

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* e *in vivo* DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM HIPERICINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE DERMATOFITOSE POR *Microsporum canis*

Tiago de Paula Bianchi (PIBIC/CNPq /Uem), Camila Barros Galinari (Pós-Graduação), Érika Seki Kioshima Cotica (Docente) Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientadora), Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientadora) e-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/ Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas e Subárea: Microbiologia

Palavras-chave: dermatomicose, *tinea capitis*, terapia fotodinâmica

Resumo:

Dermatófitos são fungos causadores de dermatofitoses e, apresentam como característica principal serem queratinofílicos, infectando desta maneira a pele, unhas e cabelo. Dentre eles destaca-se o fungo *Microsporum canis*, o qual recorrentemente é isolado em parasitismo de couro cabeludo. A terapêutica das infecções causadas por este fungo é atualmente falha, devido à resistência e toxicidade dos antifúngicos atuais. Nesse sentido, o tratamento utilizando a Terapia Fotodinâmica (TFD) vem sendo investigado como uma possível alternativa para o tratamento das dermatofitoses, devido à sua atuação local, baixa toxicidade e multiplicidade de alvos para a ação antimicrobiana. Assim, este estudo avaliou a atividade antifúngica *in vitro* da Inativação Fotodinâmica (IF) mediada por hipericina, demonstrando uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade fúngica nas concentrações 6,25 e 12,5 $\mu\text{mol/L}$, principalmente com a hipericina nanoencapsulada em P123 (hip-P123). Com essa formulação, foi realizado o teste *in vivo* em modelo experimental de dermatofitose em camundongos, o qual evidenciou uma melhora clínica das lesões e diminuição da carga fúngica no grupo tratado pela hip-P123-TFD. Os resultados encontrados são pioneiros na área e estruturam a confiabilidade no método da TFD.

Introdução

As dermatofitoses são patologias fúngicas consideradas um problema saúde pública, responsáveis por infectar 20 a 25% da população mundial. Devido à característica queratinofílica dos agentes etiológicos, os principais sítios de infecção compreendem a pele, o pelo e as unhas. Nesse contexto, destaca-se *tinea capitis*, uma dermatofitose do couro cabeludo causada por *Microsporum canis*, um fungo zoofílico. É frequente em crianças com

contagiosidade elevada. A sintomatologia caracteriza-se por prurido, eritema, descamação e placas de alopecia. De forma geral, a terapia para esses quadros é duradoura, devido ao crescimento lento dos fungos e ao sítio de localização de difícil acesso aos antifúngicos convencionais, desencadeando recorrência do quadro clínico [3]. Seguindo a natureza superficial destas infecções e a facilidade de aplicação de uma fonte de luz, a Terapia Fotodinâmica (TFD) vem sendo explorada como um método de tratamento para as dermatofitoses. A Inativação Fotodinâmica (IF) de microrganismos se baseia na combinação de um fotossensibilizador (FS) capaz de absorver energia e transmiti-la para uma biomolécula, com uma fonte luminosa de comprimento de onda específico. Desta maneira, a exposição estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em morte fúngica por apoptose, necrose ou autofagia [1]. A exemplo, tem-se a hipericina que é um FS derivado da planta *Hypericum perforatum*.

Materiais e métodos

A otimização do cultivo fúngico foi executada a partir da semeadura de cepas padrão de *Microsporum canis* em quatro meios distintos: *Potato Dextrose Ágar* (PDA), *Lactrimel Ágar* (LA), *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA) e *Mycosel Ágar* (MA). Após sete dias de crescimento, foram preparadas suspensões com material destas colônias e a contagem microscópica dos microconídios produzidos em cada cultura, atrelada a constatação da viabilidade conidial pela adição do corante *Trypan Blue*. Com a finalidade de obter um resultado quantitativo semeou-se em PDA uma alíquota diluída da solução de microconídios utilizada para a contagem anterior. A atividade antifúngica da IF mediada por hipericina (hip) contra células planctônicas de *M. canis* (1×10^5 UFC/mL) foi avaliada de forma análoga à Microdiluição em Caldo (CLSI, 2008). O composto foi diluído (0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$) em Dimetilsulfóxido (DMSO) para os primeiros testes e posteriormente nanoencapsulado em Pluronic® P123 (Sigma-Aldrich). O conjunto foi iluminado com irradiância de 31.5 mW/cm² (650nm). A seguir, uma alíquota de cada concentração do fotossensibilizador foi testada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (redução $>1\log_{10}$ UFC/mL) e Concentração Fungicida Mínima (redução $>3\log_{10}$ UFC/mL). Na análise *in vivo* da hip-P123-TFD, em modelo experimental de dermatofitose, utilizou-se camundongos machos Swiss (CEUA 5708300418). Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo: Grupo controle negativo: animais sem infecção e sem tratamento; Grupo controle: animais infectados e não tratados; Grupo hip-TFD: animais infectados e tratados com hip-P123-TFD; Grupo terbinafina: animais infectados e tratados com terbinafina 1% p/v (Sigma). Os animais foram escoriados no dorso (2,5 cm²) e infectados com *M. canis* (1×10^6 UFC/mL) de forma subdérmica por três dias. Após a confirmação do quadro dermatofítico por Exame Micológico Direto, a TFD foi realizada a cada 48 horas e a eutanásia dos animais foram realizadas após 3 e 6 sessões de TFD para a

retirada do tecido. A eficácia da TFD foi avaliada pela redução da carga fúngica e medição das feridas cutâneas. A medição foi feita através de uma pontuação semiquantitativa [2]. Também nesse sentido, foi realizado o teste de Invasão da Raiz Capilar (IRC), semeando amostras de pelo dos animais em PDA. Além disso, pedaços de pele retirados das eutanásias foram plantados em PDA nas mesmas condições do teste de IRC.

