

Comportamento *in vitro* dos fungos do gênero candida diante dos radiotraçadores emissores gama utilizados na cintilografia pulmonar inalação/perfusão e seu perfil de sensibilidade frente a anfotericina b após a irradiação

***In vitro* behavior of candidal gender fungi before gamma radiotraachers used in inhalation / perfusion pulmonary scintilography and its sensitivity profile in front of amphotericin b after irradiation**

DOI:10.34119/bjhrv3n2-014

Recebimento dos originais: 30/12/2019

Aceitação para publicação: 06/03/2020

Allysson Dângelo de Carvalho

Médico Nuclear membro titular da Sociedade Brasileira de Medicina Nuclear
Mestrando em Tecnologia Nuclear pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo-USP
Professor do curso de Medicina da Universidade Presidente Tancredo de Almeida Neves (UNIPTAN) de São João del Rei-MG
Instituição: Universidade Presidente Tancredo de Almeida Neves-UNIPTAN
Endereço: Rua José Chala Sade, 10 – Vila Marchetti, São João del Rei-MG
E-mail: allyssonmednuclear@gmail.com

Gabrielle Gontijo Guimarães

Mestrado em Cirurgia e Oftalmologia pela Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano -UNIFENAS
Endereço: Rua Basilicata, 358 - Bandeirantes, Belo Horizonte – MG
E-mail: gabrielle.ufmg@gmail.com

Carlos Alberto Zeituni

Engenheiro Químico pela Universidade Presbiteriana Mackenzie
Doutorado em Tecnologia Nuclear pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo-USP
Professor da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo-USP
Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo-USP
Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Butantã, São Paulo – SP. Prédio Ensino e Informática - IPEN
E-mail: czeituni@pobox.com

RESUMO

Dentre as infecções fúngicas mais comuns, a candidíase é um sério problema de saúde pública em todo mundo. Uma das drogas mais utilizadas para o tratamento é a Anfotericina-B, que além de ser nefrotóxica, tem potencial de causar resistência da levedura a esse antifúngico. A cintilografia pulmonar de inalação/perfusão, é um dos exames atualmente utilizados para diagnóstico de tromboembolismo pulmonar. No entanto, pacientes com alterações respiratórias inespecíficas que realizam esse procedimento na tentativa de exclusão diagnóstica, podem estar diante de uma pneumonia fúngica, ainda não diagnosticada. A literatura é escassa quando se

busca relacionar o comportamento das leveduras às baixas doses de radiação gama e seu perfil de resistência frente à Anfotericina B, após irradiadas. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil comportamental dos fungos, "in vitro", diante de baixas doses de radiação gama oriunda dos radiotraçadores utilizados em exames de cintilografia pulmonar inalação/perfusão e após a irradiação, em relação a Anfotericina B. **METODOLOGIA:** Estudo prospectivo de caso controle com cepas de *Candida albicans* distribuídas em três tubos de ensaio com quantidades idênticas acrescidas de solução salina e 40 mCi de ^{99m}Tc (Tecnécio meta estável) puro, 40 mCi de ^{99m}Tc-DTPA e 6 mCi de ^{99m}Tc-MAA respectivamente, mantendo um tubo de ensaio sem ser irradiado para fins de controle. Todo experimento sendo realizado em triplicata. Essa exposição à radiação se deu por 36 horas, acarretando seis meias-vidas do ^{99m}Tc, onde ao final da sexta meia-vida praticamente não se encontrou mais atividade radioativa significativa. Para as análises de cinética de crescimento e sensibilidade ao antifúngico foram utilizados os testes de Análise de Variância (ANOVA) baseada num modelo de medidas repetidas e o teste de Shapiro-Wilk. **RESULTADOS:** Houve diminuição do halo de crescimento dos fungos que foram irradiados em comparação ao grupo controle frente à Anfotericina B. Entretanto, os fungos não apresentaram um perfil previsível de crescimento e comportaram-se de maneiras distintas quando analisados entre os grupos (DTPA+Tc, Tc puro, MAA+ Tc, Controle), e também quando avaliados em relação aos tempos (0h, 2h, 4h, etc).

Palavras-Chave: Medicina Nuclear, Cintilografia, Candidíase, Diagnóstico Diferencial, Anfotericina B.

ABSTRACT

Among the most common fungal infections, candidiasis is a serious public health problem worldwide. One of the most used drugs for treatment is Amphotericin-B, which besides being nephrotoxic, has the potential to cause yeast resistance to this antifungal. Inhalation / perfusion pulmonary scintigraphy is one of the tests currently used to diagnose pulmonary thromboembolism. However, patients with nonspecific respiratory changes who perform this procedure in an attempt to exclude the diagnosis may be facing fungal pneumonia, which has not yet been diagnosed. Literature is scarce when trying to relate the behavior of yeasts to low doses of gamma radiation and their resistance profile against Amphotericin B, after being irradiated. **OBJECTIVE:** To evaluate the behavioral profile of fungi, "in vitro", against low doses of gamma radiation from radiotracers used in pulmonary scintigraphy inhalation / perfusion exams and after irradiation, in relation to Amphotericin B. **METHODOLOGY:** Prospective case study control with strains of *Candida albicans* distributed in three test tubes with identical amounts plus saline solution and 40 mCi of pure ^{99m}Tc (Technetium meta stable), 40 mCi of ^{99m}Tc-DTPA and 6 mCi of ^{99m}Tc-MAA respectively, keeping a tube of test without being irradiated for control purposes. Every experiment being carried out in triplicate. This exposure to radiation occurred for 36 hours, resulting in six half-lives of ^{99m}Tc, where at the end of the sixth half-life there was practically no more significant radioactive activity. For the analysis of growth kinetics and sensitivity to antifungal, the Analysis of Variance (ANOVA) tests based on a model of repeated measures and the Shapiro-Wilk test were used. **RESULTS:** There was a decrease in the growth halo of the fungi that were irradiated in comparison to the control group against Amphotericin B. However, the fungi did not present a predictable growth profile and behaved in different ways when analyzed between the groups (DTPA + Tc , Pure Tc, MAA + Tc, Control), and also when evaluated in relation to the times (0h, 2h, 4h, etc.).

Keywords: Nuclear Medicine, Scintigraphy, Candidiasis, Differential Diagnosis, Amphotericin B.

