

GEMIFLOXACINO: UM FÁRMACO ANTIBACTERIANO COM ATIVIDADE ANTI- *Pythium insidiosum*

HENRIQUE ZARNOTT RAATZ¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²; CASSIANE BORGES DE SOUZA³; JÉFERSON LUIZ SILVA DE SOUZA⁴; YASMIN DUMMER RUAS⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – henriqueraatz@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – casborges96@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – jefersonluizsds@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – yasminruas09@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum (*P. insidiosum*) é um oomiceto aquático que causa a pitiose, uma enfermidade emergente que afeta mamíferos que habitam regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GAASTRA et al., 2010).

No Brasil, é relatado o maior número de casos de pitiose, predominantemente nas regiões sul, nordeste e centro-oeste durante o verão e o outono (PEREIRA et al., 2024). Já na Tailândia e na Índia, a doença é endêmica em humanos (YOLANDA & KRAJAEJUM, 2022). Além disso, a pitiose também tem sido documentada em outras espécies incluindo cães, bovinos, gatos, caprinos, ovinos e aves, bem como em mamíferos selvagens (GAASTRA et al., 2010).

A pitiose é uma doença notável devido à dificuldade de tratamento e letalidade nas espécies afetadas. Parte dos insucessos terapêuticos com o uso de antifúngicos é atribuída à ausência de ergosterol na membrana citoplasmática do *P. insidiosum*, o que torna a espécie intrinsecamente resistente à maioria dos antifúngicos convencionais (GAASTRA et al., 2010). Além disso, os resultados nem sempre satisfatórios obtidos com os protocolos terapêuticos tradicionais, que incluem cirurgia, imunoterapia e fármacos antifúngicos, têm incentivado, nos últimos anos, a realização de diferentes pesquisas para encontrar novos compostos no combate ao *P. insidiosum* (YOLANDA & KRAJAEJUM, 2020).

Neste contexto, estudos avaliando o reposicionamento de fármacos constituem uma excelente perspectiva para incrementar o arsenal terapêutico da pitiose. A estratégia de reposicionamento é uma abordagem inovadora e promissora, uma vez que acelera o processo de desenvolvimento de novos tratamentos, aproveitando os medicamentos já aprovados para uso clínico. Isso não apenas reduz os custos, como também aumenta as chances de sucesso terapêutico (YOLANDA & KRAJAEJUM, 2020).

Estudos prévios têm comprovado que fármacos com atividade antibacteriana, assim como azitromicina, doxiciclina e minociclina, apresentaram potencial reposicionamento frente a *P. insidiosum*, evidenciando eficácia *in vitro* e *in vivo* (YOLANDA & KRAJAEJUM, 2020; LORETO et al., 2018; ROS CASTELLAR, et al., 2017).

Dentre o arsenal de fármacos encontra-se gemifloxacino, um agente antibacteriano quinolônico de amplo espectro utilizado para o tratamento de casos graves de bronquite crônica e pneumonia transitória (SHAMIM et al., 2022). Além da atividade antibacteriana, relata-se que o fármaco possui potencial atividade imunomoduladora, devido a presença de ciclopropil na sua molécula (UMAIR et al., 2016).

Considerando que não há estudos avaliando o reposicionamento desta classe de fármacos frente a *P. insidiosum*, o presente estudo tem por objetivo verificar se gemifloxacino apresenta potencial atividade anti-*P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados oito isolados de *P. insidiosum*, sendo cinco isolados clínicos oriundos de equinos, dois isolados clínicos oriundos de caninos, e uma cepa padrão equina CBS 101.555. Todos os isolados pertencem ao Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas (LABMICO-UFPEL) e foram identificados morfolologicamente e molecularmente.

Os testes de microdiluição em caldo seguiram o protocolo M38-A2 do CLSI (2008) (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com adaptações. Para a preparação do inóculo, os isolados foram cultivados em ágar extrato de levedura 0,1% por 96h em estufa a 37°C. A cultura foi hidratada com 10 mL de água destilada estéril, e o micélio foi cuidadosamente raspado utilizando uma lâmina de bisturi estéril. A solução resultante foi transferida para um tubo, e o inóculo ajustado para uma transmitância de 80–85% a 530 nm. Em seguida, o inóculo foi diluído na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640, tamponado a pH 7,0. Para verificar a viabilidade do inóculo, uma alíquota de 100 µL foi adicionada a 900 µL de caldo Sabouraud e incubada a 37°C por 48 horas.

O antimicrobiano gemifloxacino foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). A solução do antimicrobiano foi diluída em caldo RPMI glicosado e tamponado a pH 7,0, de modo a obter concentrações variando entre 128 µg/mL a 0,25 µg/mL. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram distribuídas nos poços das microplacas, sendo adicionado um volume igual de 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 com agitação a 40 rpm por 48 horas. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. A avaliação foi visual, considerando o crescimento ou não de hifas. A menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi determinada como a concentração inibitória mínima (CIM), sendo a CIM₅₀ a concentração em que 50% das amostras foram inibidas e CIM₉₀ a concentração em que 90% das amostras foram inibidas. As concentrações superiores à CIM foram utilizadas para determinar a concentração oomicida mínima (COM). Para isso, 100 µL de cada diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud e incubados a 37°C por 48 horas. A menor concentração do fármaco que não apresentou crescimento foi considerada a COM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de susceptibilidade *in vitro* ao gemifloxacino foram observados os seguintes resultados: dois isolados de *P. insidiosum* apresentaram CIM de 16 µg/mL, dois evidenciaram CIM de 32 µg/mL, três CIM de 64 µg/mL, e um apresentou CIM de 128 µg/mL. A CIM₅₀ foi de 32 µg/mL e a CIM₉₀ foi de 64 µg/mL, sendo a média geométrica de 41,49 µg/mL. Os valores da COM foram iguais a CIM para quatro isolados. Para os demais isolados do oomiceto observou-se que a COM foi maior que a CIM.