Resultados e Discussão

A espécie *M. canis* apresenta características macroscópicas singulares nos diferentes meios utilizados na micologia. A contagem microscópica realizada demonstrou uma média de crescimento para o PDA e LA de $1,78 \times 10^7$ e $1,40 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente, enquanto que nos outros substratos a contagem permaneceu na ordem de 10^6 UFC/mL. A viabilidade conidial foi mantida em todos os meios, constatada pelo citoplasma fluorescente, no ensaio com *Trypan Blue*. O resultado da cultura pós microscopia corroborou com a análise anterior e também destacou o PDA como o meio com a maior média de produção conidial ($1,78 \times 10^7$ UFC/mL). Sendo assim, para o cultivo de *M. canis*, o alvo da IFD e TFD nesse projeto, utilizamos o PDA como substratos para os seguintes experimentos. No experimento sem a aplicação da fonte luminosa constatamos que o fotossensibilizador, diluído em DMSO, não apresentava atividade antifúngica contra o inóculo aplicado, pois houve crescimento fúngico em todas as concentrações, semelhante ao controle negativo. Entretanto, a aplicação de luz viabilizou a atividade do composto nas concentrações de 3,125 - 50 $\mu\text{mol/L}$, com redução significativa das UFC ($p < 0,05$). A atividade da hip diluída em DMSO se mostrou promissora, entretanto a toxicidade inerente ao diluente se mostrou presente na porcentagem de 50% contra o inóculo empregado. Nesse sentido, procurando otimizar a entrega do fotossensibilizador para as células e eliminar o viés da toxicidade, propõe-se o nanoencapsulamento em micelas copolímeras de P123, as quais promovem um carreamento eficiente de moléculas apolares e de grande tamanho, como é o caso da hipericina [1]. A IF mostrou eficiência, visto que duas cepas de *M. canis*, Rot1 e Rot2, foram susceptíveis à formulação nas concentrações 12,5 e 6,25 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Ambas mostraram uma redução da viabilidade fúngica significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, chegando a uma redução $> 1,5 \log_{10}$ UFC/mL na Rot2 e $> 2 \log_{10}$ UFC/mL na Rot1. Sendo assim, essa formulação foi escolhida para os testes *in vivo* da TFD. No modelo experimental de dermatofitose, os scores provenientes da análise do tegumento indicaram que no último dia avaliado (16º dia), os grupos apresentavam lesões semelhantes, com crescimento de pelos e início da regeneração tecidual. No entanto, o grupo hip-TFD apresentou melhora clínica precoce do processo infeccioso. Após três sessões de tratamento (10º dia), os grupos controle fúngico ($p = 0,0276$) e terbinafina ($p = 0,0177$) exibiram estatisticamente mais edema, dano ao tegumento e eritema, em

comparação com o grupo hip-TFD. Após seis sessões de tratamento (16º dia), o grupo hip-TFD mostrou diminuição de $1,5 \log_{10}$ UFC/g ($p = <0,0001$) na carga fúngica em comparação com o grupo controle. Essa redução foi maior do que a exibida pelo tratamento com terbinafina, que resultou em um número reduzido de $0,97 \log_{10}$ UFC/g ($p = 0,0400$). Consolidando esse achado, o teste qualitativo IRC mostrou que o cabelo de animais não tratados estava fortemente infectado por *M. canis*, assim como os pedaços de pele semeados. Além disso, os pelos e peles dos animais tratados com hip-P123-TFD e terbinafina manifestaram menor crescimento fúngico justificado

Conclusões

O cultivo laboratorial primário da espécie *M. canis* em SDA não é o ideal para os ensaios realizados, visto que não há uma produção ideal de microconídios. Sendo assim, é necessária uma semeadura em meios enriquecidos como o PDA para os testes de IF. Os testes *in vitro* evidenciaram a atividade antifúngica da IF associada à hipericina, principalmente quando nanoencapsulada em P123. Essa formulação se mostrou eficiente no ensaio *in vivo* aplicando a TFD, demonstrando uma melhora clínica das lesões e redução da carga fúngica em comparação ao controle. Logo, os resultados pioneiros com a espécie estimulam a realização de estudos com diferentes dermatófitos, bem como estimula a realização de ensaios clínicos aplicando a TFD em quadros de dermatofitose por *M. canis*.

Agradecimentos

Agradecemos aos integrantes do Laboratório de Micologia Média/UEM, pelo apoio na realização do projeto e ao CNPq, o qual foi a agência de fomento do trabalho descrito.

Referências

- [1] GEROLA, A. P. ESTEVÃO, B. M. CAETANO, W. HIOKA, N. TESSARO, A. L. Estudos Quimiométricos da Pheo formulada em Pluronic®: Ação Fotodinâmica sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 36, n.1, p. 97-101, 2013.
- [2] GHANNOUM, M.A. HOSSAIN, M.A. LONG, L. MOHAMED, S. REYES, G. MUKHERJEE, P.K. Evaluation of Antifungal Efficacy in an Optimized Animal Model of Trichophyton mentagrophytes-Dermatophytosis. **Journal of Chemotherapy**, v. 16, n. 2, p. 139–144, 2004.
- [3] PEREIRO, F. M. GARCÍA-MARTÍNEZ, F. J. ALONSO-GONZÁLEZ, J. Actualización en el tratamiento de las micosis cutáneas. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 103, n. 9, p. 778–83, 2012.