

## COMBINAÇÃO *IN VITRO* DE VERAPAMIL E CLOFAZIMINA CONTRA MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Leticia Julia Faria<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Renata Alexandre de Oliveira<sup>1</sup>, Andressa Araújo Machado do Nascimento<sup>1</sup>, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>1</sup>, Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>1</sup> (Orientador). E-mail: rblscodro@uem.br

Universidade Estadual de Maringá<sup>1</sup>, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências da Saúde, Microbiologia

**Palavras-chave:** micobactérias; verapamil; clofazimina

### RESUMO

As micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) causam infecções, chamadas micobacterioses, com incidência crescente, exigem tratamento longo e difícil. Neste sentido, é necessário buscar alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença, o verapamil (VP), um fármaco usado para tratamento de hipertensão e outras doenças cardíacas, apresentou resultados promissores em outros estudos quando combinado, *in vitro*, com antimicrobianos contra *Mycobacterium tuberculosis*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade combinada entre VP e clofazimina (CFZ) em *Mycobacterium smegmatis* (mc<sup>2</sup> 155), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977) e linhagens de coleção de MCR. Foi determinado a concentração inibitória mínima (CIM) para o VP e CFZ, por meio do método *resazurin broth microdilution assay*, em triplicata, com repiques independentes e a ação combinada foi determinada pelo método *resazurin drugs combination microtiter assay*. A concentração inibitória mínima para o VP variou de 256 e 1024 µg/mL e para CFZ os valores ficaram entre 0,012 e 2 µg/mL, enquanto na ação combinada o VP modulou a ação de CFZ entre 4 e 8 vezes. O VP apresentou sinergismo, quando combinado com CFZ, em todas as linhagens analisadas, porém este resultado deve ser analisado com cautela, visto que o VP pode ser tóxico em concentrações elevadas.

### INTRODUÇÃO

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) causam infecções no organismo denominadas micobacterioses, sendo um problema de saúde pública, endêmico globalmente. Estes bacilos apresentam uma característica de resistência intrínseca (fenótipo esperado resistente) à maioria dos antimicrobianos disponíveis atualmente e por tais motivos o tratamento indicado é poliquimioterápico e de longa duração. Entretanto, esse tratamento prolongado pode levar ao aparecimento de muitos efeitos adversos no indivíduo como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e,

consequentemente, a baixa adesão e a descontinuação do tratamento por parte do paciente. Isso leva a ineficácia do tratamento e o surgimento de mais bacilos resistentes (Lopeman *et al.*, 2019).

Devido à dificuldade de estabelecer uma terapia eficaz e segura em doenças por micobactérias, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas. Uma das estratégias estudadas é o uso de fármacos já existentes, por meio do reposicionamento de fármacos, que de alguma maneira, modulam a ação de antimicrobianos já existentes no mercado. Neste sentido, o verapamil (VP), um fármaco utilizado para tratamento de hipertensão e outras doenças cardíacas, e em pesquisas apresentou resultados promissores quando combinado, *in vitro*, com antimicrobianos contra *Mycobacterium tuberculosis*, no qual seu mecanismo de ação está relacionado à inibição das bombas de efluxo (BE) e/ou na membrana celular podendo assim melhorar a biodisponibilidade dos antimicrobianos disponíveis (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2019).

Portanto, diante do aumento da incidência de doenças causadas por MCR, da dificuldade de estabelecer um tratamento eficiente e da necessidade de buscar alternativas terapêuticas mais eficazes, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade combinada do VP com o antimicrobiano clofazimina (CFZ) em cepas padrão de *Mycobacterium smegmatis* (mc<sup>2</sup> 155) e *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), bem como frente a linhagens de coleção destas mesmas espécies.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi determinado a concentração inibitória mínima (CIM) para o VP e CFZ por meio do método *resazurin broth microdilution assay* (CLSI, 2018), em triplicata, com repiques independentes. Inicialmente as MCR foram cultivadas em Müeller Hinton Broth cátion ajustado e incubado por 3 dias a 30°C. A partir desse cultivo foram preparadas suspensões bacterianas padronizadas em espectrofotômetro de acordo com a escala de McFarland 0,5 e diluídas 1:200 em MHB. Os fármacos foram diluídos em razão 2 em microplaca com MHB, no qual a concentração de VP variou entre 16.384 a 8.192 µg/mL enquanto a CFZ variou de 256 a 16 µg/mL. Após diluição seriada dos fármacos, foi adicionado 100 µL do inóculo bacteriano padronizado em cada poço, posteriormente foi incubada por 3 dias a 30°C. Depois dos 3 dias, foi adicionado 30 µL de solução de resazurina 0,02% e, após 24 horas, foi realizada a leitura da placa, em que a CIM corresponde a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para avaliação da atividade combinatória de VP e CFZ foi utilizado o método *resazurin drugs combination microtiter assay* (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013), portanto foi realizado a diluição do VP (fármaco A), nas mesmas concentrações usadas para CIM, a partir da coluna 11 até a coluna 3 e a CFZ foi diluída a partir da linha A até a linha G. Os poços da coluna 2 e linha H receberam diluições seriadas com a VP e CFZ de forma isolada. Em seguida o inóculo bacteriano foi padronizado e adicionado 100 µL em cada poço da microplaca. Para interpretar o efeito do VP com CFZ foi utilizado o índice de concentração inibitória fracionária (FICI):  $FICI = (CIM A + B / CIM$

