Universidade de São Paulo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo





Michel Rodrigues Ferreira Grillo

Efeito da radiação ionizante Cobalto 60 na morfologia e metabolismo de leveduras e clamidoconídios de *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.

São Paulo 2016

Ficha catalográfica Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo © Reprodução autorizada pelo autor

Grillo, Michel Rodrigues Ferreira

Efeito da radiação ionizante Cobalto 60 na morfologia e metabolismo de leveduras e clamidoconídios de Candida albicans / Michel Rodrigues Ferreira Grillo. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional Orientador: Andrés Jimenez Galisteo Junior

Descritores: 1. CANDIDA ALBICANS. 2. LEVEDURAS. 3. LINFÓCITOS. 4. RADIAÇÃO GAMA. 5. MORFOLOGIA. 6. METABOLISMO.

USP/IMTSP/BIB-11/2016.

Aos meus país, Angelina e Nelson, pois graças a vocês que sei o que é amor e por se dedicarem à minha educação como ser humano. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer. Sou e serei eternamente grato pela dedicação, confiança, amor e incentivos tão marcantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.**, que sempre se tornou presente em todos os momentos, seja de dificuldades ou não. E por mostrar a importância de confiarmos em nosso potencial.

Ao **Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**, por ter me dado à oportunidade de trilhar os caminhos científicos, e que cultivando a ousadia coisas incríveis poderão acontecer a qualquer instante. Serei sempre grato por ver que tudo o que faz é simplesmente por amor ao ser humano e por mostrar o significado da palavra altruísta.

À **Dra. Marina Cortez Demicheli**, com um jeito especial de ser mostrou uma singela fonte de inspiração e motivação que transformou momentos difíceis em momentos de crescimento e evolução. Sem dizer seu carisma e otimismo, que me fez sempre lutar para alcançar o que se mostra impossível.

À **Profa. Dra. Gilda Maria B. Del Negro** pela confiança e por mostrar que com dedicação e humildade tudo é possível.

À Cleusa Fumica Hirata Takakura que com paciência e muita sabedoria possibilitou um grande crescimento pessoal e mostrou como levar a vida de uma maneira mais que especial.

A Roselaine Pereira Alvim Cardoso e Solange Fernandes Ferreira dos Santos, por sempre estarem disposta a ajudar e pelo companheirismo.

Ao Luciano Monteiro da Silva, pelos auxílios e suporte de grande valia.

À equipe do Laboratório de Micologia Médica (LIM-53): Antonio Marques dos Santos Filho, Danilo Yamamoto Thomaz, Dulce Sachiko Figueiredo, Mauro Cintra Giudice, Monica Scarpelli Martinelli Vidal, Roseli Santos Freitas, Sarah Desirée Barbosa Cavalcanti, por terem me recebido com tanto carinho. Ao IPEN, e em especial a Profa. Dra. Nanci do Nascimento por receberme no Centro de Biologia Molecular/IPEN.

Ao Eng, Carlos G. da Silveira e Eng^a. Elizabeth S. R. Somessari por realizarem a irradiação das amostras utilizadas nesse projeto.

A todos os amigos que do laboratório de protozoologia: MSc. Andrea da Costa, em especial pela revisão do exemplar final, MSc. Bruna Macedo, MSc. Camila Aparecida de Carvalho, MSc. Bárbara Fialho Carvalho, Dra. Nahiara Esteves Zorgi, Cayuan Brandão, MSc. Dennis Fujita, Elizama Carneiro M. Bezerra, MSc. Felipe Hermida, Gisele Pacifico Sartori, MSc. Jaqueline Rodrigues Polizeli, Joana Desiderato, MSc. Juliana Nunes Mecca, Dra. Luciana Regina Meireles, Talita Caroline Coelho dos Santos, Thiago Fidelis Ferrão, Vanessa Rodrigues da Silva, pelos inúmeros momentos de apoio e descontração.

A Eliane Araújo (CPOSGIMT) pelo auxílio durante todo o período e em especial a Prof. Dra. Thelma Suely Okay pela compreensão e valiosas orientações profissionais.

Ao LIM49HCFMUSP pelo suporte dado ao projeto.

A CAPES e a FAPESP (2014/26782-8), pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste projeto, o meu muito obrigado!

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesqueciveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

"Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela."

Paulo Coelho

RESUMO

Grillo MRF. Efeito da radiação ionizante Cobalto 60 na morfologia e metabolismo de leveduras e clamidoconídios de *Candida albicans*. (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Candida albicans é um fungo de grande importância médica e veterinária por ser patogênico ao homem e a outros animais de sangue quente, sendo responsável por 80 a 90% das infecções fúngicas. Por apresentar sintomas semelhantes aos de infecções bacterianas sistêmicas há uma dificuldade para seu diagnostico imediato. Essas dificuldades podem levar a atrasos da terapia antifúngica, o que contribui para as altas taxas de mortalidade associadas a essa infeccão. A capacidade de alternar entre levedura e hifa (dimorfismo) é um dos atributos de virulência comum a C. albicans. Estruturas de resistência denominadas clamidoconídios são muito comuns neste patógeno, representando tipos celulares distintos que se formam em resposta a determinadas condições genéticas ou ambientais. Recentemente, diversos fármacos antifúngicos e novas estratégias terapêuticas têm entrado em uso, possibilitando ao fungo a aquisicão de uma resistência aos fármacos. O uso de radiação ionizante tem sido empregado para produção de imunógenos. A eficácia da ação fungicida de uma determinada dose de radiação depende de alguns fatores, tais como, fase de seu ciclo de vida e espécie. Estes fatos determinaram a presente pesquisa, que teve como objetivo avaliar os efeitos da radiação gama (60Co) em leveduras e clamidoconídios de C. albicans com doses entre 320 e 10240 Gy. Houve a perda da capacidade reprodutiva dos clamidoconídios e das leveduras em doses de 6000 Gy. A viabilidade das leveduras irradiadas manteve-se superior a 85% e os clamidoconídios mantiveram sua viabilidade superior a 70%. A análise linfoproliverativa resultou em significância de p<0,001 para ambas as formas. Através da microscopia de transmissão e de fluorescência pode-se notar alterações citoplasmáticas e anomalias na parede celular de ambas as formas morfológicas de C. albicans.

Palavras-chaves: *Candida albicans*, metabolismo, leveduras, radiação gama, morfologia, linfócito.

ABSTRACT

Grillo MRF. Effects of 60 Cobalt ionizing radiation in morphology and metabolismo of yeasts and chlamydospore of *Candida albicans*. (Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Candida albicans is a fungus of great medical and veterinary importance to be pathogenic to humans and other warm-blooded animals, accounting for 80-90% of fungal infections. Because the symptoms are similar to those of systemic bacterial infections there is a difficulty for immediate diagnosis. These difficulties can lead to delays of antifungal therapy, which contributes to the high mortality rates associated with this infection. The ability to switch between yeast and hyphae (dimorphism) is one of the attributes of common virulence of C. albicans. Resistance structures called chlamydospores are very common in the pathogen, representing different cell types that form in response to certain genetic or environmental conditions. Recently, several antifungal agents and new therapeutic strategies have come into use, allowing the fungus to acquire a resistance to the drugs. The use of ionizing radiation has been used to produce immunogens against several parasites. The efficacy of the fungicidal action of a given dose of radiation depends on factors such as stage of its life cycle and kind. These facts determined the present study, which aimed to evaluate the effects of gamma radiation (⁶⁰Co) in yeast and chlamydospores of C. albicans with 320 and 10240 Gy doses. There was damage of reproductive capacity of chlamydospores at 6000 Gy doses and the reproductive capacity of yeast at 6000 Gy.doses. The viability of irradiated yeasts remained greater than 85% and chlamydospores maintained their viability higher than 70%. The lymphoproliferative analysis resulted in significance of p<0.001 for both forms. Through microscopy and fluorescence microscopy may be noted cytoplasmic changes and abnormalities in the cell wall of both morphological forms of C. albicans.

Descriptors: *Candida albicans*, metabolism, yeasts, gamma radiation, morphology, lymphocyte.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitros
¹³⁷ Cs	Césio 137
³ H-Tdr	Timidina tritiada
⁶⁰ Co	Cobalto 60
C. albicans	Candida albicans
CO ₂	Dióxido de Carbono
g	Força g
Gy	Gray - Unidade de dose absorvida
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
mg	Miligramas
min.	Minutos
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
٥C	Graus Celsius
PBS	Tampão de fosfato salino
rpm	Rotações por minuto
T. cruzi	Trypanosoma cruzi
T. gondii	Toxoplasma gondii
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Monitoramento da capacidade de reprodução das amostras de leveduras, de C. albicans, irradiadas em diferentes doses de Cobalto 60..... 39 Figura 2 Monitoramento da capacidade de reprodução das amostras de clamidoconídios, de C. albicans, irradiadas em diferentes doses de Cobalto 60..... 40 Viabilidade das leveduras de C.albicans irradiadas em Figura 3 dose de 6000 Gy (listras pretas), em dose de 10240 Gy (cinza) e não irradiadas (Branco). Analise estatística entre as amostras apresentam P<0,001 (***). A viabilidade foi avaliada 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação..... 43 Figura 4 Viabilidade dos clamidoconídios de C. albicans irradiadas em dose de 6000 Gy (listras pretas), em dose de 5120 Gy (cinza) e não irradiadas (Branco). Analise estatística entre as amostras controle e irradiadas apresentam P<0,001 (***) enquanto o grau de significância entre as amostras irradiadas é de P>0,05 (ns). A viabilidade foi avaliada 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação..... 43 Figura 5 Viabilidade das leveduras de C. albicans irradiadas em dose de 6000 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. P<0,001 (***) na análise estatística entre 2 horas e 48 horas. Não houve significância estatística (ns) entre 2 horas e 24 horas e 24 horas e 48 horas apresentante P>0.05..... 44 Figura 6 Viabilidade das leveduras de C. albicans irradiadas em dose de 6000 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. P<0,001 (***) na análise estatística entre 2 horas e 24 horas e 2 horas e 48 horas. Não houve significância estatística (ns) 24

horas e 48 horas apresentante P>0,05.....