1 INTRODUÇÃO

Entre os fungos de interesse médico, leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância para o estudo em saúde pública devido à alta frequência de colonização e infecção em seres humanos. Nas últimas décadas, o avanço tecnológico da medicina garantiu maior sobrevida aos pacientes com enfermidades que antes eram potencialmente deletérias, como AIDS, neoplasias hematológicas, câncer e outras doenças imunossupressoras. Por outro lado, aumentou o número de infecções fúngicas oportunistas, principalmente as causadas pelo gênero *Candida* (ARAÚJO *et al.*, 2017)

A candidíase pode advir tanto de uma infecção primária como secundária e tem como principais sítios de infecção, boca, órgãos genitais e tecidos externos. Em pacientes hospitalizados, cujo sistema imunológico pode estar mais debilitado, as espécies de *Candida* podem causar candidíase invasiva (CI), podendo atingir tecidos mais profundos como traquéia, pulmão e trato gastrointestinal, ou até mesmo a corrente sanguínea (candidemia) (CALDERONE; CLANCY, 2011 & PEGHIN; TIMSIT, 2016 & KULLBERG, ARENDRUP, 2015).

A colonização por *Candida* ocorre em até 80% dos pacientes internados em UTI na primeira semana, mas, apenas uma pequena quantidade dessa colonização, torna-se uma infecção grave (LAGUNES; RELLO, 2016). Estudos multicêntricos por sua vez, avaliaram tanto a epidemiologia quanto os preditores de mortalidade por fungos e demonstraram que de 27 a 55% das mortes relatadas foram devido à CI (BASSETTI *et al.*, 2015 & BASSETTI *et al.*, 2014).

Embora a *Candida albicans* (*C. albicans*) ainda seja a causa mais comum de CI, as infecções causadas por espécies não-*albicans* tem aumentado nos últimos anos. Essas alterações no perfil das espécies estão relacionadas, em grande parte, aos mecanismos de resistência criados pelos fungos aos medicamentos antifúngicos (MCCARTHY; WALSH, 2017) (GUINÉ, 2014).

O padrão-ouro para a detecção de CI é a cultura de locais estéreis do corpo (como peritônio, líquido espinhal, líquido articular e medula óssea), entretanto, a interpretação do diagnóstico torna-se mais difícil quando se trata do isolamento nos sistemas respiratório, digestivo e urogenitais, devido à presença fisiológica das espécies *Candida*, na microbiota da superfície mucosa desses sistemas (LAGUNES; RELLO, 2016).

Diante disso, o diagnóstico de CI baseia-se principalmente na hemocultura que por sua vez, apresenta baixa sensibilidade além de ser demorado. Embora existam outros exames mais sensíveis, baseados em biologia molecular, por exemplo, a disponibilidade de tais testes envolve alto valor agregado e, portanto, não é uma realidade na rotina da maioria dos hospitais (ARENDRUP, 2013).

Atualmente, uma das drogas mais utilizadas e que apresenta os melhores resultados é a Anfotericina B. No entanto, a nefrotoxicidade e a resistência a esse antifúngico estimulam a variedade de estudos existentes para identificar estratégias processuais ou farmacológicas no intuito de atenuar tanto os mecanismos de resistência como a toxicidade deste medicamento (SCHLOTTFELDT, 2015).

Pacientes que se apresentam com alterações respiratórias não patognomônicas como dor ventilatório dependente, alterações radiológicas parenquimatosas inespecíficas, dessaturação de oxigênio, dentre outras sintomatologias semelhantes, podem levar a suspeita de tromboembolismo pulmonar (TEP). Entretanto, na ausência ou em casos de contra indicação médica do exame de escolha dessa condição clínica que é hoje a angiotomografia pulmonar (CTPA), alguns centros lançam mão da cintilografia pulmonar inalação/perfusão que também é um teste de diagnóstico estabelecido para suspeita de TEP na tentativa de exclusão diagnóstica (ZIESSMAN *et al*, 2014) (KONSTANTINIDES *et al.*, 2019)

Acontece que ao realizar esse procedimento podem estar diante de uma pneumonia fúngica por *Candida albicans*, ainda não diagnosticada, que obteve pouca resposta ao tratamento (YOUNG; FLYNN, 2005). A pneumonia é um dos diagnósticos diferenciais a ser considerado, principalmente na unidade de emergência hospitalar. É especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI) que os pacientes admitidos apresentam maior risco de IC, o que pode ser causado pelo déficit no sistema imunológico, internação prolongada e colonização por *Candida* (LAGUNES; RELLO, 2016) (PAPAROUPA *et al*, 2016).

Prosseguindo o raciocínio, depara-se com a medicina nuclear, método de exame imagiológico que tem o paciente como fonte radioativa. Utiliza-se radiotraçadores específicos em baixa dosagem para cada órgão do corpo humano, que são ministrados por via endovenosa, intratecal, inalatória ou por ingesta oral. Os tecidos passam então, a emitir radiação gama oriunda do tecnécio meta-estável (^{99m}Tc), produto do decaimento radioativo do molibidênio (^{99}Mo), o que possibilita a visualização e avaliação metabólica desses órgãos e tecidos (HIRONAKA *et al*, 2017).

Paralelamente, a indústria brasileira já utiliza o Cobalto 60, fonte de radiação gama, em altas doses, utilizada na prática de radioesterilização de materiais médicos, que ao encontrar os microrganismos, a energia rompe a cadeia de DNA desses seres, levando-os à morte ou à incapacidade de reprodução. Como as ondas eletromagnéticas possuem grande poder de penetração, os organismos podem ser alcançados onde quer que estejam, tanto em embalagens lacradas como em produtos acondicionados das mais variadas maneiras, o que garante a total eficácia do processo (IPEN, 2017).

Apesar da existência de diversos estudos que versam sobre o comportamento dos fungos e microrganismos frente a altas doses de radiação gama, as referências que relacionam o comportamento das leveduras às baixas doses de radiação gama e o seu perfil de resistência frente à Anfotericina B depois de irradiadas, ainda são escassas na literatura. Segundo (BARBOSA, 2011), o estresse externo gerado pela corrente elétrica contínua, pode mudar a estrutura de membrana da parede celular do fungo. Apesar de relacionar com altas doses de radiação gama, outro estudo, também, evidencia alterações de parede celular dos fungos após a irradiação. (GRILLO, 2016). De acordo, com (VIREIRA; SANTOS, 2016), as mudanças provocadas na parede celular das leveduras de *Candida albicans*, conferem a maior resistência deste microrganismo à Anfotericina B.

Em suma, o objetivo desse estudo é avaliar o comportamento “in vitro” do fungo da espécie *Candida albicans* diante de baixas doses de radiação gama oriunda dos radiotraçadores utilizados como substrato em exames de cintilografia pulmonar inalação/perfusão, após a irradiação, em relação à Anfotericina B, e por fim, observar se houve alteração na resistência da levedura a este antifúngico.

2 METODOLOGIA

I Descrição do tipo de pesquisa

Estudo prospectivo com caso controle.

