



## COMBINAÇÃO *IN VITRO* DE VERAPAMIL E FÁRMACOS DE PRIMEIRA ESCOLHA NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.

João Vítor Perez de Souza<sup>1</sup>(PIBIC/CNPq/Uem); Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>1</sup>; Aryadne Larissa de Almeida<sup>1</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>1</sup>; Vera Lúcia Dias Siqueira<sup>1</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Maringá, PR.

### Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq/CAPES

Microbiologia, Microbiologia aplicada.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, inibidores de bomba de efluxo, verapamil.

### Resumo:

O papel de bombas de efluxo na resistência de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) aos fármacos anti-tuberculose tem recebido maior atenção nos últimos tempos. A análise sequencial do genoma mostrou que *Mtb* possui múltiplas bombas de efluxo e diversas delas já foram identificadas em várias espécies de micobactérias. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação sinérgica, *in vitro*, de verapamil com rifampicina ou com isoniazida em *Mtb*. A interação entre os fármacos foi avaliada em *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv e em doze isolados de *Mtb* resistentes utilizando o método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA). Neste estudo foi observada a redução na concentração inibitória mínima (CIM) de isoniazida e rifampicina quando combinados a verapamil em alguns isolados de *Mtb*, o que indica o envolvimento de Bombas de Efluxo na resistência a isoniazida e rifampicina. Para elucidar melhor a contribuição da atividade sinérgica do verapamil no tratamento adjunto da TB, estudos adicionais nesta área são necessários, principalmente para melhoria do tratamento nos casos de tuberculose multirresistente (TB-MDR) e extensivamente resistente (TB-XDR).





## Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 9,6 milhões de indivíduos tiveram tuberculose (TB) em 2014. Neste mesmo ano, 6 milhões de novos casos da doença foram reportados (WHO, 2015).

Além dos altos índices de transmissão da doença, outro problema enfrentado é a doença causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) resistentes aos fármacos anti-tTB. Apesar de estar bem caracterizado que mutações no genoma do *Mtb* são as principais causas responsáveis pelo desenvolvimento dessa resistência, evidências apontam que Bombas de efluxo (BE) também têm papel na resistência à isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) (DEMITTO et al., 2015).

Em estudos recentes, a ação de inibidores de bombas de efluxo (IBEs) mostraram resultados promissores na redução da concentração inibitória mínima (CIM) de INH e RIF em *Mtb* quando combinados com IBEs (DEMITTO et al., 2015). Assim, nosso objetivo foi evidenciar a ação do verapamil (VP) como um promissor adjuvante na terapia anti-TB em isolados de *Mtb* resistentes à INH e RIF.

## Materiais e métodos

### **Preparo do inoculo bacteriano**

Doze isolados de *Mtb* resistentes aos fármacos anti-TB e a cepa padrão H<sub>37</sub>Rv foram semeados em Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC e incubados por 15 dias a 35°C. As suspensões bacterianas foram padronizadas com escala de McFarland nº 1 e diluídas 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC.

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Soluções de RIF, INH e VP foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. A CIM de cada fármaco para os isolados de *Mtb* e a cepa padrão, foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* - REMA em microplacas de 96 orifícios (PALOMINO et al., 2002).

### **Avaliação do efeito combinatório entre os fármacos**

A combinação entre RIF ou INH com VP foi avaliada em triplicata pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA) de acordo com Calleffi-Ferracioli et al. (2013).

Para interpretar o efeito sinérgico entre os fármacos estudados foi utilizado a Concentração da Fração Inibitória, (do inglês FIC, Fractional Inhibitory Concentration) e o fator de modulação (FM) (COELHO et al., 2015).





## Resultados e Discussão

Os resultados do efeito combinatório entre os fármacos estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Concentrações inibitórias mínimas, fator modulador e perfil de sinergismo da combinação de verapamil com isoniazida ou rifampicina para os isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

Isolado/ cepa	Perfil	CIM (µg/mL)			FIC INH+VP	FM	CIM (µg/mL)		FIC RIF+VP	FM
		VP	INH	INH+VP			RIF	RIF+VP		
H <sub>37</sub> Rv	S	125	0,06	0,03	0,5	2	0,004	0,002	0,5	<b>2</b>
04	INH <sup>R</sup>	125	4	2	0,5	2	NR	NR	NR	NR
14	INH <sup>R</sup>	125	16	16	1	1	NR	NR	NR	NR
16	INH <sup>R</sup>	125	8	4	0,5	2	NR	NR	NR	NR
23	INH <sup>R</sup>	125	8	8	1	1	NR	NR	NR	NR
26	INH <sup>R</sup>	125	16	16	1	1	NR	NR	NR	NR
57	INH <sup>R</sup>	125	8	4	0,5	2	NR	NR	NR	NR
81	INH <sup>R</sup>	125	8	4	0,5	2	NR	NR	NR	NR
84	INH <sup>R</sup>	250	8	2	0,25	<b>4</b>	NR	NR	NR	NR
100	INH <sup>R</sup>	125	32	16	0,5	2	NR	NR	NR	NR
101	INH <sup>R</sup>	125	32	16	0,5	2	NR	NR	NR	NR
12	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup>	125	8	4	0,5	2	32	4	0,125	<b>8</b>
45	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup>	250	16	8	0,5	2	32	1	0,03	<b>32</b>

VP: verapamil; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; FM: fator modulador; S: sensível à isoniazida e rifampicina; INH<sup>R</sup>: resistência à isoniazida; RIF<sup>R</sup>: resistência à rifampicina; INH<sup>R</sup>/RIF<sup>R</sup>: resistência à isoniazida e rifampicina; NR: não realizado.

A combinação de INH + VP resultou em uma diminuição no valor da CIM de INH com FM = 4 somente para o isolado de *Mtb* 84 BRF. Embora em nosso estudo, resultado sinérgico foi observado somente para um dos isolados testados, MACHADO et al. (2012) em estudo similar e de expressão gênica, observaram inibição da expressão de genes que codificam para BEs quando da ação das combinações de INH com VP em *Mtb*.

A combinação RIF + VP mostrou reduções de até 32 vezes no valor da CIM de RIF em *Mtb*. Deste modo, pudemos evidenciar que o mecanismo de resistência para RIF envolve sistemas de efluxo e não somente a resistência cromossômica, uma vez que foi evidenciado que VP é capaz de aumentar a concentração intracelular de RIF (DEMITTO et al., 2015). Estes resultados são similares aos





encontrados por COELHO et al. (2015) onde tanto a cepa de referência H<sub>37</sub>Rv como isolados resistentes a RIF mostraram reduções na CIM deste fármaco, com magnitudes de 4 a 64 vezes, quando combinado à VP.

## Conclusões

Nosso estudo foi capaz de evidenciar a ação do VP em reduzir a CIM de fármacos importante no tratamento da TB, como a RIF e INH, em isolados de *Mtb* resistentes. Para elucidar melhor a eficácia do VP no tratamento adjunto da TB, novos estudos ainda são necessários.

## Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária e ao CNPQ pelo apoio na realização do projeto.

## Referências

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. et al. Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 6, p. 660–663, nov. 2013.

COELHO, T. et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–12, 2015.

DE OLIVEIRA DEMITTO, F. et al. In vitro activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2015.

MACHADO, D. et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

PALOMINO, J.-C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, ago. 2002.

