

Título em Português: Investigação dos Efeitos da Inativação Fotodinâmica em Células Fúngicas Resistentes a Antifúngicos Utilizando Espectroscopia FTIR

Título em Inglês: investigation of the effects of photodynamic inactivation in antifungal-resistant fungal cells using ftir spectroscopy

Autor: Anna Luiza Franca de Oliveira Resende

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Kate Cristina Blanco

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biofísica de Processos e Sistemas

Agência Financiadora: Sem fomento



INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM CÉLULAS FÚNGICAS RESISTENTES A ANTIFÚNGICOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR

Anna Luiza França de Oliveira Resende

Gabriela Gomes Guimarães, Jennifer Machado Soares

Kate Cristina Blanco

Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos

annaluizaforesende@usp.br

Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é investigar as alterações fenotípicas em leveduras submetidas a inativação fotodinâmica (PDI), utilizando análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para compreender os mecanismos de resposta celular a este tratamento.

Mais especificamente, buscamos realizar a PDI utilizando parâmetros otimizados de irradiação e concentrações de fotossensibilizadores adequadas para tratar as células fúngicas resistentes, com o objetivo de induzir modificações bioquímicas detectáveis. Utilizar a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para determinar o perfil bioquímico basal de células de *Candida albicans* resistentes a antifúngicos. Buscamos identificar marcadores espectrais específicos de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Fazer análises das células de *Candida albicans* após a aplicação da PDI por meio da espectroscopia FTIR para detectar alterações nos componentes bioquímicos. Visando entender como a PDI altera a composição química das células resistentes. Comparar os espectros obtidos antes e após a aplicação da PDI para identificar padrões específicos de alteração e por fim realizar

ensaios de viabilidade celular para avaliar a eficácia da PDI em reduzir a resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos.

Métodos e Procedimentos

Cultivo de *C. albicans*: O microrganismo utilizado é uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028). A levedura é reativada em uma placa contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubada em estufa. O inóculo foi ajustado para 10^8 UFC/ml por meio da absorbância em 540 nm. Para os experimentos com as hifas, biofilmes foram formados.

Concentração Inibitória Mínima (MIC): Soluções de uso de Anfotericina B e Fluconazol foram preparadas. Os antifúngicos são distribuídos por meio de diluição sequencial em uma placa de 96 poços e posteriormente, o inóculo fúngico (tanto de leveduras quanto de hifas) e o meio de cultura líquido são adicionados aos poços. Foram realizados também o controle positivo de crescimento fúngico e o controle negativo do meio de cultura. A placa é levada para estufa e depois para o leitor de microplacas.

Inativação Fotodinâmica (PDI): A curcumina foi utilizada como fotossensibilizador. As colônias da levedura são suspensas em tampão fosfato salino (PBS) e ajustadas em 10^8 UFC/ml. As células de levedura e hifa são incubadas com fotossensibilizador por 20 minutos. Após o tempo de incubação realizou-se o grupo tratamento PDI (levedura + FS + luz) e esse grupo foi submetido à uma dose de luz de 15 J/cm^2 utilizando o dispositivo LED de 450 nm (Biotable®). As células foram centrifugadas e colocadas no MIC novamente.

Espectroscopia FTIR: Uma colônia fúngica será distribuída uniformemente sobre a superfície do cristal do equipamento. Devido à sensibilidade do equipamento, a colônia será deixada em repouso até a evaporação da maior parte da água. A amostra será escaneada 250 vezes utilizando o espectrômetro FTIR ATR, e o resultado será a média dessas medições para garantir a precisão dos dados. O espectro de FTIR será medido no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , cobrindo as bandas dos grupos funcionais de interesse específico. Os espectros resultantes serão submetidos à análise da segunda derivada, seguida de normalização pelo método mínimo-máximo e serão realizados dendrogramas, análise de componentes principais (PCA) e dinâmica molecular para interpretar os dados. Os dados coletados serão integrados a um banco de dados composto por informações de espectroscopia FTIR de microrganismos resistentes a antimicrobianos.

Resultados

Os resultados indicaram que *C. albicans* exibiu resistência à Anfotericina B. Podemos ver que a aplicação da PDI resultou em valores reduzidos de MIC, sugerindo uma maior suscetibilidade das células fúngicas à medicação antifúngica.

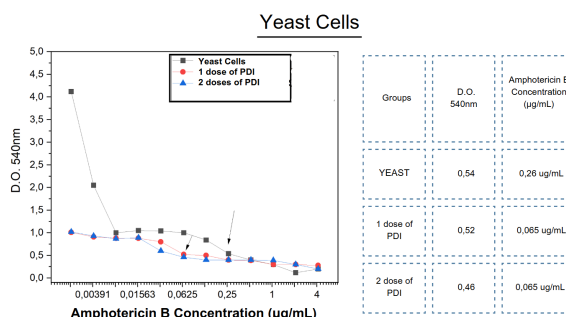


Figura 1: Valores do MIC utilizando Anfotericina B e levedura.

Conclusões

Este resultado indica que o pré-tratamento com PDI pode desempenhar um papel crucial na redução da resistência microbiana.

Próximos passos

Realizar MIC antes e depois da PDI com o antifúngico fluconazol para a levedura e hifa *Candida albicans*. Fazer espectroscopia FTIR nas células obtidas e analisar os resultados espectrais. Comparar os espectros obtidos antes e depois da aplicação de PDI em células resistentes para identificar padrões específicos de alteração. Correlacionar os resultados espectrais com as mudanças na viabilidade e resistência celular.

