INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Comportamento 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

ALLYSSON DÂNGELO DE CARVALHO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações
Orientador:
Prof. Dr. Carlos Alberto Zeituni

São Paulo
2020

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Comportamento 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

ALLYSSON DÂNGELO DE CARVALHO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações
Orientador:
Prof. Dr. Carlos Alberto Zeituni

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DÂNGELO DE CARVALHO, A. ***Comportamento 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***. 2020. 65 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DÂNGELO DE CARVALHO, ALLYSSON
Comportamento 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 / ALLYSSON DÂNGELO DE CARVALHO; orientador Carlos Alberto Zeituni. -- São Paulo, 2020.
65 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Medicina Nuclear. 2. Cintilografia. 3. Candidíase. 4. Diagnóstico Diferencial. 5. Anfotericina B. I. Zeituni, Carlos Alberto, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha esposa Laís,
aos meus pais, irmãos, sobrinhos e a todos do
setor de medicina nuclear da Santa Casa da
Misericórdia de São João Del Rei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o meu porto seguro.

À minha esposa, que com todo carinho e companheirismo é o melhor incentivo para meu crescimento como pessoa e profissional.

Aos meus pais e irmãos, que sempre estiveram ao meu lado fortalecendo e dando-me ânimo para construir de forma simples e objetiva a minha vida

À Dra. Juliana Teixeira de Magalhães, que com seu conhecimento vasto em microbiologia e sua boa vontade foi o alicerce deste trabalho.

À Priscilla Oliveira Gil, que com seu domínio em bioquímica me proporcionou horas de muito aprendizado dentro do laboratório.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto Zeituni, que com segurança e confiança conduziu precisamente meus passos e tornou possível a concretização deste projeto.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, que com suas dicas enriqueceram minha dissertação.

À UNIPTAN, que me abriu portas e disponibilizou todos os recursos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho.

A todos, meu respeito, admiração e sincero muito obrigado!

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

COMPORTAMENTO 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

Allysson Dângelo de Carvalho

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.

Como objetivo buscou-se avaliar o perfil comportamental dos fungos, "in vitro", diante de baixas doses de radiação gama oriunda dos radiofármacos utilizados em exames de cintilografia pulmonar inalação/perfusão e após a irradiação, em relação a Anfotericina B. Para isso realizou-se um 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.

Observou-se que 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 (^{99m}Tc-DTPA, ^{99m}Tc puro, ^{99m}Tc-MAA, Controle), e também quando avaliados em relação aos tempos (0h, 2h, 4h, etc).

Palavras-Chave: Medicina Nuclear**,** Cinética de crescimento, Cintilografia, Candidíase, Diagnóstico Diferencial, Anfotericina B.

COMPORTAMENTO 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

Allysson Dângelo de Carvalho

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. An inhalation / perfusion lung scan is one of the tests currently used for the diagnosis of pulmonary thromboembolism. However, patients with specific respiratory disorders who perform this procedure in an attempt to exclude the diagnosis may be facing fungal pneumonia, which has not yet been diagnosed. The literature is scarce when trying to relate the behavior of changes to low doses of gamma radiation and its resistance profile against Amphotericin B, after irradiation.

The objective of this study is to evaluate the behavioral profile of fungi, “in vitro”, given the low doses of gamma radiation or radiotracers used in pulmonary scintigraphy exams by inhalation / perfusion and after irradiation, in relation to Amphotericin B. prospective control case with Candida albicans cephae distributed in three test tubes with chemical reactions added to saline solution and 40 mCi of pure 99mTc (meta stable technology), 40 mCi of 99mTc-DTPA and 6 mCi of 99mTc-MAA, respectively , maintaining a test tube without irradiation for control purposes. Every experiment being carried out in triplicate. This exposure to the exposure took place for 36 hours, after the half-life of 99mTc, where until Friday half-life hardly any more significant radioactive activity was found. For the analysis of growth kinetics and sensitivity to antifungal, the Analysis of Variance (ANOVA) tests were used, using the repeated measures model and the Shapiro-Wilk test.

Note that there was a decrease in the growth halo of fungi that were irradiated compared to the frontal control group of Amphotericin B. However, the fungi did not have a

predictable growth profile and behave differently when analyzed between groups (DTPA + Tc, pure Tc, MAA + Tc, Control) and also when applied in relation to the times (0h, 2h, 4h, etc.).

Key words: Nuclear Medicine, Scintigraphy, Candidiasis, Differential Diagnosis, Amphotericin B.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de Variância baseado num modelo de Medidas Repetidas para a contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) quanto às variáveis 47

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 – para Tecnécio..... 48

Tabela 3 - Medidas descritivas e comparativas da contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação – para DTPA + Tecnécio, MAA + Tecnécio e Controle. 49

Tabela 4 – Relações entre as medidas descritivas e comparativas da contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação.50

Tabela 5 - Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos *estudantizados* da Análise de Variância baseada em Medidas Repetidas 53

Tabela 6 - Dados referentes ao halo de inibição..... 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo de uma célula eucarionte: *Candida albicans.* Fonte: (USP, 2020). 19

Figura 2 – Visão geral da patogenicidade de *C. albicans*. Fonte: (MAYER; WILSON, HUBE, 2013). 21

Figura 3 – Morfologias (Leveduras, hifas e pseudohifas) de C. albicans. Fonte: (AGUSTINHO, 2015). 22

Figura 4 - Modelo de parede celular de *C. albicans.* Esquematização dos componentes moleculares formadores da parede celular de *C. albicans* e sua distribuição. Fonte: (Netea et al.,2008) 23

Figura 5 - Fisiopatologia do Tromboembolismo pulmonar agudo. Fonte: (YOO, 2018). 28

Figura 6 - Exemplo de gerador de ^{99}Mo/ ^{99m}Tc. Fonte: (CARDOSO, 2020)..... 30

Figura 7 - Exemplo de decaimento radioativo. Fonte: (CARDOSO, 2020). 30

Figura 8 – Exemplo de marcação radioativa de plantas. Fonte: (CARDOSO, 2020). ... 31

Figura 9 – Exemplo de marcação radioativa de insetos. Fonte: (CARDOSO, 2020). ... 31

Figura 10 – Exemplo de radiomarcação de insetos predadores de pragas. Fonte: (CARDOSO, 2020). 32

Figura 11 - Exemplo da utilização de radiação gama na conservação de alimentos. Fonte: (CARDOSO, 2020). 33

Figura 12 - Exemplo de gama-câmara ou câmara de cintilação. Fonte: (USP, 2020).... 33

Figura 13 - Cintilografia pulmonar inalação/perfusão de alta probabilidade para TEP (mismatch) Fonte: (JUNIOR, 2020). 36

Figura 14 - Cintilografia pulmonar inalação/perfusão de baixa probabilidade para TEP, sugestivo de doença parenquimatosa (match). Fonte: (PEDROSO, 2020). 37

Figura 15 - Esquema ilustrativo de metodologia utilizada para avaliação da cinética de crescimento de *C. albicans* 39

Figura 16 – Esquema ilustrativo da metodologia utilizada para avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B..... 40

Figura 17 – Médias contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação. 50

Figura 18 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo Tecnécio. 51

Figura 19 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo DTPA + Tecnécio. 51

Figura 20 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo MAA + Tecnécio. 52

Figura 21 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo Controle 52

Figura 22- Gráfico do tipo Q-Q para avaliação de normalidade de Resíduos estudantizados nos Tempos de: 0, 2, 4, 6, 10, 12, 24, e 36 h. 54

Figura 23 - Perfil de halo de inibição fúngica frente à Anfotericina B para os grupos avaliados. 55

LISTA DE SIGLAS

ALARA As Low As Reasonably Achievable (tão baixo quanto razoavelmente exequível)

CI Candidíase invasiva

CTPA Computer tomography pulmonary angiography (Angiotomografia pulmonar)

DTPA Ácido dietilenotriaminopentacético

MAA Macroagregado de albumina

Mo Molibidênio

mCi Milicurie

Tc Tecnécio

TEP Tromboembolismo pulmonar

UTI Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Justificativa 18
1.2. Objetivos 18
2. REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1. Microbiologia fúngica e fatores de virulência 19
2.2. Pneumonia fúngica 23
2.3. Tromboembolismo Pulmonar Agudo 26
2.4. Medicina nuclear e cintilografia pulmonar inalação/perfusão 28
3. MATERIAIS E MÉTODOS 38
3.1. Descrição do tipo de pesquisa 38
3.2. Descrição dos procedimentos 38
3.2.1. Culturas microbianas 38
3.2.2. Avaliação da cinética de crescimento de *C. albicans* 38
3.2.3. Avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B 39
3.3. Descrição dos métodos estatísticos 40
3.3.1. Estatísticas descritivas 40
3.3.2. Análise de variância baseado em um modelo de medidas repetidas 40
3.3.3. Regressão polinomial 41
3.3.4. Probabilidade de significância (p) 43
4. EXPERIMENTO 44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1. Análise estatística da cinética de crescimento dos fungos *C. albicans* 46
5.2. Análise do perfil de sensibilidade dos fungos à Anfotericina B 55
6. CONCLUSÃO 56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

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 & BASSETTI; 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, 2010).

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 CI, 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 imaginológico 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 (VIEIRA; SANTOS, 2016), alterações provocadas na parede celular das leveduras de *Candida albicans* como mudanças do gene ERG3, produção de biofilme, aumento de esfingolipideos e aumento na expressão da bomba de efluxo conferem 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 radiofármacos 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.

1.1.Justificativa

A escassez de dados na literatura referentes ao comportamento dos fungos do gênero *Candida albicans* irradiados com baixas doses de radiação gama e o seu comportamento pós irradiação diante da Anfotericina B, pode ser de grande valia para estudos subsequentes e possíveis protocolos médicos futuros no que tange os exames que utilizam radiação gama como a cintilografia pulmonar de perfusão/inalação.

1.2.Objetivos

Avaliar o comportamento *in vitro* de alguns fungos patogênicos do gênero *Candida* na presença dos radiofármacos emissores de radiação gama (ácido dietilenotriaminopentacético ^{99m}Tc-DTPA e macroagregado de albumina ^{99m} Tc-MAA) utilizados nas cintilografias pulmonares inalação/perfusão respectivamente, com atividades e volumes similares aos realizados nos exames.

Verificar o comportamento, evolutivo ou não, do crescimento dos fungos do gênero *Candida albicans* diante de baixas doses de radiação gama. Analisar o perfil de sensibilidade dos fungos frente à Anfotericina B após a irradiação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico foram abordados de forma pormenorizada elementos conceituais que regem toda problemática em estudo. Para o entendimento do tema discutimos aspectos microbiológicos estruturais do fungo *Candida albicans.* Revisamos a fisiopatologia, diagnóstico, tratamento da pneumonia fúngica causada por esse microorganimo. Dando continuidade, contextualizamos o tromboembolismo pulmonar agudo e suas entidades clínicas, aspectos fisiopatológicos e métodos propedêuticos, buscando associar tal doença com a pneumonia fúngica como diagnóstico diferencial do TEP. A partir deste momento, abordamos a medicina nuclear e o uso dos radiofármacos emissores de radiação gama como exame imaginológico de uso frequente no diagnóstico do TEP agudo.

2.1.Microbiologia fúngica e fatores de virulência

A *Candida albicans* é uma levedura que se multiplica por brotamento, onde a célula parental desenvolve uma protuberância (broto) na superfície externa. Como podemos visualizar na figura 1, após o desenvolvimento do broto ocorre divisão do núcleo celular com migração de um dos núcleos para o broto e separação da célula materna. (RAVEN et al., 2007)

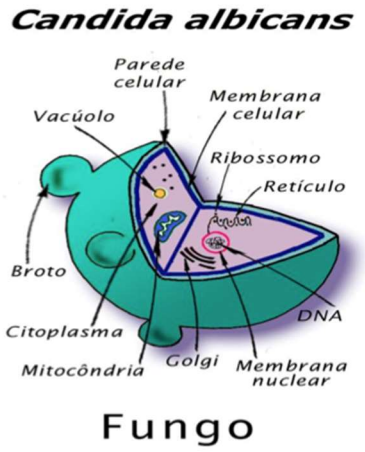


Figura 1 - Esquema ilustrativo de uma célula eucarionte: *Candida albicans.* Fonte: (USP, 2020).

As leveduras do gênero Candida são encontradas em variados ecossistemas, como no solo, alimentos, água e fazendo parte da microbiota de homens e animais. Segundo (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010) essas leveduras degradam proteínas e carboidratos como elementos essenciais para sua sobrevivência e desenvolvimento. Têm grande capacidade adaptativa podendo se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em meio anaeróbio. Sua reprodução dar-se-á de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas conídios, entretanto algumas espécies reproduzem-se sexuadamente. De acordo com o mesmo autor sua classificação taxonômica é no reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcacea. O autor ainda relata que o gênero Candida é o principal entre as leveduras patogênicas compreendendo cerca de 200 espécies.

