 años para los que se utiliza radioterapia como parte de su tratamiento³⁵. La colonización de cavidad orofaríngea por *Candida* spp en estos pacientes va de un 22 a 43% antes de recibir radioterapia, incrementándose posterior a la radiación de un 59 a 75%. Este fenómeno se ha atribuido a factores como son la xerostomía (menor drenaje de la saliva y espesamiento de la misma), mucositis con alteración en la barrera de la membrana mucosa, uso de prótesis dentales, alcoholismo y tabaquismo³⁶⁻³⁷. Las principales especies de *Candida* que se han aislado en cavidad oral en estos pacientes son en orden de frecuencia: *C. albicans* (85%), *C. tropicalis* (28%), *C. glabrata* y *C. krusei*(7%), después de la radioterapia los pacientes tienen ligera disminución en la frecuencia *C. albicans* (68%), pero continua siendo la especie predominante^{37,38}. En un estudio Ramírez-Amador y cols. encontraron que en 8 de 46 pacientes (17%) que habían sido expuestos a radioterapia desarrollaron candidiasis oral durante el transcurso de la misma, estos pacientes recibieron manejo con azoles vía oral, 38% tuvieron mala respuesta al antimicótico, y en todos los pacientes los cultivos continuaron siendo positivos con desarrollo de *Candida* spp a pesar del tratamiento³⁶. Lo anterior puede sugerir que *Candida albicans* desarrolla resistencia ó modifica su CMI a antifúngicos cuando es expuesta a radiación ionizante. De igual manera en los estudios previamente descritos se ha sugerido que uno de los efectos de la radioterapia es generar

cepas resistentes, sin embargo en los estudios previos no se ha demostrado si las cepas de *Candida* que se encuentran después de que los pacientes han sido expuestos a radiación ionizante son las mismas o tienen el mismo origen genético que las que se encontraban antes de la exposición. De corroborarse que las poblaciones de *Candida* spp son estables a lo largo de los ciclos de radioterapia, y encontrar incremento en las CMI a antifúngicos después de la radiación, sugeriría un posible efecto de la radioterapia en la susceptibilidad antifúngica de la cepa, y no simplemente que haya ocurrido un intercambio de cepas diferentes que poseen CMI mayores a los antimicóticos en forma natural, por esto es necesario monitorizar genéticamente las cepas de *Candida* que portan los pacientes durante el ciclo de radioterapia con los métodos apropiados. *Candida* puede tipificarse mediante diferentes métodos moleculares, La Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE) tipifica su cariotipo y así es posible determinar si los diferentes aislamientos en un paciente tienen un mismo origen. El método se basa en separar los cromosomas del microorganismo mediante la aplicación de distintos "pulsos" de cargas eléctricas en diferentes direcciones por distintos periodos de tiempo lo que permite la separación de moléculas de ADN mayores de 50 kilobases³⁹⁻⁴⁰. El hecho de permitir un análisis del cariotipo lo hace ser mejor que otros métodos como RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) el cual tiene un principio similar, pero utiliza enzimas de restricción de cortes frecuentes que originan fragmentos más pequeños que los obtenidos por PFGE, por lo que su capacidad discriminatoria entre diversas cepas es menor, así mismo esta capacidad discriminatoria se ve afectada por el tipo de enzima que se utiliza³⁸⁻⁴⁰. Estas dos técnicas fueron comparadas para el análisis de *Candida rugosa* por Dib y col⁴¹. encontrando una mayor discriminación por la técnica de PFGE, con mejor desempeño que RFLP. Otro método utilizado para la tipificación de cepas es el PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction - Random Amplification of Polymorphic DNA)³⁹ el cual utiliza iniciadores cortos escogidos al azar, que amplifican regiones específicas de los

microorganismos, los patrones de amplificación entre las diferentes cepas permiten catalogarlas como con un origen similar o diferentes, la sensibilidad de este método puede variar de acuerdo a la especie de *Candida* y a los iniciadores que se utilizan. Existen diversos estudios donde los tres métodos han sido utilizados con buenos resultados⁴²⁻⁴⁵. Considerando los cambios que pueden sufrir RFLP y PCR-RAPD en base a la especie de *Candida*, tipo de enzima, o el número y características del iniciador, la reproducibilidad de PFGE es la más adecuada y de mayor consistencia.

Con todo lo anterior consideramos que las cepas de *Candida albicans* obtenidas de pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a radioterapia son un buen modelo para estudiar el posible efecto de la radiación ionizante como inductor de resistencia a antimicóticos

OBJETIVO

Determinar si la exposición a radiación ionizante incrementa la colonización por *Candida* spp, y la CMI de *C. albicans* a antifúngicos en cepas aisladas en cavidad oral de pacientes con cáncer de cabeza y cuello que reciben radioterapia.

HIPOTESIS

Se encontrará un incremento en la colonización por *Candida* spp en cavidad oral en un 16% al final del ciclo de radioterapia, y un incremento en al menos 2 diluciones en la CMI a antifúngicos de una cepa, comparada con su CMI inicial en el 25% de las cepas de *Candida albicans*, después de haber sido expuestos a radiación ionizante.