A) + (CIM B + A/CIM B), sendo valores de FICI  $\leq 0,5$  indica sinergismo entre os fármacos, FICI  $> 0,5-4$  indica indiferença e FICI  $> 4$  antagonismo. Além disso foi determinado o fator modulador (FM), sendo  $FM = (CIM A / CIM A + B)$  e valores  $\geq 4$  serão considerados significativos. Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM foi avaliada para as duas cepas padrão de referência e 6 linhagens de coleção, a CIM para VP variou de 256 e 1024  $\mu\text{g/mL}$  e para CFZ os valores ficaram entre 0,012 e 2  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 1). Na avaliação da ação combinatória a partir do *checkerboard*, a ação combinada de VP e CFZ, podemos observar que o VP foi sinérgico com CFZ em todas as cepas testadas, modulando a ação dela entre 4 e 8 vezes (tabela 2). Estes resultados são similares aos encontrados na literatura científica, como no trabalho de Mudde (2022), que relatou sinergismo entre VP e CFZ em cepa de *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977).

**Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de verapamil e clofazimina em micobactérias não tuberculosas**

Isolados	Concentração Inibitória Mínima (ug/mL)	
	VP	CFZ
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	512	0,12
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	1024	2,00
<i>M. smegmatis</i> 1	256	0,50
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	256	0,12
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	256	0,25
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	256	0,25
<i>M. chelonae</i>	512	1,00
<i>M. fortuitum</i>	512	0,12

M.: *Mycobacterium*

**Tabela 2. Avaliação da ação combinada de clofazimina (CFZ) e verapamil (VP) em micobactérias não tuberculosas**

Cepas e isolados clínicos	CFZ+VP	
	FICI	FM
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	0,22	8
<i>M. abscessus</i> (ATCC 19977)	0,28	4
<i>M. smegmatis</i>	0,37	8
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	0,37	4
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	0,37	8
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	0,37	4
<i>M. chelone</i>	0,24	8

*M. fortuitum*

0,37

4

*M.: Mycobacterium*

## CONCLUSÕES

Podemos concluir que o verapamil, quando combinado com CFZ, apresentou sinergismo em todas as linhagens bacterianas analisadas. Porém apesar do resultado promissor *in vitro*, a CIM elevada de VP não nos permite considerá-lo como uma opção terapêutica *in vivo*, visto que em concentrações elevadas ele pode ser tóxico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, [s.l.], v. 93, n. 6, p. 660-663, 2013. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24083948/>. Acesso em: 20 ago. 2024

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiol.**, [s.l.], v. 14, p. 185-194, 2019. DOI: 10.2217/fmb-2018-0277. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30648892/>. Acesso em: 23 ago. 2024.

CLSI. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* spp., and other aerobic actinomycetes, 3rd ed, CLSI standard document M24. **Clin Lab Stand Inst.** 2018.

LOPEMAN, R. C. *et al.* *Mycobacterium abscessus*: Environmental bacterium turned clinical nightmare. **Microorganisms**, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7030090. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30909391/>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MUDDE, S. E. *et al.* Unraveling antibiotic resistance mechanisms in *Mycobacterium abscessus*: the potential role of efflux pumps. **J Glob Antimicrob Resist.** [s.l.], v. 31, p. 345–352, 2022. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.10.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716522002442?via%3Dihub>. Acesso em: 18 ago. 2024