45

- Levedura controle de C. albicans com núcleo em Figura 14 evidencia. Mitocondria (M), núcleo (N) e Vacúolo (V)..... 52 Figura 15 Levedura controle de C. albicans com Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) preservada. Vacúolo (V), Núcleo (N) e corpúsculo lipídico (CL)..... 53 Figura 16 Levedura controle de C. albicans com vacúolo (V) e Núcleo (N) em evidencia..... 54 Figura 17 Levedura de C. albicans controle (A) com parede celular (PC) bem definida, membrana plasmática (MP), mitocôndria (M) preservada e corpúsculo lipídico (CL). Levedura irradiada (B) com dose de 10240 Gy com parede celular (PC) preservada e citoplasma retraído (CR)..... 56 Figura 18 Levedura irradiada de C. albicans com citoplasma (C) menos condensado, vesícula secretora (VS), vacúolo (V), núcleo (N) evidenciados e citoplasma retraído (CR). 57
- Figura 20 Levedura irradiada de *C. albicans* com núcleo (N) em evidencia, e parede celular (PC) irregular...... 59
- Figura 22 Microscopia eletrônica de levedura não irradiada com dose de 6000 Gy com mitocôndrias (M), corpúsculo lipídico (CL) e núcleo (N) parcialmente preservadas...... 62

Figura 31	Clamidoconídio irradiado com dose de 6000 Gy de C.	
	albicans com Parede celular (PC) e membrana	
	plasmática (MP) preservada. Núcleo (N), mitocôndrias	
	(M), vesículas secretoras em evidencia e presença de	
	vacúolo	73
Figura 32	Levedura controle de C. albicans marcados com	
	calcoflúor em aumento de 100x	74
Figura 33	Leveduras de C. albicans irradiadas com dose de	
	10240 Gy, marcados com calcoflúor em aumento de	
	100x	75
Figura 34	Leveduras de C. albicans irradiadas com dose de 6000	
	Gy, marcados com calcofluor em aumento de 100x +	
	zoom 2x	76
Figura 35	Clamidoconídio controle de C. albicans marcados com	
	calcoflúor em aumento de 100x + zoom 2x	77
Figura 36	Clamidoconídio de C. albicans irradiadas com dose de	
	5120 Gy, marcados com calcofluor em aumento de	
	100x + zoom 2x	78
Figura 37	Clamidoconídio de C. albicans irradiadas com dose de	
	6000 Gy, marcados com calcoflúor em aumento de	
	100x + zoom 2x	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Crescimento das colônias de C. albicans em meio ágar	
	sabouraud	38
Tabela 2	Crescimento das colônias de leveduras de C. albicans	
	em meio ágar fubá e crescimento das colônias de	
	clamidonídios em meio ágar sabouraud	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Epidemiologia das candidemias	18
1.2. Características morfológicas da C. albicans	20
1.3. Radiação ionizante	23
1.3.1. Conceitos gerais	23
1.3.2. Uso da radiação ionizante em parasitoses	25
1.4. Vacinas e radiação ionizante nas candidemias	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Cultura dos fungos	31
3.1.1. Obtenção de clamidoconídios	31
3.1.2. Obtenção de leveduras	32
3.2. Irradiação das amostras	32
3.3. Avaliação da capacidade de replicação das leveduras e	
clamidoconídios	33
3.4. Analise da capacidade de reversão das leveduras e	
clamidoconídios	33
3.5. Avaliação da viabilidade celular após irradiação	34
3.6. Ensaio de linfoproliferação	34
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão	35
3.8. Análise da distribuição de quitina	36
3.9. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Avaliação da capacidade de crescimento das leveduras e	
clamidoconídios irradiados	37
4.2. Processo de reversão	41
4.3. Ensaio de viabilidade	42
4.4. Ensaio de linfoproliferação	48
4.5. Alterações da permeabilidade da membrana após a	
radiação por Cobalto 60	49
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão	51

4.7. Analise da distribuição de quitina das amostras de C.	
albicans	74
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Candida albicans* (*C. albicans*) faz parte da microbiota normal do ser humano, e está presente na superfície cutânea, região bucal, garganta, paredes do intestino grosso e dos órgãos genitais, onde o hospedeiro, com a ruptura do equilíbrio biológico, oferece meios propícios para a penetração da levedura para o interior dos tecidos e da corrente sanguínea, desenvolvendo assim a infecção fúngica¹.

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos unicelulares, pleomórficos, de ciclo sexual incompleto, e incluem aproximadamente 150 espécies, das quais cerca de 20 foram descritas como agentes etiológicos das candidíases¹.

C. albicans é um fungo patogênico ao homem e a outros animais de sangue quente, sendo responsável por 80 a 90% das infecções fúngicas em humanos. Outras espécies também possuem importância médica como: *C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. kefyr, C. utilis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*^{2,3}.

1.1 Epidemiologia das candidemias

O gênero *Candida spp*. é o quarto grupo mais comum de patógenos nosocomiais isolados de pacientes sob cuidados médicos⁴ e esta ocorrência tem sido associada à longa permanência dos pacientes no hospital e a alta mortalidade^{5,6}. No Brasil, as principais espécies agentes de candidemia são *C. albicans, C. parapsilosis* e *C. tropicalis*⁷. Em alguns hospitais nos Estados

Unidos, a incidência de fungemia nosocomial é de 10 a 15% entre todas as culturas positivas para este gênero⁸. No Brasil, estudos realizados em neonatos de baixo peso, foram encontrados índices de 4 e 15% de mortalidade⁹.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o principal padrão de transmissão de *C. albicans* é a transmissão vertical materna (através do canal vaginal da mãe), porém outra forma é através da transmissão horizontal como, por exemplo, o uso de cateteres, sondas que podem estar contaminadas¹⁰. Em dados baseados na literatura entre 2000 e 2013 mostra que a *C. albicans* foi a espécie predominantemente isolada em cavidade oral, trato respiratório e esfregaço vaginal; enquanto que as espécies de Candidas isoladas a partir de sangue, urina e pus foram predominantes espécies incomuns, tais como: *C. lusitaniae*, *C. haemulonii, C. humicola, Pichia ohmeri* e *C. ciferrii*¹¹.

Alguns estudos¹² determinaram a frequência de colonização vaginal por *Candida spp.* em um grupo de 88 pacientes com idade entre 17 e 65 anos atendidas em um serviço de ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. Das 88 amostras coletadas, 18,18% foram positivas para *Candida spp.* No mesmo trabalho foi determinado o grau de incidência e *C. albicans* prevaleceu com 81,25%, seguidas por *C. tropicalis* (6,25%), *C. glabrata* (6,25%) e *C. krusei* (6,25).

Levantamentos de dados entre 1996-2006 no Brasil demonstraram que ao considerar a AIDS como causa básica da morte e as micoses sistêmicas como as condições associadas, candidíase aparece com o segundo maior índice (30,2%)¹³.

Estudos realizados no Brasil demonstraram que há incidência do gênero *Candida spp.* em 2,49 casos para 1000 internações e 0,37 casos para 1000 pacientes-dia, sendo estes dados de 2 a 15 vezes maior que no hemisfério norte, sendo que, a mortalidade observada no decorrer de 30 dias foi de 54% e *C. albicans* foi à espécie mais comum (40,9%)¹⁴. Estes altos índices de candidemias não estão claros, podendo estar relacionado com os recursos disponíveis para os médicos, dificuldade na implementação de programas de controle de infecções em hospitais de países em desenvolvimento e o número limitado de profissionais de saúde para atender pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI).

1.2 Características morfológicas da C. albicans

Candida albicans é um fungo diploide pertencente ao Reino Fungi, grupo Eumycota, filo Deuteromycota, classe Blastomycetes e da família Criptococcace¹.

É um organismo patogênico oportunista, podendo ser encontrado sob a forma de levedura ou hifa¹⁵. As leveduras caracterizam-se pela sua forma oval, medindo de 2 a 14 micrômetros, possuem como reservatório de açúcar o glicogênio. As estruturas primárias são células que se reproduzem por brotamento. Estas células são esporos de origem assexuada e se denominam blastoconídios¹⁶. A capacidade de alternar entre levedura e hifa (dimorfismo) é um dos atributos de virulência mais discutidos. Ambas as formas morfológicas têm funções distintas durante as diferentes fases de desenvolvimento da doença, que incluem a adesão, invasão dos tecidos e a resposta imune do hospedeiro. Alguns fatores como pH, temperatura, concentração de oxigênio e a disposição de glicose afetam a morfologia do fungo¹⁷.

O desenvolvimento de hifas ou pseudo-hifas permite a quebra das barreiras do epitélio, alcançando os fluxos sanguíneos, resultando na disseminação da doença. Pseudo-hifas e os clamidoconídios representam tipos celulares distintos que se formam em resposta a determinadas condições genéticas ou ambientais¹⁸.

Os clamidoconídios são células esféricas de parede celular dupla e espessa e são estruturas de resistência do fungo. Sua localização pode ser terminal ou intercalar na hifa. A função biológica dos clamidoconídios ainda permanece um mistério e pouco se sabe sobre o seu desenvolvimento. Estas formas têm sido encontradas ocasionalmente em hospedeiros humanos, e não há indícios de que esta estrutura tenha participação no processo de infecção e patogenicidade da *C. albicans*^{19,20}.

A parede celular de *C. albicans* é responsável pela forma e proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos do meio, contribuindo para a sua patogenicidade, interação célula – hospedeiro, resposta imune do hospedeiro e sua dinâmica as diferentes condições de crescimento e estresse. A parede celular deste fungo é formada por três principais polissacarídeos; glicano, mananas e quitina²¹. O polissacarídeo manana, representa cerca de 23%, glicanos 4-60%, 1-7% lipídios, quitina representa

6-9% do peso seco da parede celular e 6-25% de proteínas. Em geral manana e manoproteínas são distribuídos ao longo da superfície da parede celular, enquanto a camada interna é composta principalmente de quitina e glicanos²².

A quitina é formada por unidades de N-acetilglicosamina, sendo um dos componentes essenciais para o desenvolvimento, crescimento e viabilidade de fungos patogênicos²³. Recentemente foram observadas proteínas associadas à parede celular, expressas em leveduras, outras encontradas apenas em hifas, proteínas achadas em ambas às formas e proteínas associadas aos diferentes nichos do hospedeiro²⁴.

Um fator importante da parede celular de *C. albicans* é a sua molécula glicano, que desempenha um papel importante na estrutura e plasticidade da parede celular e está envolvida no processo da interação hospedeiro – levedura. Estas moléculas não são reconhecidas pela imunidade adaptativa e inata, desempenhando um papel importante no equilíbrio entre saprófita, parasitismo, resistência e infecção²⁵.

Os estudos em relação à parede celular contribuem para a compreensão do funcionamento e como *C. albicans* interage com o hospedeiro durante a infecção, promovendo o desenvolvimento de melhores diagnósticos, vacinas e biomarcadores, proporcionando assim, novas ferramentas para o tratamento dessa enfermidade.