MATERIAL Y METODOS

Sitio de realización. Departamento de Radioterapia, Hospital de Oncología CMN S XXI IMSS. Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria y Laboratorio Clínico del Hospital de Pediatría CMN S XXI IMSS. El protocolo fue aceptado por el comité local de Investigación con número de registro 99-718-0011

Diseño. Estudio prospectivo, longitudinal comparativo.

Universo de trabajo. Cepas de *Candida* spp obtenidas de cavidad oral en pacientes con cáncer que iniciaron tratamiento con radioterapia por primera vez, y que por su localización el campo de la radioterapia involucró la región oro faríngea.

Criterios de inclusión. Se analizaron las cepas de *Candida* spp obtenidas durante el ciclo de radioterapia, solo las cepas de *C.albicans* fueron incluidas en los ensayos de susceptibilidad a antimicóticos. Los cultivos fueron tomados en pacientes con las siguientes características:

1. Pacientes mayores de 18 años con cáncer de cabeza y cuello que iniciaron tratamiento con radioterapia.
2. Que el campo de la radiación haya involucrado la mucosa oro faríngea.
3. Dosis total del ciclo de radioterapia mayor de 2000 cGy, dividido en fracciones diarias de 200 cGy.

Criterios de no inclusión

1. Pacientes que hubieran recibido tratamiento antifúngico por un mínimo de 3 días en las últimas dos semanas.
2. Pacientes en manejo con quimioterapia
3. Paciente con evidencia clínica de candidiasis oral a su ingreso al estudio.

Criterios de eliminación

1. Pacientes con aislamiento de *Candida* spp que no hayan recibido el ciclo completo de radioterapia.
2. Pacientes con seguimiento y/o cultivos incompletos

Variables

Variable independiente

Radioterapia

Definición conceptual: Es el uso de radiación ionizante en el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas; la radiación penetra a tejidos en donde interactúa química y físicamente con células que tienen índices altos de replicación (principalmente células neoplásicas) destruyéndolas al alterar su integridad reproductiva e inducir apoptosis³¹.

Definición operacional: La dosis total en un ciclo de radioterapia que recibió un paciente con diagnóstico de enfermedad oncológica, y que para fines del protocolo incidió en la región oro faríngea. Se consideraron aquellos con dosis de 200 cGy por día, cinco días por semana, durante 2 a 5 semanas.

Escala: nominal dicotómica.

Categoría: Sí o No

Variables dependientes

Colonización oral por *Candida* spp.

Definición conceptual: Presencia de *Candida* spp en orofaringe, sin lesiones de la mucosa oral, hay replicación del microorganismo y puede ser corroborado por medio de cultivo.

Definición operacional: Cuando en los pacientes el cultivo sea positivo para *Candida* spp, sin que haya evidencia de candidiasis oral (placas blanquecinas de fondo eritematoso, que al ser desprendidas ocasionan sangrado y dolor).

Escala: Nominal dicotómica.

Categoría: Colonizado, no colonizado.

Variación de la susceptibilidad de *Candida albicans* a antifúngicos

Definición conceptual: Cepas de *Candida albicans* que presentan incremento o disminución de la CMI a diluciones determinadas de antifúngicos (después de haber sido expuestas a diversos factores como antifúngicos, radiación, entre otros).

Definición operacional: Se consideró variación en la susceptibilidad cuando la CMI para el antifúngico probado después de haber sido expuestas a radioterapia era diferente en al menos dos diluciones (en incremento o disminución) con respecto a la CMI basal. Se probaron fluconazol, ketoconazol, itraconazol, anfotericina B y nistatina.

Escala: nominal dicotómica.

Categoría: modificada o no modificada.

Resistencia de *Candida albicans* a antifúngicos.

Definición conceptual: Cepas de *C. albicans* que presentan una CMI mayor al punto de corte para resistencia definido para cada antifúngico probado.

Definición operacional: La determinación de la CMI se realizó con técnica de microdilución de acuerdo al protocolo M-27 A de la NCCLS³⁴. Se probaron fluconazol, ketoconazol, itraconazol, anfotericina B y nistatina.

Escala: nominal dicotómica

Categoría: Sensible o resistente.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS

Obtención de los cultivos. A los pacientes que ingresaron al estudio se les tomó muestra para cultivo por medio de raspado de la mucosa oral en ambos carrillos, paladar y superficie de la lengua con un hisopo estéril, el cual se inoculó por estriado en medio gelosa Sabouraud. Las placas se incubaron a 35°C y se evaluó crecimiento cada 24 h, se dio como **negativo** la ausencia de desarrollo de *Candida* spp hasta los 7 días. Las muestras se tomaran inmediatamente antes del inicio del ciclo de radioterapia, al inicio de la cuarta semana, y un tercer cultivo al término del ciclo de radioterapia.