II Descrição dos procedimentos

Culturas microbianas

Utilizou-se cepa de referência de *C. albicans* ATCC 10231, adquirida em empresa idônea fornecedora de materiais e microrganismos para laboratórios de pesquisa e análises clínicas. Cada frasco contendo cinco discos com *C. albicans* inativadas e em altas concentrações (acima de 100.000 UFC/ml). Após reativação do fungo por técnica específica e padronizada pela empresa fornecedora da cepa, três tubos de ensaio foram preenchidos com uma amostra populacional de $1-5 \times 10^6$ de *C. albicans* cada (MOSALLAM *et al.*, 2018), e foram acrescidos 10 ml de solução salina (SF 0,9%) com 40 mCi de ^{99m}Tc (Tecnécio meta estável) puro, 40 mCi de ^{99m}Tc -DTPA e 6 mCi de ^{99m}Tc -MAA respectivamente, mantendo um tubo de ensaio sem ser irradiado para fins de controle. Essa exposição à radiação se deu por 36 horas, acarretando seis meias-vidas do ^{99m}Tc , onde ao final da sexta meia-vida praticamente não havia mais atividade radioativa significativa. Após serem submetidas à radiação as leveduras foram imediatamente estocadas a -80°C ou -20°C em caldo Sabouraud com 20% de glicerol até as análises de cinética de crescimento e sensibilidade ao fungicida.

Avaliação da cinética de crescimento de *C. albicans*

As leveduras foram reativadas em caldo Sabouraud por 24 horas a 37°C até turvação do meio de cultura. Em seguida, estrias foram realizadas em ágar Sabouraud e as placas incubadas por 24 horas a 37°C . Colônias isoladas foram homogeneizadas em salina estéril até a que turvação da solução fosse equivalente a turbidez da escala 0,5 de McFarland. Em seguida, uma alíquota (10% v/v) dessa suspensão será adicionada em caldo Sabouraud. A cultura permaneceu incubada por 48 horas a 37°C sem agitação e alíquotas foram retiradas nos tempos zero, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 horas para se estimar o número de células viáveis. Após diluições seriadas as amostras foram plaqueadas em ágar Sabouraud e as placas incubadas por 24h a 37°C . As colônias contadas e o número de UFC/ml foram calculados de acordo com (SANTOS *et al.*, 2014) conforme mostrado na **Figura 1**.

Avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B

Foi padronizada utilizando o método de difusão em disco, como descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* em protocolo específico para leveduras (CLSI, 2008). Estrias de culturas pura da levedura previamente crescidas em meio Ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C foram homogeneizadas em salina estéril até a que turvação da solução fosse equivalente a turbidez da escala 0,5 de McFarland. As células foram espalhadas pela superfície

do ágar Sabouraud e o fungicida adicionado na superfície. As placas permaneceram incubadas por 24h e os halos de inibição foram verificados, conforme apresentado na **Figura 2**.

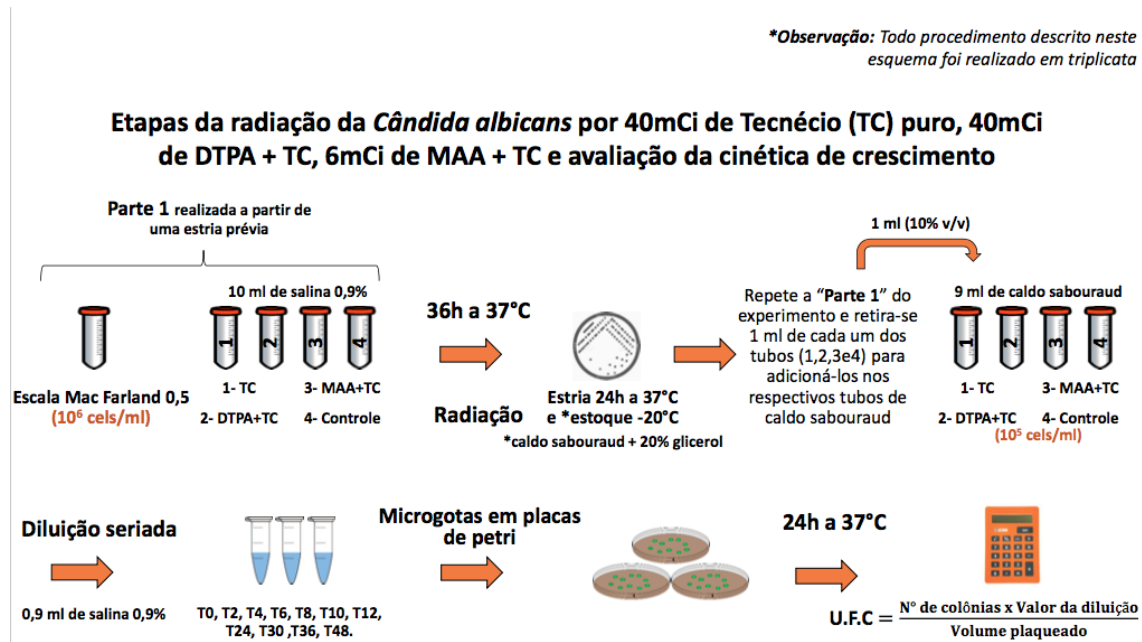


Figura 1 – Efeitos da irradiação da *Candida albicans* e avaliação da cinética de crescimento.

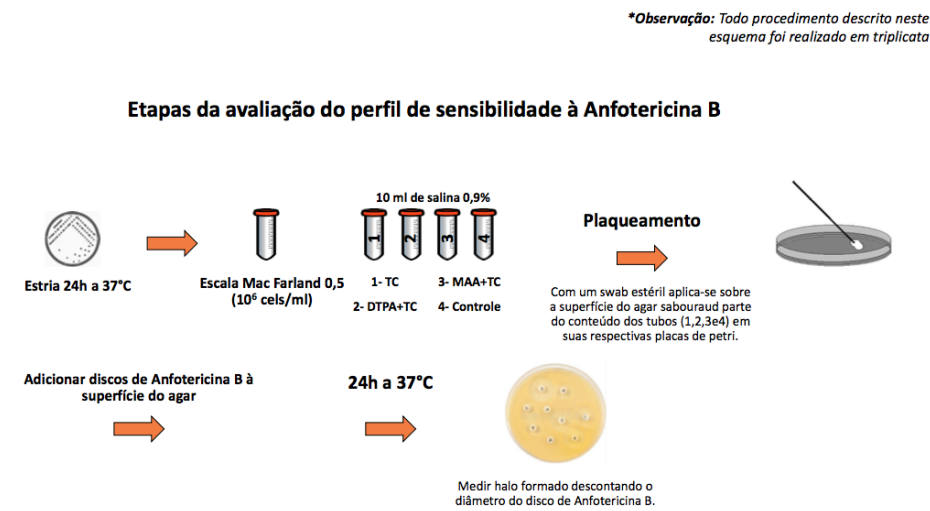


Figura 2 – Etapas de avaliação do perfil de sensibilidade à Anf. B.