1.3 Radiação ionizante

1.3.1 Conceitos gerais

As radiações são ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com determinada velocidade, contém energia e carga elétrica. Podem ser geradas por fontes naturais ou artificiais criadas pelo homem. As radiações eletromagnéticas podem ser divididas em dois grupos, as não ionizantes (ondas de rádio e televisão, telefonia móvel e microondas) e ionizantes, as quais são subdivididas em corpusculares (α , β , nêutrons, elétrons e prótons) e as eletromagnéticas como os raios X e radiação gama.

A radiação ionizante além de muito empregada na esterilização de alimentos e produtos hospitalares, também apresenta um grande potencial na pesquisa com parasitas, fungos e toxinas²⁶, pelo fato de produzir danos diretos ou indiretos sobre as moléculas. Isto deve-se ao fato desse tipo de radiação apresentar alta energia e capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração²⁷.

O possível uso da radiação como uma tecnologia capaz de criar imunógenos potencialmente úteis como vacinas é descrita desde os anos 50²⁸. Tanto a radiação gama, os raios-X e a radiação ultravioleta têm sido convincentemente úteis na atenuação ou esterilização de agentes biológicos dos mais variados tipos. Em todos os modelos celulares estudados, a radiação promove, na dose correta, a perda da capacidade reprodutiva, mantendo o potencial imunogênico adequado²⁶. A radiação gama pode agir pelas vias direta e indireta. Na ação direta ocorre transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e modificação da estrutura química, gerando alteração na função biológica. Já a ação indireta e mais frequentemente, a radiação age pela interação com a água do meio, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando hidrogênio molecular (H₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e diversos radicais livres, como hidroxila (OH[•]), elétron aquoso (e⁻aq), átomo de hidrogênio (H[•]) e peroxila (HO₂•). Estes radicais interagem com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos da radiação, devido ao seu potencial oxidante²⁹.

Os ácidos nucléicos e as proteínas são as principais moléculas afetadas, no entanto a atividade enzimática das proteínas e lipídeos de membrana celular somente podem ser alterados com doses mais elevadas de radiação³⁰. A radiossensibilidade depende da linhagem celular, e da capacidade de reparo aos danos provocados no DNA, que, quando irreversíveis, podem levar a morte celular. Esse fenômeno pode ser imediato, tanto por agressão a genes essenciais³¹, como por indução de apoptose, via radical, em grupos celulares específicos³². No entanto, o dano mais frequente só será evidenciado na próxima divisão celular, pela perda do contato das cromátides irmãs com o fuso mitótico³³.

Além da ação sobre os processos reprodutivos dos agentes ou indução de morte fisiológica, alguns fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela ação direta da radiação ou através de radicais produzidos durante a radiólise da água são sugestivos de uma melhor resposta imunológica³⁴. Tal fato provavelmente decorre da oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes, através de receptores *scavenger*³⁵, sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos.

Estudos com proteínas de venenos de serpentes, submetidas à ação da radiação gama, vêm demonstrando a eficiência do método como ferramenta na produção e melhora na qualidade de imunógenos, somado a vantagem de não adicionar novas moléculas a amostra durante o processo, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos e à melhoria da antigenicidade de muitas proteínas³⁶.

1.3.2 Uso da radiação ionizante em parasitoses

Usualmente, a radiação é usada em altas doses apenas para esterilização de alimentos contaminados, porém vem sendo utilizada como ferramenta na tentativa de produção de imunógenos, contra diversas doenças parasitárias³⁷.

Candidatos vacinais utilizando parasitas irradiados já foram utilizados com bons resultados para helmintos²⁶. Ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni*, foram isolados e irradiados com Cobalto-60 com doses de 5 a 2000 Gy, tanto os ovos irradiados como os miracídios nas doses de 10 a 500 Gy, não conseguiram se desenvolver, porém quando foi utilizada a dose de 5 Gy, 3,2% dos caramujos desenvolveram a infecção³⁸. Quando camundongos são imunizados com cercárias irradiadas (150 a 200 Gy),

ocorre uma diminuição na carga de vermes de uma infecção desafio em até 90%, quando comparados com grupos não vacinados³⁹.

Em protozoários, ao estudar o efeito da radiação, na dose de 200 Gy, em esporozoítos de *Eimeria tenella* (Protozoa;Coccidia), notou-se danos nos mecanismos nucleares e celulares de reprodução, resultando em esterilização do agente⁴⁰.

Em outros modelos como Trypanosoma cruzi, (T. cruzi) a radiação apenas induziu a perda de infectividade em um processo dosedependente⁴¹. Entretanto, outros autores observaram que não houve proteção quando camundongos, que receberam parasitas irradiados, eram inoculados com formas sanguíneas virulentas não irradiadas⁴². Camundongos imunizados com 1x10⁸ formas/animal (3 doses) de T. cruzi irradiados com ⁶⁰Co, foram desafiados com 1x10² parasitas metacíclicos isolados de Triatoma infestans e em todos os animais houve uma diminuição em parasitemia⁴³. Outro estudo realizado da bovinos. utilizando Trypanosoma brucei, demonstrou que esses animais imunizados com 107 formas dos parasitas irradiados a 600 Gy (137Cs), conferiram proteção completa contra desafio com 10³ parasitas não irradiados⁴⁴.

Em plasmódios, parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de voluntários humanos, com esporozoítos irradiados, induziu proteção parcial contra a infecção, mas sem proteção contra desafio com formas eritrocíticas⁴⁵. Esporozoítos de *Plasmodium berghei*, irradiados e criopreservados, foram inoculados em camundongos e apresentaram altos índices de proteção quando desafiados com as mesmas formas não

irradiadas⁴⁶. Foi possível observar também que esporozoítos irradiados foram capazes de invadir hepatócitos e se transformar em trofozoítos, mas com degeneração após essa fase, gerando imunidade semelhante à doença natural no hospedeiro⁴⁷. Quando voluntários humanos foram submetidos a imunizações com esporozoítos de *P. falciparum* irradiados a 150 Gy, desenvolveram anticorpos e foram protegidos contra malária transmitida através de mosquitos⁴⁸.

Em *Toxoplasma gondii*, a radiação foi empregada inicialmente com o objetivo de eliminar a infectividade de cistos em carnes contaminadas⁴⁹, ou formas infectantes como oocistos em alimentos contaminados^{50,51}, porém, quando taquizoítos foram submetidos a doses de 200 Gy, foi observado que os taquizoítos irradiados promovem uma resposta de anticorpos similar a dos animais tratados, demonstrando que os parasitas irradiados nessa dose preservam suas características, além de inibir completamente a reprodução, sem danificar os processos de invasão celular e seu metabolismo basal, fornecendo em animais uma imunidade semelhante a infecção natural⁵².

Utilizando preparações de taquizoítos irradiados por via oral, foi observada a produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos C57BI/6j, similar a infecção crônica. Seu uso com adjuvantes anti-ácidos induziu produção de IgA fecal e menos significativamente de IgG fecal. Outro fato importante observado foi que as preparações orais induziram proteção quantitativa ao desafio dos animais imunizados por cepa cistogênica, que foi semelhante à imunização parenteral, quando o hidróxido de alumínio foi usado como adjuvante⁵³. Todos estes dados demonstram o

27

potencial uso da radiação ionizante no desenvolvimento de uma vacina para toxoplasmose, para uso em animais e principalmente em felinos domésticos e selvagens.

1.4 Vacinas e radiação ionizante nas candidemias

Um diagnóstico precoce e preciso de infecções sistêmicas por fungos é difícil devido à inespecificidade dos sintomas clínicos e falta de padronizações⁵⁴. Uma vacina profilática e/ou terapêutica seria o meio mais seguro e eficaz para atender a essa necessidade da área da saúde.

C. albicans é a quarta causa principal de infecção hospitalar e um problema de saúde pública, sendo necessário o desenvolvimento de imunoterapias. Neste sentido⁵⁵ observaram que há antígenos específicos em determinadas áreas na superfície de *C. albicans* que podem ajudar o hospedeiro na resistência contra a candidíase disseminada, tornando possível que os indivíduos possam ser ativamente imunizados pela administração da vacina ou passivamente imunizados por transferência de anticorpos.

Trabalhos relacionados com vacinas para *C. albicans* demonstraram que houve uma melhora significativa na redução da carga fúngica durante candidíase disseminada, tanto em camundongos imunocompetentes e imunocomprometidos após aplicação intraperitoneal da vacina rAls1p-N⁵⁶.

Alguns autores⁵⁷ estudaram a produção de uma possível vacina contra infecções por *C. albicans* na cavidade bucal. Seus resultados demonstraram que ao utilizar cepas inativadas de *C. albicans* anticorpos

salivares foram produzidos, e estes impediram a adesão de *C. albicans* às células epiteliais, sem sintomas clínicos como inflamação e febre.

Outro estudo demostrou uma diminuição no influxo de vários aminoácidos após leveduras de *C. albicans* serem irradiadas com radiação gama em doses de 2,5 a 10 Gy⁵⁸. Nestas doses não ocorre a morte das leveduras, mas sugerem que a membrana plasmática pode ser um dos alvos primários que antecede a lesão nuclear.

Porém poucos trabalhos utilizando a radiação e seu efeito em *Candida albicans* são encontrados na literatura e os resultados iniciais demonstram um caminho muito promissor. Diante de toda a importância médica e veterinária da candidíase o estudo de uma potencial vacina para proteção contra esta infecção fúngica é muito importante. A utilização da radiação ionizante vem demonstrando sucesso em outras parasitoses e pode representar uma ferramenta importante por manter as características iniciais do parasita preservadas, mimetizando no organismo toda a resposta naturalmente causada pelo parasita e ainda garantindo ao hospedeiro a ausência do desenvolvimento da doença.

2 OBJETIVOS

a) Gerais

Avaliar os efeitos biológicos em diferentes formas de *C. albicans*, frente à radiação gama por Cobalto 60.

b) Específicos

Determinar a dose de radiação ionizante em que o organismo perde sua capacidade de reprodução, nas formas de levedura e clamidoconídios.

Determinar a capacidade de reversão entre as formas de clamidoconídios e das leveduras irradiadas.

Avaliar a viabilidade dos clamidoconídios e das leveduras após o processo de radiação por Cobalto 60.

Avaliar o índice de proliferação em linfócitos humanos de pacientes positivos para *C. albicans* em contato com fungos irradiados.

Avaliar a ocorrência de alterações morfológicas, estruturais e de permeabilidade de membrana em clamidoconídios e leveduras irradiadas em diferentes doses.

