

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA MILTEFOSINA CONTRA *Sporothrix brasiliensis*: ESTUDO PRELIMINAR

JULIANA TASENDE FERRANDO¹; ANGELITA DOS REIS GOMES²; ISABELA DE SOUZA MORALES²; MARCELA BRANDÃO COSTA²; LIANDRA SCHERER SCHMEGEL²; RENATA OSORIO DE FARIA³

¹Universidade Federal de Pelotas – tasendejul@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – angelitagomes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – isabelasmorales99@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marcelabc@hotmail.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – liandreascherer@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – renataosoriovet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação que afeta o subcutâneo de mamíferos, especialmente os da espécie felina, canina e também, humanos, sendo considerada uma doença negligenciada de caráter endêmico no Brasil (GREMIÃO et al., 2020). No Brasil a principal espécie envolvida é *S. brasiliensis* (GREMIÃO et al., 2020).

O tratamento da esporotricose geralmente envolve o uso de antifúngicos convencionais, sendo o itraconazol o principal utilizado. Além dele, o iodeto de potássio, a terbinafina e a anfotericina B também são medicamentos disponíveis para tratamento, porém, apresentam sinais adversos mais severos que o itraconazol e seu uso não é indicado para todos os pacientes (OURO-FINO et al., 2017).

Além disso, as falhas terapêuticas, a dificuldade de administrar o tratamento e o aparecimento de isolados resistentes (WALLER et al., 2019), assim como a escassez de drogas antifúngicas disponíveis, e efeitos secundários graves (POESTER, V. et al, 2023) levantam preocupações sobre as carências do tratamento padrão (WALLER et al., 2019) demonstrando a necessidade do reposicionamento de fármacos para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas (POESTER, V. et al, 2023). Isso envolve a reutilização de medicamentos já aprovados para novas indicações terapêuticas, permitindo acelerar a disponibilidade de opções de tratamento com um perfil de segurança já bem estabelecido (MEHNDIRATTA et al., 2016; XUE et al., 2018).

A Miltefosina é um análogo de fosfolípídio originalmente desenvolvido para o tratamento de câncer de mama, e por apresentar ação anti-parasitária se estendeu para o tratamento de leishmaniose visceral (WIDMER et al., 2012; BORBA-SANTOS, L et al, 2015).

Sua ação ocorre principalmente na membrana celular. Embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente elucidado, estudos sugerem que sua interação com a membrana plasmática interfere na integridade celular e na sinalização intracelular, levando à morte do patógeno (JIMÉNEZ-LÓPEZZ et al., 2010).

No entanto, poucos estudos avaliaram sua eficácia contra espécies do complexo *Sporothrix* (BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014) Diante da necessidade de novas opções terapêuticas para esporotricose, este estudo preliminar visa avaliar a eficácia *in vitro* da miltefosina contra isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*.

METODOLOGIA

Foram testados seis isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* (três de origem felina, um canino e dois humanos) pertencentes ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Foi realizado teste de suscetibilidade utilizando a técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M38-A (CLSI, 2008), com adaptações para fungos dimórficos. Os isolados foram cultivados em meio Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 3 a 5 dias. Após o cultivo, as colônias foram suspensas em solução salina estéril e ajustadas para 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL), confirmada por espectrofotometria a 530 nm, 0,08-0,82 de transmitância e 0,09-0,11 de absorbância. As suspensões foram diluídas 1:50 em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As concentrações de miltefosina (Virbac, Carros, França) variaram de 0,125 a 64 µg/mL, e o itraconazol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi utilizado como controle positivo, com concentrações de 0,03 a 16 µg/mL. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C, e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada após 72 horas, definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visível do fungo.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação *in vitro* da suscetibilidade dos seis isolados de *Sporothrix brasiliensis* à Miltefosina demonstrou ter uma resposta significativa, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 2 µg/ml, com exceção de um isolado, o qual a CIM foi de 4 µg/ml, sugerindo atividade antifúngica consistente do fármaco contra *S. brasiliensis* em concentrações que são potencialmente viáveis para o tratamento.

Estudos anteriores mostram que a Miltefosina foi utilizada com sucesso contra outros patógenos fúngicos, como *Cryptococcus neoformans* e *Candida spp.* (WIDMER et al., 2006; DORLO et al., 2012). Jiménez-Lopes et al., (2010) sugere que o fármaco atua na membrana plasmática do fungo, causando disfunção na homeostase celular, o que pode explicar a sua eficácia contra o *Sporothrix brasiliensis*.

Borba-Santos e colaboradores (2015) também obtiveram valores de MIC relativamente baixos de miltefosina contra *Sporothrix brasiliensis*, apresentando resultados *in vitro* melhores que os fármacos de eleição. Ainda, a MFC (concentração fungicida mínima) também se mostrou superior ao itraconazol e Anfotericina B. Quando testada contra biofilme de *Sporothrix spp.* houve redução da atividade metabólica das células fúngicas, e dano e destruição dessas células (BRILHANTE et al., 2018).

