

EVIDÊNCIAS *in vitro* DA ATIVIDADE DA NICLOSAMIDA FRENTE A *Pythium insidiosum*

CASSIANE BORGES DE SOUZA¹, CAROLINE QUINTANA BRAGA², JÉFERSON LUIZ SILVA DE SOUZA³, AUGUSTO DUARTE BROD⁴, SÔNIA BOTTON⁵
DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – casborges96@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jefersonluizsds@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – adbrods@gmail.com

⁵Universidade Federal de Santa Maria – sabott20@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O reposicionamento de fármacos visa novas aplicações para compostos já existentes e um exemplo é o fármaco duloxetine desenvolvida para tratamento de depressão e posteriormente reposicionado para tratamento de incontinência urinária. Desta forma, constata-se um exponencial crescimento de pesquisas com reposicionamento nos últimos anos (JOURDAN *et al.*, 2020). A niclosamida é um fármaco desenvolvido para o controle do hospedeiro intermediário de esquistossomose, posteriormente o potencial para o tratamento de teníase em humanos foi relatado (CHEN *et al.*, 2018). Atualmente estudos demonstram que esse fármaco apresenta atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica (RAMOS *et al.*, 2024) e quimioterápica (JUG; LAFFLEUR; MILLOTTI, 2024).

Dada a urgência por novas terapias, o reposicionamento de fármacos surge como uma estratégia promissora para doenças negligenciadas, como a pitiose causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, visto que pitiose não tem um protocolo padrão de tratamento; práticas como a remoção cirúrgica das lesões associada a utilização de fármacos antifúngicos, iodeto de potássio, imunoterapia, ozonioterapia, entre outros são relatadas na literatura, com resultados de cura bastante variáveis, pois não há um fármaco específico para oomicetos microrganismo semelhante a fungo, porém não possui ergosterol na membrana citoplasmática o principal sítio alvo de antifúngicos (PEREIRA *et al.*, 2024).

A pitiose acomete humanos, animais domésticos e silvestres (GAASTRA *et al.*, 2010; VIDELA *et al.*, 2012). Dependendo do hospedeiro, esta enfermidade pode apresentar diferentes formas clínicas, assim como cutânea/subcutânea, intestinal, vascular, ocular, óssea e pulmonar (CARNAÚBA *et al.*, 2023).

No Brasil o equino é a espécie mais acometida pela doença. Em geral, esses animais desenvolvem a forma cutânea/subcutânea que caracteriza-se pelo desenvolvimento de massas ulceradas de diferentes tamanhos que drenam uma secreção serossanguinolenta. No interior das lesões há a formação de pequenas, massas de consistência dura, arenosa, de coloração branca-amarelada, denominadas *kunkers* (GAASTRA *et al.*, 2010).

Pesquisa por compostos com atividade anti-*Pythium* é fundamental para a busca da qualidade de vida dos animais. Considerando o potencial da niclosamida como um fármaco reposicionado, este estudo avaliou a atividade *in vitro* da niclosamida sobre o oomiceto *P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados sete isolados de *P. insidiosum* oriundos de animais (equinos e canino) naturalmente infectados, pertencentes a pitoteca do Laboratório de Micologia (LABMICO/UFPEL) e do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI, da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM), bem como as cepas-padrão CBS119455, CBS57585 e CBS101555. Todos os isolados de *P. insidiosum* estão devidamente registrados no SISGEN (A139392 e A07F9A).

A niclosamida (Sigma-Aldrich) foi obtida comercialmente, sendo o composto preparado em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) na concentração de 52240 µg/mL. Posteriormente, a solução de trabalho foi diluída em RPMI1640 (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, EUA) em concentrações que variaram de 4µg/mL a 0,009µg/mL.

O inóculo foi preparado conforme Fonseca *et al.* (2014). Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo ágar extrato de levedura 1%, incluídos a 37°C por 96 horas. Após a cultura foi recoberta com 10mL de água destilada estéril e o micélio foi raspado com lâmina de bisturi estéril; a solução foi transferida para tubos de ensaio e a transmitância ajustada em espectrofotômetro a 80%-85% nm. Posteriormente, o inóculo foi diluído 1:10 em caldo RPMI1640.

Os ensaios de suscetibilidade *in vitro* basearam-se no método de microdiluição em caldo, seguindo as normas descritas no documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) com modificações para oomicetos (Pereira *et al.*, 2007). Alíquotas de 100µl das diferentes concentrações foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Um volume de 100µl do inóculo foi adicionado a todos os poços da placa, sendo que o poço 11 foi o controle negativo (RPMI+niclosamida) e o poço 12, o controle positivo (inóculo + RPMI) as colunas. As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 75 rpm, durante 48 horas. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração do fármaco que inibiu o crescimento de hifas, as concentrações que inibiram 50% das amostras testadas foram denominadas CIM₅₀ e as que inibiram 90% denominadas de CIM₉₀. Os testes foram realizados em quadruplicata.

