

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA DE OLIVEIRA DEMITTO

Atividade *in vitro* da combinação de rifampicina e verapamil em isolados de
Mycobacterium tuberculosis multirresistentes

Maringá
2014

FERNANDA DE OLIVEIRA DEMITTO

Atividade *in vitro* da combinação de rifampicina e verapamil em isolados de
Mycobacterium tuberculosis multirresistentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profª. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

D381a Demitto, Fernanda de Oliveira
Atividade in vitro da combinação de rifampicina e verapamil em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes / Fernanda de Oliveira Demitto. --
Local : [s.n.], Ano.
44 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

Orientador : Prof. Dr. Rosilene Fressatti Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

1. Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) - Bombas de efluxo. 2. Tuberculose - Curva de morte. 3. Tuberculose - Fluorimetria - Brometo de etídio. Tuberculose - Verapamil. I. Cardoso, Rosilene Fressatti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed.616.995

Zss-001

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA DE OLIVEIRA DEMITTO

Atividade *in vitro* da combinação de rifampicina e verapamil em isolados de
Mycobacterium tuberculosis multirresistentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Regiane Bertin de Lima Scodro
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigas, noivo e professoras que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

In vitro activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the RIF and VP combination effect in MDR *M. tuberculosis* clinical isolates and their ability to drug efflux. The time-kill curve assay was used to detect the synergic effect between the drugs and the inhibition of efflux pump effect was determined by ethidium bromide fluorometry. From six isolates, one (71A) had RIF and VP combination synergism with a decrease of more than two \log_{10} CFU/mL. For the other five MDR clinical isolates, the drug combination showed to be additive. By EtBr accumulation assay two distinct profiles on the MDR isolates were observed. Isolates 18, 109 and 3614, showed a higher EtBr accumulation in VP alone and VP + RIF combination exposure and the isolates 71A, 64A and 19 showed a lower EtBr accumulation in VP + RIF combination exposure compared to a single drugs exposure. Coadjutants anti-TB therapy with VP for MDR *M. tuberculosis* may render the bacillus to be more susceptible to RIF. However, additional studies are required in order to elucidate the safely and effectively therapeutic applications of the drug combination.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, efflux pumps, time-kill studies, fluorometry, verapamil.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da
ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo
II): *Plos one* (artigo)

dos mecanismos de efluxo de fármacos e de possíveis sinergismos entre fármacos pode ser vantajosa, pois poderá além de encurtar o tempo, melhora a adesão do paciente ao tratamento.

CAPÍTULO II

Artigo: "*In vitro* activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*"

In vitro* activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis

Fernanda de Oliveira Demitto¹, Renata C. R. do Amaral², Flaviane G. Maltempe², Vânia Cristina Desoti³ Katiany R. Caleffi Ferracioli⁴, Rosilene F. Cardoso⁴

¹Postgraduate in Health Sciences, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil;

²Postgraduate in Bioscience and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil;

³Postgraduate in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil;

⁴Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Corresponding: Rosilene Fressatti Cardoso. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas (DAC) – Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the rifampicin (RIF) and verapamil (VP) combination effect in MDR *M. tuberculosis* clinical isolates and their ability to drug efflux. The time-kill curve assay was used to detect the synergic effect between the drugs and the inhibition of efflux pump effect was determined by ethidium bromide fluorometry. From six isolates, one (71A) had RIF and VP combination synergism with a decrease of more than two \log_{10} CFU/mL. For the other five MDR clinical isolates, the drug combination showed to be additive. By EtBr accumulation assay two distinct profiles on the MDR isolates were observed. Isolates 18, 109 and 3614, showed a higher EtBr accumulation in VP alone and VP + RIF combination exposure and the isolates 71A, 64A and 19 showed a lower EtBr accumulation in VP + RIF combination exposure compared to a single drug exposure. The anti-TB therapy with VP for MDR *M. tuberculosis* may render the bacillus to be more susceptible to RIF. However, additional studies are required in order to elucidate the safely and effectively therapeutic applications of the drug combination.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, efflux pumps, time-kill studies, fluorometry, verapamil, rifampicin.

17. Luna-Herrera J, Reddy MV, Gangadharam PR (1995) In Vitro Activity of the Benzoxazinorifamycin KRM-1648 against Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Tubercle Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 440-4.
18. Machado L, Spengler G, Evaristo M, Handzlik J, Molnár J, et al. (2011). Biological activity of twenty-three hydantoin derivatives on intrinsic efflux pump system of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. *In Vivo* 25:769-72.
19. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, et al. (2009) Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J Biol Eng* 3:18.
20. Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39:162-76.
21. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, Leon R, Jimenez A, et al. (2011) Rifampicin Reduces Susceptibility to Ofloxacin in Rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* through Efflux. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 269-76.
22. Gupta S, Tyagi S, Almeida DV , Maiga MC, Ammerman NC, et al. (2013) Acceleration of Tuberculosis Treatment by Adjunctive Therapy with Verapamil as an Efflux Inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 600-7.
23. Piddock LJ, Williams KJ, Ricci V (2000) Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 45: 159-65.
24. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M (2012) Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 12: 695-700.
25. Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, et al. (2012) Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7: e34538.
26. Chan EL, Zabransky RJ (1987) Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 6:157-64.
27. Steenwinkel JEM, Knegt GJ, Kate MT, Belkum A, Verbrugh HA, et al. (2010) Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 65: 2582-9.

