

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA EM *Candida albicans* APÓS SUCESSIVAS EXPOSIÇÕES À INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA.

Tiago de Paula Bianchi (PIBIC/CNPq/UEM), Camila Barros Galinari (Pós-Graduação), Ana Carolina Vieira de Oliveira (Pós-Graduação), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientador), Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador)
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, tolerância

Resumo:

A Inativação Fotodinâmica (IF) é uma alternativa estudada para o tratamento de várias doenças que possuem crescente falha terapêutica devido a resistência as drogas disponíveis, como é o caso das dermatomicoses por *Candida albicans*. Na IF, a combinação de uma fonte luminosa e uma molécula fotoativa, como é o caso da hipericina, ocasiona inativação fúngica pelas espécies reativas de oxigênio (ERO's) geradas pelo método. A aplicação dessa tecnologia na pele possibilita que os microrganismos venham a ser expostos a doses subletais de fototratamento, devido a baixa solubilidade das drogas nesse tecido, desencadeando a emergência de tolerância. A ação inespecífica das (ERO's) diminui essa possibilidade, entretanto é necessário analisar esse aspecto nas novas alternativas terapêuticas. O presente trabalho identificou experimentalmente a ausência de tolerância fúngica após cinco sessões de IF com uma concentração subinibitória (0,5µmol/L) de hipericina nanoencapsulada em Pluronic®123.

Introdução

A dinâmica das dermatomicoses determinam quadros clínicos recorrentes e de difícil tratamento devido ao restrito arsenal de antifúngicos disponíveis. Em um cenário em que as drogas de primeira linha utilizadas para tratar essas micoses foram ineficientes em cepas resistentes, novas opções terapêuticas se tornaram urgentes na prática (CHAVES et al., 2021). É nesse contexto que as tecnologias envolvendo a fotodinâmica voltaram a tomar espaço na microbiologia, cujas principais vantagens são a aplicação tópica e versatilidade de mecanismo de ação (GALINARI et al., 2022). A inativação fúngica por essa metodologia ocorre devido a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e radicais livres que resultam na oxidação de lipídios de membrana e danos a proteínas e ácidos nucleicos. Essas reações ocorrem por meio da aplicação de um composto fotossensibilizante (FS), como a hipericina, capaz de ser fotoativado pela luz visível em comprimento de onda

apropriado. A aplicação dessa tecnologia em ambientes heterogêneos, no local de infecção, possibilita que os microrganismos venham a ser expostos a doses subletais de fototratamento. Portanto, é questionável se os danos são suficientes para causar a morte microbiana em todas as células fototratadas e se as células restantes podem se recuperar e formar fenótipos mais tolerantes (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019). Apesar de por muito tempo os estudos afirmarem a ausência de resistência em bactérias e fungos expostos sucessivamente a inativação fotodinâmica, a comprovação da emergência de fenótipos bacterianos tolerantes após fototratamentos subletais reabriu a discussão sobre esse tema (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019), motivando estudos sobre essa problemática nos diferentes campos de aplicação da inativação fotodinâmica. Nosso grupo de pesquisa vem acompanhando esses estudos e identificamos, em estudos pilotos (dados não publicados), a ausência de resistência fúngica em leveduras após exposições sucessivas de inativação fotodinâmica com hipericina nanoencapsulada em Pluronic® 123 (hip-P123). Este estudo visa conhecer a emergência de tolerância em células de *C. albicans* fototratadas consecutivamente com hip-P123 em condições subletais.