Avaliar modificações citoplasmáticas dos clamidoconídios e das leveduras irradiadas, por Cobalto 60.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura dos fungos

A cepa ATCC 6458645 de *C. albicans*, de fácil cultivo, foi gentilmente cedida pela Dra. Gilda Maria B. Del Negro, pesquisadora no Laboratório de Micologia – LIM-53/IMTSP/LIMHCFMUSP. Os fungos utilizados nos experimentos foram mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP – Universidade de São Paulo) utilizando-se do meio ágar Sabouraud e ágar fubá.

Os sais e demais reagentes usados foram de qualidade pró-análise, sendo a água utilizada purificada em sistema Milli-Q[®], apresentando resistividade de 18,2 MΩ.cm.

3.1.1 Obtenção de clamidoconídios

Para uma maior concentração de clamidoconídios utilizou-se como base o protocolo⁵⁹ com algumas modificações.

Foi adicionado ao meio de indução e crescimento de clamidoconídios, ágar fubá, 4 mL de solução tamponada com fosfato – NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS) e gentilmente homogeneizado. Com o auxílio do aparelho Vortex (Phoenix Luferco AP 56) a suspensão foi agitada por 1 min. Após esse processo o material foi centrifugado a 1500 rpm, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o pellet descartado e adicionado 10mg/mL da enzima zimoliase e mantido por 2 horas e vortexado por 30 segundos, logo após esse processo o mesmo foi centrifugado a 1500 rpm, a 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi coletado e o pellet descartado. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10000 rpm por 15 min. O pellet formado foi ressuspendido em PBS v/v pH 7,2 estéril, e armazenada para análise.

3.1.2 Obtenção de leveduras

Primeiramente o material fúngico localizado na parte mais superficial da colônia, mantida em ágar Sabouraud, foi raspado com o auxílio de uma alça descartável e estéril e adicionado em um eppendorf com 1,5 mL de PBS e agitado com o auxílio do aparelho Vortex (Phoenix Luferco AP 56[®]) por 30 segundos, logo após esse processo o mesmo foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min. O pellet formado foi ressuspendido em PBS v/v pH 7,2 estéril, e armazenado para análise.

3.2 Irradiação das amostras

Todas as amostras foram irradiadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em parceria com a Dra. Nanci do Nascimento.

As leveduras e clamidocodiníos foram transferidos para seus respectivos frascos com 1,5 mL de PBS. Os diferentes frascos foram submetidos a radiação, em suas respectivas doses predeterminadas de 320Gy, 640 Gy, 1280 Gy, 2560 Gy, 5120 Gy, 6000 Gy, 7000 Gy, 8000 Gy,

9000 Gy e 10240 Gy, com exposição a raios- γ de uma fonte de ⁶⁰Co (GAMMACELL[®], Atomic Energy of Canada, Ltd.) de forma homogênea na presença de O₂. O grupo controle permaneceu na parte externa da fonte durante todo o processo de irradiação.

3.3 Avaliação da capacidade de replicação das leveduras e clamidoconídios.

A capacidade de multiplicação das leveduras e clamidoconídios foi monitorada através do plaqueamento, já que, somente as células com capacidade de reprodução preservada podem formar colônias.

Após o processo de irradiação as amostras foram deixadas em descanso por 24 horas, retirou-se uma alíquota de células com concentrações de 10⁷ célula/ml, e adicionados as suas respectivas placas. As leveduras irradiadas nas doses de 320 Gy, 640 Gy, 1280Gy, 2560 Gy, 5120 Gy, 6000 Gy, 7000 Gy, 8000 Gy, 9000 Gy e 10240 Gy foram plaqueadas, em triplicatas, no meio ágar sabouraud e mantidos a 37°C por 7 dias, e os Clamidoconídios irradiados nas doses de 320 Gy, 8000 Gy, 9000 Gy e 10240 Gy, 1280Gy, 2560 Gy, 5120 Gy, 6000 Gy, 7000 Gy, 8000 Gy, 9000 Gy e 10240 Gy foram plaqueadas, em triplicatas, no meio ágar sabouraud a 27°C por 7 dias.

3.4 Análise da capacidade de reversão das leveduras e clamidoconídios

Após o processo de irradiação as amostras foram deixadas em descanso por 24 horas, retirou-se uma alíquota de células com concentrações variando de 10⁷ células/mL e adicionados em placas. As

leveduras irradiadas nas doses de 320 Gy, 640 Gy, 1280Gy, 2560 Gy, 5120 Gy, 6000 Gy, 7000 Gy, 8000 Gy, 9000 Gy e 10240 Gy foram plaqueadas em meio ágar Fubá e mantidos a 27°C por 7 dias, e os Clamidoconídios irradiados nas doses de 320 Gy, 640 Gy, 1280 Gy, 2560 Gy, 5120 Gy, 6000 Gy, 7000 Gy, 8000 Gy, 9000 Gy e 10240 Gy foram plaqueadas em meio ágar sabouraud e mantidos a 37 °C por 7 dias.

3.5 Avaliação da viabilidade celular após irradiação

A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se método modificado de coloração com Verde-Janus 0,05%⁶⁰. As leveduras, os clamidoconídios controles e das respectivas doses onde não foi observado crescimento de colônias, tiveram sua concentração ajustada para 10⁶ células/mL em PBS 1x e foram adicionadas em tubos cônicos, acompanhados por um período de 2 horas, 24 horas e 48 horas após o processo de irradiação. Uma percentagem (10uL) da solução celular era retirada e homogeneizada com 10uL de Verde-Janus 0,05%, após 10 min de incubação na temperatura ambiente, a proporção de células viáveis foi determinada por contagem em câmara de Neubauer⁶¹.

3.6 Ensaio de linfoproliferação.

Para o ensaio de linfoproliferação os linfócitos foram isolados do sangue periférico, para isso foi coletado sangue humano em tubos heparinizados, dilui-se em solução salina estéril para torná-lo menos viscoso, logo após foi colocado cuidadosamente em um tubo contendo um gradiente de densidade Ficoll (Ficoll-Hypaque[®]), centrifugado por 20 min a

2200 rpm por 3 min a 15 °C. Na camada contendo os linfócitos foi retirada com auxílio de uma pipeta, em seguida, adicionado 1mL de solução salina estéril e novamente centrifugado por 10 min a 1500 rpm, 15 °C a fim de retirar o excesso de Ficoll.

Após a lavagem as células foram adicionadas ao meio RPMI 1640 suplementado com soro humano do tipo AB numa proporção de 10%. Com o azul de Tripan (Sigma-Aldrich[®]) ajustou-se o número de células para $2x10^6$ células/mL. Um volume de 100 µL da suspensão celular ($2x10^6$ células/mL) acrescido com clamidoconídios ou leveduras (2:1), controle ou irradiados, de *C. albicans* previamente incorporados com timidina marcada com trício (3H-Tdr), foi adicionada em cada poço de placas de cultivo de 96 poços, e em seguida incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ por 3 dias.

As placas foram aspiradas por um aspirador automático (Cell Harvester[®]) após o período de incubação e as células depositadas em uma membrana de fibra de vidro, após secarem essas membranas foram imersas no liquido de cintilação (Beta Plate Scint[®]). O resultado final é obtido através da média aritmética da quantidade de poços utilizado para cada estímulo.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras irradiadas e controles foram lavadas com PBS, e em seguida ressuspendidas e fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M, com sucrose a 2%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% e tampão s-colidine 0,1M, pH 7,4. Posteriormente as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, com sacarose a 2%; e contrastação com

acetato de uralina a 5% em etanol 50%; posteriormente lavadas com etanol a 70%; desidratadas em 2,2-dimetroxipropeno acidificado com ácido clorídrico 1N e com acetona 100%. Os materiais foram infiltrados com acetona a 100% e com Epon Polybed 812 e Araldite 502. Após a polimerização a 100% foram realizados cortes ultrafinos e posterior coloração com acetato de uranila saturada e citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico JEOL-JEM-1010[®] do Departamento de Patologia da FMUSP. Todo material submetido a microscopia eletrônica foi processada no laboratório de patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da FMUSP.

3.8 Análise da distribuição de quitina.

Para avaliarmos os efeitos da radiação na estrutura celular de *C. albicans*, os fungos foram marcados com 1 uL de Calcofluor-white 0,05% (Sigma[®], S. Luis, MO, EUA) em uma suspensão de 10 uL de células (10⁶ células/mL) e visualizado em microscópio de fluorescência com filtro ultravioleta.

3.9 Análise estatística.

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prism 6.0 e a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida do teste de Tukey. O resultado foi considerado significativo quando p<0,05.
4.1 Avaliação da capacidade de crescimento das leveduras e clamidoconídios irradiados.

Através do método de plaqueamento determinou-se a dose em que as leveduras e clamidoconídios perderam a capacidade de reprodução. Nesse método, as colônias formadas pelo crescimento de células individuais são visualizadas e contadas.

Verificamos que as leveduras e clamidoconídios perderam sua capacidade de reprodução com a dose de 6000 Gy, como pode ser observado na Tabela 1, demonstrando que com o aumento da dose de radiação ocorreu uma diminuição progressiva na formação de colônias (Fig.1).

Doses	Levedura			Clamidoconídio		
(Gy)	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
320	+++	+++	+++	+++	+++	+++
640	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1280	+++	+++	+++	++	++	++
2560	++	++	++	+	+	+
5120	+	+	+	-	-	+
6000	-	-	-	-	-	-
7000	-	-	-	-	-	-
8000	-	-	-	-	-	-
9000	-	-	-	-	-	-
10240	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 - Crescimento das colônias de C. albicans em meio ágarsabouraud.

Presença de alto (+++) médio (++), baixo (+) número de Colônias de *C.albicans* (+), Ausência de Colônias de *C.albicans* (-)



leveduras, de *C. albicans*, irradiadas em diferentes doses de Cobalto 60.



clamidoconídios, de *C. albicans*, irradiadas em diferentes doses de Cobalto 60.

4.2 Processo de Reversão

Para verificar se o processo de irradiação interfere no mecanismo de dimorfismo do fungo, analisamos sua capacidade de reversão conforme descrito no item 3.4 em material e métodos.

Ao analisar a capacidade de reversão das amostras, não obtivemos crescimento na dose de 6000 Gy para a formas de leveduras e 5120 Gy para os clamidoconídios (Tab. 2).

Levedura para Clamidoconídio para Clamidoconídio (27°C) Levedura (37°C) Doses (Gy) Placa Placa 2 Placa 1 Placa 3 Placa 2 Placa 3 1 0 + + + + + + 320 + + + + + + 640 + + + + + + 1280 + + + + + + 2560 + + + ++ + 5120 + + + -_ _ 6000 _ _ 7000 _ _ 8000 -_ -_ -_ 9000 ------10240 --_ _ _ _

Tabela 2 - Crescimento das colônias de leveduras de *C. albicans* em meio ágar fubá e crescimento das colônias de clamidonídios em meio ágar sabouraud.

