

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Catrine de Souza Machado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DA
AMITRIPTILINA**

Santa Maria, RS
2019.

Catrine de Souza Machado

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DA AMITRIPTILINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Santa Maria, RS.
2019.

Machado, Catrine de Souza
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DA
AMITRIPTILINA / Catrine de Souza Machado.- 2019.
83 p.; 30 cm

Orientadora: Rosmari Horner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

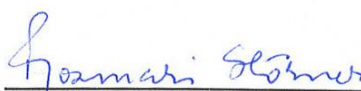
1. Amitriptilina 2. Compostos antibacterianos 3.
Reposicionamento de drogas 4. Clivagem do DNA I. Horner,
Rosmari II. Título.

Catrine de Souza Machado

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DA AMITRIPTILINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

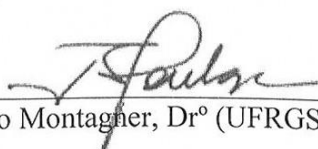
Aprovado em 29 de agosto de 2019:



Rosmari Horner, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Luciana Maria Fontanari Krause, Dr^a (UFN)



Francisco Montagner, Dr^o (UFRGS)- Parecer

Santa Maria, RS
2019.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela capacidade de acreditar e investir em mim. Ao meu irmão pelo incentivo e apoio constante. Ao meu namorado, pelo cuidado, segurança e paciência diária. A vocês se faz necessário agradecer a educação recebida e o amor dedicado que me fez fortalecida até hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, simplesmente, por tudo! Pela saúde, força, luz e sabedoria que me deste. Por estar ao meu lado em cada decisão que tomei e por me guiar sempre pelo melhor caminho!

Aos meus pais, pela educação, atenção, amor, incentivo e compreensão, por terem me ensinado que a base de tudo que move a vida é o respeito e nossos princípios! Meu muito obrigada por tudo, sempre! Ao meu irmão, por todo apoio, amizade, carinho e pela calma transmitida nos momentos de desespero. Vocês são essenciais na minha vida e na minha carreira! Amo muito vocês!

Ao meu namorado, pelo amor, apoio constante, paciência (muita), compreensão e até mesmo pelos puxões de orelha! Não tenho palavras para descrever tua importância nessa caminhada e na minha vida. Muito obrigada! Te amo!

À minha família, pelo carinho, palavras de incentivo e por entender minha ausência nesse tempo, foi muito importante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós, que sempre acreditaram e me incentivaram. Muito obrigada pelo apoio e confiança!

Às minhas amigas de Santiago, em especial ao meu “quarteto fantástico”, muito obrigada pela amizade, cumplicidade e carinho que sempre tivemos e por me proporcionarem momentos tão únicos e maravilhosos!

Aos meus amigos de Santa Maria, muito obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas soltas e pelo carinho!

À minha orientadora, pela oportunidade, por me acolher em seu laboratório e auxiliar na formação acadêmica com seus ensinamentos e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, pelo companheirismo, aprendizado e pela amizade.

À minha colega e dupla Taciéli, por estar presente em todos trabalhos, técnicas e congressos. Pela troca de ensinamentos e apoio constante. Tua amizade e ajuda foi muito importante.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela infraestrutura e ensino público de qualidade.

*“Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais,
mas que seja intensa, verdadeira,
pura enquanto durar.*

***Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”.***

Cora Coralina

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DA AMITRIPTILINA

AUTORA: Catrine de Souza Machado

ORIENTADORA: Dr^a. Rosmari Hörner

A emergência de infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas no mundo todo e o substancial aumento do câncer conduziu a procura por terapias inovadoras. Dessa maneira, lançou-se mão da utilização de pesquisas com medicamentos já em uso clínico que pudessem proporcionar alternativas de tratamento mais eficazes para superar estes desafios atuais, devido ao limitado número de agentes terapêuticos disponíveis, caracterizando-se o reposicionamento ou redirecionamento de drogas. A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico não muito utilizado na clínica para este fim, devido a seus efeitos colaterais acentuados na dose em que tem que ser utilizada. Porém, em dose menor, seu emprego atualmente é no tratamento da dor, como por exemplo, profilático na enxaqueca e da dor oncológica. Contudo, estudos demonstraram sua atividade frente a vários tipos de bactérias e fungos. Devido sua diversificada atividade biológica aliada ao preço relativamente baixo e ao isolamento de bactérias multirresistentes (MDR) principalmente a nível hospitalar, nos incentivou a conduzir esta pesquisa. Frequentemente medicamentos aptos a clivar o DNA fita dupla possuem tanto efeito antibacteriano como anticancerígeno. Estes conhecimentos e a existência somente de hipóteses no esclarecimento do mecanismo de ação desta droga constitui o objetivo deste estudo no qual pretendemos avaliar a atividade biológica *in vitro* do medicamento amitriptilina frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM), do nível de tolerância, do índice de concentração inibitória fracionada (FICI), associadas ou não a antibióticos usados na clínica médica e da capacidade de clivagem do DNA plasmidial fita dupla pUC18.

Palavras-chave: Amitriptilina; Compostos antibacterianos; Reposicionamento de drogas; Clivagem do DNA.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF AMITRIPTILINE

AUTHOR: Catrine de Souza Machado

ADVISOR: Dr^a. Rosmari Hörner

The emergence of infections caused by multi-drug resistant bacteria worldwide and the substantial increase in cancer has led to the search for innovative therapies. In this way, the use of researches with drugs already in clinical use that could provide more effective treatment alternatives to overcome these current challenges, due to the limited number of available therapeutic agents, characterizing the repositioning or redirection of drugs, was used. Amitriptyline is a tricyclic antidepressant not widely used in the clinic for this purpose because of its marked side effects in the dose at which it has to be used. However, at a lower dose, its use is currently in the treatment of pain, such as prophylactic migraine and cancer pain. However, studies have demonstrated their activity against various types of bacteria and fungi. Due to its diversified biological activity coupled with the relatively low price and the isolation of multiresistant bacteria (MDR) mainly at the hospital level, we were encouraged to conduct this research. Often drugs that are capable of cleaving DNA double-stranded have both antibacterial and anti-cancer effects. This knowledge and the existence of only hypotheses in the clarification of the mechanism of action of this drug is the objective of this study in which we intend to evaluate the *in vitro* biological activity of the drug amitriptyline against *American Standard Culture Collection* (ATCC) reference standard strains and clinical isolates MDR, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bacterial concentration (MBC), tolerance level, fractional inhibitory concentration index (FICI), associated or not with antibiotics used in clinical practice and cleavage ability of the pUC18 double stranded plasmid DNA.

Keywords: Amitriptyline; Antibacterial compounds; Repositioning drugs; DNA cleavage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química e molecular da Amitriptilina-----	21
Figura 2- Diferentes formas do DNA plasmidial-----	24
Figura 3-Representação das formas do DNA-----	25
Manuscrito 2:	
Figure 1- Chemical structure of amitriptyline-----	58
Figure 2- Comparison of amitriptyline in combination with ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and colistin in standard ATCC strains and clinical isolates MDR-----	59
Figure 3- Agarose gel with amitriptyline showing a cleavage of plasmid DNA-----	61

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1:

Table 1- Selection of drug repositioning studies with anticancer effect-----27

Manuscrito 2:

Table 1- Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of amitriptyline, ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim, and Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and its associations against standard strains and clinical MDR isolates-----50

Table 2- Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of amitriptyline, ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim and their associations against standard strains and clinical MDR isolates-----52

Table 3- Minimum inhibitory concentrations (MIC) of amitriptyline, alone and in combination with colistin against clinical isolates MDR and FICI and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)-----54

Table 4- Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and determination of tolerability level (CBM / MIC) of amitriptyline against standard strains and clinical isolates-----55

Table 5- Resistance profile of clinical isolates of KPC and SCoN-----56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	Antidepressivo tricíclico
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IMAO	Inibidores da Monoanimoxidase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISRS	Inibidores da Recaptação de Serotonina
MDR	Multidrug resistant bacteria
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ONU	Organização das Nações Unidas
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
TSB	Tryptic Soy Broth