Experimento

A cepa de *C. albicans* ATCC 10231 inativa, foi reativada após a retirada asséptica de um disco com altas concentrações desse microrganismo do frasco de origem com auxílio de uma pinça flambada/resfriada e imediatamente colocado em um tubo de ensaio com 3 ml de

caldo Sabouraud. Foi, então, incubada em uma estufa a 37°C por duas horas até turvação visível. Logo em seguida com o uso de uma pipeta calibrada em 100 µl e uma alça de platina flambada/resfriada foi inoculada em forma de estrias em uma placa de Petri de meio de cultura não seletivo ágar-ágar por esgotamento e posteriormente incubada em estufa a 37°C por uma noite (“*overnight*”). No dia seguinte, três tubos de ensaio foram preenchidos com uma amostra populacional de $1-5 \times 10^6$ de *C. albicans* cada (MOSALLAM *et al*,2018), retirados a partir da estria prévia da placa Petri e foram colocados 10 ml de solução salina estéril (SF 0,9%) com 40 mCi de ^{99m}Tc puro (tubo 1), 40 mCi de ^{99m}Tc -DTPA (tubo 2) e 6 mCi de ^{99m}Tc -MAA (tubo 3) respectivamente, mantendo um tubo de ensaio (tubo 4) sem ser irradiado como controle até a que turvação da solução fosse equivalente a turbidez da escala 0,5 de McFarland. Os tubos de ensaio foram separados em estufas diferentes a 37°C. Aguardou-se seis meias-vidas do ^{99m}Tc , com duração total de 36 horas. Em seguida repetiu-se a primeira parte do experimento onde, 1 ml (10% v/v) de cada tubo (1, 2, 3 e 4) foi retirado e colocado em tubos de ensaio com 9 ml de caldo Sauboraud. Após serem submetidas à radiação as leveduras foram imediatamente estocadas a -20°C em caldo Sabouraud com 20% de glicerol até as análises de cinética de crescimento e sensibilidade ao fungicida (SPENCER & SPENCER,1996). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas com 0,9 ml de solução salina estéril a 0,9% em tubos “*eppendorf*” de 1,5 ml, nos tempos 0, 2, 4, 6, 10, 12, 24, 36 e 48 horas para se estimar o número de células viáveis. Após diluições seriadas as amostras foram plaqueadas (microgotas feitas em placas de Petri com ágar -ágar) e as placas incubadas por 24h a 37°C. No dia seguinte, as colônias foram contadas e o número de UFC/ml calculados (SANTOS *et al.*, 2014). Todo o procedimento realizado e descrito foi realizado em triplicata.

Para a avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B, utilizou-se um *swab* estéril de material proveniente dos tubos controle e pós irradiação conforme descrito. Realizado, então, o plaqueamento em placas de Petri contendo ágar Sabouraud, espalhando o material em sua superfície com o *swab*. Logo em seguida, adicionou-se um disco de Anfotericina B no centro de cada placa e armazenaram-se todas placas em estufas diferentes a 37°C por 24 horas. Novamente todo o procedimento foi feito em triplicata. No dia posterior foram medidos os halos de inibição com uma régua milimétrica, descontando-se o diâmetro do disco de Anfotericina B.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**I Análise estatística da cinética de crescimento dos fungos *C. albicans***

Neste estudo foram apresentadas as medidas descritivas Mínimo, Máximo, Média e desvio-padrão (d.p.), além, de percentuais como medidas para descrever os resultados das variáveis estudadas. Com o objetivo de avaliar a influência dos fatores Grupo de estudo e Tempo de avaliação na contagem de fungos do gênero *Candida* uma Análise de Variância baseada num modelo de Medidas Repetidas foi aplicado aos dados do presente estudo. A **Tabela 1** mostra que existe influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) tanto do Tempo de avaliação quanto do Grupo de estudo, de forma conjunta, na Contagem de fungos do gênero *Candida* (em log), isto é, existe interação estatisticamente significativa entre os dois fatores estudados no comportamento da contagem de fungos. Desta forma, o resultado indica que existe diferença no comportamento de um fator (por exemplo: Grupo) para cada nível do outro fator (por exemplo: Tempo de avaliação), independentemente dos fatores analisados separadamente mostrarem-se estatisticamente significativos ou não significativos (Grupo de estudo: $p = 0,227 \rightarrow$ Não significativo e Tempo de avaliação: $p < 0,001 \rightarrow$ Significativo). Ressalta-se que os dados de Contagem de fungos original foram transformados, ou seja, foi recalculado o Logaritmo na base 10 da Contagem de fungos do gênero *Candida* uma vez que a variabilidade das medidas originais realizadas no Tempo e nos grupos eram “explosivas”. Com isso, caso os dados não fossem transformados, os pressupostos para utilização da Análise de Variância baseado num modelo de Medidas Repetidas não seriam aceitos e a análise não poderia ser aplicada aos dados. Mesmo com os dados transformados, existe uma restrição adicional no caso da utilização das Medidas Repetidas, ou seja, a medida da esfericidade (“Variâncias iguais” entre os grupos e tempos avaliados). E, como essa a condição de esfericidade foi violada e o valor da Esfericidade foi maior do que 0,75 os resultados foram ajustados pelo método de Huynh-Feldt (H-F) para alcançar a maior fidedignidade dos resultados apresentados, sem perda de generalização do modelo estatístico aplicado.