Presença de Colônias de *C.albicans* (+), Ausência de Colônias de *C.albicans* (-)

4.3 Ensaio de viabilidade

Estabelecidas as doses em que não há crescimento ou formação de colônias nas leveduras e nos clamidoconídios (6000 Gy), verificou-se a viabilidade das amostras irradiadas e dos controles utilizando o corante Verde - Janus, como descrito em material e métodos

No grupo controle as leveduras mantiveram-se em sua maioria viáveis, correspondendo a 98% após 2 horas, 98% após 24 horas e a 96% após 48 horas da irradiação. Observamos nas leveduras irradiadas uma menor viabilidade em relação ao controle entre a menor dose de inibição reprodutiva do fungo e a dose máxima. As células irradiadas com doses de 6000 Gy apresentaram uma média de 87,3%, após 2 horas, de células viáveis, 83,9% após 24 horas e 79,5% após 48 horas (Fig. 3). O grupo irradiado com 10240 Gy apresentou uma média de 77,2%, após 2 horas, de células viáveis, 70,3% após 24 horas e 67,7% após 48 horas. Ao comparar estatisticamente as amostras irradiadas com doses de 6000 Gy e 10240 Gy obteve-se um grau de significância de p<0,001. O controle positivo de Clamidoconídios correspondeu a 97% após 2 horas, 96,5% após 24 horas e a 95% após 48 horas. Os Clamidoconídios irradiados com doses de 6000 Gy corresponderam a 74,5% após 2 horas, 73,1% após 24 horas e a 70,3% após 48 horas. O grupo de clamidoconídios irradiados com doses de 5120 Gy apresentou 74,1% após 2 horas, 70,1% após 24 horas e a 68,1% após 48 horas. A análise estatística em relação ao controle e as amostras com doses de 5120 Gy e 6000 Gy apresentou uma significância de p<0,001.

Porém ao analisar estatisticamente as amostras irradiadas com doses de 6000 Gy e 5120 Gy obteve-se um resultado contrário, não houve significância, apresentando p>0,05 (Fig. 4).



Figura 3 – Viabilidade das leveduras de *C.albicans* irradiadas com doses de 6000 Gy (listras pretas) e 10240 Gy (cinza) e não irradiadas (Branco). Análise estatistica entre as amostras apresentou p<0,001 (***). A viabilidade foi avaliada 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação.



Figura 4 – Viabilidade dos clamidoconídios de *C.albicans* irradiados com doses de 6000 Gy (listras pretas) e 5120 Gy (cinza) e não irradiados (Branco). Análise estatística entre as amostras controle e irradiadas apresentaram p<0,001 (***). A viabilidade foi avaliada 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação.

A análise das leveduras irradiadas com doses de 6000 Gy, em relação ao período de 2 horas e o de 48 horas se mostrou significante estatisticamente (P<0,001). Diferentemente da análise entre 2 horas e 24 horas e a relação de 24 horas e 48 horas que se mostrou não significante estatisticamente (P>0,05) (Fig. 5).

As leveduras irradiadas com doses de 10240 Gy, em relação ao período de 2 horas e o de 48 horas revelaram-se significantes estatisticamente (p<0,001). O período de 2 horas e 24 horas apresentou significância estatística com P<0,001. Diferentemente da análise estatística do período de 24 e 48 horas que obteve um P>0,05 não significante (Fig. 6).



Figura 5 - Viabilidade das leveduras de *C.albicans* irradiadas com dose de 6000 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p<0,001 (***).</p>



Figura 6 - Viabilidade das leveduras de *C.albicans* irradiadas com dose de 10240 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p<0,001 (***).

Tanto a análise estatística dos clamidoconídios irradiados com doses de 6000 Gy (Fig. 7) e 5120 Gy (Fig. 8) em relação ao tempo comparativamente não foi significativo, apresentando p>0,05 (ns).



Figura 7 - Viabilidade dos clamidoconídios de *C.albicans* irradiadas com dose de 6000 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p>0,05 (ns).



Figura 8 - Viabilidade dos clamidoconídios de *C.albicans* irradiadas com dose de 5120 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p>0,05 (ns).

A análise comparativa entre as diferentes estruturas morfológicas e suas respectivas doses de irradiação, mostrou ser significante (P<0,001) em todos os períodos analisados (Fig. 9).



Figura 9 – Análise estatística da viabilidade de clamidoconídios e leveduras de C.albicans irradiadas com dose de 6000 Gy na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p<0,001 (***).</p>



Figura 10 – Análise estatística da viabilidade de clamidoconídios, irradiados com 6000 Gy e leveduras, irradiadas com 10240 Gy, de *C.albicans*, na escala de tempo de 2 horas, 24 horas e 48 horas após a irradiação. p<0,001 (***).</p>

4.4 Ensaio de linfoproliferação.

A análise estatística do ensaio de linfoproliferação mostrou que as leveduras irradiadas com 6000 Gy apresentaram um índice de expressão significante, com p<0,001, em relação as amostras não irradiadas (Fig. 11).



Figura 11 - Resposta da linfoproliferação das amostras de leveduras de *C. albicans* irradiadas com dose de 6000 Gy. Índice de expressão com p<0,001(***).

A análise estatística do ensaio de linfoproliferação mostrou que os Clamidoconídios irradiados com 6000 Gy apresentaram um índice de expressão significante, com p<0,001, em relação as amostras não irradiadas (Fig. 12).



Figura 12 - Resposta da linfoproliferação das amostras de Clamidoconídio de C. albicans irradiadas com dose de 6000 Gy. Índice de expressão com p<0,001(***).</p>

4.5 Alterações da permeabilidade da membrana após a radiação por Cobalto 60.

Através do corante Verde-Janus observou-se se houve algum comprometimento da permeabilidade da membrana dos fungos após irradiação nas doses de 5120 Gy (Fig. 13B) e 6000 Gy (Fig. 13C), quando comparamos com o grupo controle.

Quando observamos o mesmo efeito em leveduras após a exposição máxima de radiação (10240 Gy), notamos irregularidades e rompimentos em sua parede celular (Fig. 13F). Já as leveduras irradiadas com uma dose intermediária a 6000 Gy (Fig. 13E) apresentaram estruturas morfológicas mais preservadas.



Figura 13 – Amostras de *C. albicans* expostas a diferentes doses de radiação ionizante por Cobalto 60. Clamidoconídios controles (A), clamidoconídios irradiados 5120 Gy (B), clamidoconídios irradiados 6000 Gy (C), leveduras controles (D), leveduras irradiadas 6000 Gy (E) e leveduras irradiadas 10240 Gy (F), corados com Verde-Janus, aumento 10x.

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para obter uma análise mais precisa das características ultra estruturais de ambos os estados morfológicos de *C. albicans* após irradiação, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito no item 3.6 de material e métodos.

O aspecto das leveduras controle de *C. albicans*, não apresentaram alterações na estrutura da parede celular, as regiões intercelulares possuem um citoplasma denso e homogêneo, exibindo uma membrana celular aparentemente intacta e sem sinais de desorganização estrutural. Nota-se um envoltório nuclear bem definido, a presença de corpúsculos lipídicos, vacúolos e mitocôndrias bem estruturadas (Fig. 14, 15, 16).



Figura 14 – Levedura controle de *C. albicans* com núcleo em evidencia. Mitocondria (M), núcleo (N) e Vacúolo (V).



Figura 15 – Levedura controle de *C. albicans* com Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) preservada. Vacúolo (V), Núcleo (N) e corpúsculo lipídico (CL).



Figura 16 – Levedura controle de *C. albicans* com vacúolo (V) e Núcleo (N) em evidencia.

As leveduras de *C. albicans* após o processo de irradiação com doses de 10240 Gy, mostraram a presença de vários vacúolos e um citoplasma retraído em comparação com o controle (Fg. 17). Nota-se que o aspecto das vesículas secretoras (Fig 18) e mitocôndrias estão preservadas (Fig. 19). É possível observar um citoplasma menos condensado nas imagens, evidenciando claramente que a parede celular permanece conservada, havendo ocorrências de irregularidades na membrana plasmática (Fig 20).



Figura 17 – Levedura de *C. albicans* controle (A) com parede celular (PC) bem definida, membrana plasmática (MP), mitocôndria (M) preservada e corpúsculo lipídico (CL). Levedura irradiada (B) com dose de 10240 Gy com parede celular (PC) preservada e citoplasma retraído (CR).



Figura 18 – Levedura irradiada de *C. albicans* com citoplasma (C) menos condensado, vesícula secretora (VS), vacúolo (V), núcleo (N) evidenciados e citoplasma retraído (CR).



Figura 19 – Levedura irradiada de *C. albicans* com mitocôndrias (M) em evidencia, membrana plasmática (MP) e parede celular (PC) irregular.



Figura 20 – Levedura irradiada de *C. albicans* com núcleo (N) em evidencia, e parede celular (PC) irregular.

As leveduras de *C. albicans* irradiadas com doses de 6000 Gy em comparação a amostra não irradiada (Fig. 21A), nota-se que a parede celular (PC) está bem definida, mitocôndria (M), corpúsculo lipídico (CL) e membrana plasmática (MP) evidentes (Fig 21B). Este grupo apresentou o citoplasma menos condensado, havendo ocorrências de irregularidades na membrana plasmática e um núcleo bem definido (Fig. 22).



Figure 21- Microscopia eletrônica de levedura não irradiada (A) com parede celular (PC) bem definida, mitocôndria (M), membrana plasmática (MP) e corpúsculo lipídico (CL). Levedura irradiada (B) com dose de 6000 Gy com citoplasma retraído (CR), parede celular (PC) preservada, mitocôndria (M) e vesículas secretoras (VS) parcialmente preservadas.



Figura 22 - Microscopia eletrônica de levedura irradiada com dose de 6000 Gy com mitocôndrias (M), corpúsculo lipídico (CL) e núcleo (N) parcialmente preservadas.



Figura 23 - Microscopia eletrônica de levedura não irradiada (A) com parede celular (PC) bem definida, mitocôndria (M), núcleo em evidencia (N) e vacúolo (V). Levedura irradia (B) com dose de 6000 Gy com parede celular (PC) preservada, mitocôndria (M), Núcleo (N) e vesículas secretoras (VS) parcialmente preservadas.

Nas imagens seguintes, os clamidoconídios controles apresentam uma densa camada citoplasmática, uma parede celular bem definida e é possível observar a presença de corpúsculos lipídicos, mitocôndrias e núcleo bem preservado (Fig. 24, 25 e 26).