As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isto, 100 µl da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µl de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37°C por 24 horas. A menor concentração de niclosamida que não evidenciou crescimento foi considerada a COM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar o reposicionamento do antiparasitário niclosamida sobre um oomiceto patógeno de mamíferos. Observou-se que a niclosamida inibiu o crescimento de *P. insidiosum* em concentrações inibitórias mínimas que variaram de 1 a 0,125 µg/mL com CIM₅₀ de 0,25 µg/mL e CIM₉₀ de 1 µg/mL (Tabela 1); COM foi igual a CIM.

Tabela 1: Atividade *in vitro* de niclosamida contra amostras de *P. insidiosum*.

Isolado	Origem	CIM (µg)
PI 001	Equino	0,125
PI 016	Equino	0,125
PI 021	Equino	0,25
PI 018	Equino	0,25
CBS 119455	Humano	0,25
CBS 57585	Equino	0,5
PI 010	Equino	0,5
PI 009	Equino	0,5
CBS 101555	Equino	1
PI 023	Canino	1

Estudos prévios realizados por RAMOS *et al.* (2024) em *Sporothrix* ssp., mostraram que niclosamida inibiu este fungo em concentrações inibitórias mínimas que variaram entre espécies do gênero, sendo de 0,2 a 3,27 µg/mL. Estes autores sugeriram que esse composto atinge as mitocôndrias do fungo, inibindo a fosforilação oxidativa, ação que já foi demonstrado em outros modelos experimentais; sendo o mesmo mecanismo de ação decrito para os helmintos. Embora niclosamida tenha um amplo espectro de ação, nem todos mecanismos estão elucidados, a estrutura química deste fármaco apresenta característica farmacológica pleiotrópica, o que lhe confere múltiplos alvos biológicos.

Testes *in vitro* empregando culturas celulares de queratinócitos humanos demonstraram que esse fármaco é citotóxico a partir de 2,56 µg/mL (FOLLIERO *et al.*, 2022); assim, considerando os resultados obtidos no presente estudo, a maior CIM sobre *P. insidiosum* foi 1 µg/mL, abaixo da concentração citotóxica citada por Folliero *et al.*, (2022). Desta forma, acredita-se que a niclosamida é um fármaco que pode ser reposicionado para uso em infecções causadas por *P. insidiosum*. Contudo, futuras pesquisas são requeridas para avaliar o potencial terapêutico deste fármaco na pitiose em animais.

4. CONCLUSÕES

A niclosamida inibiu o crescimento de *P. insidiosum* em ensaios *in vitro*, apresentando perspectivas promissoras como fármaco reposicionado para o manejo de infecções causadas por este oomiceto patógeno. Contudo, investigações futuras são indispensáveis para confirmar seu potencial terapêutico na pitiose em animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, Boston, v.3, n.8, p.673–683, 2004.
- BRAGA, C. Q. *et al.* *In vitro* and ex vivo anti-*Pythium insidiosum* potential of ozonated sunflower oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 867–873, 2023.
- CARNAÚBA, R. T. M. S. *et al.* *Pythium insidiosum* e pitiose : uma revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 30, p. 1–12, 2023.

- CHEN, W. et al. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. **Cellular Signalling**, v.41, p.89–96, 2018.
- FOLLIERO, V. et al. Niclosamide as a Repurposing Drug against *Corynebacterium striatum* Multidrug-Resistant Infections. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 651, 2022.
- FONSECA, A.O.S. et al. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **J Antimicrob Chemother**, v.69, p.1564-1567, 2014
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 1–16, 2010.
- IANISKI, L. B. et al. *Pythium insidiosum*: *In vitro* oomycidal evaluation of telithromycin and interactions with azithromycin and amorolfine hydrochloride. **Journal de mycologie médicale**, v. 34, n. 1, p. 101460–101460, 2024.
- JOURDAN, J. et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.72, n.9, p.1145–1151, 2020.
- JUG, M.; LAFFLEUR, F.; MILLOTTI, G. Revisiting Niclosamide Formulation Approaches – a Pathway Toward Drug Repositioning. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 18, p. 4153–4182, 2024.
- LORETO, É. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to Macrolides and Tetracycline Antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 55, n. 7, p. 3588–3590, 2011.
- LORETO, É. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to Macrolides and Tetracycline Antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 55, n. 7, p. 3588–3590, 2011.
- LORETO, É. S. et al. New Insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 58, n. 12, p. 7534–7537, 2014.
- 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.
- RAMOS, M. L; et al. *In vitro* activity of the anthelmintic drug niclosamide against *Sporothrix* spp. strains with distinct genetic and antifungal susceptibility backgrounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1359–1368, 2024.
- VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v.50, n.2, p. 219-24, 2012.