Tabela 1 - Análise de Variância baseado num modelo de Medidas Repetidas para a contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) quanto às variáveis

Grupo de estudo e Tempo de avaliação

Fonte de Variação	Soma de quadrados	g.l.	Quadrados médios	F	P
Grupo	0,451	3	0,150	1,792	0,227
Erro (Grupo)	0,671	8	0,084		
Tempo	122,222	5,9	20,601	698,084	< 0,001
Tempo × Grupo	1,316	17,8	0,074	2,505	0,006
Erro (Fase)	1,401	47,5	0,030		

BASE DE DADOS: 96 casos (4 Grupos avaliados em 8 tempos, sendo, 3 réplicas para cada grupo e tempo)

NOTA: F → Estatística da Análise de Variância

p → Probabilidade de significância do teste

g.l. → grau de liberdade

- Devido a esfericidade ter sido violada o resultado foi ajustado pelo método de *Huynh-Feldt*

Uma vez que a ANOVA baseada num modelo de Medidas Repetidas mostrou interação estatisticamente significativa entre os 2 fatores estudados na contagem de fungos do gênero *Candida* (em log), a Tabela 2 mostra que, fixando o fator tempo de avaliação, tem-se que no Tempo 0h (inicial) somente o grupo “DTPA + Tecnécio” apresentou, em média, contagem de fungos significativamente maior do que o grupo “Controle”, portanto, em média, as contagens nos grupos “Tecnécio” e “MAA + Tecnécio” não diferem significativamente entre si, além disso, esses 2 grupos não diferem significativamente dos demais. No que tange ao Tempo 2h após, o resultado mostra que, em média, os grupos “DTPA + Tecnécio” e “MAA + Tecnécio” não diferem significativamente entre si, porém, esses 2 grupos apresentaram média de Contagem de fungos significativamente maior do que o grupo “Tecnécio”, além disso, o grupo Controle não difere significativamente dos 3 grupos estudados. Para o tempo avaliado 6h após, os resultados mostram que, em média, os grupos “Tecnécio”, “DTPA + Tecnécio” e “Controle” não diferem significativamente entre si, porém, esses 3 grupos apresentaram média de Contagem de fungos significativamente maior do que o grupo “MAA + Tecnécio”. Em relação aos demais tempos avaliados (4h, 10h, 12h, 24h e 36h), os resultados mostram que não existe

diferença estatisticamente significativa da contagem de fungos do gênero *Candida*, em média, entre os 4 grupos estudados de acordo com as comparações múltiplas aplicadas (Obs.: o teste de comparações múltiplas LSD foi utilizado neste estudo).

Nas comparações entre os tempos avaliados em cada um dos 4 grupos de estudo, os resultados mostram que em relação ao grupo “Tecnécio” não existe diferença estatisticamente significativa, em média, na contagem de fungos entre os tempos 10h, 12h e 24h, porém, esses 3 tempos apresentaram contagem de fungos significativamente maior do que encontrado nos demais tempos estudados, além disso, a contagem de fungos nos tempos 36h e 6h não mostraram-se significativamente diferentes entre si, mas, em média, apresentaram contagem de fungos significativamente maior do que nos tempos 4h, 2h e 0h e, por fim, a contagem de fungos no tempo 4h foi significativamente superior aos avaliados nos tempos 2h e 0h, sendo que, estes 2 últimos tempos não mostraram diferenças significativas entre si. Nos demais grupos estudados também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados e a interpretação e conclusão das comparações entre os tempos é análogo ao discutido no início deste parágrafo. A Figura 3 representa a visualização dos resultados discutidos anteriormente.

Tabela 2 - Medidas descritivas e comparativas da contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação

	Tempo (h)	n	Medidas descritivas			
			Mínimo	Máximo	Média	d.p.
Tecnécio	0	3	4,57	4,64	4,61	0,04
	2	3	4,35	4,94	4,67	0,30
	4	3	5,52	5,88	5,76	0,20
	6	3	6,92	7,04	6,96	0,07
	10	3	7,37	7,75	7,52	0,20
	12	3	7,42	7,67	7,52	0,13
	24	3	7,47	7,56	7,52	0,05
	36	3	7,07	7,28	7,18	0,11
DTPA + Tecnécio	0	3	4,61	5,01	4,77	0,21
	2	3	5,00	5,29	5,16	0,15

	4	3	5,59	6,28	6,01	0,37
	6	3	6,85	7,04	6,92	0,11
	10	3	7,36	7,78	7,53	0,22
	12	3	7,54	7,79	7,67	0,12
	24	3	7,67	7,82	7,76	0,08
	36	3	7,11	7,20	7,17	0,05
<hr/>						
	0	3	4,55	4,72	4,63	0,09
	2	3	5,19	5,24	5,21	0,02
	4	3	5,60	6,09	5,82	0,25
	6	3	6,08	6,80	6,33	0,40
MAA + Técnico	10	3	7,40	7,52	7,44	0,07
	12	3	7,44	7,80	7,62	0,18
	24	3	7,48	7,97	7,74	0,25
	36	3	7,09	7,20	7,14	0,05
<hr/>						
	0	3	4,23	4,60	4,45	0,19
	2	3	4,80	5,08	4,97	0,15
	4	3	5,44	5,99	5,76	0,29
	6	3	6,48	6,88	6,74	0,22
Controle	10	3	7,35	7,43	7,39	0,04
	12	3	7,49	7,55	7,52	0,03
	24	3	7,60	7,64	7,61	0,02
	36	3	7,09	7,26	7,16	0,09

BASE DE DADOS: 96 casos (4 Grupos avaliado em 8 tempos, sendo, 3 réplicas para cada grupo e tempo)

Resultado da ANOVA baseado num modelo de medidas repetidas:

Fonte de variação: *Tempo* → ($F_{5,9; 47,5} = 698,084$; $p < 0,001$)

Grupo → ($F_{3; 8} = 1,792$; $p = 0,227$) *Tempo* × *Grupo* → ($F_{17,8; 47,5} = 2,505$; $p = 0,006$)

Conclusão	0h	2h	4h	6h	10h	12h	24h	36h
------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------

p/ Grupo:	2 > 4	(3=2) > 1	1=2=3= 4	(1=2=4) > 3	1=2=3= 4	1=2=3= 4	1=2=3= 4	1=2=3= 4
Conclusão	<i>Tecnício</i>	<i>DTPA + Tecnício</i>	<i>MAA + Tecnício</i>	<i>Controle</i>				
p/ Tempo:	(10=12=24)>(36=6)>4>(2=0)	(24=12=10) >(36=6) >4>2>0	24> 10> 36> 6> 4> 2> 0 12> 36> 6> 4> 2> 0	(24=12)> 36> 6> 4> 2> 0 10> 6> 4> 2> 0				

NOTA: Os valores de *p* na tabela referem-se à probabilidade de significância da Análise de Variância baseado num modelo de Medidas Repetidas.

Nos casos onde há diferenças significativas comparações múltiplas (LSD) são realizadas.

