

ALTERAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *C. albicans* RESISTENTE AO FLUCONAZOL APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

G. L. Santos*, G. Santucci*, T. Oliveira-Silva**, R. A. Prates**, M. S. Ribeiro*** e I. T. Kato*

* Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil

** Programa de Pós-Graduação em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho-UNINOVE, São Paulo, Brasil

***Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil
e-mail: ilka.kato@ufabc.edu.br

Introdução: As doenças infecciosas causadas por fungos ainda representam um grande desafio para os profissionais de saúde e a comunidade científica, especialmente as infecções causadas por micro-organismos resistentes aos fármacos antifúngicos convencionais. Novas alternativas de tratamento foram estudadas, entre elas a terapia fotodinâmica (PDT) que surgiu como uma promissora modalidade terapêutica por causar a morte de micro-organismos a partir da associação de um fotossensibilizador e luz. Recentemente observamos que a PDT realizada em condições subletais aumenta a suscetibilidade do fungo *Candida albicans* ao fluconazol [1]. Dando continuidade a este estudo iniciamos a investigação em *C. albicans* que apresentam diferentes mecanismos de resistência aos antifúngicos. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano da associação de PDT e fluconazol em *C. albicans* que apresenta um sistema de efluxo responsável pela resistência ao antifúngico.

Materiais e Métodos: Para a realização deste trabalho foi utilizado *C. albicans* YEM 13, uma cepa com expressão exacerbada de bomba de efluxo da família MFS (*Major Facilitator Superfamily*). As células foram submetidas a PDT com azul de metileno na concentração final de 50 μM e irradiadas com parâmetros subletais ($\lambda=660\text{ nm}$, 75 mW/cm^2 , 4 min)[1]. Para investigar a atividade antimicrobiana do fluconazol foram determinados os valores de concentração mínima inibitória (CMI) do crescimento celular. A CMI foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Europeu de Teste à Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST)[2]. A solução de fluconazol (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparada, considerando a potência do fármaco de 98% e a faixa de concentrações testadas foi de 0,125-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os valores de CMI foram determinados por meio da leitura da absorção em 530 nm, em espectrofotômetro (SpectraMax M4, Molecular Devices, EUA). Para cada grupo foi determinada a menor concentração da droga que promoveu a inibição $\geq 50\%$ do crescimento em comparação ao controle livre de drogas. Foram avaliadas células *C. albicans* YEM 13 sem tratamento e previamente submetidas a PDT subletal. Foi utilizado como controle a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 que não apresenta resistência ao fluconazol.

Resultados: *C. albicans* ATCC 90028 apresentou valor de CMI de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dado compatível com os descritos na literatura. As amostras de célula YEM 13 que não foram submetidas à PDT apresentaram o valor de CMI de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que também coincide com o valor descrito na literatura [3]. Estes dados demonstram que a cepa YEM 13 apresenta um valor de CMI 128 vezes superior ao de uma cepa suscetível ao fluconazol (ATCC 90028). Confirmando nossa hipótese, o fluconazol foi mais ativo em *C. albicans* submetida previamente à PDT subletal. Dentro da faixa de 0,125-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, houve maior inibição do crescimento celular quando previamente submetido à PDT, resultando na redução do valor de CMI de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusões: Foi possível demonstrar que a PDT pode aumentar a susceptibilidade ao fluconazol em cepa de *C. albicans* que apresentam bombas de efluxo da família MFS. Estes resultados preliminares sugerem que a associação terapêutica entre a PDT e o fluconazol pode ser uma importante alternativa no tratamento de infecções por cepas de *C. albicans* que apresentam resistência a este antifúngico. Vale ressaltar que neste trabalho foram utilizadas condições subletais e resultados ainda mais promissores podem ser obtidos com a otimização dos parâmetros de irradiação.

Referências: [1] Kato, I.T.; *et. al.* Antimicrobial Photodynamic Inactivation Inhibits *Candida albicans* Virulence Factors and Reduces In Vivo Pathogenicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013; 57:445-451. [2] RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; *et al.* EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infections*, 2008; 14:398 – 405. [3] Otzen, T.; *et al.* Folate-synthesizing enzyme system as target for development of inhibitors and inhibitor combinations against *Candida albicans*-synthesis and biological activity of new 2,4-diaminopyrimidines and 4'-substituted 4-aminodiphenyl sulfones. *J Med Chem*. 2004 Jan 1;47(1):240-53.

Palavras-chave: azul de metileno, bomba de efluxo, fotossensibilizador, antifúngico, resistência microbiana.

Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/13313-9).