Para (MAYER; WILSON, HUBE, 2013), o total de espécies eucarióticas na Terra foi recentemente estimado em 8,7 milhões, com fungos compreendendo cerca de 7%. No entanto, 600 espécies apenas são patógenas humanas. São micro-organismos comensais que habitam o trato gastro-intestinal, microbiota vaginal, uretra e pulmões. No entanto, tornam-se patogênicas caso ocorra um desequilíbrio em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro (extremos de idade, doenças de base, imunossupressão) ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas. (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010), ainda, versa que a Candida albicans é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos. De acordo com (MAYER; WILSON, HUBE, 2013) a Candida albicans pode causar dois tipos de infecções: superficiais como candidíase oral e vaginal e infecções sistêmicas com risco de vida, dentre elas a pneumonia.

Como podemos ver na figura 2, no decorrer da infecção superficial e sistêmica, a *C. albicans* conta com uma bateria de fatores de virulência. Transição morfológica (figura 3) entre leveduras e formas de hifas, denominado dimorfismo (KULETA; KOZIK; KOZIK,2009), expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, formação de biofilmes, troca fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas são alguns dos fatores de virulência, além de rápida adaptação às alterações de PH do meio, flexibilidade metabólica e sistemas poderosos de aquisição de nutrientes com robustez na resposta ao estresse.

O sucesso da *C. albicans* como patógeno depende em grande parte de sua plasticidade morfológica, genética e fisiológica, como por exemplo fenômenos

epigenéticos que resultam em mudanças entre dois estados fenotipicamente diferentes, chamados branco e opaco. Nomenclatura dada devido às colônias de *C. albicans* crescidas em meio sólido assumirem a coloração branca, ou roxa. (SOLL, 2004)

De acordo com (ROBBINS, et al, 2011) os biofilmes são uma das principais causas de mortalidade humana e fatores preponderantes na maioria dos tratamentos devido à resistência intrínseca aos medicamentos usuais.

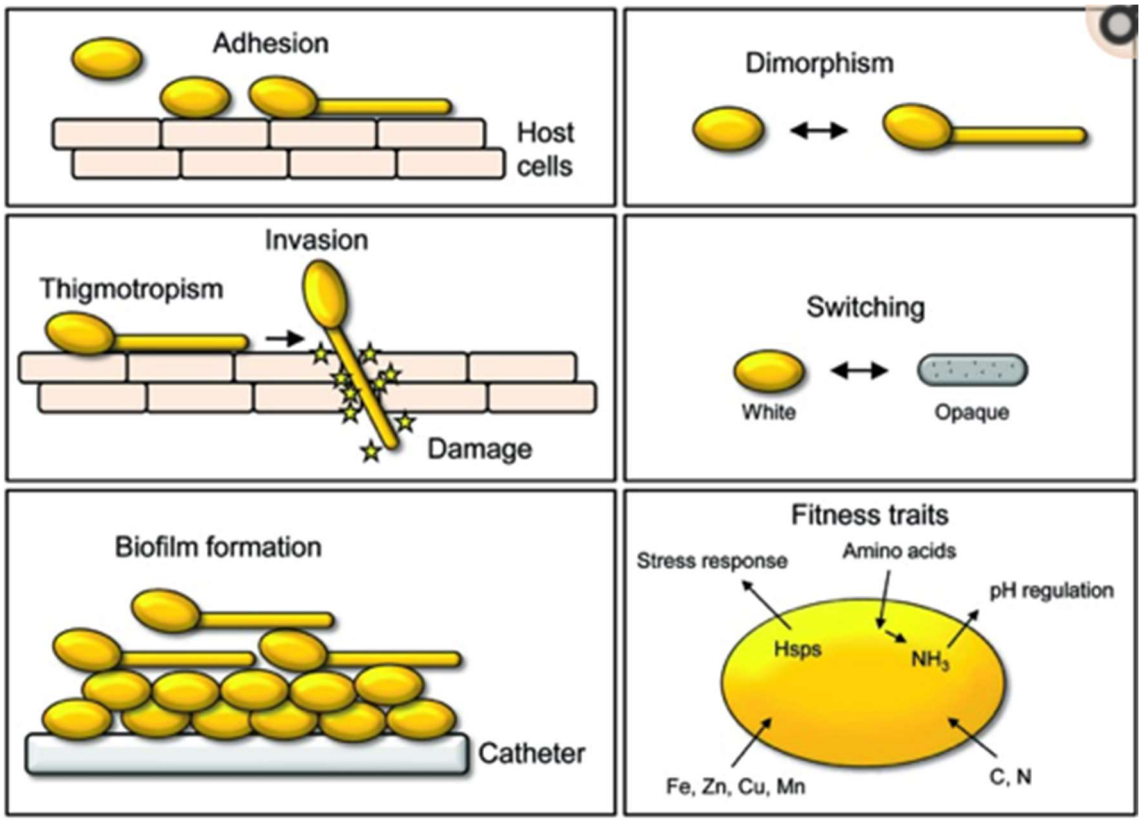


Figura 2 – Visão geral da patogenicidade de *C. albicans*. Fonte: (MAYER; WILSON, HUBE, 2013).

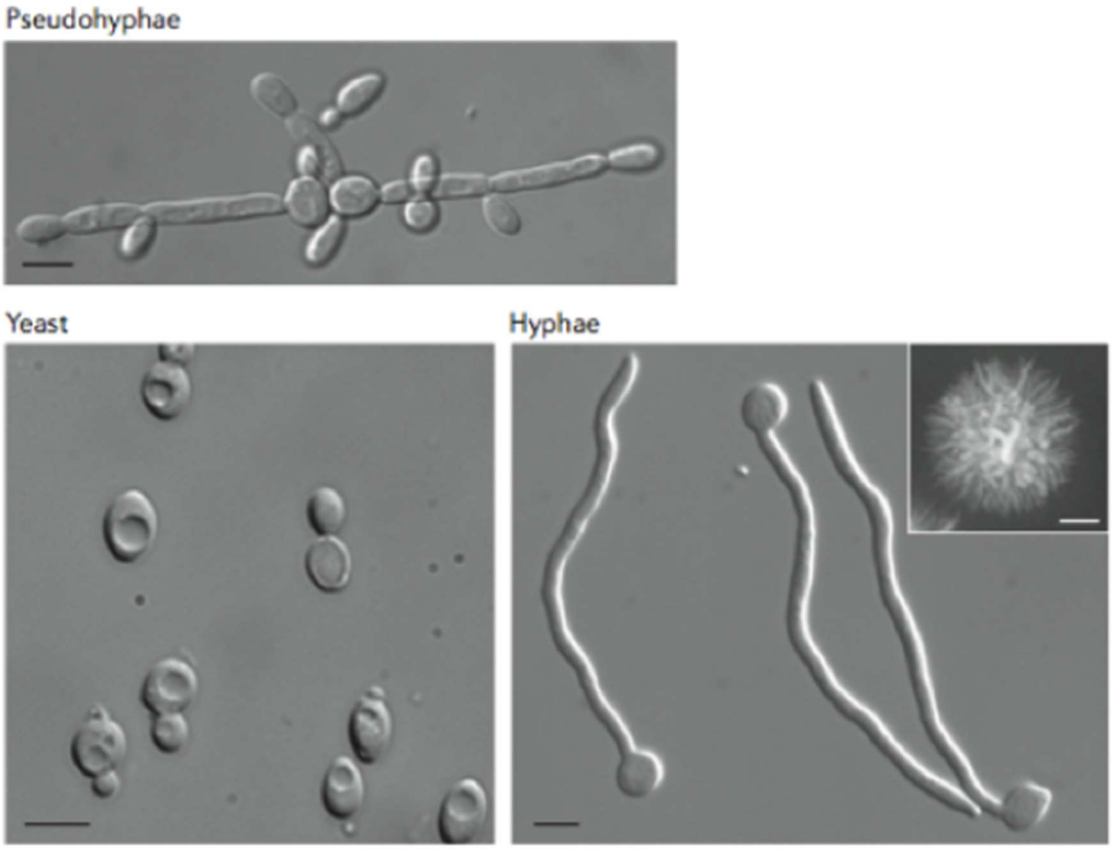


Figura 3 – Morfologias (Leveduras, hifas e pseudohifas) de C. albicans. Fonte: (AGUSTINHO, 2015).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares para detectar e fugir do sistema imunológico do hospedeiro, caracterizando os fatores de virulência fúngica envolvem, então, a adesão, dano celular e invasão. Quase sempre, esses fatores estão relacionados à parede celular do fungo *Candida albicans*, que constitui a estrutura principal do contato com as células do hospedeiro e são essenciais para integridade celular fúngica. A parede celular (figura 4) tem papel fundamental na proteção fúngica contra estresse ambiental, alterações osmóticas, desidratação, alterações de temperatura, ataques do sistema imunológico do hospedeiro ou de outros microorganismos, e é responsável pela adesão das células hospedeira através de adesinas, como já descrito (BELTRÁN, et al, 2019).

A parede do fungo trata-se de uma estrutura dinâmica e organizada, que determina tanto a viabilidade como a morfologia do microorganimo. A estrutura da parede de *C. albicans* é composta de um esqueleto de fibras do polissacarídeo β-(1,3)-glicana, covalentemente ligados entre si. Esse esqueleto liga-se a moléculas de β-(1,6)-glicana e quitina (um polímero de GlcNAc), e esses poilssacarídeos formam pontes de hidrogênio

entre si, formando uma verdadeira nuvem de microfibras, que se estruturam como uma verdadeira armadura. Essa rede de polissacarídeos, por sua vez, forma um arcabouço para o ancoramento de proteínas da parede (Gantner et al., 2005)

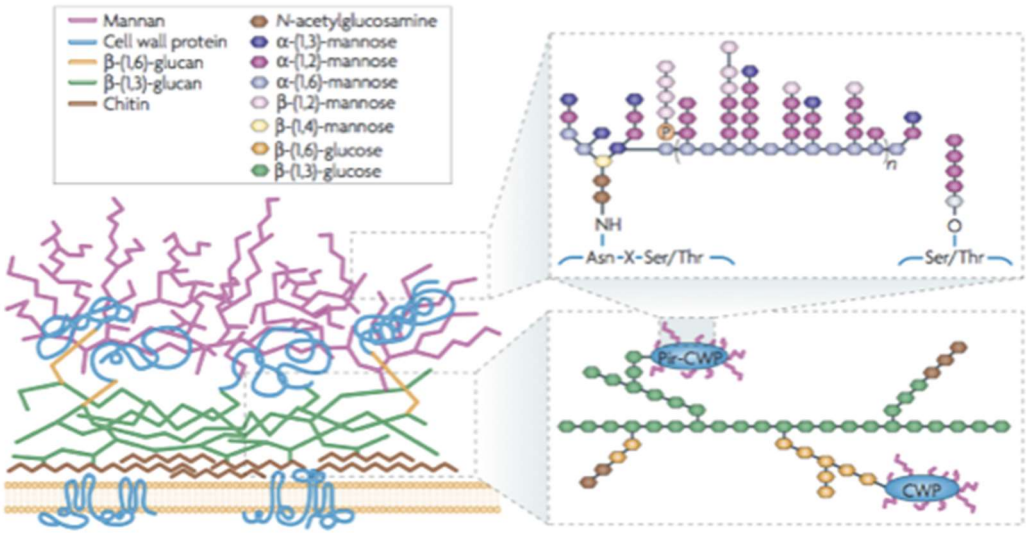


Figura 4 - Modelo de parede celular de *C. albicans.* Esquematização dos componentes moleculares formadores da parede celular de *C. albicans* e sua distribuição. Fonte: (Netea et al.,2008)

2.2.Pneumonia fúngica

A pneumonia é uma das principais causas infecciosas de morte nos países desenvolvidos. Sendo as infecções respiratórias por fungos em pacientes imunocomprometidos, principalmente espécies de *Candidas*, através de disseminação hematogênica uma ocorrência frequente nesses pacientes e de grande preocupação mundial. Essas espécies, como *Candida albicans*, podem ser isolados no trato orofaríngeo e respiratório como colonizadores, sem evidências de invasão ou sintomas até que haja uma quebra das barreiras dos tecidos e principalmente do sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, o diagnóstico não se faz de maneira tão simples, na maioria dos casos é de difícil acesso e dificultoso no quesito tempo, demora-se para que se tenha um resultado dos testes implementados, como cultura microbiológicas, métodos histopatológicos e moleculares por exemplo. Marcadores fúngicos não moleculares no

soro ou em outras amostras biológicas representam uma ferramenta de diagnóstico não invasiva, que pode ajudar nas decisões terapêuticas (MANDANAS, et al, 2019).

