

POLIMIXINA B: UM FÁRMACO REPOSICIONADO COM ATIVIDADE ANTI- *Pythium insidiosum*

HENRIQUE ZARNOTT RAATZ¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²; AUGUSTO
DUARTE BROD³; SUZANE OLACHEA ALLEND⁴; DAIANE DRAWANZ
HARTWIG⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – henriqueraatz@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – adbrods@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – suzane_olachea@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático e agente etiológico da pitiose, uma importante enfermidade que acomete mamíferos, sendo relatada em diversos países de clima tropical, subtropical e temperado (GAASTRA et al., 2010).

No Brasil, a doença afeta principalmente equinos, sendo endêmica no Rio Grande do Sul, Pantanal mato-grossense e Nordeste (LEAL et al., 2001) e na Tailândia e Índia, é endêmica em humanos (YOLANDA & KRAJAEJUM, 2022). Além destas espécies, a pitiose também é documentada em outras espécies domésticas incluindo caninos, bovinos, felinos, caprinos, ovinos e aves e mamíferos selvagens (GAASTRA et al., 2010).

A pitiose merece destaque pela dificuldade de tratamento e letalidade nas espécies acometidas. Partes dos insucessos terapêuticos com fármacos antifúngicos é explicado pela ausência de ergosterol na membrana citoplasmática que os torna intrinsecamente resistentes à maioria dos antifúngicos convencionais (GAASTRA et al., 2010).

Adicionalmente, os resultados terapêuticos nem sempre satisfatórios empregando os protocolos tradicionais (cirurgia, imunoterapia e fármacos antifúngicos) têm impulsionado, nos últimos anos, o desenvolvimento de pesquisas que visam a busca de novos compostos no combate ao *P. insidiosum*. Assim, várias pesquisas têm avaliado a ação de princípios ativos diferentes, incluindo antifúngicos convencionais, fármacos antibacterianos (PEREIRA et al., 2007; WORASILCHAI et al., 2020; IANISKI et al., 2021); compostos naturais (VALENTE et al., 2016); bem como compostos nano-particulados (VALENTE et al., 2019; IANISKI et al., 2023).

Contudo, é imprescindível a continuidade de pesquisas que avaliem o potencial de novos fármacos, incluindo o reposicionamento de medicamentos conhecidos, o que constitui uma abordagem excelente e inovadora. Nesse sentido, destaca-se a polimixina B, um antimicrobiano polipeptídeo catiônico que possui ação contra bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (TAVARES, 2014). Interessantemente, a polimixina B possui atividade antifúngica, podendo também apresentar sinergismo com fármacos antifúngicos (FORTES et al., 2023; HSU et al., 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade *in vitro* anti - *P. insidiosum* da polimixina B e demonstrar as alterações morfológicas causadas pelo fármaco nas hifas do oomiceto.

2. METODOLOGIA

Nesta pesquisa, foram avaliados dez isolados de *P. insidiosum*, sendo sete isolados clínicos oriundos de equinos naturalmente infectados (SIGEN A139392),

duas cepas-padrão de origem equina (CBS 101555, CBS 575.85) e uma de origem humana (CBS 119453). Todos os isolados foram identificados molecularmente e pertencem a micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas/ Instituto de Biologia.

Os testes de microdiluição em caldo seguiram o protocolo M38-A2 do CLSI (2008) (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com adaptações. O inóculo para os testes de suscetibilidade *in vitro* consistiu de zoósporos de *P. insidiosum* (2 a 3 x 10³ zoósporos/mL) diluído 1:10 em caldo RPMI 1640, ajustado para pH 7,0. Os zoósporos foram obtidos por zoosporogênese, seguindo a metodologia previamente descrita por Pereira et al. (2007) e adaptações de Janiski et al. (2021).

O antimicrobiano polimixina B foi adquirido comercialmente (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA). A solução do antimicrobiano foi diluída em caldo RPMI glicosado e tamponado a pH 7,0, para obter concentrações que variavam de 125µg/mL a 0,24µg/mL. Alíquotas de 100µL de cada diluição foram dispensadas a cada poço das microplacas e adicionado igual volume do inóculo. Para cada teste foi utilizado um controle positivo (inóculo + RPMI) e negativo (fármaco + RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação/40rpm/48 horas. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi identificada como a concentração inibitória mínima (CIM). As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isto, um volume de 100 µL de cada diluição foi transferido para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37°C/48 horas. A menor concentração do fármaco que não evidenciou crescimento foi considerada a COM.

Uma análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para verificar as alterações morfológicas causadas pelo fármaco sobre as hifas do oomiceto. Seguindo a metodologia previamente descrita por Valente et al. (2019), hifas de *P. insidiosum* (CBS 101555) expostas a concentração sub-letal de polimixina B (3,91 µg/mL) e hifas controle (sem tratamento) foram submetidas à MEV. Estas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de suscetibilidade evidenciaram que a polimixina B foi capaz de inibir o crescimento micelial de *P. insidiosum* em concentrações inibitórias que variaram de 0,49 µg/mL a 31,25 µg/mL. Adicionalmente, constatou-se que 50% e 90% dos isolados avaliados (CIM₅₀ e CIM₉₀) foram inibidos em concentrações de 3,91 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente e uma média geométrica de 3,65 µg/mL. As CIM foram iguais as COM para todos os isolados testados. Estes resultados diferem dos relatados por Worasilchai et al. (2020) que encontraram CIM de polimixina B >32 µg/mL frente a 39 isolados tailandeses de *P. insidiosum* de origem humana e ambiental e 10 isolados não tailandeses oriundos de equinos. Acredita-se que as menores concentrações inibitórias mínimas encontradas no presente estudo podem ser decorrentes do pequeno número de isolados avaliados até o momento, bem como pela origem dos isolados de *P. insidiosum*.