Identificación de *Candida* spp. Cuando hubo desarrollo de levaduras en los cultivos se les realizó la prueba de tubo germinativo. Con una pipeta capilar se tomó una colonia del aislado de *Candida* a identificar y se hizo una emulsión en 0.5 ml de suero humano la cual se incubó a 37 °C durante 3 h, se tomó una gota de la emulsión y se examinó en un microscopio de luz con el objetivo 40x en búsqueda de tubos germinativos (pequeña proyección celular sin tabicación que lo separe de la levadura). Se consideró como una cepa sugestiva de *Candida albicans* aquella que daba la prueba positiva.

Todas las cepas aisladas se analizaron por el sistema API ID 32C para determinar o confirmar la especie. La colonia a identificar se inoculó en 2 ml de agua destilada estéril, hasta lograr una turbidez equivalente al estándar de McFarland Nº 2 (Densidad celular aproximada 6×10^8 /ml), se tomaron 250 μ l y se inocularon en un ampula de Medio C, se homogeneizó y se tomaron 135 μ l para inocular en cada cúpula de la galería, se colocó la tapa de la galería y se incubó a 30°C durante 48 hrs. en ambiente húmedo. La lectura se realizó en cada cúpula, se considera "0" aquella que no mostró desarrollo, y positivas las que presentaron algún grado de turbidez, con la lectura se obtuvo un código numérico que corresponde a alguna especie de *Candida* en el manual de identificación.

Cuando los aislamientos en los diferentes cultivos de un paciente correspondieron a *Candida albicans* se realizó Electroforesis en gel por Campos Pulsados en las diferentes cepas para determinar el cariotipo.

Subtipificación de *Candida albicans* por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE). Se realizó PFGE mediante la técnica descrita por Dib y colaboradores⁴¹

Extracción del DNA. Las cepas se sembraron en cajas con agar dextrosa sabouraud incubándose a 37°C durante 24 h.

1. Se tomó una colonia y fue inoculada en 10 ml de caldo dextrosa Sabouraud, incubada a 37°C por 48 hrs.
2. Se tomó 1 ml del crecimiento y se colocó en un tubo de microcentrifuga estéril, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 2 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante dejando el paquete celular, fue adicionado con 500 µl de buffer suspensión celular (50 nM de EDTA sódico pH 8.0), centrifugando con las condiciones anteriores, verificando el paquete celular (pastilla en el fondo de 4 mm de diámetro).
4. Se agregaron 150 µl de buffer suspensión celular + 6 µl de liticasa (se mezcló cuidadosamente).
5. Se adicionó con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1.6% a 50°C, y se prepararon los bloques en moldes (5 x 8 mm), se dejaron solidificar a 4°C.
6. En tubo de microcentrifuga de 1.5 ml con 500 µl de buffer lisis II + 20 µl de liticasa, se depositaron en cada uno de ellos los bloques de agarosa, se incubó a 37°C toda la noche.
7. Se eliminó el buffer lisis y se adicionó buffer proteinasa K 500 µl + proteinasa K 20 µl, se incubó en baño María en agitación constante a 50°C toda la noche.

8. Los bloques fueron lavados en agitación durante 30 minutos con buffer de lavado 6 veces; en este mismo buffer se almacenó a 4°C hasta realizar el corrimiento del gel.

PFGE. La mitad del bloque fue depositado en los pozos de un gel de agarosa al 0.8%. El gel se colocó en una cámara de electroforesis de campos pulsados, con buffer TBE 0.5x (0.089 M Tris-0.089 M borato 0.0025 M EDTA diluido en agua destilada). Se utilizó una temperatura constante de 14°C, con pulsos 130 s a 140 V por 20 horas, y 14 horas 300 s a 150 V, y 22 horas con 300 s a 110 V (Sistema Gene Path-Bio-Rad).

Las bandas de DNA fueron visualizadas y fotografiadas con transiluminación Ultra Violeta. Se consideraron de un mismo origen aquellas cepas de *Candida albicans* de diferente cultivo en un mismo paciente que mostraban un cariotipo idéntico o máximo una banda diferente. Aquellas cepas que mostraban más de una banda diferente en el cariotipo fueron consideradas de un origen diferente.

Pruebas de susceptibilidad antifúngica. Una vez que se corroboró que las cepas de *Candida albicans* aisladas en un paciente correspondieron a la misma cepa antes y después del ciclo de radioterapia, se realizaron las pruebas de susceptibilidad antifúngica: Se utilizó la técnica de microdilución de la NCCLS obtenida del manual M-27 A³⁴. Se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (con L-glutamina sin bicarbonato de sodio, GIBCO). El pH del medio se ajustó a 7.0 con MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico, 0.165 M) y NaOH.

