

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA DE *Candida albicans* À INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.

Tiago de Paula Bianchi (PIBIC/CNPq /UEM), Camila Barros Galinari (Pós-Graduação), 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 da Saúde e Subárea: Microbiologia

Palavras-chave: hipericina, inativação fotodinâmica, resistência

Resumo:

O desafio encontrado para se diagnosticar e tratar as dermatomicoses contribui para que esse quadro se configure como uma problemática clínica importante. Nos últimos 100 anos, a Inativação Fotodinâmica (IFD) evoluiu concretamente como uma alternativa segura e eficaz para terapêutica de patologias dermatológicas, devido à propriedade tópica do método. A combinação de uma fonte luminosa e uma molécula fotoativa, chamada de fotossensibilizador (FS), abre um cenário muito promissor para vários compostos. Dentre os FS se destaca a hipericina (hip), uma naftodiantrona detentora de propriedades fotofísicas singulares especialmente exploradas na IFD. A atividade antifúngica do método com hip já está relatada na literatura e foi explorado na revisão bibliográfica realizada neste projeto, a qual evidenciou que a hip tem efeito fungicida na IFD, principalmente quando nanoencapsulada. Ainda, a eficiente geração de oxigênio singlete, uma molécula imprescindível no mecanismo de ação da IFD, se mostrou dependente de uma combinação precisa entre fonte luminosa e solução de hip empregada. Evidentemente, devido a ação inespecífica da molécula, pouco se tem publicado sobre a possibilidade de resistência à IFD pelas células fúngicas. Entretanto, é necessário analisar esse aspecto nas novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, e de forma inovadora, nosso trabalho comprovou experimentalmente a ausência de resistência fúngica após ensaios sucessivos de IFD com hip nanoencapsulada em P123.

Introdução

A prevalência das dermatomicoses atinge aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o planeta. Apesar da severidade ser intrínseca às micoses sistêmicas, os quadros mucocutâneos podem evoluir de assintomáticos e leves, para lesões significativas com conseqüente morbidade (SAKITA et al.,

2019). Adicionalmente, a dificuldade de acesso dos antifúngicos a esses locais de infecção e a recorrência clínica devido a emergência de resistência fúngica, concretizam essas infecções como um agravo de saúde pública (GALINARI et al., 2021). Nesse cenário, se destacam as estratégias terapêuticas de aplicação tópica que procuram inviabilizar o desenvolvimento de resistência ou tolerância, como é o caso da Inativação Fotodinâmica (IFD) de microrganismos. Nesta técnica, um corante não tóxico conhecido como fotossensibilizador (FS) é fotoativado com uma fonte de luz de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio, para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singlete (1O_2) e radicais livres (GIULIANI et al., 2010). Devido ao alvo não específico dessas moléculas, pouca visibilidade tem sido dada à possibilidade de tolerância fúngica induzida pela IFD (GALINARI et al., 2021), embora já existam relatos de resistência em células tumorais. A utilização da hipericina (hip) como FS tem apresentado resultados fungicidas frente a uma gama de gêneros fúngicos envolvidos em parasitismo de pele, mucosas, cabelo e unha, como *Trichophyton*, *Candida* (SAKITA et al., 2019), *Microsporum* (GALINARI et al., 2021) e *Fusarium*, respectivamente. Nesse contexto, o intuito deste trabalho foi reunir informações sobre a atividade antifúngica da IFD medida por hip, e avaliar a capacidade de indução de resistência em *C. albicans* ocasionada pela IFD com hip nanoencapsulada em partículas poliméricas de Pluronic® P123 (hip-P123).

Materiais e métodos

Para a revisão bibliográfica, foi realizada uma busca livre, em artigos, na base de dados PubMed, guiada pelos *Mesh terms*: *hypericin*, *photodynamic therapy*, *Hypericum perforatum*, *antimicrobial photodynamic therapy/aPDT*, *photodynamic inactivation*, *naphthodianthrones*, *antifungal activity*, *nanoencapsulation* e *drug delivery system*. Foram incluídos artigos publicados na língua inglesa desde 2010 até 2021. Para os ensaios de resistência, foi analisada *in vitro*, a capacidade de indução de resistência em *C. albicans* (ATCC 90028), após sucessivas exposições à IFD com hip-P123. Para tal, cinco ensaios sucessivos de IFD foram realizados de forma análoga à Microdiluição em Caldo (CLSI, 2008). A hip-P123 foi testada frente ao inóculo de *C. albicans* (1×10^6 UFC/mL) nas concentrações de 0,03125-16 μ mol/L, combinada com LED branco quente de fluência: 37,8 J.cm⁻² (650nm) (SAKITA et al., 2019). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada e uma redução $\geq 2 \log_{10}$ [UFC/mL] foi considerada fungistática (GIULIANI et al., 2010). As leveduras que sobreviveram na concentração subinibitória foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