Figura 24 – Clamidoconídio controle de *C. albicans* com Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) preservada. Núcleo (N) e corpúsculo lipídico (CL) em evidência.



Figura 25 – Clamidoconídio controle de *C. albicans* com Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) preservada. Núcleo (N) e mitocôndrias (M) em evidência.



Figura 26 – Clamidoconídio controle de *C. albicans* com núcleo (N), mitocôndria(M) e vacúolo (V) em evidência.

Ao contrário das amostras controles, o material irradiado com doses de 5120 Gy, mostrou a presença generalizada de vacúolos, um citoplasma menos condensado ou apresentando uma retração, ou seja, a membrana plasmática desprende-se da parede celular e tende a deslocar-se para o centro da célula (Fig. 27). Evidencia-se claramente que a parede celular permanece preservada, porem um número relevante de células encontra-se com irregularidades na parede, havendo ocorrências de alterações na membrana plasmática, a existência de mitocôndrias preservadas (Fig 28) e vesículas secretoras podem ser observadas (Fig. 29).



Figura 27 – Clamidoconídio de *C. albicans* irradiado com dose de 5120 Gy, com parede celular (PC) preservada, vacúolos (V), corpúsculo lipídico (CL) em evidência e citoplasma retraído (CR).



Figura 28 – Clamidoconídio de *C. albicans* irradiado com dose de 5120 Gy, com mitocôndrias (M) preservadas e vacúolos (V) em evidência.



Figura 29 – Clamidoconído de *C. albicans* controle (A) com parede celular (PC) bem definida, membrana plasmática (MP) e mitocôndria (M) preservada. Clamidoconídio irradiado (B) com dose de 5120 Gy com Parede celular (PC) preservada, vesícula secretora (VS) preservada e citoplasma retraído (CR). O material irradiado com doses de 6000 Gy, revelou-se semelhante as amostras irradiadas com doses de 5120 Gy. Houve presença de vacúolos, um citoplasma menos condensado, sua membrana plasmática desprendeuse da parede celular e tendeu a deslocar-se para o centro da célula (Fig. 30D). Evidencia-se claramente que a parede celular permanece preservada, porem um número de células encontra-se com irregularidades na parede, havendo ocorrências de alterações na membrana plasmática, há existência de mitocôndrias preservadas (Fig 30). Núcleo bem estruturado e condensado e vesículas secretoras podem ser observadas (Fig. 31).



Figura 30 – Clamidoconídio de *C. albicans* irradiado com dose de 6000 Gy, com parede celular (PC) preservada, membrana plasmática (MP) irregular, vacúolos (V), corpúsculo lipídico (CL) e vesículas secretoras (VS) em evidência e citoplasma retraído (CR).


Figura 31 – Clamidoconídio irradiado com dose de 6000 Gy de *C. albicans* com Parede Celular (PC) e membrana plasmática (MP) preservadas. Núcleo (N), mitocôndrias (M), vesículas secretoras em evidência e presença de vacúolo.

4.7 Analise da distribuição de quitina das amostras de *C. albicans*

Para avaliação da integridade da parede celular, das amostras de *C. albicans* irradiadas e não irradiadas, foi utilizada a coloração por *Calcofluor White* como descrito em métodos.

Foi possível observar nas amostras leveduriformes, não irradiadas, um padrão uniforme de distribuição da quitina e sem comprometimento da integridade da parede celular, como pode ser observado na Fig. 32.



Figura 32 – Levedura controle de *C. albicans* marcada com calcoflúor em aumento de 100x.

Porém no padrão apresentado nas células irradiadas, como podemos observar, houve anomalias na parede celular das leveduras com a dose de 10240 Gy, consistindo-se de vários pontos de fratura ou rompimento total da parede celular, liberação de material intracelular (Fig. 33B) e formação de calos na região dos septos com o acúmulo de quitina (Fig. 33A).



Figura 33 – Leveduras de *C. albicans* irradiadas com dose de 10240 Gy, marcadas com calcoflúor em aumento de 100x.

As amostras leveduriformes, irradiadas com doses de 6000 Gy, apresentaram um padrão irregular na distribuição da quitina, porém, não houve comprometimento da integridade da parede celular (Fig. 34).



Figura 34 – Leveduras de *C. albicans* irradiadas com dose de 6000 Gy, marcadas com calcoflúor em aumento de 100x + zoom 2x.

As amostras de clamidoconídios não irradiados apresentaram resultados semelhantes aos obtidos para as leveduras não irradiadas. Uma alta intensidade e igual distribuição da quitina pela célula (Fig. 35).



Figura 35 – Clamidoconídio controle de *C. albicans* marcados com calcoflúor em aumento de 100x + zoom 2x.

Semelhante ao obtido nas amostras leveduriformes irradiadas com dose de 10240 Gy, as amostras de clamidoconídios irradiados apresentaram alterações na parede celular com a dose de 5120 Gy (Fig. 36) e 6000 Gy (Fig. 36), consistindo-se de vários pontos de fratura ou rompimento total da parede celular, liberação de material intracelular (Fig. 36), porém um número pequeno de células permaneceu com igual distribuição da quitina pela célula e densidade (Fig. 36B e 37).



Figura 36 – Clamidoconídio de *C. albicans* irradiados com dose de 5120 Gy, marcados com calcoflúor em aumento de 100x + zoom 2x.



Figura 37 – Clamidoconídio de *C. albicans* irradiados com dose de 6000 Gy, marcados com calcoflúor em aumento de 100x + zoom 2x.

5 DISCUSSÃO

O emprego da radiação ionizante como ferramenta para o desenvolvimento de candidatos vacinais já vem sendo estudado há alguns anos. Plasmódios, parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de voluntários humanos, com esporozoítos irradiados, induziu proteção parcial contra a infecção, mas sem proteção contra desafio com formas eritrocíticas⁴⁵. Esporozoítos de Plasmodium berghei, irradiados е criopreservados, foram inoculados em camundongos e apresentaram altos índices de proteção quando desafiados com as mesmas formas não irradiadas⁴⁶. Foi possível observar também que esporozoítos irradiados foram capazes de invadir hepatócitos e se transformar em trofozoítos, mas com degeneração após essa fase, gerando imunidade semelhante à doença natural no hospedeiro⁴⁷. Quando voluntários humanos foram submetidos a imunizações com esporozoítos de P. falciparum irradiados a 150 Gy, desenvolveram anticorpos e foram protegidos contra malária transmitida através de mosquitos⁴⁸. Mais recentemente, já se encontra comercialmente, a primeira vacina utilizando essa tecnologia, desenvolvido pela empresa SANARIA (PfSPZ Sanaria® Vaccine) e apresenta bons níveis de imunização e proteção e foi desenvolvida em um programa de erradicação da malária⁶².

A utilização da radiação ionizante pode causar uma variedade de efeitos físicos e bioquímicos nos microrganismos. A radiação gama, utilizada nesse trabalho, apresenta um mecanismo de ação indireta, consistindo-se na quebra de moléculas, como a água. Os produtos primários da radiólise da

água, como hidroxila (OH*), agentes redutores, assim como, o elétron aquoso (e-aq), íons de hidrogênio (h*) entre outros, são eficientes em produzir danos biológicos²⁹. Esses radicais interagem com as moléculas biológicas, alterando suas estruturas e funções, ampliando os efeitos da radiação. Os ácidos nucléicos e as proteínas são as principais moléculas afetadas. As lesões que podem ser provocadas no DNA são as quebras simples e duplas da fita de DNA, alterações estruturais das bases, eliminação das mesmas, anomalias na desoxirribose e ligações cruzadas (DNA - DNA ou DNA - proteína). As duplas quebras são mais difíceis de serem reparadas, pois necessitam de um mecanismo de reparo mais complexo, essas duplas quebras nas fitas do DNA são, provavelmente, a causa da perda da capacidade de reprodução⁶³. Outros autores⁶⁴ demonstraram que o DNA das amostras de leveduras e conídios de Paracoccidioides brasiliensis irradiados apresentaram-se completamente fragmentados, causando paralisação do ciclo celular. Estudos demonstraram que com doses equivalentes a 600 Gy de radiação gama, as cepas de Trypanosoma cruzi apresentaram uma diminuição de sua virulência e ao elevar a dose para 900 Gy, foram observadas alterações na capacidade reprodutiva dos parasitas e ausência de alterações na morfologia do patógeno⁴². Cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* irradiados com doses aproximadas de 600 Gy perderam completamente sua capacidade de infecção⁶⁵. Trabalhos posteriores demonstraram que taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy perderam sua capacidade de reprodução e mantiveram suas funções metabólicas⁶⁶. O mesmo já foi observado utilizando células leveduriformes de *P. brasiliensis* (amostra Pb 18) utilizando radiação gama. Foi possível também neste caso determinar uma dose na qual o patógeno perde a capacidade de se reproduzir⁶⁷. Alterações morfológicas foram verificadas no núcleo, mas sem comprometer a estrutura celular⁶⁸.

Alguns autores⁶⁹ demonstraram uma grande resistência à radiação gama em fungos, como *Aspergillus, cladosporium* entre outros, em relação às células de diferentes microrganismos. Estas células com doses baixas, tiveram suas habilidades em se reproduzir interrompidas, enquanto as células leveduriformes precisaram de doses muito elevadas para impossibilitar sua capacidade reprodutiva. Os diversos fungos, apresentaram parâmetros de resistência entre doses de 1700 Gy e 2500 Gy, porém destacaram-se espécies com radioresistência mais elevada para apresentar inativação, que variou entre 17000 Gy e 20000 Gy. Segundo o autor essa alta capacidade de resistência pode estar relacionada a concentração de melanina, presente na parede celular.

A presença de pigmentos, como a melanina pode, em maior ou menor extensão, prevenir ou reduzir os danos a componentes celulares. Fungos que produzem melanina são mais tolerantes a espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio. Esta ação protetora observada na presença do pigmento se deve ao fato da melanina ser um eficiente neutralizador de radicais livres⁷⁰.