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1.	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	Resistência Bacteriana	16
2.2.	Antibioticoterapia	17
2.3.	Reposicionamento de fármacos	19
2.4.	Antidepressivos tricíclicos	20
2.5.	Amitriptilina	21
2.6.	Clivagem do DNA plasmidial	23
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	26
3.1.	Manuscrito 1- Repositioning of drug: an alternative to cancer treatment	26
3.2.	Manuscrito 2- In vitro evaluation of the antibacterial activity of amitriptyline and its synergistic effect with ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and colistin as an alternative in drug repositioning	34
4	DISCUSSÃO GERAL	62
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	75
	ANEXO A- TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DA CIM E CBM	75
	ANEXO B- FÓRMULA PARA CALCULAR O ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FICI) SEGUNDO ODDS, 2003	78
	ANEXO C- FÓRMULA PARA CALCULAR O NÍVEL DE TOLERÂNCIA, SEGUNDO DAS E COLABORADORES, 2016	79
	ANEXO D- TÉCNICA PARA REALIZAÇÃO DA CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL	80

1. INTRODUÇÃO

A inapropriada utilização dos antimicrobianos tem levado a emergência das bactérias resistentes a múltiplas drogas, do inglês *multidrug resistant bacteria* - *MDR*. Esse é um expressivo problema de saúde pública, uma vez que exhibe consequências clínicas e econômicas alarmantes, que vão desde o aumento da mortalidade devido a falta de tratamento efetivo até o aumento da hospitalização. Somado a isto está o risco significativo para a dissipação hospitalar e comunitária deste tipo de cepas resistentes (LOUREIRO et al., 2016; AZEVEDO; SILVA, 2012).

Nas últimas décadas, houve uma redução significativa no número de medicamentos antibacterianos aprovados por agências reguladoras. Em consequência disso, ocorreu também um declínio nos investimentos para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, figurando um cenário assustador para a saúde pública (RODRIGUES et al., 2018).

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um desafio crescente, pois as alternativas de tratamento para determinadas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) provocada por microrganismos estão cada vez mais limitadas (RODRIGUES et al., 2018). Com isso, a pesquisa de novas substâncias e compostos que apresentem atividade antibacteriana é imprescindível (BROWN, 2015).

Nos últimos anos, a amitriptilina, um antidepressivo tricíclico (ADT), teve sua atividade antibacteriana frente a cepas Gram positivas e Gram negativas relatada na literatura (MANDAL et al., 2010; MUTHUKUMAR; JANAKIRAMAN, 2014). Além disso, diversas terapias com a amitriptilina estão sendo reconhecidas fora da indicação farmacológica da mesma, principalmente no tratamento de distintos estados de dor. Seu principal efeito é realizar o bloqueio da recaptura das aminas pelas terminações nervosas por competição pelo sítio de ligação do transportador de aminas (RANG et al., 2012).

Considerando a importância do problema da resistência microbiana e a progressiva ameaça para a saúde pública a nível mundial, uma vez que os clínicos não possuem antibióticos sensíveis para tratar determinadas infecções hospitalares provocadas por bactérias multirresistentes, pesquisadores estão tentando descobrir a atividade antimicrobiana de algumas classes farmacológicas, tais como, anti-hipertensivos, anti-histamínico, tranquilizantes, antipsicóticos, anti-inflamatório, estes chamados de 'não antibióticos'. Visto que vários destes compostos apresentam de dois a três anéis de benzeno, o que contribui, significativamente, para a atividade antibacteriana. (KRISTIANSEN; AMARAL, 1997; MUTHUKUMAR; JANAKIRAMAN, 2014; MOURA et al., 2017)

