PERFIL DE TOLERÂNCIA DE *Candida albicans* AO ESTRESSE OXIDATIVO OCASIONADO POR EXPOSIÇÕES SUCESSIVAS À INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM HIPERICINA.

Camila Dutra de Castro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Tiago de Paula Bianchi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Glaucia Sayuri Arita (PBF/DAB/UEM), Renato Sonchini Gonçalves (DQI/UFMA), (Wilker Caetano (DQI/UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientador) Terezinha Estivalet Svidzinski (Orientador). E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Microbiologia; Microbiologia Aplicada/ Microbiologia Médica.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; sensibilidade; peróxido de hidrogênio

RESUMO

A terapia fotodinâmica pode ser utilizada como uma importante alternativa para o tratamento de doenças infecciosas, dentre elas as infecções fúngicas. A técnica apresenta como ponto chave a inativação fotodinâmica (IFD), por meio de uma fonte de luz, fotossensibilizador e oxigênio. Esse conjunto pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), lesivas para as células. Apesar da técnica possuir baixas chances de resistência, é necessário o conhecimento dessa possibilidade, visto a utilização de exposições sucessivas para erradicação de um determinado patógeno. Portanto, o presente trabalho avaliou o perfil de tolerância ou resistência de *Candida albicans* após exposições sucessivas a IFD+hip-P123 (hipericina nanoencapsulada com P123), analisando em conjunto a sensibilidade das células tratadas ao peróxido de hidrogênio. A dinâmica ao longo das exposições não determinou um padrão contínuo de inibição fúngica, evidenciando uma pequena oscilação entre o perfil de sensibilidade. No sétimo tratamento ocorreu um aumento da concentração inibitória mínima para 2µM de hip-P123 (primeira exposição foi de 1µM de hip-P123). Mas não foi um perfil persistente, indicando ausência de tolerância. Na 15º exposição, as leveduras apresentaram um perfil mais sensível do que as outras exposições, com CIM de 0.5µM de hip-P123. Além disso, essas leveduras ficaram mais sensíveis à um ambiente estressor na presença de peróxido de hidrogênio, indicando que a IFD alterou outras características de susceptibilidade das células fúngicas. Dessa forma, os tratamentos sucessivos utilizando IFD+hip-P123 não induziu tolerância ou resistência em *C. albicans*, e as células ficaram mais sensíveis à ERO.

INTRODUÇÃO

A inativação fotodinâmica (IFD) envolve um processo fotoquímico onde ocorre a excitação de uma molécula fotoativa, denominada fotossensibilizador (FS), no qual apresenta uma fonte luminosa de comprimento de onda respectivo a faixa de

absorção do composto (Cieplik *et al.* 2018). A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), causa danos em determinadas estruturas celulares de patógenos. Entre os FS, a hipericina vem se destacando com importante atividade antifúngica (Galinari *et al*. 2022). Apesar de a interação das ERO_S geradas na IFD com uma ampla gama de alvos intracelulares minimizar as chances de resistência, a necessidade de repetidas aplicações para erradicar um determinado patógeno vai de encontro com essa questão (Rapacka-Zdonczyk *et al.* 2021). É necessário conhecer outros aspectos além da atividade antifúngica da IFD, considerando a importância da avaliação do risco de desenvolvimento de tolerância ou resistência durante o tratamento. Dessa forma, o presente estudo analisou a tolerância ou resistência de *Candida albicans* após sucessivas exposições a IFD com hipericina nanoencapsulada em *Pluronic*® P123 (hip-P123), além de analisar estrategicamente a sensibilidade da levedura ao peróxido de hidrogênio após o tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo
Foi utilizado uma cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 90028, armazenada pelo Laboratório de Micologia Médica, UEM, a -80 °C.

Fotossensibilizador e Fonte Luminosa
A hipericina foi sintetizada pelo Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) da UEM.

Teste de suscetibilidade in vitro da hip-P123 com IFD
Foi preparado uma suspensão de leveduras *Candida albicans* cultivadas em salina (85%), utilizando a concentração de $1X10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC)/ml nos ensaios. A hip-P123 (8 a 0.125 µmol/L) foi adicionada a uma placa de poliestireno de 96 poços juntamente com o inóculo padronizado, incubada no escuro por duas horas e posteriormente iluminada com fluência de 37.8 J/cm^2 por 20 minutos. Foram incluídos dois controles fúngicos, ou seja, na presença (CFI) e ausência de luz (CF). Após esse processo uma alíquota de 20 µl de cada concentração de hip-P123 e dos dois controles foram semeadas em SDA, onde após 24 horas foi avaliada a atividade antifúngica por meio da contagem das UFC. Para a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada aquela com uma redução ≥ 2 $\log_{10}$ UFC/mL. Foram realizados dois testes independentes, sendo conduzidos em duplicata.

Indução da tolerância/ resistência in vitro de C. albicans à IFD com hip-P123
Após o teste de susceptibilidade, as colônias presentes em uma alíquota da concentração subinibitória (SUB-CIM) apresentando uma redução de 1-2 $\log_{10}$ UFC/mL foram aplicadas ao inóculo para compor o próximo teste, processo realizado quinze vezes em intervalos de 36 horas.