Resultados e Discussão

Os estudos envolvidos na revisão bibliográfica permitiram delinear um potencial antifúngico promissor da hip na IFD. Esse composto é isolado naturalmente como metabólito secundário da herbácea *Hypericum perforatum*, em estruturas glandulares. Embora sua função ainda não esteja

completamente elucidada, acredita-se um papel na defesa contra patógenos e herbívoros. Caracterizada estruturalmente como uma naftodiantrona biologicamente ativa, esta molécula é amplamente explorada devido a gama de atividades terapêuticas atribuídas, como: antioxidante, anti-inflamatória e antidepressiva (SAKITA et al., 2019). Apesar da aplicabilidade antimicrobiana sinalizar uma atividade antifúngica, esta é atingida somente em concentrações elevadas. Os resultados fungicidas encontrados nos nove artigos selecionados para a revisão, singularizam a sua fototoxicidade em baixas concentrações na IFD contra diferentes fungos patogênicos humanos, tais como leveduras do gênero *Candida* spp., englobando as espécies *C. albicans*, *C. albicans* resistente à azóis, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (SAKITA et al., 2019). Do mesmo modo, sua eficácia foi relatada contra fungos dermatófitos (GALINARI et al., 2021) como *M. canis*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e fungos filamentosos não-dermatófitos pertencentes ao complexo de espécies *F. oxysporum* e *F. solani*.

As características da hip envolvidas na sua propriedade fotossensibilizadora abrangem a excitação em luz visível (500 e 620 nm), reatividade molecular, devido a aromaticidade, e consequente densidade eletrônica. Os grupos hidroxila na periferia da molécula conferem certa hidrofiliabilidade, porém, as interações intermoleculares entre os anéis policíclicos prevalecem, resultando em insolubilidade (GALINARI et al., 2021). Adicionalmente, a presença de múltiplos ciclos, sua grande estrutura química também contribui para a sua apolaridade, resultando em auto-agregação em meio aquoso, decorrente das ligações de hidrogênio entre o grupo carbonila de uma molécula de hip com o grupo fenol de outra hip adjacente, configurando as homoassociações (SAKITA et al., 2019). Em uma perspectiva, a hidrofobicidade da hip é importante para a interação do composto com as macromoléculas presentes nas membranas celulares dos eucariotos, assim como em diferentes organelas, intensificando a foto-destruição causada por diferentes mecanismos de morte celular. Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade da hip na forma monomérica, sem prejudicar suas propriedades fotodinâmicas e fototóxicas, destaca-se as matrizes poliméricas anfifílicas de plurônicos (P123), as quais aumentam o potencial fototóxico da hip devido às características biofísicas desses nanomateriais em meio aquoso. Dentre as vantagens proporcionadas por esse material, distingue-se o tamanho ideal dessas partículas (20 nm), que contribui no aumento da permeabilidade e retenção da formulação no alvo terapêutico.

Um parâmetro significativo envolvido na capacidade da hip de atuar como um potente FS é a geração de $^1\text{O}_2$, a qual é dependente da fonte luminosa e do meio empregado. A maior eficiência de geração de oxigênio singlete pela hip, utilizando LED branco quente e âmbar é solvente dependente. Esta dinâmica de combinação corrobora com as metodologias aplicadas nos estudos de atividade antifúngica analisados na revisão. É necessário destacar que o amplo espectro do LED branco permite a sua utilização em distintas soluções, visto que este acaba cobrindo as alterações no espectro

de absorção da hip ocasionados pela mudança de meio (GALINARI et al., 2021).

Um trabalho analisado na revisão permitiu identificar que a citolocalização da hip em *Candida* não atinge o núcleo celular. Logo, sugere-se uma reduzida probabilidade do $^1\text{O}_2$ desencadear mutagenicidade ou resistência fúngica. Nesse sentido, o presente estudo também avaliou o perfil de susceptibilidade de *C. albicans* expostas sucessivamente à IFD com hip-P123 e não identificou a perda de sensibilidade ao método, como já relatada para a IFD com ftalocianina de Zn (II) (GIULIANI et al., 2010). Logo na segunda exposição, as leveduras apresentaram um aumento de sensibilidade, apresentando MIC de 0,25µmol/L. Após cinco testes, a levedura permaneceu inibida pela concentração 1µmol/L, compatível com o perfil encontrado para as leveduras expostas pela primeira vez ao método. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a carga fúngica presentes nessa concentração na 1ª e 5ª exposição.

Conclusões

Os trabalhos analisados na revisão confirmam a potencialidade da hipericina na IFD com a extensão para modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, estruturando um conhecimento pré-clínico com esse FS frente ao tratamento de uma gama de micoses cutâneas. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado, por meio de várias pesquisas, a promissora utilização da hip nanocarreada em P123 como um potente FS no contexto das infecções fúngicas. Adicionalmente, ao mimetizar experimentalmente uma condição de resistência fúngica à IFD com hip-P123, não foi possível identificar a emergência desse fenômeno, reforçando a eficácia desta alternativa frente à problemática enfrentada pelas terapias antifúngicas clássicas.

Agradecimentos

Agradecemos aos integrantes do Laboratório de Micologia Médica/ UEM, pelo apoio na realização do projeto, ao CNPq, agência de fomento do trabalho e ao Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF).

Referências

GALINARI, C. B.; CONRADO, P. C. V.; ARITA, G. S.; MOSCA, V. A. B. et al. Nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy for the treatment of dermatophytosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, 215, p. 112103, Feb 2021.

GIULIANI, F.; MARTINELLI, M.; COCCHI, A.; ARBIA, D. et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, n. 2, p. 637-642, Feb 2010.

SAKITA, K. M.; CONRADO, P. C.; FARIA, D. R.; ARITA, G. S. et al. Copolymeric micelles as efficient inert nanocarrier for hypericin in the photodynamic inactivation of. **Future Microbiology**, 14, p. 519-531, 04 2019.