De acordo com uma diretriz de prática clínica recente da Sociedade de Doenças Infecciosas da América, a *Candida* é frequentemente isolada do trato respiratório de pacientes que estão na unidade de terapia intensiva e são intubados ou têm traqueostomia crônica. O diagnóstico definitivo requer evidência histológica de infiltração fúngica no tecido pulmonar, considerado o padrão-ouro. A pneumonia por *Candida* geralmente é relatada em indivíduos gravemente imunocomprometidos com doença disseminada, lactentes com muito baixo peso ao nascer e em pacientes com tumores malignos. Um diagnóstico definitivo de pneumonia invasiva por *Candida*, muitas as vezes, requer confirmação histológica, que geralmente é obtida apenas na autópsia. Os relatórios nos quais o diagnóstico antemortem de pneumonia por *Candida* são feitos usualmente são baseados em culturas positivas de escarro e / ou líquido de lavagem broncoalveolar (LBA) sem confirmação histológica (DERMAWAN, et al, 2018).

De acordo com (TORRES, 2018) pneumopatias fúngicas proporcionam considerável morbidade e mortalidade, podendo ser oportunistas ou endêmicas. De maneira geral, as apresentações clínicas e padrões de imagem são múltiplos e superponíveis a várias doenças, dificultando a abordagem diagnóstica. Tendo em conta a amplitude do território nacional, o conhecimento da realidade epidemiológica dessas doenças em cada região é fundamental para a consideração delas no diagnóstico diferencial. No entanto, a definição do estado imunológico irá, ainda, definir a possibilidade de doenças fúngicas oportunistas, por exemplo, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou em situações de neutropenia febril. Achados de imagens são múltiplos, nas pneumopatias fúngicas, por vezes inespecíficos e superponíveis entre os agentes, com inúmeros diagnósticos diferenciais que incluem causas infecciosas e não infecciosas.

Habitualmente a localização pulmonar é fruto de uma disseminação sistêmica do fungo, o uso de antibióticos em larga escala e por tempo excessivo, além de corticoterapia em pacientes por muito tempo acamados em leitos de UTI, são fatores importantes na ocorrência da infecção fúngica (TORRES; et al, 2018). Clinicamente, essas pneumopatias fúngicas cursam com quadros febris em pacientes que não respondem à antibioticoterapia implementada.

A hemocultura, cultura de escarro e principalmente cultura do lavado broncoalveolar constituem os principais meios de identificação do fungo. Quando não se tem um diagnóstico por esses meios, o que é bastante comum, pode-se avaliar a presença do agente etiológico com a realização de aspiração por agulha fina, com sensibilidade de 50-67% das vezes.

Especificamente as infecções por *Candida albicans* vão desde infecção da mucosa localizada até a disseminação com o envolvimento de múltiplos orgãos, como os pulmões por exemplo, conforme dito anteriormente a resposta imune é um fator preponderante e determinante para o tipo de infecção que esse fungo específico acarretará, contudo, o nível da queda da imunidade celular está associada a gravidade da infecção, e a disseminação hematogênica pode ocorrer a partir de anormalidades anatômicas como, por exemplo, nas próteses valvares, em pacientes em intubação orotraqueal por períodos prolongados ou mesmo cânula de traqueostomia de pacientes hospitalizados por longas datas em uso de antibioticoterapia prolongada, sendo um fator importante para o desenvolvimento de pneumonias por *Candida albicans* e sua gravidade nesses pacientes.

O tratamento para candidemia disseminada com cultura positiva para Candida albicans, visa primeiramente a remoção do foco de desenvolvimento do fungo, sejam cateteres ou troca de dispositivos de ventilação avançada como tubos orotraqueais e cânulas de traqueostomia. A abordagem terapêutica para pacientes instáveis e, contudo, graves com candidemia persistente por mais de 5 dias pode-se utilizar a Anfotericina B na dose de 0,7-1,0 mg/Kg/dia.

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 avidez 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 e, 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 *C. albicans* com resistência ao antifúngico citado são a produção de biofilme, alterações do gene ERG3, aumento de esfingolipideos 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 causado por radiação gama. (GRILLO et al., 2015).

Como alertado, as manifestações clínicas desses pacientes compreendem piora do quadro respiratório e queda do estado geral e na maioria das vezes não resposta à antibioticoterapia implementada. O que pode ocasionar complicações como disseminação da doença para outros locais (cérebro, meninges, fígado, baço dentre outros), podendo ocorrer sepse com invasão dos vasos sanguíneos, levando inclusive a quadros como infarto do miocárdio e infarto pulmonar (MANDANAS; et al, 2019).

Diante da não resposta à antibioticoterapia e piora do quadro respiratório, alguns profissionais médicos são levados a suspeitar de um quadro de Tromboembolismo pulmonar Agudo com infarto pulmonar associado, conforme já relatado, motivo pelo qual leva o profissional a buscar mecanismos propedêuticos na tentativa diagnóstica rápida para implementação de terapêutica adequada.

2.3.Tromboembolismo Pulmonar Agudo

O tromboembolismo pulmonar agudo (TEP) tem alta morbimortalidade em um grande número de pacientes. Diagnóstico imediato e correto é importante para que se diminuam os riscos de complicações e se inicie o tratamento com anticoagulantes o mais rápido possível. A base do diagnóstico é a probabilidade clínica, fatores de risco (por exemplo: pacientes internados e acamados por longos períodos) e avaliação de uma enzima chama dímero D, quando disponível. No entanto, o diagnóstico específico requer métodos imaginológicos como a cintilografia pulmonar inalação-perfusão (V/Q) que por muitos anos representou o principal método de imagem na avaliação de paciente com suspeita clínica de TEP agudo, o que será discutido mais a frente (SILVA, MULLER, 2004).

De acordo com (YOO, 2018) o tromboembolismo pulmonar (TEP) agudo é uma das principais causas de emergência cardiorrespiratória e, em cerca de 25% dos casos, cursa com a morte súbita. A incidência anual varia de 23 a 69 casos para cada 100.000 habitantes, com mortalidade de até 30% nos pacientes não tratados e com redução desta taxa para 2,5 a 10% nos pacientes tratados adequadamente. Nos Estados Unidos, cerca de 5 milhões de pacientes são acometidos anualmente por pelo menos um episódio de

trombose venosa profunda (TVP) das pernas, manifestação essa que pode ocorrer em pacientes hospitalizados de longa data, acamados ou imobilizados. Destes, 500.000 pacientes (10%) desenvolvem TEP e 10% (50.000) acabam morrendo. Mesmo assim, apenas 30% dos casos de TEP são diagnosticadas antes do óbito.

A figura 5 exemplifica como é desencadeado de forma objetiva um quadro de tromboembolismo pulmonar agudo.

Um coágulo sanguíneo pode se formar em uma veia na perna, devido ao longo período acamado em que um paciente em tratamento em uma unidade de terapia intensiva (UTI) pode se encontrar, ocasionando o que chamamos de trombose venosa profunda. (TVP). Esse coágulo pode se soltar e seguir o fluxo sanguíneo indo parar em um capilar pulmonar de menor calibre obstruindo esse pequeno vaso. Diante desta obstrução a pressão retrógrada na artéria pulmonar aumenta significativamente colocando o paciente em risco iminente de morte. A obstrução por esse coágulo leva a um quadro de isquemia local, que se caracteriza pela não chegada de sangue e consequentemente ocasionando um infarto pulmonar. A manifestação clínica mais frequente se da através de sintomas como a dispneia, dor pleural, (dor ventilatório-dependente), ansiedade, tosse, taquicardia, febre e hemoptise. No entanto, esses sintomas podem ser encontrados em pacientes com quadro de pneumonia, o que muitas as vezes leva a um tratamento errôneo e diagnóstico não tão simples e rápido como deveria ser.

Como relatado anteriormente, pacientes com quadro de pneumonia que não apresentam melhora, ou mesmo resposta à antibioticoterapia implementada, evoluindo com piora do quadro respiratório podem estar diante de uma pneumonia fúngica ainda sem diagnóstico, ao passo que muitas as vezes o quadro de tromboembolismo pulmonar agudo deve ser levado em consideração devido à grande possibilidade de morte iminente, o que faz com que o médico mesmo pensando em infecção fúngica pulmonar, solicite imediatamente exames de imagem que possam descartar a possibilidade de TEP agudo com rapidez, já que os métodos propedêuticos como a cultura de escarro para crescimento fúngico se fazem demorados.

Os métodos de imagem incluem a angiotomografia de tórax e a cintilografia pulmonar inalação/perfusão (V/Q) sendo esse último, uma ferramenta da medicina nuclear que utiliza radiação ionizante (raios gama) em baixas doses associado a fármacos originando, então, os radiofármacos ou radiofármacos específicos que levarão a radiação até os

pulmões por via sanguínea e inalatória, para posterior visualização do metabolismo do órgão através de equipamento específico chamado gama-câmara.

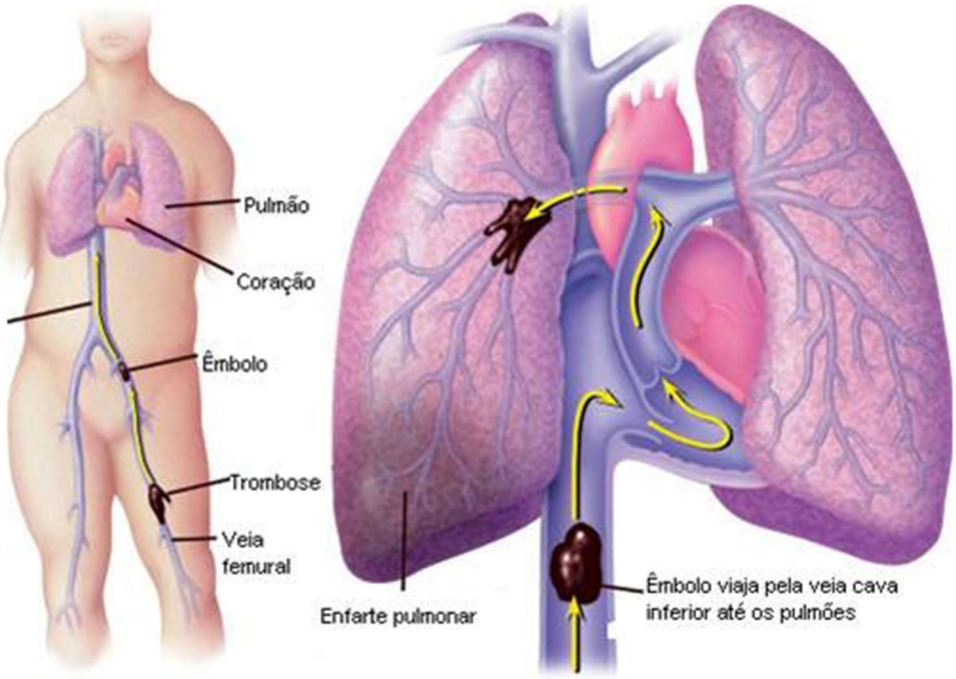


Figura 5 - Fisiopatologia do Tromboembolismo pulmonar agudo. Fonte: (YOO, 2018).

2.4.Medicina nuclear e cintilografia pulmonar inalação/perfusão

A medicina nuclear é um método diagnóstico através da imagem (cintilografia) e terapêutico que usa a radiação gama como substrato para o desenvolvimento de suas atividades. (HIRONAKA *et al*, 2017)

Segundo o autor a base de transmissão de conhecimentos na especialidade é, portanto, fundamentada no atendimento ao paciente nas atividades de rotina da clínica. Os métodos utilizados são: estudo cintilográficos planos e tomográficos (SPECT), tomografia por emissão de pósitrons (PET), procedimentos e cirurgias radioguiadas, terapia e opcionalmente procedimentos *in vitro*. Nesse amplo leque de atividades a anamnese para confirmação de um estudo diagnóstico, avaliação da qualidade e necessidade de imagens

complementares na liberação de um exame cintilográfico para interpretação correta e posterior laudo dos exames com discussão aprofundada do significado clínico de um achado diagnóstico, transformam a medicina nuclear uma especialidade médica de grande importância no cenário de saúde mundial. Além de toda abordagem e conhecimento clínico, o médico nuclear deve se munir de noções aprofundadas de física das radiações, interação das radiações com a matéria, efeitos biológicos radioativos, e conceitos pormenorizados de radioproteção enriquecendo, assim, o seu conhecimento nas diversas áreas das ciências nucleares.