Indução do perfil de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As suspensões das leveduras testadas foram preparadas em PBS após 24 horas de tratamento (1 x 10^6 UFC/mL), diluídas em série e semeadas em *Yeast Extract Peptone Dextrose Ágar* (YPD) contendo 2 mmol/L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas juntamente com uma placa controle de YPD sem H_2O_2 e o resultado obtido semi-quantitativamente, frente ao crescimento nas diluições. A sensibilidade ao H_2O_2 foi testada na 1ª, 5ª, 10ª e 15ª exposição a IFD com hip-P123 e pontualmente no 7° e 8° tratamento.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística pelo programa *GraphPad Prism* 8.0®, de acordo com o *one-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Tukey*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dinâmica ao longo das exposições não determinou um padrão contínuo de inibição, evidenciando uma oscilação entre o aumento e perda de sensibilidade. A atividade antifúngica da 1ª a 4ª exposição a IFD com hip-P123 obteve uma CIM de 1 µmol/L (figura 1-A). As leveduras apresentaram uma maior sensibilidade no 5° teste, visto que a CIM foi reduzida para 0.5 µmol/L. A 7ª exposição obteve um aumento da CIM para 2 µmol/L, indicando um possível fenômeno de persistência fúngica, onde as células persistentes apresentaram baixa ou inexistente taxa de replicação em resposta ao microambiente hostil. Como demonstrado por Rapacka-Zdonczyk *et al*. 2021, esse fenótipo é transitório e pode desaparecer nas exposições seguintes. Neste trabalho observamos que a CIM reduziu para 0.5 µmol/L ao final do 10° tratamento, parâmetro esse mantido até o último tratamento (figura 1-B). Sendo assim, é possível descartar que houve resistência, pois a aplicação de parâmetros mais extremos de fotoinativação, ou seja, de maior concentração de hip-P123, promoveu a erradicação completa da população fúngica (Rapacka-Zdonczyk *et al*. 2019). O teste de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio foi testado durante as exposições em momentos estratégicos com o intuito de determinar um mecanismo envolvido na tolerância. Não foi identificada resistência das leveduras ao H_2O_2, incluindo as recuperadas que apresentaram aumento da CIM. O fungo utilizado na 1ª e 5ª exposição demonstrou ser sensível ao H_2O_2 devido a inibição do crescimento a partir da 10^5 na ordem de 50%, evoluindo para inibição total em 10^3 em comparação ao controle. Após sete e oito tratamentos, as leveduras passaram a ser mais sensíveis ao H_2O_2 apresentando inibição superior a 90% na ordem de 10^5, atingindo ausência de crescimento em 10^4. Na 15ª exposição uma inibição de 70% pode ser identificada em 10^5 e uma redução total das colônias em 10^4, igualmente ao 7° e 8° tratamento, evidenciando uma alta sensibilidade ao composto oxidante.

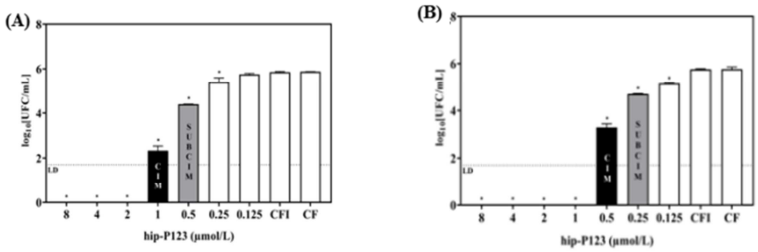

Figura 1 – Resultados representativos das exposições de *Candida albicans* à Inativação Fotodinâmica associada a hipericina nanoencapsulada com P123. A) Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) na 1ª exposição e B) 15ª exposição. *p<0.05.

CONCLUSÕES

Após quinze exposições da IFD + hip-P123 foi possível concluir que este tratamento não induziu tolerância ou resistência em *Candida albicans*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária pela a atribuição da bolsa e ao Laboratório de Micologia Médica/UEM pelo o apoio durante todo o processo.

REFERÊNCIAS

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; Al-AHMAD A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit Rev Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 571-589, sep 2018. DOI: 10.1080/1040841X.2018.1467876 Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2018.1467876. Acesso em: 8 ago. 2023.

GALINARI, C. B.; BIANCHI, T. P.; GONÇALVES, R. S.; CESAR, G. B.; BERGMANN, E. V.; MALACARNE, L. C.; KIOSHIMA COTICA, É.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application. **Crit Rev Microbiol,** v. 49, n. 1, p. 38-56, feb, 2022. DOI: 10.1080/1040841X.2022.2036100. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040841X.2022.2036100. Acesso em: 15 ago. 2023.

RAPACKA-ZDONCZYK, A.; WOZNIAK, A.; NAKONIECZNA, J.; GRINHOLC, M. Development of Antimicrobial Phototreatment Tolerance: Why the Methodology Matters. **Int J Mol Sci,** v. 22, n. 4, feb, 2021. DOI: 10.3390/ijms22042224. DOI: Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7926562/. Acesso em: 15 ago. 2023.

RAPACKA-ZDONCZYK, A.; WOZNIAK, A.; PIERANSKI, M.; WOZIWODZKA, A.; BIELAWSKI, K. P.; GRINHOLC, M. Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment. **Sci Rep,** jul, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45962-x. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6603016/. Acesso em: 16 ago. 2023.