Agradecimentos

CePOF (Centro de Pesquisa de Óptica e Fotônica), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), IFSC - USP (Instituto de Física de São Carlos).

Referências

[1] Lamoth, F., et al., (2018). Changes in the epidemiological landscape of invasive



candidiasis. Journal of Antimicrobial
Chemotherapy, 73(suppl_1), i4-i13.

[2] Zhang, L., et al., (2017). FTIR spectroscopy
for protein analysis: From conventional
methods to new trends. Analytical and
Bioanalytical Chemistry, 409(23), 5501-5511

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION ON ANTIFUNGAL-RESISTANT FUNGAL CELLS USING FTIR SPECTROSCOPY

Anna Luiza França de Oliveira Resende

Gabriela Gomes Guimarães, Jennifer Machado Soares

Kate Cristina Blanco

University of São Paulo - Institute of Physics of São Carlos

annaluizaforesende@usp.br

Objectives

The main objective of this work is to investigate the phenotypic changes in yeasts submitted to photodynamic inactivation (PDI), using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, to understand the mechanisms of cellular response to this treatment.

More specifically, we seek to perform PDI using optimized irradiation parameters and concentrations of photosensitizers suitable for treating resistant fungal cells, with the aim of inducing detectable biochemical modifications. To use Fourier transform infrared spectroscopy to determine the baseline biochemical profile of antifungal-resistant *Candida albicans* cells. We sought to identify specific spectral markers of carbohydrates, lipids, proteins, and nucleic acids. Perform analyses of *Candida albicans* cells after PDI application by means of FTIR spectroscopy to detect changes in biochemical components. Aiming to understand how PDI alters the chemical composition of resistant cells. To compare the spectra obtained before and after the application of PDI to identify specific patterns of alteration and finally to perform cell viability assays to evaluate the efficacy of PDI in reducing the resistance of *Candida albicans* to antifungals.

Materials and Methods

Cultivation of *C. albicans*: The microorganism used is a strain of *Candida albicans* (ATCC 90028). The yeast is reactivated in a dish containing Sabouraud Dextrose Agar (SDA) culture medium and incubated in an incubator. The inoculum was adjusted to 10^8 CFU/ml by absorbance at 540 nm. For the hyphae experiments, biofilms were formed.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC): Amphotericin B and Fluconazole use solutions were prepared. Antifungals are distributed by sequential dilution in a 96-well plate and subsequently, fungal inoculum (both yeast and hyphae) and liquid culture medium are added to the wells. Positive control of fungal growth and negative control of culture medium were also performed. The plate is taken to the greenhouse and then to the microplate reader.

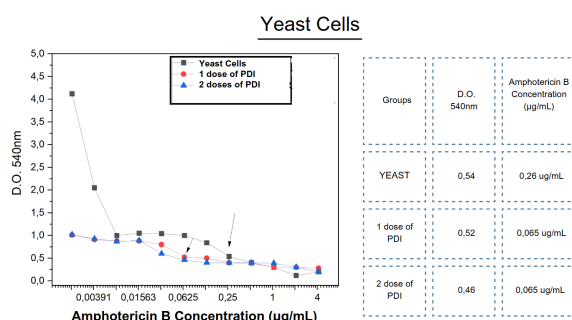
Photodynamic Inactivation (PDI): Curcumin was used as a photosensitizer. Yeast colonies are suspended in saline phosphate buffer (PBS) and adjusted at 10^8 CFU/ml. Yeast and hypha cells are incubated with a photosensitizer for 20 minutes. After the incubation time, the PDI treatment group (yeast

+ FS + light) was performed and this group was submitted to a light dose of 15 J/cm² using the 450 nm LED device (Biotable®). The cells were centrifuged and placed in the MIC again.

FTIR spectroscopy: A fungal colony will be evenly distributed over the surface of the equipment crystal. Due to the sensitivity of the equipment, the colony will be left to rest until most of the water evaporates. The sample will be scanned 250 times using the FTIR ATR spectrometer, and the result will be the average of these measurements to ensure the accuracy of the data. The FTIR spectrum will be measured in the range of 4000 to 500 cm⁻¹, covering the bands of the functional groups of specific interest. The resulting spectra will be subjected to second derivative analysis, followed by normalization by the minimum-maximum method and dendrograms, principal component analysis (PCA) and molecular dynamics will be performed to interpret the data. The data collected will be integrated into a database consisting of FTIR spectroscopy information from antimicrobial-resistant microorganisms.

Results

The results indicated that *C. albicans* exhibited resistance to Amphotericin B. We can see that the application of PDI resulted in reduced MIC values, suggesting a greater susceptibility of fungal cells to antifungal medication.



Picture 1: MIC values using Amphotericin B and yeast.

Conclusions

This result indicates that pretreatment with PDI may play a crucial role in reducing microbial resistance.

Next Steps

Perform MIC before and after PDI with the antifungal fluconazole for the yeast and hypha *Candida albicans*. Perform FTIR spectroscopy on the cells obtained and analyze the spectral results. Compare the spectra obtained before and after the application of PDI in resistant cells to identify specific patterns of alteration. To correlate the spectral results with changes in cell viability and resistance.

Acknowledgements

CePOF (Centro de Pesquisa de Óptica e Fotônica), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), IFSC - USP (Instituto de Física de São Carlos).

References

- [1] Lamoth, F., et al., (2018). Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(suppl_1), i4-i13.
- [2] Zhang, L., et al., (2017). FTIR spectroscopy for protein analysis: From conventional methods to new trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(23), 5501-5511