28. Wehrli W, Knüsel F, Schmid K, Staehelin M (1968) Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 61: 667-73.
29. Gumbo T, Louie A, Deziel MR, Liu W, Parsons LM, et al. (2007) Concentration-Dependent *Mycobacterium tuberculosis* Killing and Prevention of Resistance by Rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.*51: 3781-8.
30. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, et al. (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647-50.
31. Viveiros M, Leandro C, Amaral L (2003) Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int J Antimicrob Agents* 22: 274-8.
32. Viveiros M, Martins M, Couto I, Kristiansen JE, Molnar J, et al. (2005) The in vitro activity of phenothiazines against *Mycobacterium avium*: potential of thioridazine for therapy of the co-infected AIDS patient. *In Vivo* 19: 733-6.
33. Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, Sampaio D, Couto I, et al. (2008) Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 61: 1076-82.
34. Rodrigues L, Sampaio D, Couto I, Machado D, Kern WV, et al. (2009) The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *Inter J of Antimicrob. Agents* 34: 529-33.
35. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, et al. (2010) Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb Drug Resist* 16: 21-8.
36. Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, et al. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity over-expresses a tap-like efflux pump. *Infection* 32: 109-11.
37. Singh M, Jadaun GP, Ramdas, Srivastava K, Chauhan V, et al. (2011) Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* 133: 535-40.
38. Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, et al. (2008) Demonstration of Intrinsic Efflux Activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an Automated Ethidium Bromide Method. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 458-62.
39. Jin J, Zhang JY, Guo N, et al. (2010) Farnesol, a Potential Efflux Pump Inhibitor in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecules* 15: 7750-62.

40. Ramon-Garcia S, Martin C, Thompson CJ, Ainsa JA (2009) Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3675-82.
41. De Knecht GJ, Bruning O, ten Kate MT, de Jong M, van Belkum A, Endtz HP, Breit TM, Bakker-Woudenberg IA, de Steenwinkel JE (2013) Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 93: 96-101.
42. Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M (2008) Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2503-11.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of EtBr for *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and clinical isolate, 71A, 18, 19, 109, 3614 and 64A, by fluorometry method.

Clinical isolate	Resistance	MIC EtBr (μg/mL)
H ₃₇ Rv	Sensitive	1
64A	(INH, RIF) ^R	0.5
71A	(INH, RIF, PZA) ^R	1
19	(INH, RIF, EMB) ^R	0.5
18	(INH, RIF, EMB) ^R	0.5
109	(INH, RIF) ^R	0.5
3614	(INH, RIF, EMB) ^R	0.5

R=resistant, INH= isoniazid, RIF= rifampicin, EMB= ethambutol, PZA= pirazinamid

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Este estudo mostrou sinergismo entre a RIF, um dos fármacos clássicos utilizados no tratamento da TB, e o VP, um conhecido inibidor de bombas de efluxo, para um isolado de MDR-TB. Os dados sugerem que as bombas de efluxo podem desempenhar um papel importante na resistência à RIF em *M. tuberculosis*. Assim, o uso de inibidores de bombas de efluxo de fármacos devem ser considerados no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da TB, principalmente no sentido de prevenir o surgimento de cepas resistentes à múltiplos fármacos. A combinação de RIF e VP poderia sinergicamente melhorar o resultado do tratamento, bem como permitir o encurtamento da duração da terapia. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação envolvidos nesta combinação de fármacos, a fim de avaliar se esses compostos podem ser usados com segurança e eficácia em futuras aplicações terapêuticas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando a atividade da RIF em *M. tuberculosis* e os dados epidemiológicos que indicam o aumento na incidência de isolados de *M. tuberculosis* resistente a múltiplas drogas (MDR), novas opções terapêuticas para o tratamento da TB são necessárias. Frente aos resultados promissores da combinação RIF + VP *in vitro* pela curva de morte e pelo ensaio de fluorometria, faz-se necessário a continuidade nos estudos de interações com outros fármacos anti-TB tais como isoniazida e etambutol a fim de compreender melhor a ação coadjuvante do inibidor de bomba VP no tratamento da TB.

Nosso grupo de pesquisa pretende caracterizar a expressão gênica de algumas bombas de efluxo em *M. tuberculosis* utilizando a técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) em tempo real nos isolados em que as associações entre RIF e VP mostraram-se sinérgicas ou aditivas. Além disso, vale analisar os isolados resistentes por meio de técnicas de microscopia eletrônica, com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre a combinação RIF + VP.

Análises adicionais com RIF e VP em modelos animais também poderão contribuir para a compreensão do efeito observado *in vitro*.