Especificamente a medicina nuclear trabalha com a utilização de radiação gama oriunda de elementos radioativos como o tecnécio meta estável (^{99m} Tc) que teve origem através do decaimento do molibdênio (^{99} Mo) em um gerador específico (Figura 6), ou mesmo radioisótopos como o ^{131} Iodo.

Conforme (CARDOSO, 2020) decaimento radioativo se da através de um núcleo com excesso de energia que tende a estabilizar-se, emitindo partículas alfa ou beta. (Figura 7) Em cada emissão de uma dessas partículas, há uma variação do número de prótons no núcleo, isto é, o elemento se transforma ou se transmuta em outro, de comportamento químico diferente.

Essa transmutação também é conhecida como desintegração radioativa, sendo o termo mais apropriado decaimento radioativo, que sugere a diminuição gradual de massa e atividade.

Figura 6 - Exemplo de gerador de ^{99}Mo/ ^{99m}Tc. Fonte: (CARDOSO, 2020).

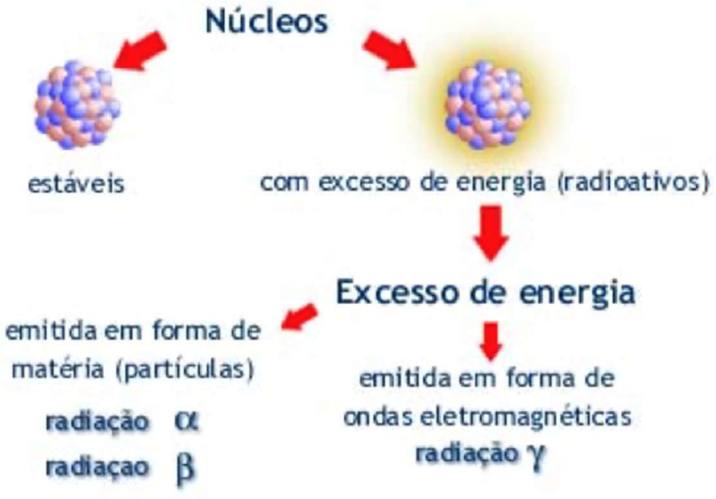


Figura 7 - Exemplo de decaimento radioativo. Fonte: (CARDOSO, 2020).

O autor ainda versa, que a radiação gama pode ser utilizada na agricultura, sendo possível acompanhar, com o uso de traçadores radioativos, o metabolismo das plantas. Pode-se, então, verificar onde um determinado elemento químico fica retido. Uma planta que absorveu um traçador radioativo pode, também, ser "radiografada", permitindo localizar o radioisótopo, o que chamamos de auto-radiografia da planta. (Figura 8)

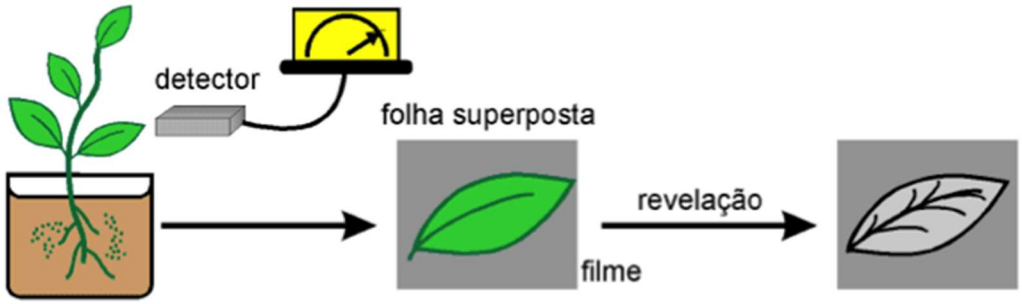


Figura 8 – Exemplo de marcação radioativa de plantas. Fonte: (CARDOSO, 2020).

Pode-se, inclusive, com essa técnica marcar insetos para identificação por exemplo de formigueiros e plantas de preferência das abelhas. (Figura 9)

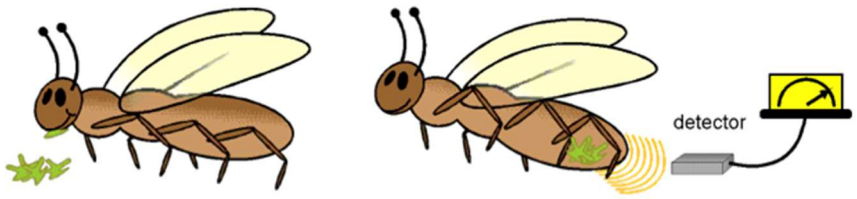


Figura 9 – Exemplo de marcação radioativa de insetos. Fonte: (CARDOSO, 2020).

A marcação radioativa de insetos com radioisótopos pode ser feita, também, para a identificação de insetos predadores de pragas de vegetações fazendo com que possa ser utilizado o predador ao invés de pesticidas nocivos a saúde. (Figura 10)

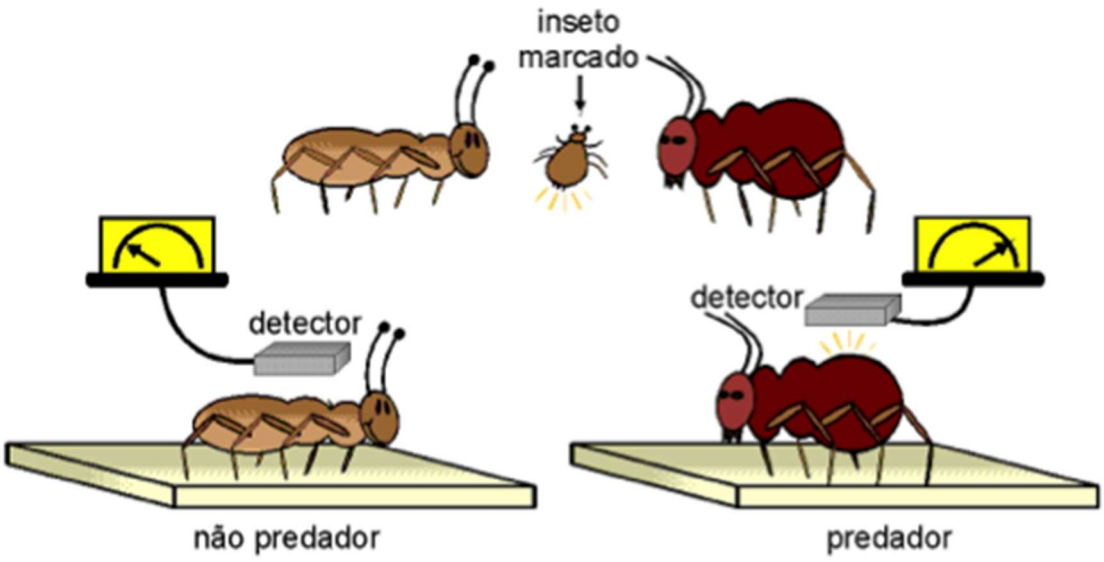


Figura 10 – Exemplo de radiomarcação de insetos predadores de pragas. Fonte: (CARDOSO, 2020).

A radiação gama pode ser utilizada na indústria farmacêutica, esterilizando materiais como seringas, luvas e agulhas. Como também na indústria de alimentos. A tecnologia de preservação de alimentos por ionização em conseqüência de irradiação tem recebido uma crescente atenção de todo o mundo. As autoridades de vigilância sanitária e de segurança alimentar de 37 países, inclusive o Brasil, aprovaram a irradiação de vários tipos de alimentos, englobando especiarias, carne de frango, frutas e legumes. Deve-se salientar que a preservação de alimentos por irradiação não substitui processos de higiene. A vantagem do método é que não altera a qualidade do alimento e não deixa resíduos tóxicos. (Figura 11) A fonte de radiação gama é o Cobalto-60, e a técnica é feita em altas doses radioativas. Fala a favor do uso de uma fonte de Co-60 a devida penetração da radiação gama, proporcionando maior versatilidade e maior amplitude de utilização do irradiador.

Figura 11 - Exemplo da utilização de radiação gama na conservação de alimentos. Fonte: (CARDOSO, 2020).

Voltando o raciocínio para medicina nuclear, temos o uso da radiação gama em baixas doses, respeitando o princípio da otimização como o princípio de ALARA que vem do inglês As Low As Reasonably Achievable (tão baixa quanto razoavelmente exequível) (OKUNO, 2013). A utilização da radiação gama se dá através do uso de radiofármacos específicos para cada orgão. Os fármacos são marcados com tecnécio meta estável (^{99m}Tc). Após a marcação *in vitro* os, então, radiofármacos ou radiofármacos são inalados, ingeridos ou injetados em veias periféricas do corpo humano, para que posteriormente possam-se realizar imagens oriundas da radiação gama emitida pelo metabolismo do determinado orgão e captadas por detectores específicos contidos no equipamento denominado gama-câmara ou câmara de cintilação. (Figura 12)

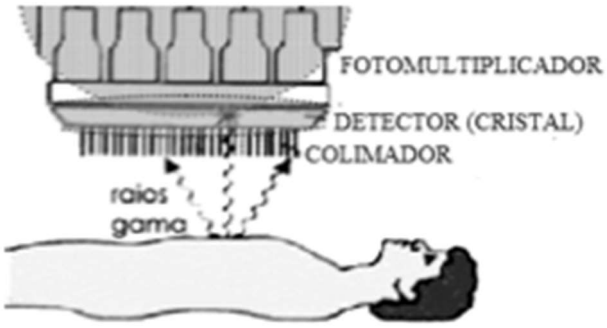


Figura 12 - Exemplo de gama-câmara ou câmara de cintilação. Fonte: (USP, 2020).

A principal indicação para a cintilografia de inalação / perfusão é a detecção de tromboembolismo pulmonar agudo (TEP). É caracterizada por obstrução aguda de uma artéria pulmonar, ou um capilar pulmonar de menor calibre, causada por trombo venoso. O quadro clínico apresenta dispnéia, dor torácica ventilatório dependente e hemoptise, acompanhados por sinais de baixa saturação de oxigênio no sangue e taquicardia. Perda de consciência, instabilidade hemodinâmica e morte podem ocorrer em casos mais graves. A diretriz do American College of Radiology (2011) classifica a cintilografia de inalação / perfusão como altamente recomendada, associada à angiotomografia de tórax(CTPA). Ambos os estudos são altamente precisos no diagnóstico de TEP aguda e a escolha de um ou outro depende da disponibilidade de cada serviço e pode seguir algumas recomendações específicas, como no caso de pacientes com alergia ao contraste iodado ou insuficiência renal, onde a cintilografia inalação/ perfusão é preferida. O uso e avaliação correto da cintilografia de inalação / perfusão torna o método uma ferramenta importante para a detecção de anormalidades regionais da perfusão e ventilação pulmonares, permitindo o diagnóstico preciso de embolia pulmonar com baixa exposição à radiação e riscos mínimos de complicações (RIGOLON; MESQUITA; AMORIM 2019).

De acordo com (HIRONAKA *et al*, 2017), os radiofármacos mais utilizados são o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com tecnécio meta estável (^{99m}Tc – DTPA) para a etapa de inalação com atividade entre 20 a 40 mCi diluído em 5 mL de solução salina para que o paciente possa inalar durante cinco minutos e posteriormente ser encaminhado para sala de exames. Esse aerossol se localiza de maneira fixa por sedimentação em toda a árvore brônquica, proporcionalmente à aeração dos diferentes segmentos pulmonares. Durante a inalação, o paciente deve ser constantemente incentivado a inalar o mais forte que conseguir. Áreas com redução da atividade representam regiões não ventiladas, que podem ser causadas por doenças parenquimatosas com colabamento dos alvéolos, regiões de atelectasias, ou ocupação do parênquima por processos expansivos. Já nas doenças vasculares, como obstrução por êmbolos pulmonares ou vasculites, a inalação geralmente não apresenta alterações na imagem, levando a dissociação perfusão-oxigenação típica.