Las drogas probadas fueron: Anfotericina B, nistatina, fluconazol, itraconazol y ketoconazol (Estándar USP). De cada una de las drogas se preparó una solución madre "Stock":

- El Fluconazol se diluyó en agua bidestilada estéril a una concentración de 5120 µg/ml.
- Las drogas no solubles en agua (Anfotericina B, nistatina, ketoconazol e itraconazol) se diluyeron en dimetilsulfóxido al 100% a una concentración de 16,000 µg/ml.

Se inocularon diluciones seriadas de las diferentes drogas en placas de ELISA que contenían 100 µl de las drogas a una concentración 2x. Las concentraciones variaron de 0.03 µg/ml a 16µg/ml para anfotericina B, nistatina, itraconazol y ketoconazol, y de 0.062 µg/ml a 64 µg/ml para fluconazol. Se utilizaron placas individuales para cada antifúngico las cuales se inocularon del pozo 1 al 10 en orden descendente de concentración, el pozo 11 de cada fila correspondió al control positivo y el pozo 12 al control negativo.

El valor de corte para considerar resistencia fue

- Resistencia a anfotericina B >1 µg/ml
- Resistencia a ketoconazol >8 µg/ml
- Resistencia a Fluconazol >64 µg/ml
- Resistencia a itraconazol >1 µg/ml
- Resistencia a nistatina >4 µg/ml

Preparación del inóculo. Cada una de las cepas probadas se cultivó en gelosa Sabouraud a 37°C durante 24 hrs., se eligieron 5 colonias con diámetro mayor de 1 mm, con las cuales se preparó una suspensión en solución salina estéril al 0.9% ajustándola a una turbidez del 0.5 del estándar de McFarland (Densidad celular aproximada 1.5×10^8 /ml). De esta suspensión se realizó una dilución de 1:50, seguido de una dilución de 1:20 con RPMI 1640. Con una pipeta multicanales se inocularon 100 µl de la dilución final del inóculo en los pozos de cada fila, del 1 al 10 en donde se encontraban las concentraciones de las drogas en orden descendente, el pozo once correspondió al control positivo (con inóculo, sin antifúngico), el pozo doce (control negativo) se inoculó solamente con RPMI. Cada cepa se probó por duplicado. Se inoculó una cepa en cada una de las filas de las microplacas de ELISA (una microplaca para cada antifúngico), en cada microplaca se probó un cepa de referencia (*C. albicans* ATCC 24433 ó *C.parapsilosis* ATCC 22019, que sirvieron como estándar de referencia)

Una vez inoculadas las microplacas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las microplacas con azoles se agitaron durante 5 minutos antes de la lectura, ésta se llevó a cabo visualmente utilizando un espejo para lectura de microplacas de ELISA. Las concentraciones mínimas inhibitorias para los azoles se consideró en el pozo que mostraba una diferencia importante en la turbidez comparada con el control positivo de cada cepa. Para los polienos las placas de ELISA no se agitaron, la CMI se ubicó en el primer pozo ópticamente claro, sin ninguna huella de crecimiento de los microorganismos.

Para evaluar el efecto de la radiación sobre la CMI de *C.albicans* se comparó la CMI de las cepas del segundo y tercer cultivo con la cepa aislada en el primer cultivo en cada paciente, se considero un efecto significativo cuando la CMI del segundo y tercer cultivo tuvo al menos dos diluciones de diferencia con respecto a la cepa basal, evaluando esto con cada uno de los cinco antifúngicos probados.

Tamaño de la muestra. Se ha reportado falla al tratamiento para los azoles y polienos en candidiasis oral en pacientes radiados en aproximadamente 25% de los casos, por lo que se propuso un tamaño del efecto del 25% para investigar el porcentaje de cepas de *C.albicans* que modifican su CMI a polienos y azoles al ser expuestas a radiación ionizante, con α de 0.05 unilateral y β 0.2, son necesarios 27 pacientes con *C. albicans*⁴⁶.

Análisis estadístico. Se realizó estadística descriptiva con medidas de resumen para variables nominales y continuas

RESULTADOS

Ingresaron al estudio 90 pacientes (hombres 60% y mujeres 40%), la mediana de edad fue de 63 años (límites 27 a 87 años). Los diagnósticos más frecuentes fueron: Cáncer de lengua 10%, parótida 9%, y epidermoide 8%. La mediana de la dosis recibida de radioterapia fue 4500 cGy (Límites 2440-7250). De los 90 pacientes hubo 3 pérdidas, 87 pacientes completaron el estudio, en razón de la duración del ciclo de radioterapia se programaron los cultivos intermedio y final, por lo que para estos se tomaron cultivos en 84 y 75 pacientes respectivamente.

Distribución de los aislamientos (Cuadro 1). En la fase basal se cultivaron levaduras en 51% de los pacientes, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron: *C.albicans* 74%, *C.glabrata* 7%, *C.krusei*, *C.tropicalis* y *C.famata* en 4%. Dos cultivos presentaron desarrollo mixto con *C.albicans* y otra especie no *albicans* en cada uno de los casos.