Gemifloxacino é um antibacteriano de amplo espectro, atuando tanto em bactérias Gram negativas como Gram positivas, sendo muito utilizado no tratamento das enfermidades pulmonares. Sua ação é bacteriostática, uma vez que age inibindo a replicação bacteriana. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da DNA girase, uma enzima ativa na replicação do DNA da bactéria permitindo que a cadeia se desenrole, porém age também na enzima topoisomerase IV, que separa as cadeias de DNA após a sua replicação (BLONDEUA, J; MISSAGHI, B; 2004).

No presente estudo o fármaco causou a inibição do crescimento dos isolados de *P. insidiosum* avaliados em concentrações a partir de 16 µg/mL, com CIM₉₀ de 64 µg/mL, demonstrando um potencial oomicida do presente. Interessantemente, naquelas concentrações do fármaco onde houve o crescimento micelial de *P. insidiosum*, observou-se redução desse crescimento, quando comparado ao controle positivo. Esses resultados indicam que o fármaco avaliado tem ação sobre esse microrganismo patógeno.

Em estudos avaliando a suscetibilidade de bactérias Gram negativas e Gram positivas ao gemifloxacino, a CIM relatada variou de 0,008 µg/mL a 4,6 µg/mL. (BLONDEAU & TILLOTSON, 2009; LOPEZ, et al., 2001). Em comparação com outros fármacos antibacterianos, o gemifloxacino apresentou CIMs menores na maioria dos casos, especialmente contra *Streptococcus pneumoniae* (0,06 µg/mL) e evidenciou uma ação superior em *S. pneumoniae* resistentes ao levofloxacino (JOGERSEN et al, 2000). Acredita-se que as maiores CIM obtidas para *P. insidiosum* decorram do fato que este microrganismo é um eucarioto.

A pitiose é uma doença onerosa e de difícil tratamento, onde os pacientes apresentam um prognóstico reservado e desfavorável (GAASTRA et al, 2010). Terapias integrativas vem sendo empregadas para otimizar o tratamento da enfermidade, sendo o reposicionamento de fármacos uma delas. Atualmente, o reposicionamento de fármacos tem sido amplamente estudado e adotado em protocolos terapêuticos para o tratamento de doenças em seres humanos e animais. A descoberta de novos usos para medicamentos já conhecidos representa uma abordagem inovadora e eficaz, pois os perfis de segurança e as características farmacocinéticas desses compostos já foram previamente ajustados, além de questões ligadas à fabricação e ao armazenamento estarem validadas (RASTEGAR-MOJARAD et al., 2015). Assim sendo, pelos resultados obtidos neste estudo preliminar sugere-se que o gemifloxacino pode vir a ser uma opção de fármaco reposicionado a ser utilizado no tratamento da pitiose.

4. CONCLUSÕES

Gemifloxacino, um fármaco antibacteriano quinolônico tem atividade anti-*P. insidiosum*. Demonstra-se neste estudo a potencial reposição deste composto sobre um patógeno eucarioto. Contudo, estudos avaliando um maior número de isolados, bem como ensaios clínicos são requeridos para validar o uso deste fármaco em infecções causadas por *P. insidiosum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLONDEAU, J. M., MISSAGHI, B. Gemifloxacin: a new fluoroquinolone. **Expert opinion on pharmacotherapy**. v. 5, n. 5, p. 1117-1152. 2004

BLONDEAU, J.M., TILLOTSON, G.S. Gemifloxacin for the treatment of uncomplicated urinary infections (acute cystitis). **Ginecologia y Obstetricia de Mexico**. V. 77, n. 12, pp.573-582. 2009

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

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.

JORGENSEN, J.H., et al. Activities of clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, and trovafloxacin against recent clinical isolates of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 11, pp.2962-2968. 2000.

LOPEZ, H., et al. Comparative in vitro activity of gemifloxacin against gram-positive and gram-negative clinical isolates in Argentina. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 40, n. 4, pp.187-192. 2001

PEREIRA, D.I.B; et al. Equidae pythiosis in Brazil and the world: a systematic review of the last 63 years (1960–2023). **Brazilian Journal of Microbiology**, pp.1-13, 2024.

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.

ROS CASTELLAR, F., et al.. Intraocular minocycline for the treatment of ocular pythiosis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 11, pp.821-825. 2017.

SHAMIM, S; et al. Gemifloxacin-transition metal complexes as therapeutic candidates: antimicrobial, antifungal, anti-enzymatic, and docking studies of newly synthesized complexes. **Heliyon**, v. 8, n. 8. 2022.

UMAIR, M; et al. Immunomodulatory activities of gemifloxacin in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 9, p.985. 2016.

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; Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. **Heliyon**, v. 6, n. 4; 2020.

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