O reposicionamento de drogas consiste em descobrir novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes (ASHBURN; THOR, 2004). Sendo assim, tornou-se uma alternativa para a identificação mais rápida de drogas eficazes para tratar doenças infecciosas (SERAFIN; HÖRNER, 2018).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Apresentar o reposicionamento de fármacos de diversas classes farmacológicas e avaliar a atividade biológica *in vitro* da amitriptilina como provável redirecionamento para tratamento de infecções bacterianas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da amitriptilina frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos bacterianos de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) através do método de microdiluição em caldo, baseado no documento M100-S26 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012) e no documento M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (NCCLS, 1999), com algumas alterações.
- Avaliar o efeito sinérgico da amitriptilina associada a antibióticos como ciprofloxacino, sulfametozaxol-trimetoprima e colistina frente a cepas ATCC e isolados clínicos bacterianos de pacientes do HUSM através do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).
- Avaliar o nível de tolerância da amitriptilina associada a antibióticos como ciprofloxacino, sulfametozaxol-trimetoprima e colistina frente a cepas ATCC e isolados clínicos bacterianos de pacientes do HUSM.
- Avaliar o potencial de clivagem do DNA da amitriptilina inserido em cepa de *Escherichia coli* (puC 18) utilizando a lise alcalina (large-scale preparation of plasmid DNA), descrita no livro de protocolo de Ausubel e colaboradores (AUSUBEL et al., 2003).
- Apresentar o reposicionamento de drogas, abordando as principais vantagens e usos deste processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana é a capacidade das bactérias de resistir à sua destruição por um antibiótico, ou seja, essas bactérias não morrem durante o tratamento com os antibióticos, pelo contrário, elas se multiplicam cada vez mais, gerando bactérias mais resistentes enquanto as bactérias sensíveis são eliminadas (FIOCRUZ, 2017). Esta resistência acontece através de quatro principais mecanismos: alterações na permeabilidade, que irá impedir e/ou dificultar a entrada do antimicrobiano na célula bacteriana; alterações no sítio de ação, que impossibilita a molécula de encontrar o local onde sua interação resultará na resistência; ativação da bomba de efluxo, que expulsa o antimicrobiano de dentro da célula, e mecanismos enzimáticos (DA SILVA; MANÇANO; PICÃO, 2018; ANVISA, 2019).

A resistência antimicrobiana acontece quando bactérias, vírus, parasitas e fungos manifestam resistência contra os medicamentos que antes faziam parte do tratamento deste microrganismo (OPAS BRASIL, 2016). Consiste em uma propriedade intrínseca de um microrganismo ou uma capacidade adquirida. Para adquirir resistência, ocorre a alteração do DNA da bactéria através da indução de mutação no DNA nativo ou pela introdução de um DNA estranho, genes de resistência (ANVISA, 2019)

Estimativas mostram que em 2050 uma pessoa morrerá a cada três segundos em consequência de agravos causados por resistência aos antimicrobianos, resultando em 10 milhões de óbitos por ano, ultrapassando a atual mortalidade por câncer (8,2 milhões de mortes/ano). Entre 2015 e 2050 cerca de 2,4 milhões de pessoas poderão morrer nos países de elevados rendimentos caso a resistência antimicrobiana não for freada (WHO, IACG, 2019). Além disso, entre 2000 e 2010 ocorreu um aumento de 36% no consumo de antimicrobianos em 71 países, sendo que o Brasil, Rússia, Índia, África do Sul e China tiveram participação de três quartos (75%) nesse crescimento (ANVISA, 2018).

A resistência aos antibióticos tornou-se um fenômeno mundial, pois é considerada um problema de saúde pública a nível global e uma questão desafiadora (MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018). A resistência a múltiplas drogas torna-se preocupante, pois inativa a terapia antimicrobiana convencional aumentando as chances de uma infecção ser intratável por qualquer antibiótico usado na prática clínica (ZAWACKA et al., 2018).

É considerada uma manifestação clínica observada desde o início da antibioticoterapia, pois o descobrimento de novos antimicrobianos mostrou-se interessante, especialmente pela

observação de que a sensibilidade das bactérias às drogas era capaz de sofrer variações, tornando-se microrganismos pertencentes a uma mesma espécie em que algumas classes eram sensíveis, à medida que outras eram resistentes à ação de um mesmo antibiótico (TAVARES, 2014). Com isso, muitas bactérias que anteriormente eram sensíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes (MATSUNAGA; HAYAKAWA, 2018).

A Organização das Nações Unidas (ONU) publicou em abril de 2019, um relatório de recomendações contra a resistência bacteriana. Preconiza-se acelerar os processos de desenvolvimento na implementação de Planos Nacionais de Saúde contra a Resistência Antimicrobiana nos países, aumentar o investimento e a inovação em antimicrobianos, possuir um envolvimento sistemático e significativo, uma ação mais intensificada por parte do setor privado, investir para uma resposta sustentável e reforçar a responsabilidade a nível mundial (WHO, IACG, 2019).

A resistência bacteriana é responsável por consequências clínicas e econômicas agravantes. Os antimicrobianos muito usados estão sendo ineficazes, produzindo várias implicações ao paciente como o prolongamento da doença, aumento na taxa de mortalidade, no tempo de internação hospitalar, do custo do tratamento e a ineficácia dos tratamentos preventivos que comprometem toda a população (ANVISA, 2017).