En la fase intermedia se incrementó el aislamiento a 61%, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron: *C.albicans* 67%, *C.glabrata* 12%, *C.krusei* 6%, y *C.tropicalis* 4%; en cuatro casos se encontró desarrollo mixto, con *C.albicans* y una especie no *albicans*.

En la fase final se aislaron levaduras en 63% de los pacientes, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron: *C.albicans* 62%, *C.glabrata* 19%, y *C.krusei* 11%. Se tuvieron 3 cultivos con desarrollo mixto, en dos de ellos con *C.albicans* y otra especie no *albicans*.

Análisis del cariotipo (Fig. 1). Se evaluó el cariotipo de *C.albicans* de los pacientes cuyos cultivos mostraron desarrollo en al menos dos cultivos para esta especie. Los cultivos de 33 pacientes mostraron esta característica. Al hacer el análisis del cariotipo mediante PFGE se encontró que en 31 casos fue idéntico de acuerdo al patrón electroforético en el gel, en dos casos se encontró variación del patrón electroforético del cariotipo por lo que se tipificaron como cepas con un origen diferente, estos dos casos fueron excluidos del análisis de CMI a antifúngicos.

Pruebas de susceptibilidad antifúngica (Cuadro 2). En el análisis de susceptibilidad a antifúngicos de las 31 cepas con cariotipo idéntico se encontró lo siguiente: para anfotericina B solo una cepa (3%) correspondiente al paciente 39 incrementó la CMI sin llegar a ser resistente, la CMI basal fue de 0.125 µg/ml e incremento a 0.5 µg/ml al final de la radioterapia. Para fluconazol tres cepas (9%) se modificaron, en dos de ellas (paciente 27 y 73) la CMI incrementó, con una CMI basal y final de 0.125 y 2 µg/ml, y 0.5 y 4 µg/ml respectivamente, en ningún caso se rebasó el valor de corte para considerarse resistente, la otra cepa (paciente 32) disminuyó su CMI a fluconazol, con una CMI basal y final de 1 y 0.25 µg/ml respectivamente. Para las cepas del resto de los pacientes no se encontraron cambios significativos en la CMI basal-final para fluconazol o anfotericina B, de igual forma para el resto de los antifúngicos probados (nistatina, ketoconazol e itraconazol) no se encontraron cambios significativos en la CMI en ningún caso. No se encontraron cepas de *C.albicans* resistentes en ninguna de las cepas probadas.

DISCUSIÓN

En los pacientes con cáncer de cabeza y cuello que son expuestos a radiación ionizante se incrementa la colonización de cavidad oral por *Candida* spp, y se presenta un predominio de especies no *albicans* al final del ciclo de radioterapia, esto puede explicar parcialmente el incremento en la frecuencia de candidiasis oral. Se ha descrito que en general la respuesta al tratamiento es mala y la erradicación del microorganismo es difícil; por lo anterior se ha especulado que la radiación ionizante puede tener efecto como inductor de resistencia a antifúngicos en *Candida* spp^{30,36}. Este estudio se realizó para buscar el efecto mencionando, estudiando cepas de *Candida* spp aisladas de cavidad oral en pacientes sometidos a radioterapia, tomando cultivos para su análisis en diferentes fases del ciclo de radioterapia.

Al observar las poblaciones y frecuencias de especies de *Candida* durante las diferentes fases del ciclo de la radiación se encontraron colonizados 51% de los pacientes antes del inicio de la radiación, con un incremento de 12% después de la exposición a radiación, lo cual ha sido previamente encontrado en otros estudios^{36,37,38}, *C.albicans* fue la especie predominante, sin embargo a medida que aumentó la dosis de radioterapia las especies no *albicans* incrementaron su frecuencia en un 12%. En forma individual las especies que incrementaron en forma más importante fueron *C. glabrata* y *C. krusei*, de la primera incrementó el porcentaje de aislamiento de 7 a 19%, y de la segunda de 4 a 11%, esta tendencia también ha sido observada por otros autores^{37,36}, aun así al final de la radioterapia *C. albicans* continuó siendo la especie predominante, este efecto ha sido relacionado con una gran debilidad en el hospedero que permite que especies menos virulentas que *C. albicans* se reproduzcan y lleguen a ocasionar enfermedad⁴⁷.

Por otra parte se observó que las poblaciones de *C.albicans* que se encontraban colonizando a estos pacientes se mantuvieron estables a lo largo del ciclo de radioterapia.

En 33 pacientes que se aisló *C.albicans* en las diversas fases de cultivo, al analizar el cariotipo mediante PFGE, se encontró que las cepas finales en cada uno de 31(94%) pacientes fueron las mismas que se encontraban antes de la exposición a radiación, solo las cepas de dos (6%) pacientes mostraron un cariotipo diferente al final de la radioterapia con respecto al que mostraban al inicio del tratamiento. Redding⁴⁶ y Leung⁴⁹ analizaron el comportamiento epidemiológico de *Candida* en pacientes expuestos a radiación utilizando RFLP y PFGE y PCR-RAPD, de la misma forma encontraron persistencia en su mayoría de las mismas poblaciones de *Candida* después de la exposición a radiación, Leung da seguimiento post radiación y el comportamiento es similar.