LEGENDA do Grupo: 1. *Tecnício* 2. *DTPA+Tecnício* 3. *MAA+Tecnício*
4. *Controle*

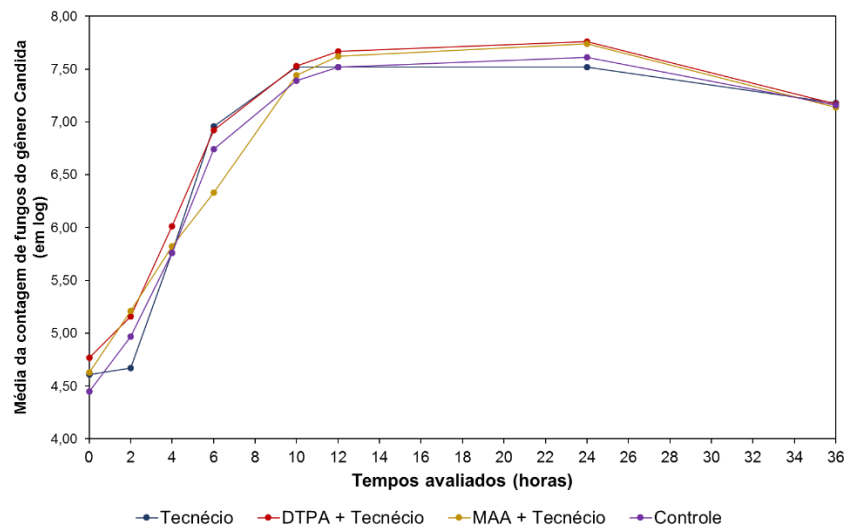


Figura 3 - Médias contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação. Base de dados: 96 casos (4 Grupos avaliados em 8 tempos, sendo, 3 réplicas para cada grupo e tempo)

A **Tabela 3** e a **Figura 4** mostram a avaliação do pressuposto de normalidade de resíduos para a utilização e confiabilidade nos resultados apresentados pela Análise de Variância (ANOVA) baseada num modelo de Medidas Repetidas. E, os resultados sugerem que os resíduos da análise são normalmente distribuídos, ou seja, pelo teste de Shapiro-Wilk a normalidade dos resíduos para cada um dos 8 tempos avaliados não foi rejeitada e a probabilidade de significância (*p*) do teste foi superior a 0,05 ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos *estudentizados* da Análise de Variância baseada em Medidas Repetidas

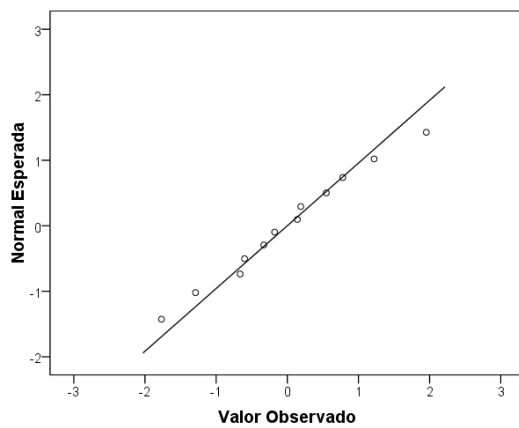
Resíduos <i>estudentizados</i>	Teste de Shapiro-Wilk		
	Estatística	g.l	P
0h	0,992	12	1,000
2h	0,944	12	0,558
4h	0,901	12	0,165
6h	0,919	12	0,276
10h	0,901	12	0,164
12h	0,962	12	0,809
24h	0,890	12	0,119
36h	0,965	12	0,855

BASE DE DADOS: 12 casos, por tempo (sendo, 3 medidas realizadas por Grupo, em cada tempo)

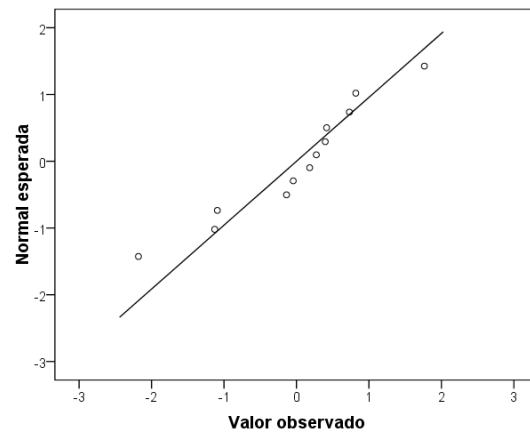
NOTA: *Estatística* → Estatística do Teste de *Shapiro-Wilk*

g.l. → Grau de liberdade

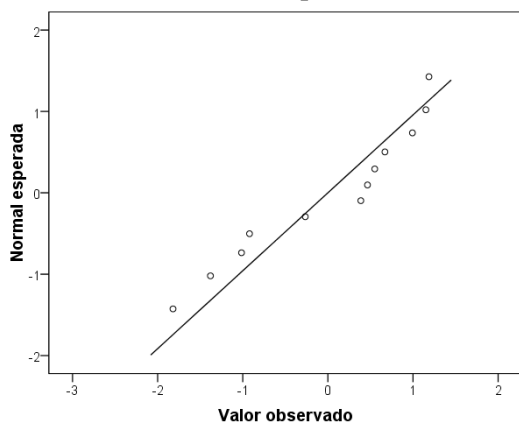
p → Probabilidade do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*