2.2. ANTIBIOTICOTERAPIA

Os antibióticos surgiram através do descobrimento da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, médico, pesquisador e cientista que trabalhava em um hospital de Londres. Fleming buscava uma substância que combatesse infecções bacterianas, pois verificou a necessidade e a importância quando trabalhou como médico na Primeira Guerra Mundial (FIOCRUZ, 2006). Assim, os antimicrobianos são definidos como produtos capazes de destruir microrganismos ou de suprimir sua multiplicação ou crescimento, sendo classificados como antibióticos aqueles produzidos por microrganismos e quimioterápicos, aqueles produzidos sinteticamente em laboratórios (BRASIL, 2001).

Desde a descoberta da penicilina, os antimicrobianos colaboram para a cura e o combate de doenças infecciosas que, antigamente, ocasionavam a morte ou sequelas graves a milhares de pessoas. Dessa forma, a antibioticoterapia caracteriza-se como o tratamento do paciente com sinais e sintomas clínicos pela administração de antimicrobianos (BRASIL, 2001).

Estudo mostra que o tratamento inicial de antimicrobiano de amplo espectro minimiza

as taxas de mortalidade. Entretanto, seu uso prolongado e irracional, acarreta na multirresistência, aumenta o risco de toxicidade, interações medicamentosas e de diarreia por *Clostridium difficile*. Com isso, deve-se buscar o êxito terapêutico e diminuir os riscos do uso inadequado e prolongado dos antimicrobianos (SILVA; SILVA JÚNIOR, 2015).

O ciprofloxacino foi a primeira fluorquinolona a entrar em uso clínico (GREENE; HARRIS, 2012). Apresenta atividade *in vitro* contra uma ampla gama de microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos. Possui ação bactericida pela inibição da topoisomerase bacteriana do tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, que são necessárias para a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano (CIPRO®, 2019). Possui alta biodisponibilidade e baixa toxicidade o que resultam no sucesso clínico desta classe. Porém, seu uso excessivo ocasionou o aparecimento de algumas cepas bacterianas resistentes às quinolonas, como por exemplo, a maioria dos enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (NAEEM et al., 2016.)

O sulfametoxazol e a trimetoprima agem sinergicamente pelo bloqueio sequencial de duas enzimas que catalisam a biossíntese do ácido folínico no microrganismo (BACTRIM®, 2019). Estudo descritivo demonstra uma prevalência de 55% das culturas de urina resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima, sugerindo a importância de identificar e caracterizar microrganismos, perfis de suscetibilidade antimicrobiana e definir quais antibióticos devem ser escolhidos na primeira linha do manejo empírico (SPITIA et al., 2019).

A colistina é do grupo das polimixinas, um polipeptídeo ativo contra diversas cepas aeróbicas Gram-negativas e possui atividade bactericida. Age através da adesão à membrana celular da bactéria, alterando sua permeabilidade e, conseqüentemente, provocando a morte bacteriana (PROMIXIN®, 2019). Uma revisão sistemática, nos mostra que a colistina tornou-se frequentemente usada nos países endêmicos, como por exemplo, Itália e Grécia, na resistência aos carbapenêmicos, e que não se limita a uma faixa etária ou comorbidade específica (HIGUITA-GUTIÉRREZ; QUICENO, 2017). O mecanismo mais importante de resistência a colistina inclui modificações da porção lipopolissacarídica da membrana externa bacteriana. Porém, regimes de combinação com tigeciclina e fosfomicina podem ser úteis para o tratamento de infecções Gram-negativas resistentes à polimixina (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010).

2.3. REPOSICIONAMENTO DE DROGAS

A base mais proveitosa para a descoberta de um novo medicamento é o estudo de uma droga já existente no mercado. Com isso, a investigação de novos usos para drogas existentes em diferentes doses é um atalho entre o laboratório e a clínica, pois reduz os riscos de descoberta de medicamentos relacionados a custo, tempo e desafios científicos (PALIT; MANDAL; MANDAL, 2013).