Ao avaliar a radioresistência das leveduras e clamidoconídios de *C. albicans*, observamos que somente nas doses mais elevadas houve a incapacidade de crescimento de ambas as formas. Apenas na dose de 6000

Gy foi possível observar uma dose segura onde o crescimento foi totalmente inibido em ambas as formas. A causa dessa maior radioresistência, que depende da linhagem celular, pode estar relacionada com um mecanismo mais eficiente de reparo do DNA dos danos causados pelos raios gama. O fato da C. albicans ser um fungo melanizado pode contribuir para a radiorresistência de ambas as formas do fungo. Outros fatores também são determinantes, como o fato das células possuírem enzimas e antioxidantes capazes de inativar substâncias tóxicas e/ou mutagênicas induzidas pela radiólise da água. Geralmente os organismos mais simples são mais resistentes aos efeitos da radiação ionizante. A diferença na resistência destes microrganismos não se restringe somente aos gêneros, mas também entre linhagens de uma mesma espécie⁷¹. Outro fator muito importante que deve ser levado em consideração é a forma de cultura desses fungos que pode influenciar na sensibilidade da radiação. Culturas com 3 semanas de idade de Penicillium viridicatum ou Aspergillus flavus requerem uma dose de 2000 Gy para impedir seu crescimento, enquanto que doses de 1000 Gy são suficientes para inibir o crescimento das mesmas culturas com 6 semanas⁷². Notamos esta mesma fragilidade com as culturas de clamidoconídios, que levam um tempo maior de cultura em relação às leveduras, de tal modo, que com doses menores apresentaram seu potencial de crescimento inibido. Outro fator que deve ser observado é a concentração de conteúdo lipídico, que também influência nos danos causados pela irradiação. Esse efeito já foi evidenciado em outras pesquisas, onde foi observado que, fungos com maior conteúdo lipídico possuem uma maior radiorresistência aos efeitos da radiação ao comparados a outros de menor concentração lipídica⁷³.

Ao analisar o processo de perda do dimorfismo celular, nas leveduras de *C. albicans*, notou-se que até a dose de 2560 Gy não houve qualquer comprometimento de reversão das formas avaliadas. Já nas doses superiores começamos a observar um comprometimento, também observado por outros autores⁷⁴ ao estudar esse mesmo processo em outras espécies como: *Alternaria alternata, Aspergillus flavus, Trichoderma viride* e *Curvularia geniculata* evidenciando um comprometimento na sua capacidade de germinação e crescimento reduzido entre doses de 2000 Gy e 3000 Gy. Este fato provavelmente está relacionado com a capacidade de reparo de DNA que difere entre os organismos o que impede determinar precisamente a dose de inibição desse efeito entre os diferentes fungos.

Quando avaliamos a viabilidade das leveduras e clamidoconídios, observamos que a mesma foi mantida após a irradiação, mostrando níveis superiores a 70%, até a dose máxima empregada neste estudo. Isto já havia sido observado em outros agentes irradiados com o mesmo modelo de radiação, como *Toxoplasma gondil*⁶⁶. Em nossos ensaios as leveduras mantiveram-se com viabilidade superior a 85% e os clamidoconídios mantiveram sua viabilidade superior a 70%. Nota-se que a permeabilidade seletiva da membrana plasmática do material irradiado, foi preservada, fato evidenciado pela ausência de incorporação do corante Verde-Janus⁷⁵.

Através da microscopia eletrônica foram visualizadas alterações na parede celular dos clamidoconídios irradiados. Esse fato já era esperado,

83

uma vez que, a composição e espessura da parede celular é variável e se modifica por fatores ambientais e em condições desfavoráveis como calor, luz e agentes químicos⁷⁶. Mas essas alterações não interferiram na integridade da membrana plasmática, como observamos na microscopia eletrônica de transmissão e no confocal (dados não mostrados) utilizando o corante acridine orange, uma vez que os corantes estavam preservados no interior do fungo, dados corroboram com os resultados da viabilidade anteriormente observados por nós neste trabalho.

As mitocôndrias e vesículas secretoras visualizadas através da microscopia de transmissão, apresentaram-se preservadas, sugerindo que a atividade biológica de ambos os estados morfológicos de *C. albicans*, encontram-se preservadas. Esse tipo de observação também foi encontrada em outros fungos irradiados, com altas doses de radiação gama, como o encontrado em leveduras de *Sporothrix schenckii*⁷⁷.

Nossos dados demonstram que a radiação gama de *C. albicans* tanto da forma de levedura quanto dos clamidoconídios, resultou na perda da capacidade reprodutiva, entretanto mantiveram a morfologia e o metabolismo oxidativo dos fungos mesmo após as doses de radiação. Novos estudos de resposta imunológica frente a esses fungos irradiados são necessários para o esclarecimento e confirmação do uso da radiação como ferramenta para a produção de candidatos vacinais e para um futuro desenvolvimento de uma vacina.

84

6 CONCLUSÕES

a) Gerais

Ambas as formas estudadas de *C. albicans* apresentaram perda gradual de crescimento, danos de metabolismo e danos estruturais progressivos com o aumento da dose após a exposição à radiação gama por Cobalto 60.

b) Específicas

A dose de 6000 Gy demonstrou ser a dose determinante para o crescimento de ambas as formas de *C. albicans*.

A partir da dose de 6000 Gy as leveduras irradiadas perdem a capacidade de reversão para a forma de clamidoconídios. O inverso foi também observado a partir da dose de 5120 Gy.

Tanto as leveduras quanto os clamidoconídios permaneceram viáveis, após radiação a 6000 Gy, por até 48 horas.

Linfócitos humanos de pacientes infectados, apresentaram altos índices de proliferação frente as formas de fungos irradiadas.

Não foi observado até a dose de 6000 Gy comprometimento expressivo na permeabilidade dos fungos.

Na dose de 6000 Gy foi possível observar a preservação morfológica externa e a manutenção das estruturas internas das leveduras e clamidoconídios, ficando comprometido em doses mais elevadas.

REFERÊNCIAS

- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N. Tratado de micologia médica. 9th ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
- Odds FC. Candida infections: an overview. Crit Rev Microbiol [Internet]. 1987 Jan [cited 2016 Jun 2];15(1):1–5. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3319417
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 May 28];50(4):243–60. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014897
- Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. J Clin Pathol [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Jun 7];57(2):196–8. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747450
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis [Internet]. 1999 Aug [cited 2016 Jun 7];29(2):239–44. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10476719

 Barberino MG, Silva N, Rebouças C, Barreiro K, Alcântara AP, Netto EM, et al. Evaluation of blood stream infections by Candida in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. Braz J Infect Dis [Internet]. 2006 Feb [cited 2016 Jun 7];10(1):36–40. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767314

- Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical Candida spp. isolates, including strains of the Candida parapsilosis complex. Med Mycol [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Jun 7];49(3):253–62. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039308
- Sandven P. Detection of fluconazole-resistant Candida strains by a disc diffusion screening test. J Clin Microbiol [Internet]. 1999 Dec [cited 2016 Jun 2];37(12):3856–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10565896
- Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of Candida parapsilosis. J Clin Microbiol [Internet].
 1994 Feb [cited 2016 Jun 2];32(2):452–6. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263052&tool =pmcentrez&rendertype=abstract
- Carrara MA, Bazotte RB, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL, Patussi E V, et al. Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2009 Jun [cited 2016 Jun 7];200(6):659.e1– 4. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286145

- Ng KP, Kuan CS, Kaur H, Na SL, Atiya N, Velayuthan RD. Candida species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. Trop Med Int Health [Internet]. 2015 Nov [cited 2016 Jun 7];20(11):1447–53. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216479
- Alves IA, Camargo FP de, Goulart LS. [Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical Candida sp isolates]. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2010 [cited 2016 Jun 7];43(5):575–9.
 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085873
- Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP.
 Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2009;104(3):513–21. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Jun 2];44(8):2816–23. Disponível em:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1594610&to ol=pmcentrez&rendertype=abstract

15. Brawner DL, Cutler JE. Oral Candida albicans isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol [Internet]. 1989 Jun [cited 2016 Jun 2];27(6):1335-41. Disponível em:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=267553&tool =pmcentrez&rendertype=abstract

- Miotto N, Yurgel L, Cherubini K, Cazanova R. Métodos laboratoriais de identificação do fungo Candida sp. Revi Fac Odontol. 2004;9(1):27–33.
- 17. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in Candida albicans. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Apr 18];61:529–53.
 Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4452225&to

ol=pmcentrez&rendertype=abstract

 Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of Candida albicans. Trends Microbiol [Internet]. 2004 Jul [cited 2016 Jun 3];12(7):317–24. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223059

- Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Chennebault JM. [Candida albicans chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS]. Ann Biol Clin (Paris) [Internet]. 1988 Jan [cited 2016 Jun 2];46(10):817–8. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069016
- Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in Candida albicans and Candida dubliniensis--an enigmatic developmental programme. Mycoses [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Jun 3];50(1):1– 12. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302741
- 21. Nather K, Munro CA. Generating cell surface diversity in Candida albicans and other fungal pathogens. FEMS Microbiol Lett [Internet].

2008 Aug [cited 2016 Apr 21];285(2):137–45. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616597

- McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 1996 Apr [cited 2016 Jun 2];25(2):136–44. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727588
- 23. Lenardon MD, Milne SA, Mora-Montes HM, Kaffarnik FAR, Peck SC, Brown AJP, et al. Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in Candida albicans. J Cell Sci [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2016 Jun 2];123(Pt 13):2199–206. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886742&to ol=pmcentrez&rendertype=abstract
- Ebanks RO, Chisholm K, McKinnon S, Whiteway M, Pinto DM.
 Proteomic analysis of Candida albicans yeast and hyphal cell wall and associated proteins. Proteomics [Internet]. 2006 Apr [cited 2016 Jun 2];6(7):2147–56. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16493703

- Poulain D, Jouault T. Candida albicans cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2004 Aug [cited 2016 Jun 2];7(4):342–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358252
- Wales A, Kusel JR. Biochemistry of Irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. Parasitol Today [Internet].

1992 Nov [cited 2016 Jun 3];8(11):358–63. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463538

- Grosh D, Hoopywood L. Biological effects of radiation. 2nd ed. New York: Academic Press; 1979.
- Taylor SM, Mallon TR, Green WP. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. Vet Rec [Internet]. 1986 Oct 11 [cited 2016 Jun 28];119(15):370–2. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2947379
- Michaels HB, Hunt JW. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. Radiat Res [Internet]. 1978 Apr [cited 2016 Jun 28];74(1):23–34. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/674566
- Butler J, Land EJ, Swallow J. Chemical Mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat Phys Chem [Internet]. 1984;24(3/4):273–82. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0146572484900645
- 31. Szumiel I. Ionizing radiation-induced cell death. Int J Radiat Biol
 [Internet]. 1994 Oct [cited 2016 Jun 28];66(4):329–41. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7930835
- Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced signal transduction and stress response. Radiat Res [Internet]. 1998 Nov [cited 2016 Jun 28];150(5 Suppl):S102–8. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806613
- 33. Nascimento PA, da Silva MA, Oliveira EM, Suzuki MF, Okazaki K.

Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. Brazilian J Med Biol Res [Internet]. 2001 Feb [cited 2016 Aug 23];34(2):165–76. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175491

- 34. Pinho JR, Cardi BA, Andrade HF, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, et al. Immunogenic properties of the M. leprae recombinant 18-kDa antigen purified from Saccharomyces cerevisiae; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. Int J Lepr Other Mycobact Dis [Internet]. 1995 Sep [cited 2016 Jun 29];63(3):381–90. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594921
- 35. Cardi BA, Nascimento N, Andrade Jr. HF. Irradiation of Crotalus durissus terrificus crotoxin with 60Co gamma- rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. Int J Radiat Biol. São Paulo; 1998 May;73(5):557–64.
- Baptista JA, Spencer PJ, Oliveira JE, Casare MS, Nascimento N. Immune response against antigens irradiated with 60Co gamma-rays. J Radioanal Nucl Chem [Internet]. 2006;269(3):565–9. Disponível em: http://springerlink.metapress.com/content/r67g4666v1127n44/?p=da50 5d47d3654fc18127e082fc416e81&pi=7
- 37. Erickson MC, Ortega YR. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. J Food Prot [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Jun 29];69(11):2786–808. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133829
- 38. Antunes CM, Katz N, de Andrade RM, Mansur Neto E, Lima JM. Study

of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of Schistosoma mansoni. Rev Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 1971 [cited 2016 Jun 28];13(6):383–6. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5166384

- Richter D, Harn DA, Matuschka FR. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. Parasitol Today [Internet]. 1995;11(8):288–93. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275325
- 40. Gilbert JM, Fuller AL, Scott TC, McDougald LR. Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of Eimeria tenella (Protozoa; Coccidia). Parasitol Res [Internet]. 1998 Jun [cited 2016 Jun 28];84(6):437–41. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660131

- Martínez-Silva R, López VA, Colón JI, Chiriboga J. Trypanosoma cruzi: effects of gamma radiation on growth and infectivity. Exp Parasitol [Internet]. 1969 Aug [cited 2016 Jun 29];25(1):162–70. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5362579
- 42. Salata E, Wiendl FM, Corrêa FM. Effects of gamma radiation on Trypanosoma cruzi. Revi Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 1973
 [cited 2016 Jun 29];15(2):66–71. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4580087
- Okanla EO, Stumpf JL, Dusanic DG. Resistance of mice immunized with irradiated and lyophilized stages of Trypanosoma cruzi to infections with metacyclics. Int J Parasitol [Internet]. 1982;12(4):251–6.

Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6811465

- 44. Morrison WI, Black SJ, Paris J, Hinson CA, Wells PW. Protective immunity and specificity of antibody responses elicited in cattle by irradiated Trypanosoma brucei. Parasite Immunol [Internet]. 1982 Nov [cited 2016 Jun 29];4(6):395–407. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7155625
- Nussenzweig RS, Vanderberg JP, Most H, Orton C. Specificity of protective immunity produced by x-irradiated Plasmodium berghei sporozoites. Nature [Internet]. 1969 May 3 [cited 2016 Aug 18];222(5192):488–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5768632
- 46. Orjih AU, Nussenzweig RS. Immunization against rodent malaria with cryopreserved irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1980 May [cited 2016 Jun 29];29(3):343–7. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6992606
- 47. Scheller LF, Stump KC, Azad AF. Plasmodium berghei: production and quantitation of hepatic stages derived from irradiated sporozoites in rats and mice. J Parasitol [Internet]. 1995 Feb [cited 2016 Jun 29];81(1):58–62. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876979

48. Egan JE, Hoffman SL, Haynes JD, Sadoff JC, Schneider I, Grau GE, et al. Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated Plasmodium falciparum sporozoites. Am J Trop Med Hyg [Internet].
1993 Aug [cited 2016 Jun 29];49(2):166–73. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8357078

- 49. Dubey JP, Brake RJ, Murrell KD, Fayer R. Effect of irradiation on the viability of Toxoplasma gondii cysts in tissues of mice and pigs. Am J Vet Res [Internet]. 1986 Mar [cited 2016 Jun 29];47(3):518–22.
 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3963554
- Dubey JP, Lunney JK, Shen SK, Kwok OC. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated Toxoplasma gondii oocysts. J Parasitol. 1998 Aug;84(4):749–52.
- Dubey JP, Jenkins MC, Thayer DW, Kwok OC, Shen SK. Killing of Toxoplasma gondii oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. J Parasitol. 1996 Oct;82(5):724–7.
- 52. Hiramoto RM, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF. 200 Gy sterilised Toxoplasma gondii tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. Vaccine [Internet]. 2002 May 15 [cited 2016 Jun 2];20(16):2072–81. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972976
- 53. Galisteo Jr. AJ. Toxoplasma gondii vs radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados [Internet]. [Dissertação]: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2004. Disponível em:

http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-05072004-

095512/

54. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2002 Aug [cited 2016 Apr 18];5(4):379–85. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160856

- 55. Han Y, Cutler JE. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. Infect Immun [Internet]. 1995 Jul [cited 2016 Jun 2];63(7):2714–9. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173363&tool =pmcentrez&rendertype=abstract
- 56. Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avenissian V, Filler SG, Myers CL, Fu Y, et al. The anti-Candida albicans vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. Infect Immun [Internet]. 2005 Sep [cited 2016 May 24];73(9):6191–3. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1231102&to ol=pmcentrez&rendertype=abstract
- 57. Fukuizumi T, Nagamatsu H, Kojo T, Inoue H. Induction of salivary antibodies to inhibit Candida albicans adherence to human epithelial cells by tonsillar immunization in rabbits. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Jun 2];47(3):398–404. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872376
- 58. Khare S, Trivedi A, Kesavan PC, Prasad R. Effect of gamma-radiation on the structure and function of yeast membrane. Int J Radiat Biol

Relat Stud Phys Chem Med [Internet]. 1982 Oct [cited 2016 Jun 2];42(4):369–83. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6757162

- 59. Citiulo F, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Purification and germination of Candida albicans and Candida dubliniensis chlamydospores cultured in liquid media. FEMS Yeast Res [Internet].
 2009 Oct [cited 2016 Jun 2];9(7):1051–60. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538507
- 60. Berliner MD, Reca ME. Vital staining of Histoplasma capsulatum with Janus Green B. Sabouraudia [Internet]. 1966 Jun [cited 2016 Jun 2];5(1):26–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4164266
- Sano A, Kurita N, Iabuki K, Coelho R, Takeo K, Nishimura K, et al. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of Paracoccidioides brasiliensis. Mycopathologia [Internet]. 1993 Dec [cited 2016 Jun 2];124(3):157–61. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517514
- 62. Hollingdale MR, Sedegah M. Development of whole sporozoite malaria vaccines. Expert Rev Vaccines [Internet]. 2016 Jul 18 [cited 2016 Aug 18];1–10. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27327875

63. Rhind N, Russell P. Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. Curr Opin Cell Biol [Internet]. 1998 Dec [cited 2016 Jun 9];10(6):749–58. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914174

- 64. Demicheli MC. Paracoccidioides brasiliensis: Efeito da radiação gama sobre viabilidade, metabolismo e propriedades imunológicas de conídios e leveduras. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2014.
- 65. Song CC, Yuan XZ, Shen LY, Gan XX, Ding JZ. The effect of cobalt-60 irradiation on the infectivity of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol [Internet]. 1993 Feb [cited 2016 Jun 2];23(1):89–93. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8468140
- Hiramoto RM, Galisteo Jr. AJ, Do Nascimento N, De Andrade Jr. HF.
 200 Gy sterilised Toxoplasma gondii tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. Vaccine.
 2002;20(16):2072–81.
- Demicheli MC, Reis BS, Goes AM, de Andrade ASR. Paracoccidioides brasiliensis: attenuation of yeast cells by gamma irradiation. Mycoses [Internet]. 2006 May [cited 2016 Jun 9];49(3):184–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16681808
- Demicheli MC, Goes AM, de Andrade ASR. Ultrastructural changes in Paracoccidioides brasiliensis yeast cells attenuated by gamma irradiation. Mycoses [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Jun 9];50(5):397– 402. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714360
- 69. Saleh YG, Mayo MS, Ahearn DG. Resistance of some common fungi to gamma irradiation. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1988 Aug [cited

2016 Jun 2];54(8):2134-5. Disponível em:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=202816&tool =pmcentrez&rendertype=abstract

- 70. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized
 Cryptococcus neoformans to UV light. Appl Environ Microbiol [Internet].
 1994 Oct [cited 2016 Jun 3];60(10):3864–6. Disponível em:
 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986054
- Rodríguez-Calleja JM, Patterson MF, García-López I, Santos JA, Otero A, García-López M-L. Incidence, radioresistance, and behavior of Psychrobacter spp. in rabbit meat. J Food Prot [Internet]. 2005 Mar [cited 2016 Aug 18];68(3):538–43. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771179
- Diehl JF. Safety of irradiated foods. 2nd ed. Boca Raton CRC Press; 1999.
- Aziz NH, el-Fouly MZ, Abu-Shady MR, Moussa LA. Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating medicinal plants. Appl Radiat Isot [Internet]. 1997 Jan [cited 2016 Jun 2];48(1):71–6. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9022214
- 74. Maity JP, Kar S, Banerjee S, Sudershan M, Chakraborty A, Santra SC.
 Effects of gamma radiation on fungi infected rice (in vitro). Int J Radiat
 Biol [Internet]. 2011 Nov [cited 2016 Jun 2];87(11):1097–102.
 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781005
- 75. Dias MFRG, Mesquita J, Rodrigues N, Filgueira AL, De Souza W.

Viability of yeast form cells of Paracoccidioides brasiliensis after sonication. Med Mycol [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Jun 9];42(1):43–9. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982113

- 76. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae. Yeast [Internet]. 2006 Feb [cited 2016 Jun 2];23(3):185–202. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498706
- T7. Lacerda CM de S, Martins EM do N, de Resende MA, de Andrade ASR. Gamma radiation effects on Sporothrix schenckii yeast cells.
 Mycopathologia [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Jun 2];171(6):395–401. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21327789

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA www.imt.usp.br



São Paulo, 15 de fevereiro de 2013

llmo Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr

Em reunião do dia 07 de fevereiro de 2013, a Comissão de Pesquisa e Ética e a Comissão de ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisaram e aprovaram, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2013/154** e intitulado "Análise da radiorresistência de leveduras e clamidoconídios de *Candida albicans*".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão Rosário Casseb Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética - IMTSP

Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman Coordenadora da Comissão ética no Uso de Animais em Pesquisa - IMTSP