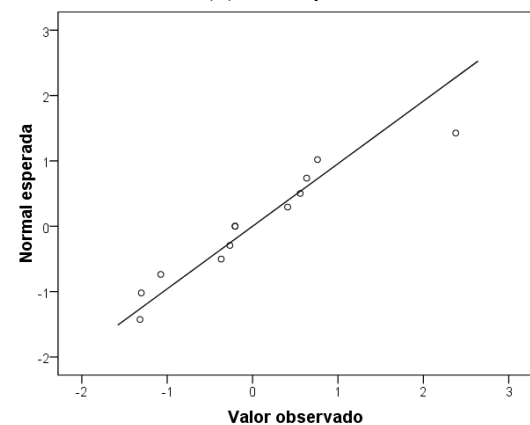
(a) Tempo 0 h



(b) Tempo 2 h



(c) Tempo 4 h



(d) Tempo 6 h

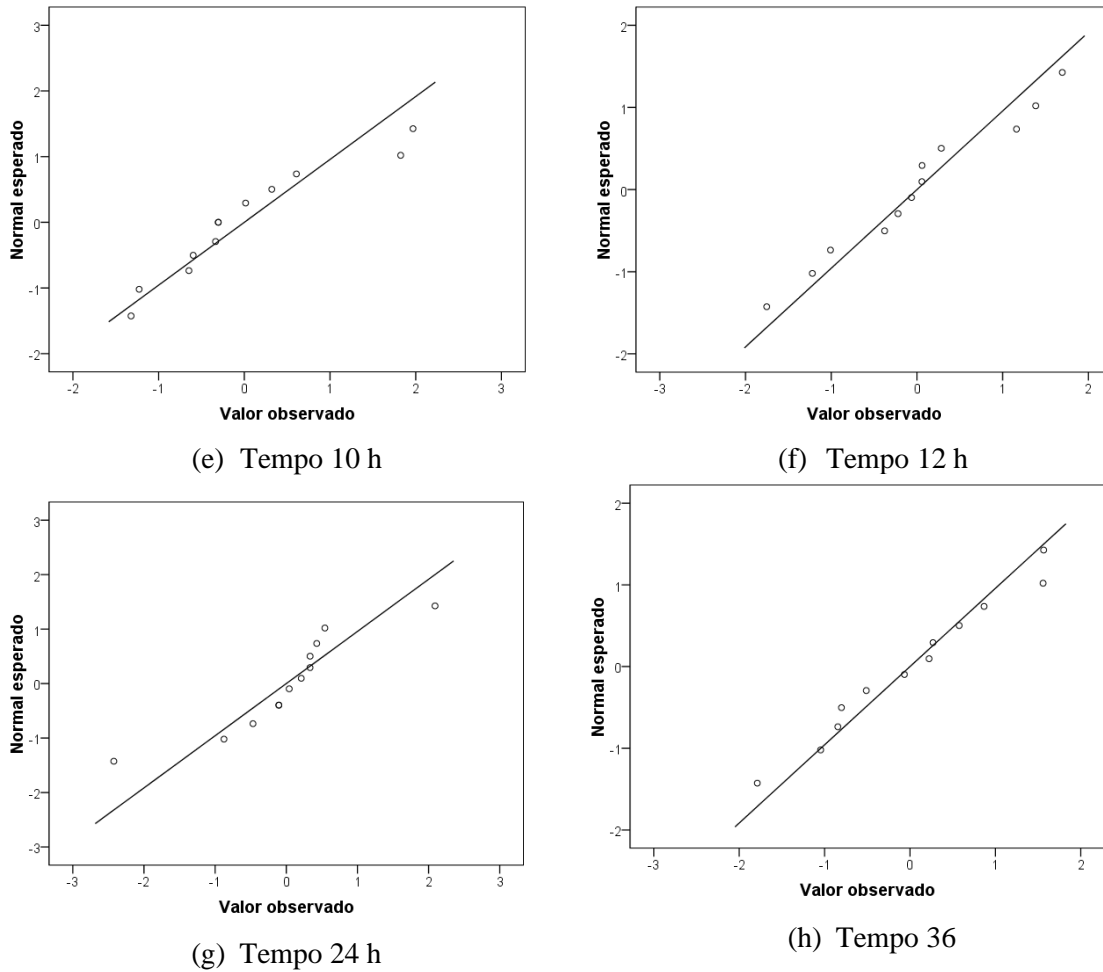


Figura 4 - Gráfico do tipo Q-Q para avaliação de normalidade de Resíduos *estudentizados* nos Tempos de: 0h, 2hs, 4hs, 6hs, 10hs, 12hs, 24hs e 36 hs.

Análise do perfil de sensibilidade dos fungos à Anfotericina B

A Anfotericina B é indicada para formas graves de doença fúngica invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos. São grandes moléculas que atuam na membrana celular do fungo, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando sua especificidade. Também interferem com a permeabilidade e com as funções de transporte pela sua capacidade de formar grandes poros na membrana causando distúrbios graves no equilíbrio iônico, com perda de K^+ extracelular, além de utilizar múltiplas vias de sinalização intracelular para indução da morte da levedura (VIEIRA; SANTOS, 2016). Baseado nestas informações, algo que possa alterar a membrana celular consequentemente fortalecer a parede celular do fungo, poderá criar resistência da levedura à Anfotericina B. Mecanismos já conhecidos de fortalecimento ou alteração de parede celular da *Candida albicans* com resistência ao antifúngico citado são a produção de biofilme,

alterações do gene ERG3, aumento de esfingolipídeos e aumento na expressão da bomba de efluxo, como, também, processos de melanização deste microrganismo (VIEIRA; SANTOS, 2016). Algumas dessas alterações podem ser causadas devido ao estresse externo por ação da radiação gama. (GRILLO et al., 2015).

O presente estudo demonstrou que após o estresse proporcionado às cepas de *C. albicans* pelos raios gama em baixas doses, quando avaliou-se o comportamento dos microrganismos frente a Anfotericina B, houve diminuição do halo de crescimento das triplicatas irradiadas quando comparado ao grupo controle, conforme Tabela 4 de resultados e na Figura 5, conferindo maior resistência dos grupos irradiados.

Tabela 4 – Dados referentes ao halo de inibição.

	1ª Repetição	2ª Repetição	3ª Repetição	Média	Desvio Padrão
Tecnécio	1,8 cm	1,3 cm	1,3 cm	1,47 cm	0,24
DTPA + Tc	1,3 cm	0,8 cm	1,3 cm	1,13 cm	0,24
MAA + Tc	1,6 cm	1,6 cm	2,3 cm	1,83 cm	0,33
Controle	1,6 cm	1,8 cm	2,6 cm	2 cm	0,43

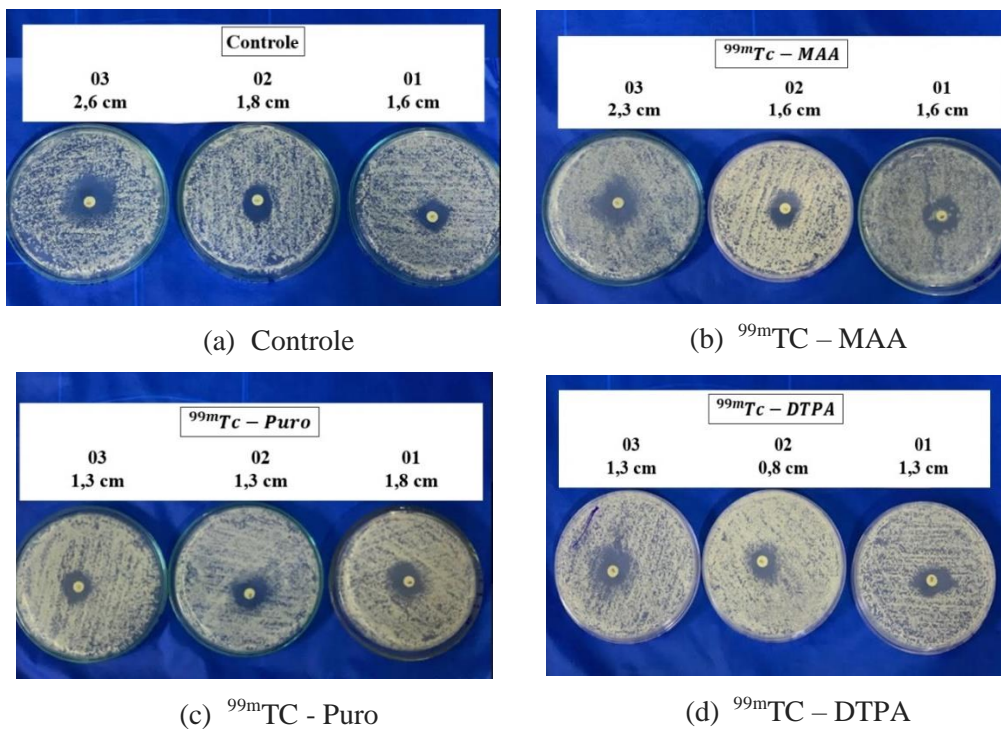


Figura 5 – Perfil de halo de inibição fúngica frente à Anf. B.