Para a etapa perfusional utiliza-se o macroagregado de albumina humana marcado, também, com o tecnécio meta estável (^{99m}Tc - MAA) na dose de 3 a 6 mCi injetados em veia periférica. A cintilografia de perfusão pulmonar baseia-se na microembolização da microvasculatura pulmonar por partículas radiomarcadas do traçador descrito. Tais partículas têm tamanho entre 10 e 90 micrometros após o seu preparo para injeção, enquanto o diâmetro máximo dos leitos das arteríolas pré-capilares e dos capilares pulmonares é de cerca de 20-25 micrometros e 7-10 micrometros, o que garante a obstrução mecânica da maioria dos vasos que recebe as partículas, e uma alta taxa de retenção pulmonar do radiofármaco na sua primeira passagem. Estima-se que menos de 0,1% de todos os capilares sejam bloqueados no estudo. Assim, o risco de embolia pela injeção do radiofármaco é desprezível clinicamente. Essas partículas após injetadas no sistema venoso percorrem átrio, ventrículo direito e artérias pulmonares, de onde se distribuem de forma proporcional à circulação pulmonar. Nos leitos dos capilares pulmonares elas se depositam por bloqueio capilar mecânico (diâmetro maior que o da microvasculatura). Com isso, forma-se uma imagem dos campos pulmonares relativa à sua perfusão.

Segundo (HIRONAKA et al, 2017) a cintilografia inalação/perfusão é um dos principais métodos para pesquisa de tromboembolismo pulmonar agudo (TEP), e que a interpretação conjunta das imagens cintilográficas deve incluir sempre que possível uma radiografia de tórax recente, feita nas últimas 24 horas nas projeções posteroanterior e perfil lateral, para guiar na interpretação de algumas alterações anatômicas e aumentar a especificidade caso haja alguma alteração no parênquima pulmonar. As manifestações cintilográficas sugestivas de TEP são geralmente acompanhadas de achados pobres ou nenhum achado na radiografia de tórax. A interpretação cintilográfica pulmonar baseia-se em defeitos vistos à perfusão e não vistos à inalação, ou relativamente maiores à perfusão, são chamados de mismatch. (Figura 13) Com isso, há uma incompatibilidade entre os exames, com padrão pior à perfusão, o que sugere acometimento vascular com preservação do parênquima pulmonar. Em casos de defeitos inalatórios compatíveis com déficits perfusionais (match), considera-se doença de etiologia parenquimatosa, devendo-se considerar diagnósticos diferenciais como pneumonia dentre outros. (Figura 14)

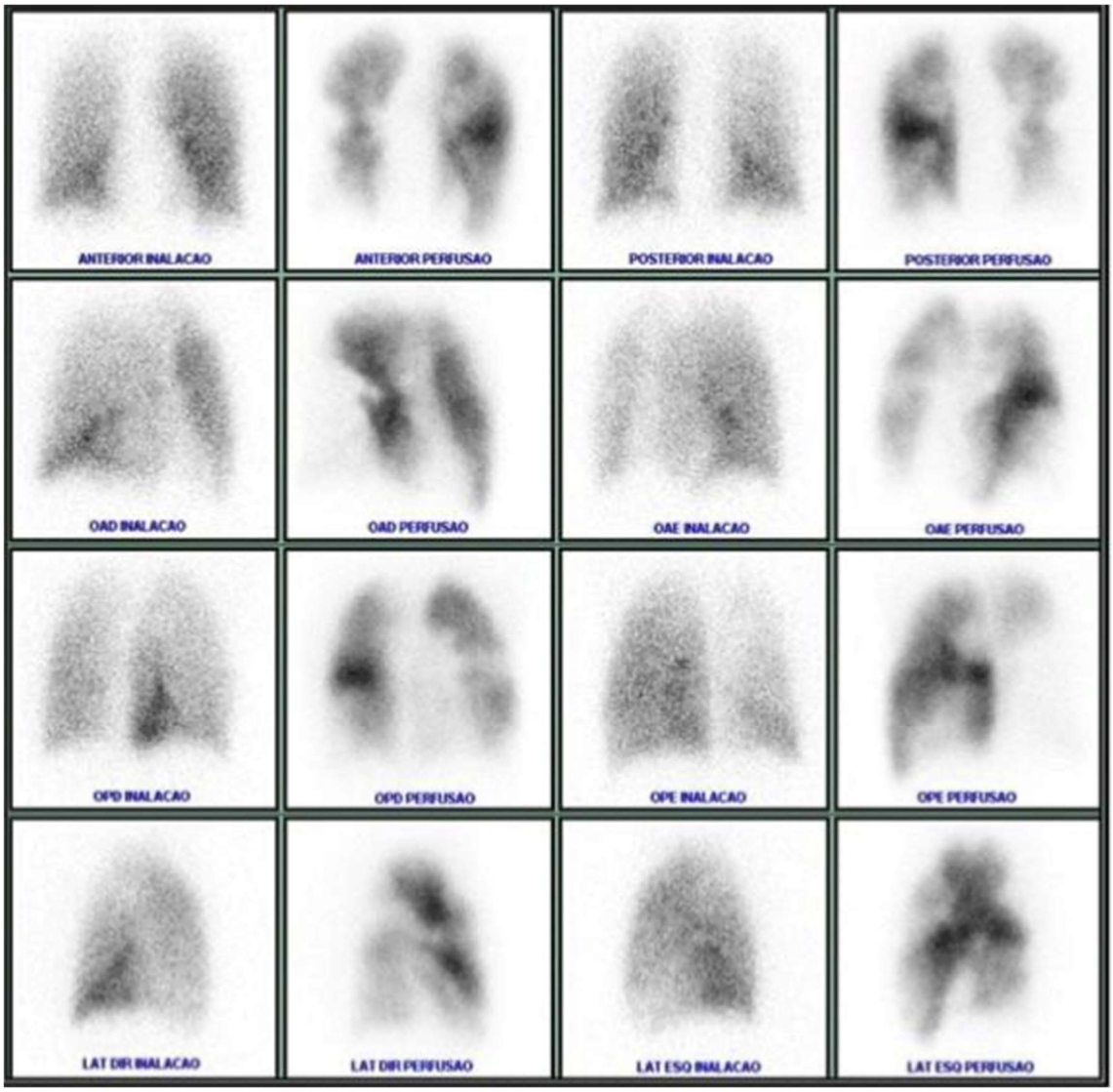


Figura 13 - Cintilografia pulmonar inalação/perfusão de alta probabilidade para TEP (mismatch) Fonte: (JUNIOR, 2020).

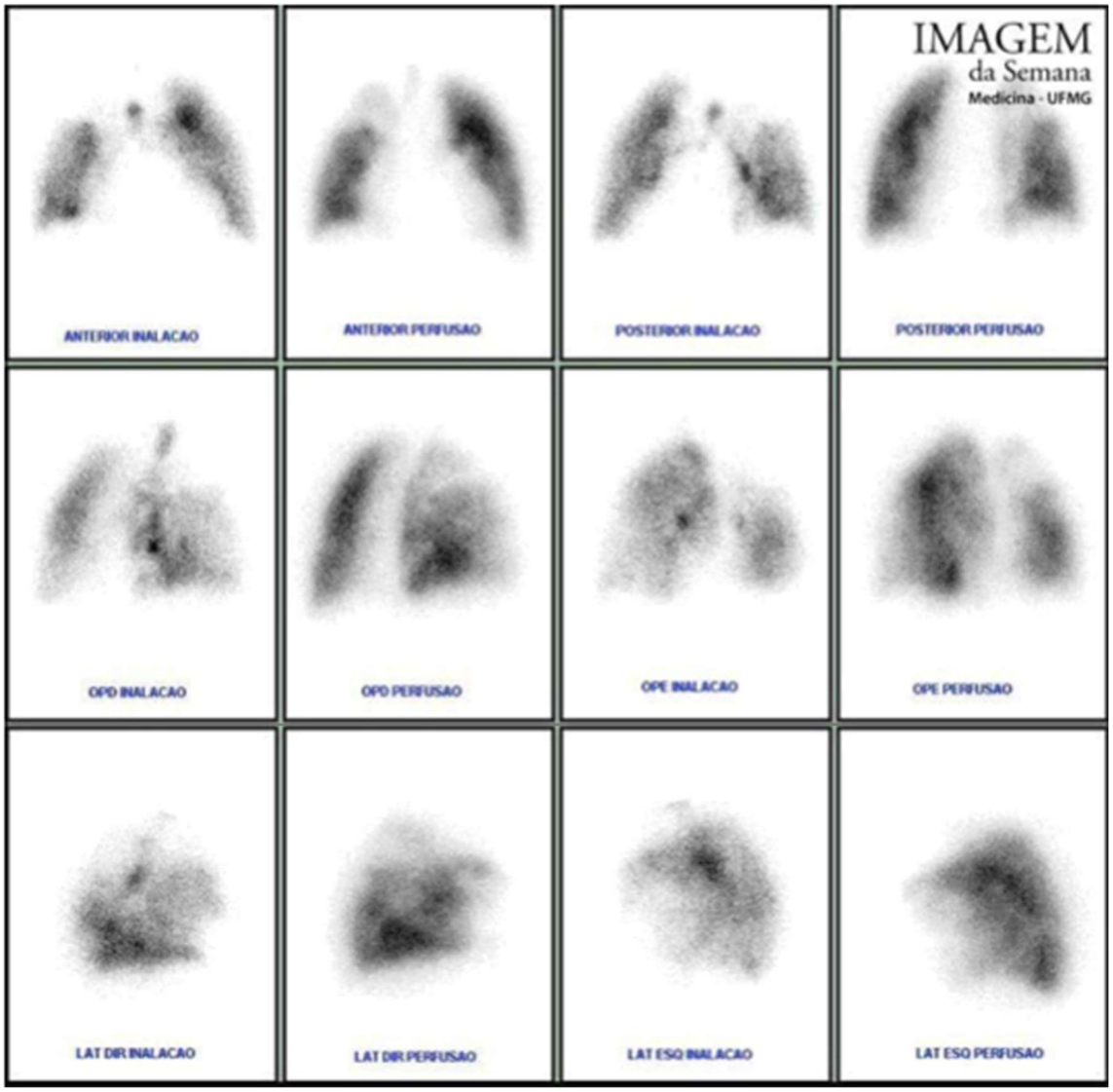


Figura 14 - Cintilografia pulmonar inalação/perfusão de baixa probabilidade para TEP, sugestivo de doença parenquimatosa (match). Fonte: (PEDROSO, 2020).

Em síntese e de acordo com (BAJC; NEILLY; MINIATI, et al, 2009), o princípio básico para o diagnóstico de TEP com base na cintilografia pulmonar inalação/perfusão é reconhecer segmentos ou subsegmentos pulmonares sem perfusão, mas com ventilação preservada, ou seja, incompatibilidade. O TEP agudo deve ser relatado quando for encontrada uma incompatibilidade de mais de um subsegmento. O diagnóstico diferencial inclui doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), insuficiência cardíaca e pneumonia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Descrição do tipo de pesquisa

Estudo prospectivo com caso controle.

3.2.Descrição dos procedimentos

3.2.1. Culturas microbianas

Para este estudo foi utilizada uma 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 continha 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, três tubos de ensaio foram preenchidos com uma amostra populacional de *C. albicans* de 1-5 x 10^6/mL cada (MOSALLAM *et al*., 2018), e foram colocados 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 h, acarretando seis meias-vidas do ^{99m}Tc, onde ao final da sexta meia-vida praticamente não se encontra mais atividade radioativa significativa. 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.

3.2.2. Avaliação da cinética de crescimento de *C. albicans*

As leveduras foram reativadas em caldo Sabouraud por 24 h a 37°C até turvação do meio de cultura. Em seguida, estrias foram realizadas em ágar Sabouraud e as placas incubadas por 24 h 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, correspondendo a 1,5 x 10^6 UFC/mL. Em seguida, uma alíquota (10% v/v) dessa suspensão foi adicionada ao caldo Sabouraud. A cultura foi incubada por 48 h a 37°C sem agitação e alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h para contagem do número de células viáveis. Isso foi feito através de diluições seriadas com 0,9 mL de solução salina estéril a 0,9% em tubos de eppendorf de 1,5 mL, nos tempos acima descritos, para contagem do número de células viáveis. As amostras foram, então, plaqueadas em ágar Sabouraud e as placas incubadas por 24h a 37°C. As colônias contadas e o número de UFC/mL foram calculados (SANTOS et al., 2014) conforme mostrado na Figura 15.

3.2.3. Avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B

Foi determinada utilizando o método de difusão em disco, como descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* específico para leveduras (CLSI, 2008). Estrias de culturas pura da levedura previamente crescidas em meio Ágar Sabouraud por 24 h a 37°C foram homogeneizadas em salina estéril até a que turvação da solução fosse equivalente à turbidez da escala 0,5 de McFarland. As células foram espalhadas pela superfície do ágar Sabouraud e o fungicida foi adicionado na superfície. As placas foram incubadas por 24 h e os halos de inibição foram verificados, conforme apresentado na Figura 16.