Nas análises de MEV, observou-se que as hifas de *P. insidiosum* não tratadas com polimixina B (controle) estavam íntegras, com aspecto túrgido, superfície lisa e homogênea (Figura 1A). Por outro lado, as hifas tratadas com concentrações subletais do fármaco apresentavam descamações na superfície e cavitações ao

longo da parede celular, ocasionando a perda de continuidade da parede (Figura 1B), evidenciando a ação anti-*P.insidiosum* da polimixina B.

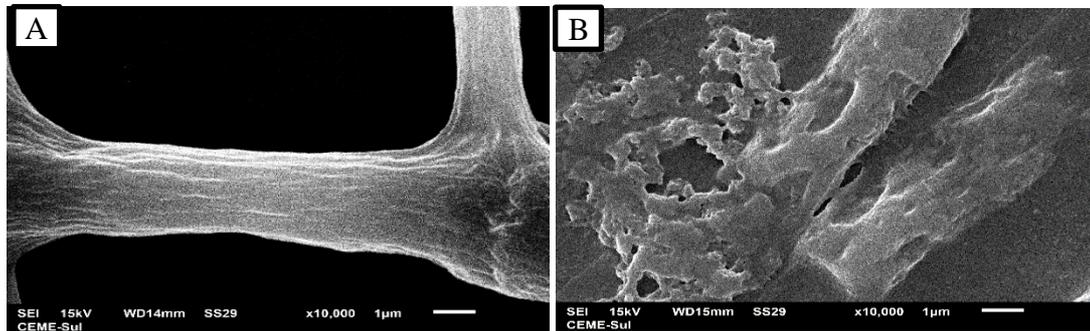


Figura 1. Ultraestrutura de *Pythium insidiosum* (CBS 101555) visualizada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A. Controle (sem tratamento): hifa com aspecto túrgido, superfície lisa e homogênea. B. hifa de *P. insidiosum* tratada com polimixina B (3,91 µg/mL). Visualiza-se uma hifa com cavitações, descamação e perda de continuidade da parede celular.

Previamente, Schwartz et al. (1972), demonstraram que a polimixina B foi capaz de inibir *Saccharomyces cerevisiae*, destruindo a sua membrana citoplasmática. No presente estudo, demonstrou-se na MEV, que a polimixina B causou lesões irreversíveis nas hifas de *P. insidiosum*, evidenciando atividade oomicida sobre este eucarioto.

O principal sítio de ação das polimixinas é a membrana celular da bactéria. A polimixina B também interage com o lipídeo A da membrana externa lipopolissacarídica (LPS) da parede celular, alterando a sua permeabilidade e causando a inibição da divisão celular, que culmina na lise da célula bacteriana (FALAGAS, et al., 2005). Assim, é possível que a ação antifúngica da polimixina B seja decorrente da ligação da molécula do fármaco aos lipídios aniônicos da membrana celular fúngica resultando na sua ruptura (ZHAI et al., 2010).

Atualmente, o reposicionamento de fármacos tem sido amplamente pesquisado e empregado em protocolos terapêuticos de doenças que afetam o homem e animais. Novos usos para medicamentos conhecidos constituem uma abordagem inovadora e excelente, uma vez que os perfis de segurança e farmacocinéticas foram previamente otimizados e questões relacionadas à manufatura e ao armazenamento validadas (RASTEGAR-MOJARAD et al., 2015). Assim, acredita-se que a polimixina B é um potencial fármaco reposicionado, podendo ser futuramente empregado no tratamento da pitiose.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que a polimixina B apresenta relevante atividade anti-*P. insidiosum*, evidenciando lesões irreversíveis sobre as hifas deste importante patógeno de mamíferos. Sendo assim, constitui-se num fármaco antibacteriano com potencial reposicionamento sobre *P. insidiosum*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FALAGAS M.E; et al. Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. **BMC Infectious Diseases**. v.5, n.1, 2005.

FORTES, B.N; SCHEUNEMANN, G; MELO, A.S.A; ISHIDA, K. Caspofungin alone or combined with polymyxin B are effective Against mixed biofilm of *Aspergillus fumigatus* and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Research in Microbiology**. v.174, 2023.

GAASTRA, W; et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.1–16, 2010.

HSU, L. H; et al. The antibiotic polymyxin B exhibits novel antifungal activity Against *Fusarium* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.49, p. 740–748, 2017.

IANISKI L.B; et al. Oomycidal activity of polypyrrole nanoparticles against *Pythium insidiosum*. **Letters in Applied Microbiology**. v.76, p.1–4, 2023.

IANISKI, L. B; et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 67–73, 2021.

LEAL, A.T; et al. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, p. 735-743, 2001.

PEREIRA, D. I. B; et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

RASTEGAR-MOJARAD, M; et al. Opportunities for drug repositioning from phenome-wide association studies. **Nature Biotechnology**, v.33, p.342–345, 2015.

SCHWARTZ, S. N; et al. Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 36-40, 1972. §

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico** – 3. ed. rev. e atual. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

VALENTE J.S.S; et al. *In vitro* anti- *Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2019.

VALENTE J.S.S; et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**, v.181, n.5-6, 2016.

WORASILCHAI, N; et al. *In Vitro* Susceptibility of Thai *Pythium insidiosum* Isolates to Antibacterial Agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 64: n. e02099-19, 2020

YOLANDA, H. & KRAJAEJUN T. Global Distribution and Clinical Features of Pythiosis in Humans and Animals. **Journal of Fungi**. v. 8, n.182, 2022.

ZHAI, B; et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 5, p. 931-938, 2010.