No presente estudo a eficácia da Miltefosina foi comparável à do itraconazol, que apresentou CIMs variando entre 1 e 4 µg/mL. Esses resultados são encorajadores, já que o itraconazol tem sido amplamente utilizado como tratamento de primeira linha para a esporotricose, mas enfrenta limitações em termos de resistência e efeitos colaterais (CHAKRABARTI et al., 2015; GREMIÃO et al., 2021).

A variação observada nos valores de CIM entre os isolados de *S. brasiliensis* pode refletir a diversidade genética e fenotípica das cepas, o que é consistente com achados anteriores que documentam variabilidade na susceptibilidade antifúngica entre isolados de *Sporothrix* (RODRIGUES et al., 2016).

Estudos futuros poderiam explorar a combinação de miltefosina com outros antifúngicos, como o itraconazol, para melhorar os resultados terapêuticos e reduzir o risco de toxicidade ou resistência emergente (XUE et al., 2018; PUSHPAKOM et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo preliminar *in vitro* sugerem que a miltefosina tem potencial como agente antifúngico contra *Sporothrix brasiliensis*, com valores de CIM entre 2 e 4 µg/mL. No entanto, a variabilidade observada entre os isolados, aliada ao número reduzido de amostras (n=6), exige uma interpretação cuidadosa dos dados. A limitação do tamanho amostral ressalta a necessidade de estudos futuros com um número mais robusto de isolados, a fim de validar esses achados e investigar de forma mais abrangente os mecanismos de resistência envolvidos. Além disso, investigações *in vivo* e ensaios clínicos são cruciais para confirmar a viabilidade clínica da miltefosina no manejo da esporotricose

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORBA-SANTOS, L.P.; GAGINI, T.; ISHIDA, K.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S.; **Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to anphotericin B or Itraconazole.** Journal of Medical Microbiology, 2015.
- BRILHANTE RSN, MALAQUIAS, ADM., CAETANO, EP.; **In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. capsulatum and *Sporothrix spp*;** International Society for Human and Animal Micology, 2014.
- Clinical and Laboratory Standard Institute; **Reference Method for Both Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - Second Edition;** M38-A2, vol 28 No.16; 2008
- CHAKRABARTI, A., BONIFAZ, A., GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., MOCHIZUKI, T., & LI, S. (2015). **Global epidemiology of sporotrichosis.** Medical Mycology, 53(1), 3-14. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu062>
- DORLO, T.P.C., BALASEGARAM, M., BEIJNEN, J.H., & de VRIES, P.J. (2012). **Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(11), 2576-2597 <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>
- GREMIÃO, F.D.I., SILVA DA ROCHA, E.M., MONTENEGRO, H., et al; **Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision;** Veterinary Micologist - Review; Sociedade Brasileira de Microbiologia - SBM; 2020

GREMIÃO, F.D.I., EVANGELISTA OLIVEIRA, M.M., MONTEIRO DE MIRANDA, L.H., et al; **Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil**; Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil; 2020

GREMIÃO, F.D.I., OLIVEIRA, M.M.E., MONTEIRO DE MIRANDA, L.H., SARAIVA FREITAS, D.F., PEREIRA, S.A. (2021). **Zoonotic epidemic of sporotrichosis: Cat to human transmission**. PLoS Pathogens, 17(1), e1009237. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009237>

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.M. et al., **Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids**; Lipids in Health and Disease: Review. 2010

MEHNDIRATTA, M.M., WADHAI A.S., TYAGI KISHOR, B., GULATI SINGH, N., SINHA, M., **Drug Repositioning**, International Journal of Epilepsy, 2016.

OROFINO-COSTA, R.O; RODRIGUES, A.M, et al., **Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics**; Continuing Medical Education. (2017);92(5):606-20.

PUSHPAKOM, S., LORIO, F., EYERS et al., (2019). **Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations**. Nature Reviews Drug Discovery, 18(1), 41-58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>

POESTER VR, MUNHOZ LS, STEVENS DA, et al. **Nikkomycin Z for the treatment of experimental sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis***. Mycoses. 2023; 66: 898-905. doi:[10.1111/myc.13629](https://doi.org/10.1111/myc.13629)

RODRIGUES, A.M., de HOOG, G.S., & CAMARGO, Z.P. (2016). **Molecular identification of pathogenic species of the *Sporothrix complex***. Future Microbiology, 11(1), 585-600. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.8>

WIDMER, F., WRIGHT, L. C.; OBANDO, D.; HANDKE, R.; GANENDREN, R.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. **Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006.

WALLER, S.B; **Uso promissor do óleo essencial de Rosmarinus officinalis L. e Origanum majorana L. na esporotricose cutânea experimental por *Sporothrix brasiliensis* resistente ao itraconazol, e susceptibilidade de isolados aos óleos vegetais**; Universidade Federal de Pelotas, 2019.

XUE, H., LI, J., XIE, H., WANG, Y.; **Review of Drug Repositioning Approaches and Resources**; International Journal of Biological Sciences; School of Computer Science and Technology, Harbin Institute of Technology, 150001, Harbin, China, 2018.