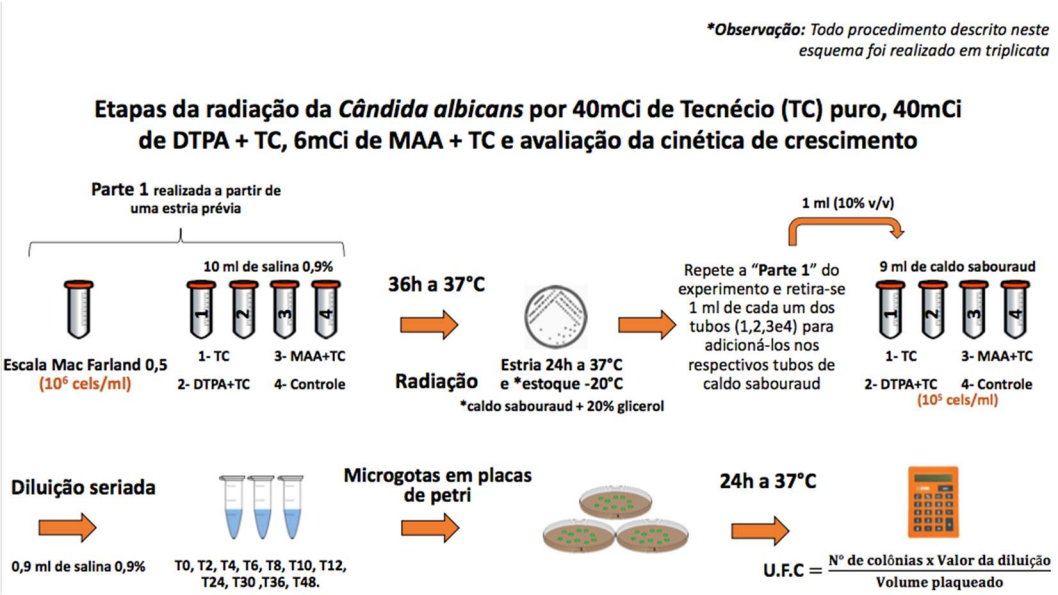


Figura 15 - Esquema ilustrativo de metodologia utilizada para avaliação da cinética de crescimento de *C. albicans*

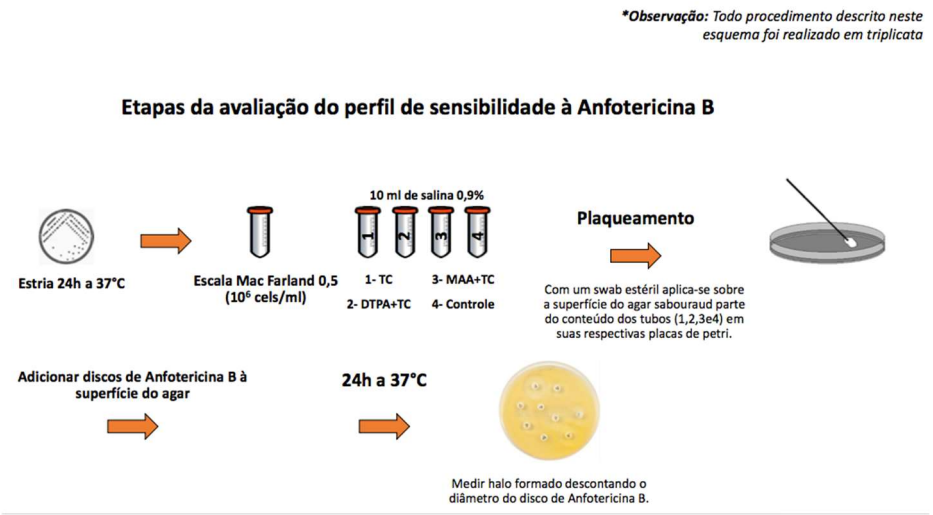


Figura 16 – Esquema ilustrativo da metodologia utilizada para avaliação do perfil de sensibilidade à Anfotericina B.

3.3.Descrição dos métodos estatísticos

3.3.1. Estatísticas descritivas

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.

3.3.2. Análise de variância baseado em um modelo de medidas repetidas

Com o objetivo de avaliar o efeito / influência do Grupo de estudo (Tecnécio, DTPA + Tecnécio, MAA + Tecnécio e Controle), bem como, o efeito / influência do Tempo de avaliação (0h, 2h, 4h, 6h, 10h, 12h, 24h e 36h) na variação das médias na contagem de fungos do gênero *Candida* foi utilizado a *Análise de Variância baseada em um planejamento de Medidas Repetidas.* Cabe destacar que o planejamento de Medidas Repetidas vem do fato de uma mesma "lâmina" ser avaliada em 2 ou mais momentos distintos na pesquisa (variável - "Tempo de avaliação"). Portanto, além de avaliar a influência do fator Grupo de estudo é necessário avaliar a influência do Tempo de

avaliação, bem como, a interação entre as variáveis Grupo de estudo e Tempo de avaliação. Ressalta-se que quando a interação é significativa no modelo de Análise de Variância 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). E, quando a análise identifica uma influência estatisticamente significativa de um ou mais fatores com 2 categoriais ou mais ou mesmo uma ou mais interações será utilizado o teste de comparações múltiplas de médias LSD para avaliar as diferenças encontradas dentro de cada um dos fatores significativos. Ressalta-se que os pressupostos para a utilização desta análise serão verificados, isto é, a normalidade de resíduos (Teste K-S – *Kolmogorov-Smirnov*) e variâncias constantes (Teste de *Levene*). Ressalta-se que na análise de Medidas Repetidas, existe uma restrição adicional, a esfericidade ("Variâncias iguais" entre as diferenças de escores entre as 2 fases estudadas). E, caso a condição de esfericidade seja violada e o valor da Esfericidade for maior do que 0,75 os resultados serão ajustados pelo método de *Huynh-Feldt (H-F)*.

A normalidade dos resíduos (Diferença entre as medidas Contagem real e a Contagem de fungos estimada pela Análise de Variância) foi avaliada através do teste *Shapiro-Wilk*. Trata-se de um teste não paramétrico que tem como objetivo avaliar se a amostra em estudo segue uma determinada distribuição, no caso desse estudo, verificar se os resíduos do modelo seguem uma distribuição normal. A hipótese nula a ser testada é de que a distribuição dos resíduos seja Normal, isto é, se a probabilidade de significância (p) do teste for maior que 5% (0,05) podemos concluir que os dados seguem uma distribuição normal. Porém, recomendam-se valores de ***p*** (probabilidade de significância do teste) superiores a 0,10 ($p > 0,10$) para afirmar, com maior confiabilidade, que uma variável segue uma distribuição Normal.

3.3.3. Regressão polinomial

Os modelos de regressão linear ou logística são ótimos para aprender fenômenos simples, nos quais as variáveis interagem de forma linear. Uma interação entre variáveis é linear quando a variação conjunta que acontece nelas é constante. Essa função será uma reta ou linha, daí o nome linear. Nem sempre uma relação que observamos entre variáveis é linear.

Mesmo sem saber a forma funcional do processo gerador de dados, pode-se desenvolver uma técnica geral que funciona bem para problemas de relações não lineares. Teoricamente, pode-se aproximar qualquer função com um polinômio. Então, nós vamos utilizar esse fato para estender regressão linear para regressão polinomial. A partir das variáveis existentes, constrói-se novas variáveis polinomiais e a regressão com elas terá maior capacidade quanto maior o grau do polinômio criado (por exemplo, elevando-se ao quadrado, ao cubo, à quarta, etc).

Note que a capacidade de ajustamento aos dados é mais forte conforme aumentamos o grau do polinômio. Uma desvantagem do modelo de regressão polinomial é que ele não funciona bem quando temos muitas variáveis e o grau do polinômio é muito alto. Isso porque o número de variáveis cresce exponencialmente com o grau do polinômio ajustado, tornando o aprendizado impraticável rapidamente.

Assim, é recomendável utilizar regressão polinomial apenas em casos de não linearidades mais simples, por exemplo quando se desconfia de alguma relação marginalmente decrescente (ou marginalmente crescente). Nesses casos, utilizar um polinômio de grau 2 ou 3 basta e polinômios com grau superior tendem a sobre-ajustar o modelo.

Uma medida que quantifica a precisão e a qualidade do modelo de uma regressão (Regressão linear simples: $Y = aX + b$ ou Regressão Polinomial) é o Coeficiente de Determinação (R^2), que pode ser interpretado como a proporção da variabilidade presente nas observações da variável resposta y que é explicada pelas variáveis preditoras / regressoras / independentes no modelo de regressão ajustado aos dados. O R^2 de uma Regressão Linear simples é igual a medida do coeficiente de correlação elevado ao quadrado ou de outra forma, o valor de R^2 nada mais é do que a correlação ao quadrado entre os valores reais e os valores previstos pelo modelo. Ressalta-se que quanto mais próximo de 100% for a medida de R^2, melhor e mais preciso será o modelo ajustado. Está aplicação pode ser utilizada nas análises de correlação entre as variáveis pesquisadas.

3.3.4. Probabilidade de significância (p)

Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% (**p** < 0,05), tendo, portanto, pelo menos 95% de confiança nas conclusões apresentadas.

4. 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 colocada 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-Sabouraud por esgotamento e posteriormente incubada em estufa a 37°C *overnight*. No dia seguinte, três tubos de ensaio foram preenchidos com uma amostra populacional de 1-5 x 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 à 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 h. 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 Sabouraud. 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 h para contagem do número de células viáveis. Após diluições seriadas, as amostras foram plaqueadas (microgotas feitas em placas de Petri com ágar Sabouraud) e as placas incubadas por 24 h a 37°C. No dia seguinte, as colônias foram contadas e o número de UFC/ml calculados (SANTOS et al., 2014).

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. Foi 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 h. 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. 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 2 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: $p = 0,227$ → Não significativo e Tempo de avaliação: $p < 0,001$ → Significativo). Ressalta-se que os dados de Contagem de fungos original foram transformados, ou seja, foi calculado 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 exponenciais. 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), as Tabelas 2, 3 e 4 mostram 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. As Figuras 17 a 21 mostram uma melhor 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 – para Tecnécio.

			Medidas descritivas			
	Tempo (h)	**n**	**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

Tabela 3 - Medidas descritivas e comparativas da contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação – para DTPA + Tecnécio, MAA + Tecnécio e Controle.

			Medidas descritivas			
	Tempo (h)	**n**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**d.p.**
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
MAA + Tecnécio	*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
	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
Controle	*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
	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**)

Tabela 4 – Relações entre as medidas descritivas e comparativas da contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação.

Relações	***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

Relações	***Tecnécio***	***DTPA + Tecnécio***	***MAA + Tecnécio***	***Controle***
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. *Tecnécio* **2.** *DTPA+Tecnécio* **3.** *MAA+Tecnécio* **4.** *Controle*

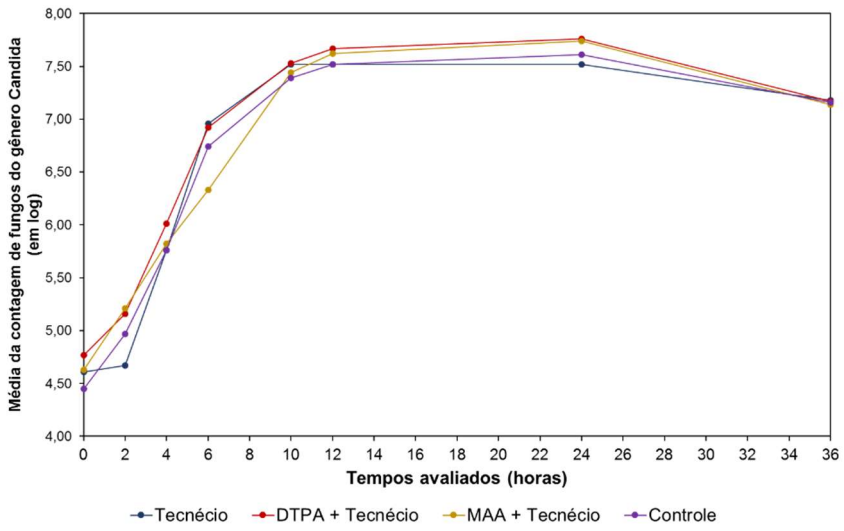


Figura 17 – Médias contagem de fungos do gênero *Candida* (em log) em relação ao Grupo de estudo e ao Tempo de avaliação.