3 CONCLUSÃO

Após experimento realizado para avaliar o comportamento do fungo da espécie *Candida albicans* diante de baixas doses de radiação gama oriunda dos radiotraçadores utilizados como substrato para realização de exames de cintilografia Pulmonar inalação/ perfusão e avaliação do comportamento desses fungos, após a irradiação, em relação ao antifúngico Anfotericina B chegou-se a conclusão que os resultados indicam que existe diferença no comportamento de um fator (Grupo) para cada nível do outro fator (Tempo de avaliação), independentemente de os fatores analisados separadamente mostrarem-se estatisticamente significativos ou não significativos. Entretanto, os fungos não apresentaram um perfil previsível de crescimento e comportaram-se de uma forma quando analisados entre os grupos (DTPA+Tc, Tc puro, MAA+Tc, Controle), comportando-se de forma diferente quando avaliados em relação aos tempos (0h, 2h, 4h, etc). E esta interação de grupo versus tempo mostra que o que acontece em cada período não é igual para todos os grupos. Com isso, estudos mais aprofundados fazem-se necessários para se relacionar de forma segura que a radiação gama tem influência significativa no perfil de crescimento desses fungos. No entanto, o que chama bastante atenção é a avaliação do halo de inibição de crescimento da *C. albicans* frente à Anfotericina B. O trabalho mostrou diminuição do halo de crescimento dos fungos que foram irradiados em comparação ao grupo controle. Evidenciou-se, então, maior resistência da cepa de *C. albicans* ao antifúngico Anfotericina B após a irradiação.

Analisando a utilização de radiação gama em baixas doses nas cintilografias pulmonares para pacientes que tenham alterações respiratórias mas que ainda não tenham um diagnóstico preciso e possam estar diante de um quadro de pneumonia fúngica, e se esteja buscando descartar Tromboembolismo Pulmonar Agudo, sugere-se que estudos mais aprofundados “in vivo” devam ser feitos para que se correlacione o grau de comprometimento desses pacientes após serem submetidos à cintilografia pulmonar inalação/perfusão. Tais estudos elucidariam a relação da radiação com a piora clínica do paciente posterior ao procedimento. Ocasionalmente a mudança do protocolo ou mesmo contraindicando o procedimento cintilográfico pulmonar para pacientes que potencialmente possam estar diante de uma pneumonia fúngica por *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

A RAÚJO, Daniela; HENRIQUES, Mariana; SILVA, Sónia. Portrait of Candida species biofilm regulatory network genes. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.

ARENDRUP, Maiken C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current opinion in critical care**, v. 16, n. 5, p. 445-452, 2010.

BASSETTI, Matteo et al. Um estudo multinacional multicêntrico de candidíase abdominal: epidemiologia, resultados e preditores de mortalidade. **Medicina intensiva**, v. 41, n. 9, p. 1601-1610, 2015.

BASSETTI, Matteo et al. Um estudo multicêntrico de choque séptico por candidemia: resultados e preditores de mortalidade. **Medicina intensiva**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.

BASSETTI, Matteo; PEGHIN, Maddalena; TIMSIT, Jean-François. O cenário atual de tratamento: candidíase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. suppl_2, p. ii13-ii22, 2016.

BARBOSA, Gleyce Moreno. Atividade antifúngica de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade em leveduras de Candida albicans. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). **Candida and candidiasis**. American Society for Microbiology Press, 2011.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. 2008.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5-10, 2014.

GRILLO, Michel Rodrigues Ferreira. Efeito da radiação ionizante Cobalto 60 na morfologia e metabolismo de clamidoconídios de *Candida albicans*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

GRILLO, Michel RF et al. Effects of 60 cobalt ionizing radiation in morphology and metabolism of yeasts and chlamydospore of *Candida albicans*. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, 2015, São Paulo.

HIRONAKA, Fausto Haruki; ONO, Carla Rachel; BUCHPIQUEL, Carlos Alberto; SAPIENZA, Marcelo Tatit; LIMA, Marcos Santos. **Medicina nuclear: princípios e aplicações**. [S.l: s.n.], 2017.

IPEN, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares. **Radioesterelização**. Acesso em 13 de Junho de 2017. Disponível em: https://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?secao_id=741

KONSTANTINIDES, SV *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, Volume 41, Issue 4, 21 January 2020, Pages 543–603, 2019.

KULLBERG, Bart Jan; ARENDRUP, Maiken C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

LAGUNES, L.; RELLO, J. Candidíase invasiva: do microbioma à infecção, terapia e prevenção. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1221-1226, 2016.

MCCARTHY, Matthew W.; WALSH, Thomas J. Drugs currently under investigation for the treatment of invasive candidiasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 26, n. 7, p. 825-831, 2017.

MOSALLAM, Farag M. et al. Biomolecules-mediated synthesis of selenium nanoparticles using *Aspergillus oryzae* fermented Lupin extract and gamma radiation for hindering the growth of some multidrug-resistant bacteria and pathogenic fungi. **Microbial pathogenesis**, v. 122, p. 108-116, 2018.

PAPAROUPA, Maria et al. Pulmonary embolism in pneumonia: still a diagnostic challenge? Results of a case-control study in 100 patients. **Disease markers**, v. 2016, 2016.

SANTOS, Valdirene Alves dos et al. Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. **Brazilian oral research**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

DOS SANTOS SCHLOTTFELDT, Fábio et al. Prevention of amphotericin B nephrotoxicity through use of phytotherapeutic medication. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, p. 73-78, 2015.

SPENCER, John F.T.; SPENCER, Alicia L. R. The growth kinetics and fermentation behavior of *Saccharomyces* yeast. 1996.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, Jairo Ivo. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 2016

ZIESSMAN, Harvey A.; O' MALLEY, Janis P.; THRALL, James H.; FAHEY, Frederic H. **Medicina Nuclear** (Tradução da 4ª edição), Rio de Janeiro, 2014.