En las cepas de los 31 pacientes que mostraron un cariotipo idéntico en las diferentes fases de cultivo se determinó la CMI a antifúngicos para determinar si existían variaciones que pudieran estar asociadas a la exposición a radiación. Contrario a lo esperado de que la emergencia de resistencia en *Candida albicans* puede estar asociada a la exposición a radiación ionizante³⁰⁻³⁶, no se encontró tal efecto. De 31 cepas analizadas en ninguna se modificó la CMI de polienos o azoles hasta el nivel requerido para ser considerada resistente. Para anfotericina B una cepa incrementó la CMI en forma significativa, con una CMI final de 0.5 µg/ml, de los azoles probados solo para fluconazol 2 cepas incrementaron la CMI, y una cepa mostró disminución en la CMI. Redding y col. en 1999⁴⁸ reportaron un estudio similar en 30 pacientes expuestos a radioterapia, estudiaron cepas de *Candida* aisladas de cavidad oral, y midieron la CMI a fluconazol. Todos los pacientes que mostraron candidiasis oral con aislamiento de *Candida albicans* respondieron al manejo con fluconazol, en 15 pacientes aislaron *C.albicans*, todas estas cepas mostraron una CMI a fluconazol <4 µg/ml, solo una cepa mostró una CMI de 64 µg/ml pero respondió al tratamiento con fluconazol. Las especies no *albicans* aisladas con mayor frecuencia fueron *C.glabrata* y *C.krusei*, en ellas fueron comunes CMI a fluconazol hasta 64 µg/ml sin superar este nivel. El estudio descrito investiga un efecto directo de la

radiación ionizante como inductor de resistencia en *C.albicans*, al igual que en este estudio no se encontró tal efecto, nosotros además evaluamos anfotericina B, nistatina, ketoconazol e itraconazol de igual manera sin encontrar cambios significativos en la CMI posterior a la exposición a radiación ionizante. Lo anterior indica que la mala respuesta a tratamiento en candidiasis oral en este tipo de pacientes, y la dificultad para la erradicación de los microorganismos, más que ser secundarios al desarrollo de resistencia, está asociado a las alteraciones que ocurren en el huésped tanto locales como sistémicos, como son la alteración de la barrera mucosa que facilita la invasión del microorganismo, la xerostomia que incrementa la adherencia de *Candida* spp a la mucosa, y alteraciones en la respuesta inmune de tipo celular secundario a la radiación. Otros estudios que habían tratado de investigar este problema²⁹⁻³⁰ no contaron con una metodología adecuada y para tener la certeza de que las cepas probadas para susceptibilidad efectivamente habían sido las mismas antes y después de la exposición a la radiación, de igual manera la técnica utilizada para la determinación de la CMI a los antifúngicos no estaba estandarizada.

Otra hipótesis que había sido planteada para explicar la mala respuesta a tratamiento en este tipo de pacientes era que la radiación puede tener efecto en la selección de cepas de *C.albicans* resistentes a los antifúngicos. En este trabajo la mayoría de las cepas se analizaron por PFGE y fueron las mismas a lo largo del tratamiento con radioterapia. Resultados similares reportaron Redding⁴⁶ y Leung⁴⁶, en el mismo tipo de pacientes los evalúan antes y después de radioterapia, y de tratamiento dental y/o antifúngico, en el segundo estudio utilizan RFLP y PFGE y PCR-RAPD además de otros métodos no moleculares, de igual manera encontraron que las cepas antes y después del manejo tienen un mismo origen; ahora bien, una de las causas de la mala respuesta a tratamiento puede ser la sustitución de especies, ya que también encuentran en los cultivos finales

hubo incremento en el aislamiento de especies no *albicans*, que en forma natural presentan CMI's más altas a antifúngicos que *C.albicans*²⁶⁻²⁷.