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

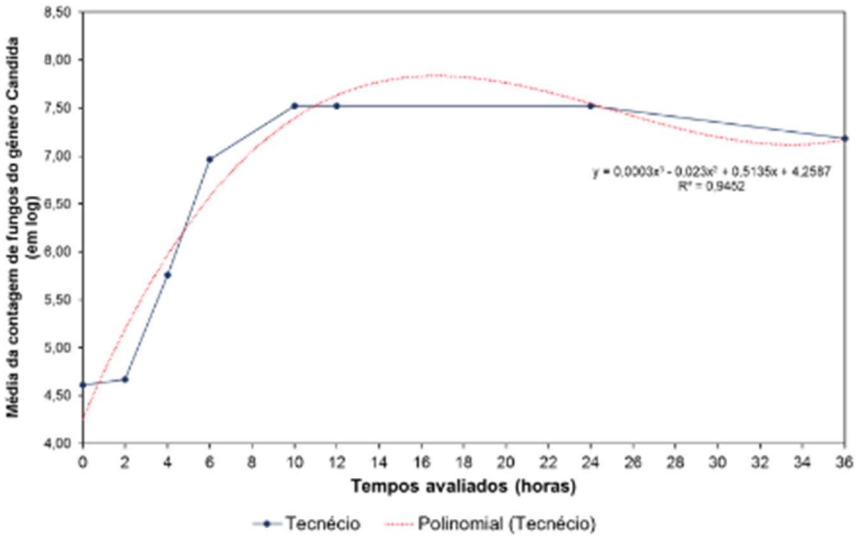


Figura 18 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo Tecnécio.

BASE DE DADOS: 24 casos, no geral (sendo, 3 réplicas em cada tempo)

NOTA: R^2 → Coeficiente de Determinação

y → Estimativa da medida da contagem de fungos do tipo Candida

x → Tempo

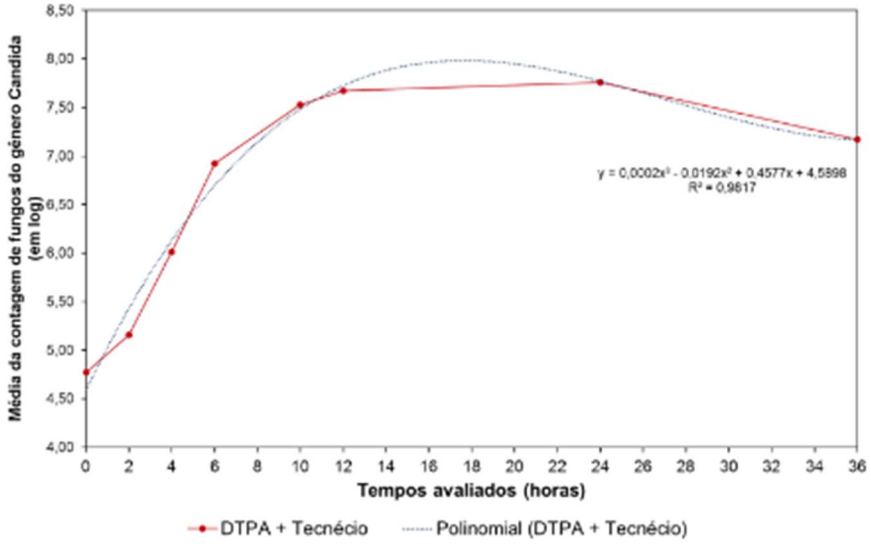


Figura 19 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo DTPA + Tecnécio.

BASE DE DADOS: 24 casos, no geral (sendo, 3 réplicas em cada tempo)

NOTA: R^2 → Coeficiente de Determinação

y → Estimativa da medida da contagem de fungos do tipo Candida

x → Tempo

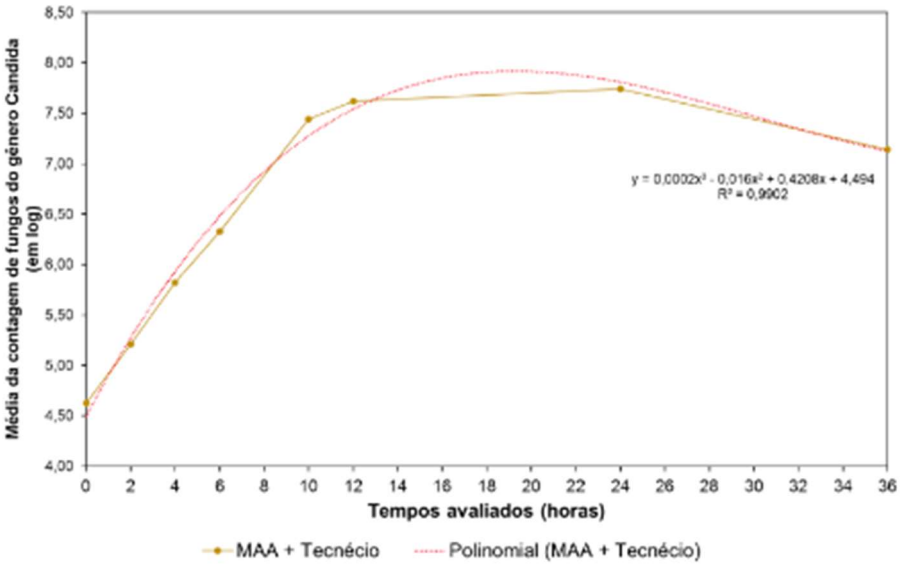


Figura 20 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo MAA + Tecnécio.

BASE DE DADOS: 24 casos, no geral (sendo, 3 réplicas em cada tempo)

NOTA: R^2 → Coeficiente de Determinação

y → Estimativa da medida da contagem de fungos do tipo Candida

x → Tempo

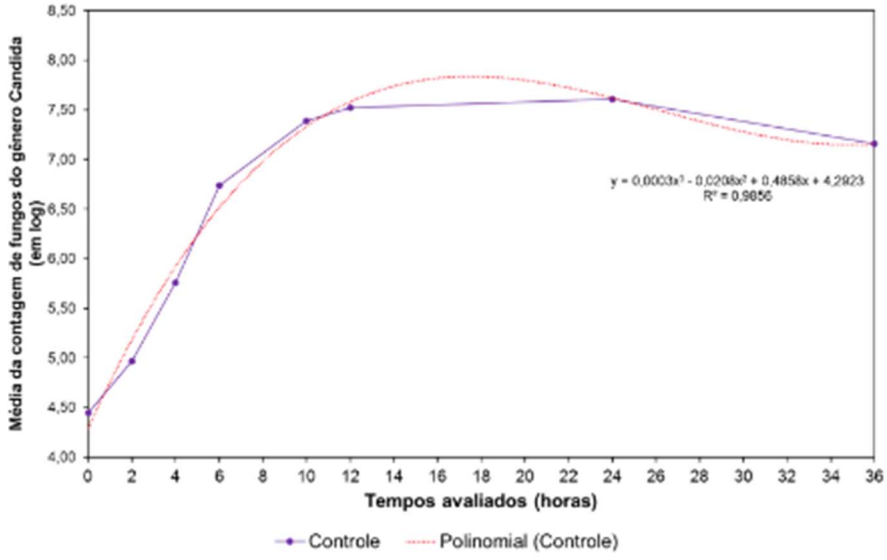


Figura 21 - Média da contagem de fungos do gênero Candida e a equação da estimativa de crescimento – Grupo Controle

BASE DE DADOS: 24 casos, no geral (sendo, 3 réplicas em cada tempo)

NOTA: R^2 → Coeficiente de Determinação

y → Estimativa da medida da contagem de fungos do tipo Candida

x → Tempo

A Tabela 5 e a Figura 22 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 mostram 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, ou seja, a probabilidade de significância (p) do teste foi superior a 0,05 (p > 0,05).

Tabela 5 - Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos resíduos *estudantizados* da Análise de Variância baseada em Medidas Repetidas

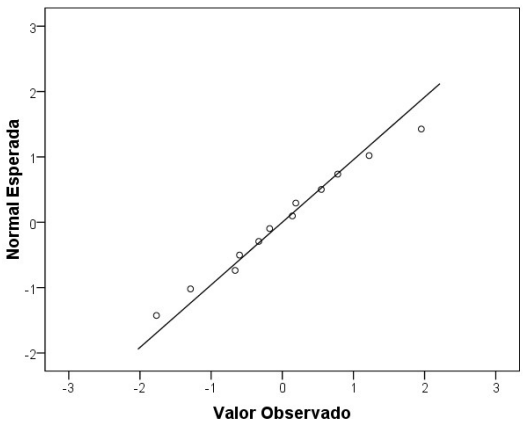
	Teste de Shapiro-Wilk		
Resíduos *estudantizados*	Estatística	g.l	p
0h	0,992	12	1,000
2h	0,944	12	0,558
4h	0,901	12	0,165
6h	0,919	12	0,276
10h	0,901	12	0,164
12h	0,962	12	0,809
24h	0,890	12	0,119
36h	0,965	12	0,855

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

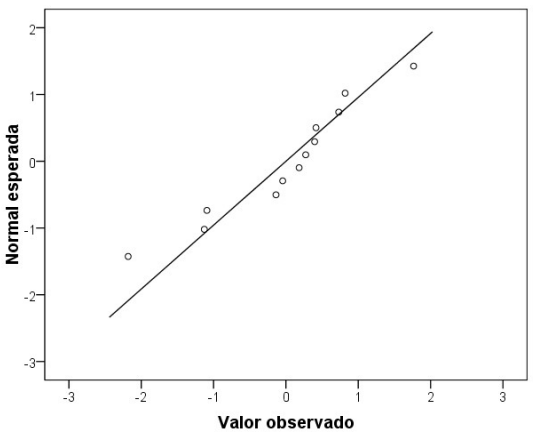
NOTA: *Estatística* → Estatística do Teste de *Shapiro-Wilk*

g.l. → Grau de liberdade

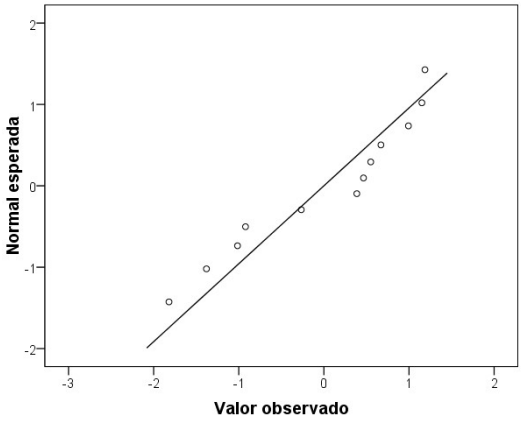
p → Probabilidade do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*