Materiais e Métodos

Para testar a tolerância das leveduras, primeiramente foi necessário identificar a concentração subinibitória mínima (Sub-MIC) de hip-P123 capaz de reduzir entre 1-2log₁₀ (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019). Para tal, foi realizado um teste de susceptibilidade antifúngica, análogo a microdiluição em caldo utilizando um inóculo de 1x10⁶ UFC/ml de *C. albicans* (ATCC 90028) e hip-P123 nas concentrações de 0,125-8µmol/L. O sistema contendo esses componentes foi incubado por duas horas à 35°C e posteriormente irradiado com LED branco quente de fluência 37,8 J.cm⁻² (650nm) (GALINARI et al., 2022). Após o término da irradiação, uma alíquota de cada concentração foi semeada em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) para a análise da viabilidade celular. Os controles utilizados foram: leveduras expostas a luz, porém na ausência de hip-P123 (Controle Claro; CC); e leveduras na ausência concomitante de luz e fotossensibilizador (Controle Fúngico; CF). Foram realizados três testes independentes, cada um conduzido em duplicata. Posteriormente, foi analisada a tolerância por meio de cinco ensaios sucessivos do teste de susceptibilidade em condições subletais, denotado pelo tratamento do fungo com a Sub-MIC determinada anteriormente. Após o processo de irradiação descrito, uma alíquota das leveduras tratadas foi semeada em SDA para a análise da viabilidade celular e o restante foi centrifugado a 10.000 rpm por cinco minutos. Depois desse processo, o sedimento foi ressuspensionado em *Sabouraud Dextrose Broth* e incubado por 20 horas a 35°C. Transcorrido esse período, o caldo foi centrifugado e as leveduras remanescentes foram utilizadas como material fúngico para a realização do inóculo para o ensaio subsequente. O controle utilizado neste experimento foi o CC. Em casos pontuais de perda de sensibilidade ao método foi realizado um teste de susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual consistia na inoculação das leveduras em Extrato de levedura *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YPD) contendo 3mmol/L de H₂O₂. Os resultados foram analisados estatisticamente por

meio do software *Prism* 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) com o *t-test* não pareado. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A fotoinativação associada à hip-P123 já foi relatada na literatura com uma gama de patógenos, singularizando uma atividade fungicida, mesmo em baixas concentrações do fotossensibilizador (GALINARI et al., 2022). Os resultados coletados com o teste de susceptibilidade permitiram constatar essa dinâmica com as concentrações 1-8 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 1-A). Foi possível identificar ausência de atividade da fonte luminosa isoladamente (CC) sobre as leveduras de *C. albicans*, visto que a diferença entre a carga fúngica presente no controle fúngico e no controle claro não foi significativa com $p > 0,05$ ($p = 0,7050$). Dessa forma, foi possível estabelecer a concentração 1 $\mu\text{mol/L}$ como inibitória, apresentando redução maior que $3 \log_{10}$, enquanto o parâmetro de redução para Sub-MIC convergiu para a concentração 0,5 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 1-A). Com esse parâmetro determinado, permite-se estudar a possibilidade de indução de tolerância em *C. albicans* em condições subletais de fototratamento. Um microrganismo tolerante denota uma susceptibilidade reduzida a uma molécula antimicrobiana caracterizada por uma concentração inibitória mínima elevada (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019). Ao submeter o alvo a uma concentração subinibitória, pode-se induzir uma alteração adaptativa em resposta a esse estímulo subletal, fazendo com que um fenótipo tolerante se estabeleça. Ao propor um tratamento para dermatomicose com a IF, é necessário considerar as características da pele em relação à distribuição homogênea de um fármaco de aplicação tópica nesse tecido (GALINARI et al., 2022). Apesar da IF promover uma terapia localizada, conjectura-se a possibilidade de o FS atingir o fungo em concentrações subinibitórias, estimulando dessa forma a emergência de células tolerantes. A elucidação desse fenômeno será de grande valia para os estudos com hip-P123, tendo em vista os resultados antifúngicos promissores em vários patógenos. Os achados deste estudo sugerem ausência de um fenótipo tolerante nas células de *C. albicans* tratadas sucessivamente (Figura 1-B). Isso foi constatado pela constância na fotoinativação com redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao CC entre as exposições. No terceiro tratamento não houve redução da viabilidade celular, configurando uma possível perda de sensibilidade ao método (Figura 1-B). Um aspecto envolvido na tolerância à IF é a capacidade de mutagênese atribuída às ERO's e consequente perda de sensibilidade a essas moléculas (RAPACKA-ZDONCZYK et al., 2019). Entretanto, as leveduras recuperadas na terceira exposição se apresentaram sensíveis quando semeadas no meio YPD com H_2O_2 , a qual é uma das ERO's gerada durante a fotoinativação (Figura 1-C). Os estudos do mecanismo de ação da IF com hipericina destacaram a sua citolocalização em organelas intracelulares e ausência no núcleo celular. Logo, o reduzido contato das ERO's com o genoma diminui a probabilidade de mutagenicidade e consequente emergência de tolerância fúngica à fotoinativação com hipericina, corroborando com os resultados desse trabalho.