CONCLUSIONES

Tomando como modelo al paciente con cáncer de cabeza y cuello, los resultados obtenidos con la investigación actual sugieren que la probabilidad es mínima de que la emergencia de cepas de *C.albicans* resistentes a antifúngicos sea inducido por exposición a radiación ionizante; se apoya una posible selección filogenética para la susitución de especies, como se muestra con el incremento proporcional en el aislamiento de las cepas de *C.glabrata* y *C.krusei*, y otras especies no *albicans*. Entre estas especies no *albicans* se sabe que existe resistencia natural a antifúngicos, sin embargo no se ha relacionado directamente a alguna de estas especies como causante de candidiasis que no responda a tratamiento. Factores de mucho mayor peso, entonces, parecen ser las condiciones asociadas a este tipo de cáncer y radiación como la presencia universal de mucositis y xerostomia aunados a la depresión de la respuesta inmune celular secundaria a la radiación y a la proliferación de especies no *albicans* son las responsables de la mala evolución y mala respuesta a tratamiento en los casos de candidiasis oral.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumate J, Muñoz HO, Gutiérrez G, Santos JI. Candidiasis. En: Manual de Infectología Clínica. Editores Mendez 1998: 471-77
2. Bodey gp, buckley M, Sathe YS, freireich ej. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. Ann Intern Med 1996;64:328-40
3. MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for Candidemia in a Children's Hospital. Clin Infect Dis 1998;26: 642-5.
4. Wenzel RP. Nosocomial Candidemia: Risk factors and attributable mortality. Clin Infect Dis 1995;20: 1531-4.
5. Uzun O, Ascioğlu S, Anaissie EJ, Rex JH. Risk factors and predictors of outcome in patients with cancer and breakthrough candidemia. Clin Infect Dis 2001;32: 1713-7
6. SaraL R. Candida and Aspergillus infections in Immunocompromised Patients: An Overview. Rev Infect Dis 1991;13: 487-92.
7. Brown AE. Overview of fungal infections in cancer patients. Semminar Oncol 1990;17(3) S6: 2-5
8. Rex JH, Bennet JE, Sugar AM, Pappas PG, Vaan Der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, Levenstein MJ, Webb CD. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of Candidemia in patients without neutropenia. N Engl J Med 1994;17(20): 1325-30.
9. Beck-Sagué C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. J Infect Dis 1993;167: 1247-51.
10. Rangel-Ffrausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE Jr, Jarvis W, Dawson J and Wenzel RP. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units. Clin Infect Dis 1999;29(2): 253-8.

11. Registro de hemocultivos año 2000, Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.
12. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-Candida albicans species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996,100(6): 617-23.
13. Goldman M, Cloud GA, Smedema M, LeMonte A, Connolly P, McKinsey DS, Kauffman CA, Moskowitz B, Wheat LJ. Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal Candida albicans isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study group. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(6):1585-7
14. St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noel G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 Candida isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2001 ;39(3): 949-53.
15. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31(1): 327-32
16. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Martin MA, Neu HC, Saiman L, Patterson JE, Dibb JC, Roldan CM, Rinaldi MG, Wenzel RP. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of Candida species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31(1): 289-96
17. Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A, Vazquez JA, Rampalo A; HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. The evolution of Candida

- species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 2001; 183(2) :286-93
18. Revankar SG, Dib OP, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Rinaldi MG, Redding SW, Patterson TF. Clinical evaluation and microbiology of oropharyngeal infection due to fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; 26(4): 960-3
19. Tumbarello M, Caldarola G, Tacconelli E, Morace G, Posteraro B, Cauda R, Ortona L. Analysis of the risk factors associated with the emergence of azole resistant oral candidosis in the course of HIV infection. *J Antimicrob Chemother* 1996;38(4): 691-9.
20. Tumbarello M, Tacconelli E, Caldarola G, Morace G, Cauda R, Ortona L. Fluconazole resistant oral candidiasis in HIV-infected patients. *Oral Dis* 1997,3(Sup 1): S110-2.
21. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Hilsenbeck SG, Patterson TF. A randomized trial of continuous or intermittent therapy with fluconazole for oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients: clinical outcomes and development of fluconazole resistance. *Am J Med* 1998;105(1): 7-11
22. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000;30: 653-7
23. San-Blas G. Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Revista Iberoamericana de Micología* 1991;8: 24-34
24. Kerridge D, Fasoli M, Wayman FJ. Drug resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Ann N Y Acad Sci* 1988;544: 245-59
25. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4): 501-17.

26. DeMuri G, Hostetter MK. Resistencia a los antimicóticos. Clin Ped N Am 1995;42(3): 619-39.
27. Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeast recovered from clinical specimens. Antimicrob Agents Chemother 1980;18: 158-163
28. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, et al. Amphotericin B resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. Am J Med 1988;84: 826-32
29. Mendling W, Haller I. The effect of therapeutic doses of gamma radiation on *Candida albicans* cells in vitro. Geburtshilfe Frauenheilkd 1977;37: 947-51.
30. Haller I, Mendling W. Are, during radiotherapy for genital cancer in the female, side-effect influencing the existing vaginal blastomyces flora-especially the appearance of resistant mutants to be feared?. Mykosen 1978;21: 313-7.
31. De Vita. Physical basis of radiation therapy. EN: Cancer: Principles and practice of oncology 5ª edición Lippincott-Raven Publishers 1997: 297-322
32. Cáncer (cap 24) En:Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biología molecular de la célula 3ª Ed.1996 Ediciones Omega S.A.Cap 24:1345-1387
33. Larry E. Kun. Chapter 11: General Principles of Radiation Therapy En:Pizzo and Poplack: Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd ed.1997 Lippincott-Raven Publishers 290-321
34. Galgiani JN, Bartlett MS, Ghannoum MA, Espinel-Ingroff A, Lancaster MV, Odds FC, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved standard. 1997; 17(9). M-27 A.
35. Million RR, Cassisi NJ, Mancuso AA. Oral Cavity. En: management of head and neck cancer: A multidisciplinary Approach. Editor JB Lippincott Co, 2ª Ed. 1994; 321.
36. Ramirez Amador V, Silverman S, Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997;84(2): 148-53