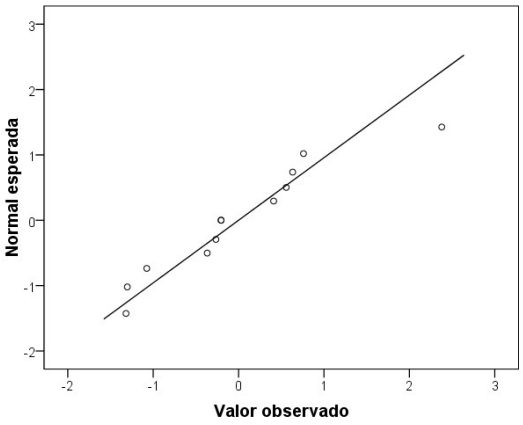
(a) Tempo 0 h



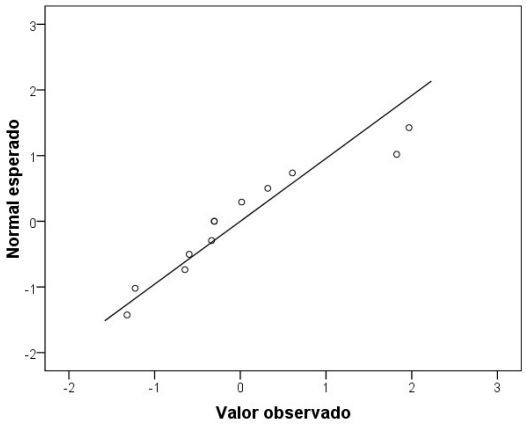
(b) Tempo 2 h



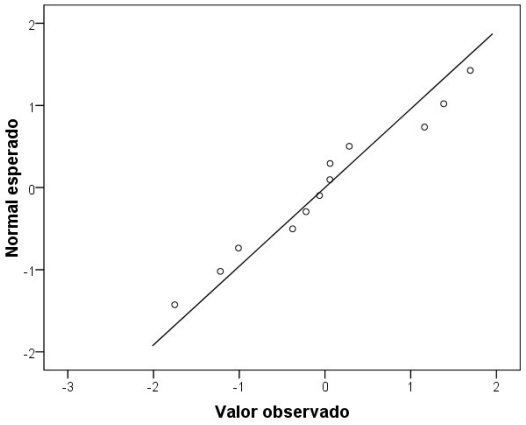
(c) Tempo 4 h



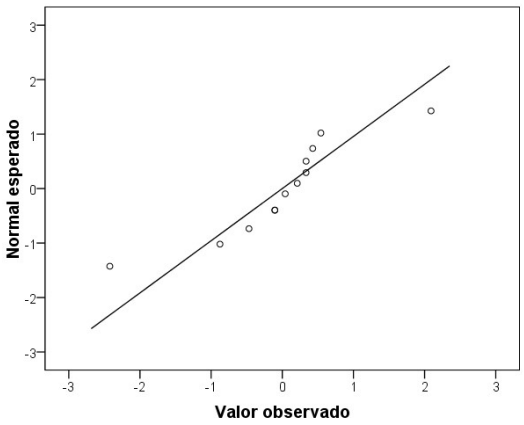
(d) Tempo 6 h



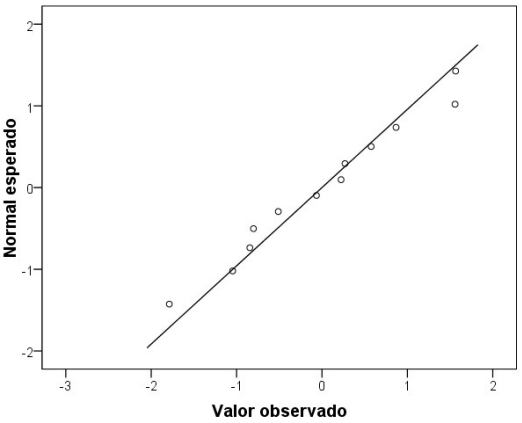
(e) Tempo 10 h



(f) Tempo 12 h



(g) Tempo 24 h



(h) Tempo 36

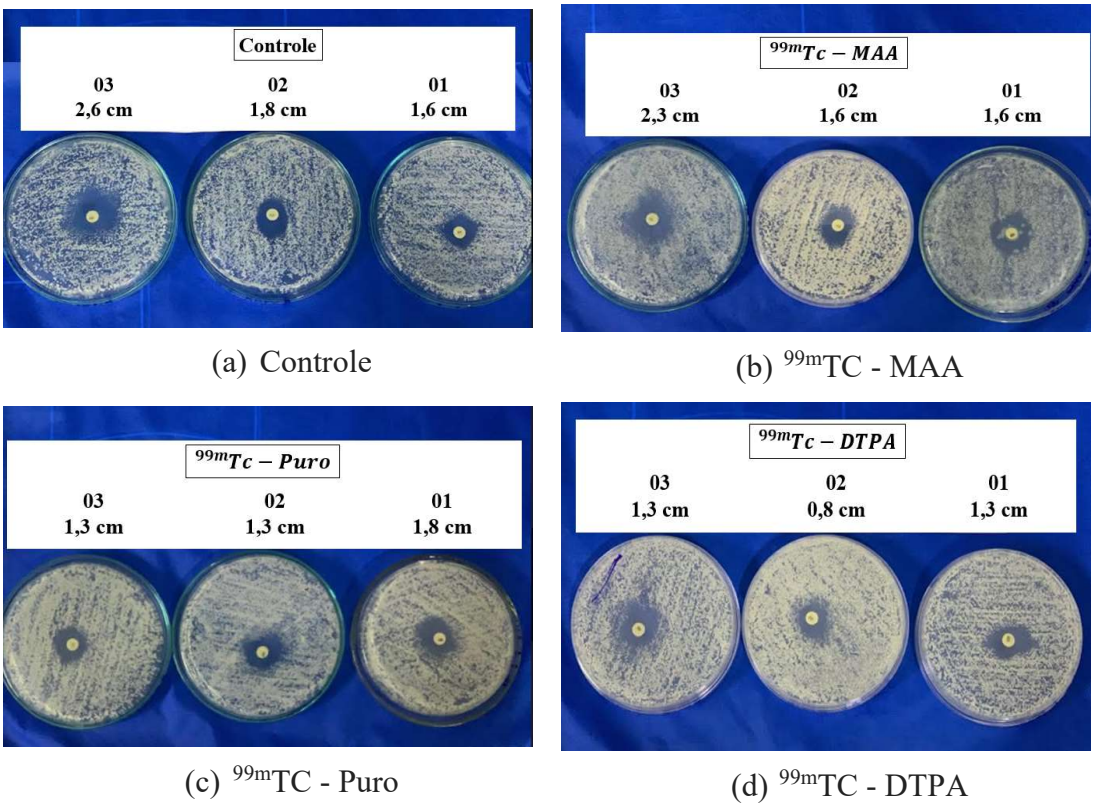
Figura 22- Gráfico do tipo Q-Q para avaliação de normalidade de Resíduos estudantizados nos Tempos de: 0, 2, 4, 6, 10, 12, 24, e 36 h.

5.2. Análise do perfil de sensibilidade dos fungos à Anfotericina B

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 à Anfotericina B, houve diminuição do halo de crescimento das triplicatas irradiadas quando comparado ao grupo controle, conforme Tabela 6 de resultados e na Figura 23, conferindo maior resistência dos grupos irradiados (^{99m}Tc puro no tubo 1, ^{99m}Tc-DTPA no tubo 2, ^{99m}Tc-MAA no tubo 3 e controle no tubo 4).

Tabela 6 - 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



(a) Controle

(b) ^{99m}TC - MAA

(c) ^{99m}TC - Puro

(d) ^{99m}TC - DTPA

Figura 23 - Perfil de halo de inibição fúngica frente à Anfotericina B para os grupos avaliados.

6. CONCLUSÃO

Após experimento realizado para avaliar o comportamento do fungo da espécie *C. albicans* diante de baixas doses de radiação gama oriunda dos radiofármacos utilizados como substrato para realização de exames de cintilografia Pulmonar inalação/ perfusão, nossos 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 (^{99m}Tc - DTPA, ^{99m}Tc - Puro, ^{99m}Tc - MAA, 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, ocasionando a mudança do protocolo ou mesmo contraindicando o procedimento cintilográfico pulmonar para pacientes que potencialmente possam estar diante de uma pneumonia fúngica por *C. albicans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINHO, Daniel Paiva. Caracterização das bases moleculares da suscetibilidade imunológica à infecção por Candida albicans. Tese (Doutor em Medicina), Universidade de Brasília (UnB), 2015

ARAÚJO, 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.

BAJC, M., NEILLY, J.B., MINIATI, M. et al. EANM guidelines for ventilation/perfusion scintigraphy. Eur J Nucl Med Mol Imaging 36, 1356–1370, 2009. https://doi.org/10.1007/s00259-009-1170-5

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.BG. Candidíase. DST - J bras Doenças Sex Transm 2010: 22(1): 22-38 - ISSN: 0103-4065 - ISSN on-line: 2177-8264, 2010.

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.

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.

BELTRÁN, E.R.; MÉNDEZ, C. I. B.; IRANZO, M.; MORMENEO, S.; LUNA-ARIAS, J. P.. The Cell Wall of Candida albicans: A Proteomics View. Candida Albicans, Edited by Doblin Sandai, 2019, DOI: 10.5772/intechopen.82348

BRIAN A. Young, TIMOTHY W. Flynn. Pulmonary Emboli: The Differential Diagnosis Dilemma. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy 2005 35:10, 637-644

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

CARDOSO E. M. Programa de integração CNEN – Módulo de Informação Técnica. Disponível em: www.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/programa-de-informacao-cnen.pdf. Acesso em: 08 de julho de 2020

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.

DERMAWAN, J., GHOSH, S., KEATING, M. K., GOPALAKRISHNA, K. V., & MUKHOPADHYAY, S. Candida pneumonia with severe clinical course, recovery with antifungal therapy and unusual pathologic findings: A case report. Medicine, 97(2), e9650. 2018 https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009650

FIELD, ANDY; *Descobrindo a Estatística usando o SPSS;* Porto Alegre: Artmed, 2009, 2ª ed. 688 p. (*Tradução: Lorí Viali)*

GANTNER, B.N., SIMMONS, R.M., AND UNDERHILL, D.M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments. The EMBO journal *24*, 1277-1286, 2005.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J Bras Patol Med Lab, v. 46, n. 3, p. 225-234, junho 2010.

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.

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

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.

JOHNSON. R & BHATTACHARYYA. G. *Statistics Principles and Methods*. New York: John Wiley & Sons. 1986. 578p.

JUNIOR, C.A.M., et al. Imagem da Semana: Cintilografia. *[online]* Disponível em: https://www.acoesunimedbh.com.br/sessoesclinicas/wordpress/wp-content/uploads/2017/02/Caso.pdf. Acesso em: 30 de junho de 2020.

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.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates. Acta Bichimica Polonica*, Warszawa, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

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 micobioma à infecção, terapia e prevenção. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** , v. 35, n. 8, p. 1221-1226, 2016.

MANDANAS, R. A.; ANARIBA, D. E. I.; LANZA, J.; LESSNAU, K. D. Fungal Pneumonia. MedScape, 2019

MAYER FL, WILSON D, HUBE B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. Vol 4,3, 2013

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.

MILLIKEN, G.A. & JOHNSON, D.E. *Analysis of Messy Data*. New York: Chapman & Hall, 1992, 472p.

MONTGOMERY, D.C., *Design and Analysis of Experiments*, New York: John Wiley & Sons, 1991, 649 p.

MONTGOMERY, DOUGLAS C. & PECK, ELIZABETH A., *Introduction to Linear Regression Analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1982, 504p.

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.

NETEA, M.G., BROWN, G.D., KULLBERG, B.J., AND GOW, N.A. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. Nature reviews Microbiology *6*, 67-78, 2008.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estud. av.**, São Paulo , v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013 https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014.

.

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

PEDROSO, M. A. Imagem da Semana: Tomografia Computadorizada. *[online]* Disponível em: https://www.acoesunimedbh.com.br/sessoesclinicas/wordpress/wp-content/uploads/2015/02/Caso-07-da-ufmg_-caso-81-da-Unimed-BH-1.pdf. Acesso em: 30 de junho de 2020.

PRADO, G. Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B1 e no crescimento de cepa toxigênica de Aspergillus flavus em amendoim (Arachis hypogaea L.).Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)[online]. 2005, vol.64, n.1, pp. 85-90. ISSN 0073-9855.

RABINOVITCH, Leon *Selective inactivation of spores maintaining larvicidal activity in Bt serovar israelensis irradiated with gamma rays.* Neotropical Biology and Conservation, v.9, n.3, p.120-124, dec. 2014

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN. Procariotos e vírus. In: Biologia vegetal. 7o ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan S.A., Cap.13 p. 260-269, 2007.

RIGOLON, Marcel Yanagihara; MESQUITA, Claudio Tinoco; AMORIM, Bárbara Juarez. Guideline for Ventilation/Perfusion Scintigraphy. Int. J. Cardiovasc. Sci., Rio de Janeiro , v. 32, n. 3, p. 302-309, June 2019 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-56472019000300302&lng=en&nrm=iso>. access on 30 June 2020. Epub May 20, 2019. https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180103.

ROBBINS N, UPPULURI P, NETT J, et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. PLoS Pathog. 2011;7(9):e1002257. doi:10.1371/journal.ppat.1002257

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.

SILVA, C. Isabela S.; MULLER, Nestor L.. Diagnóstico por imagem do tromboembolismo pulmonar agudo. J. bras. pneumol., São Paulo, v. 30, n. 5, p. 474-479, Oct. 2004.

SOLL, D.R. Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in Candida albicans. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology *26*, 10-20, 2004.

SPSS 17.0 for Windows (*Software* Estatístico).

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

SUDBERY, P.E. (2011). Growth of Candida albicans hyphae. Nature reviews Microbiology *9*, 737- 748.

TORRES, Pedro Paulo Teixeira e Silva et al . Avaliação tomográfica das doenças fúngicas no tórax: abordagem por padrões e sinais. Radiol Bras, São Paulo , v. 51, n. 5, p. 313-321, Oct. 2018 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-39842018000500313&lng=en&nrm=iso>. access on 08 July 2020. https://doi.org/10.1590/0100-3984.2017.0223.

USP. MEDICINA NUCLEAR, *[online]* Disponível em: http://moodle.stoa.usp.br/file.php/220/texto-resumido-principios-fisicos-MN.pdf. Acesso em: 30 de junho de 2020.

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

YOO, H.H.B. Tromboembolia Pulmonar. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. 2018. *[online]* Disponível em: www.hcfmb.unesp.br/tromboembolia-pulmonar/. Acesso em: 07 de julho de 2020.

YOUNG BA, FLYNN TW. Pulmonary emboli: the differential diagnosis dilemma. J Orthop Sports Phys Ther. 2005; 35(10):637-644. doi:10.2519/jospt.2005.35.10.637

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

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.