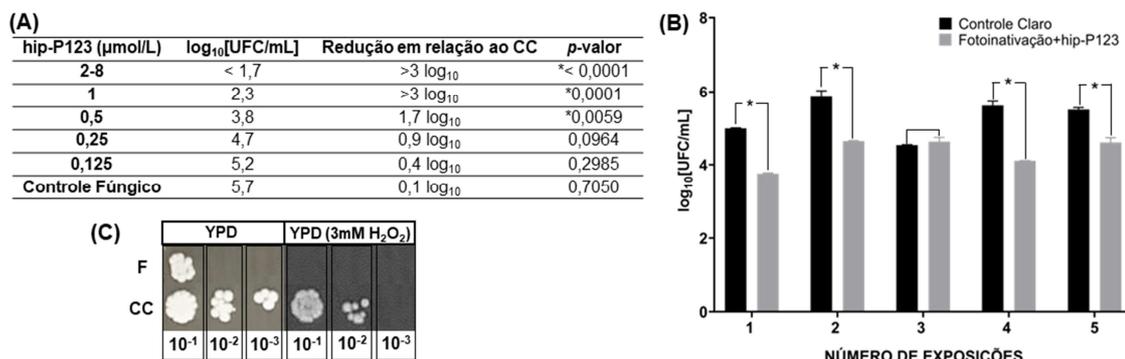


Figura 1: Estudo da tolerância à IF com hip-P123 em *C. albicans*. (A) Perfil de susceptibilidade *in vitro* à fotoativação com hip-P123. (B) Impacto das exposições sucessivas a IF com hip-P123 (0,5µmol/L) sobre o crescimento das leveduras. (C) Sensibilidade ao H₂O₂ das leveduras tratadas na terceira exposição. (CC) Controle Claro. (F) Fotoativação com hip-P123. (*) Redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao CC.

Conclusões

Discutir a possibilidade de tolerância fúngica no âmbito da IF ainda é muito difícil, visto a escassez de estudos explorando essa possibilidade e a diversidade de fotossensibilizadores testados. Ao mimetizar *in vitro* esse contexto com a hip-P123 detectou-se a ausência desse fenômeno, reforçando a eficácia desta alternativa frente à problemática enfrentada pelos antifúngicos tradicionais.

Agradecimentos

Agradecemos ao grupo de pesquisa em tecnologias aplicadas às infecções fúngicas (mico.tec), pelo apoio na realização do projeto, ao CNPq, e ao Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF).

Referências

- CHAVES, A. F. A.; XANDER, P.; ROMERA, L. M. D.; FONSECA, F. L. A. et al. What is the elephant in the room when considering new therapies for fungal diseases? **Critical Reviews in Microbiology**, 47, n. 3, p. 275-289, May 2021.
- GALINARI, C. B.; BIANCHI, T. P.; GONÇALVES, R. S.; CESAR, G. B. et al. Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-19, Feb 16 2022.
- RAPACKA-ZDONCZYK, A.; WOZNIAK, A.; PIERANSKI, M.; WOZIWODZKA, A. et al. Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 9423, 07 01 2019.