37. Epstein JB, Freilich MM, Le ND. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76(2): 169-74.
38. Paula CR, Sampaio MC, Birman EG, Siqueira AM. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. *Mycopathologia*. 1990;112(2): 119-24
39. Verduyn-Lunel FM, Verweij PE, Belkum AV, Meis JFGM, Voss A. Molecular epidemiology of *Candida* infections. *Rev Med Microbiol* 1999;10(2): 115-24
40. Richard V. Goering. The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, application, and interpretation. En: *Rapid detection of infectious agents*. Edit. Specter y col. 1988; 131-157
41. Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and Restriction Fragment Length Polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1996;34(6): 1494-1496.
42. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, Melchers WJG, Meis JFGM. Evaluation of the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis and PCR fingerprinting for epidemiological typing of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 1998;4: 82-7
43. van Belkum A, Melchers W, de Pauw B, Scherer S, Quint W, Meis JF. Genotypic characterisation of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole treated neutropenic patients *J Infect Dis* 1994;169: 1062-1070
44. Bostock A, Khattak MN, Matthews R, Burnie J. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans* *J Gen Microbiol* 1993;139: 2179-84
45. Mehta SK, Stevens DA, Mishra SK, Feroze F, Pierson DL Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34(1): 19-25.

46. Browner WS, Black D, Newman TB, Hulley SB. Estimación del tamaño de la muestra y la potencia 153-65. En: Diseño de la Investigación Clínica, Un Enfoque Epidemiológico Ediciones Doyma 1ª 1993
47. Rippon JW .Infecciones Oportunistas, A. Levaduras. En: Tratado de micología Médica, 3ª Ed, Interamericana, McGraw Hill; 574-628, 1988
48. Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, Lopez-Ribot José, Bailey CW, Rinaldi MG, Patterson TF. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. J Clin Microbol 1999;37(12): 3896-900.
49. Leung K W, Dassanayake RS, Yau YYJ, Jin LJ, Yam WG, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic naspharyngeal carcinoma survivors. J Clin Microbiol 2000;38(6): 2219-26.

ANEXO 1

Cuadro 1. Porcentaje de cultivos positivos y especies de *Candida* identificadas a lo largo del estudio

Cultivo	Basal	Intermedio	Final
Positivo	(51%)	(61%)	(63%)
Negativo	(49%)	(39%)	(37%)
Especies			
<i>C. albicans</i>	74%	67%	62%
<i>C. glabrata</i>	7%	12%	19%
<i>C. krusei</i>	4%	6%	11%
<i>C.tropicalis</i>	4%	4%	0
<i>C.famata</i>	4%	0	2%
Mixto	4%	8%	6%

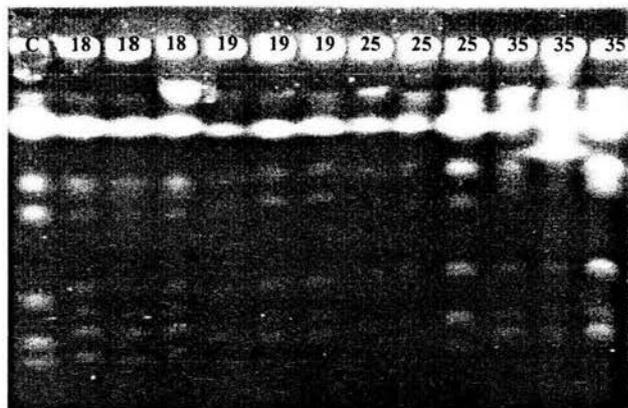
Cuadro 2. Concentraciones mínimas inhibitorias en cepas idénticas de *Candida albicans* en cuatro pacientes que presentaron cambios.

Paciente	Anf basal	Anf Final	Flu basal	Flu final	Nis bas-fin	Itra Bas-fin	Ket bas-fin
39	0.125 µg/ml	0.5 µg/ml	SC	SC	SC	SC	SC
72	SC	SC	0.125 µg/ml	2 µg/ml	SC	SC	SC
73	SC	SC	0.5 µg/ml	4 µg/ml	SC	SC	SC
32	SC	SC	1 µg/ml	0.25 µg/ml	SC	SC	SC

*SC sin cambio. Se muestran las cepas de 4 de los 31 pacientes que tuvieron un cambio significativo en la CMI basal y final. Ninguna cepa superó el punto de corte para resistencia. Las cepas de los 27 pacientes restantes no presentaron cambios significativos en la CMI

ANEXO 2

Fig. 1. Cariotipo de *Candida albicans*



Nótese la diferencia en el cariotipo de *C. albicans* en el paciente 19 del cultivo 1 con respecto al 2 y 3, en el paciente 25, cultivo 1 y 2 con el 3