O “reposicionamento de drogas”, “redirecionamento”, “reaproveitamento” (ASHBURN; THOR, 2004), “re-profilaxia” e “redescoberta” (AGRAWAL, 2015) foi descrito primeiramente por Ashburn e Thor em 2004, e surgiu como o processo de encontrar novos usos para drogas já aprovadas e usadas na clínica médica (ASHBURN; THOR, 2004). Esta ideia pode melhorar o processo de desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos, reduzindo as chances de problemas relacionados à farmacocinética e toxicidade (PALIT; MANDAL; MANDAL, 2013). Entretanto, é sabido que as pesquisas e estudos são fundamentais para esta prática, visto que estudos adicionais sobre mecanismos de ação e estudos *in vivo*, entre outros, são indispensáveis para o uso seguro desses medicamentos (SERAFIN; HÖRNER, 2018).

O redirecionamento é considerado uma abordagem alternativa para a identificação rápida de terapias eficazes para o tratamento de doenças infecciosas. Além disso, combinações sinérgicas de fármacos empregando drogas aprovadas e identificadas a partir do reaproveitamento, tornou-se uma alternativa vantajosa para solucionar o problema da fraca atividade de fármacos isolados (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). O sinergismo de fármacos aumenta o espectro antimicrobiano, conferindo-lhes atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos bacterianos resistentes a múltiplos fármacos (EJIM et al., 2011).

Estamos enfrentando um problema com a escassez de antimicrobianos eficazes e com isso, o desenvolvimento de novos antibióticos torna-se cada vez mais difícil e incapaz de acompanhar o rápido surgimento de microrganismos multiresistentes. Dessa forma, tem-se uma necessidade imediata de novas abordagens e novos medicamentos (THAKARE et al., 2017), assim, o reposicionamento de drogas é apontado como uma provável solução para este problema (NG et al., 2017).

Estudos investigam as atividades antimicrobianas, antineoplásicas entre outras, de algumas classes farmacológicas, incluindo, cardiovasculares (REGULSKA et al., 2019) antipsicóticas (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 1996; OGUNDEJI; POHL; SEBOLAI, 2017; PARK et al., 2019;) antidepressivos (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2000; MANDAL et al., 2010; MUTHUKUMAR; JANAKIRAMAN, 2014; BIELECKA-WAJDMAN et al., 2018) antiarrítmico (PINTO; TEMPONE, 2018), anti-inflamatório (THANGAMANI; YOUNIS;

SELEEM, 2015; CHAN et al., 2017), inibidores da bomba de prótons (LU; TIAN; GUO, 2017) e estatinas (RAMPELOTTO et al., 2018) como alternativas ao reposicionamento de drogas, já que a segurança, farmacologia, perfil e processo de fabricação destes medicamentos é conhecido e elucidado, tornando-se assim, mais rápido e disponível para um possível tratamento de outras doenças (NOSENGO, 2016).

3.4. ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS

As primeiras descobertas sobre os antidepressivos foram realizadas através da observação clínica. Eles podem ser divididos em vários grupos, com base em suas ações farmacológicas, clínicas e adversas. Apresentam-se como antidepressivos tricíclicos (ADT), cíclicos de segunda geração, inibidores da receptação, especialmente para serotonina (ISRS) e inibidores da monoaminoxidase (IMAO) (GREENE; HARRIS, 2012).

Antigamente, os antidepressivos tricíclicos mostravam boa eficácia terapêutica devido à sua ação, pois aumentavam a disponibilidade de norepinefrina e serotonina. Porém, seu emprego foi restrito em função do bloqueio de receptores de histamina, colinérgicos e alfa-adrenérgicos que causavam efeitos colaterais antimuscarínicos (MORENO; MORENO; SOARES, 1999) como, por exemplo, sedação, entorpecimento cognitivo, visão turva, boca seca, constipação, taquicardia, entre outros, levando à baixa tolerabilidade e risco de toxicidade (BRUNTON et al., 2012; RANG et al., 2012).

Comparando a amitriptilina com outros ADT, heterocíclicos e ISRS para o tratamento da depressão, ela demonstra ser pouco mais eficaz que outros compostos tricíclicos ou mais novos, porém, seus efeitos colaterais são mais acentuados (GUAIANA; BARBUI; HOTOPF, 2003). Em razão disso, os ADTs normalmente não são usados como fármacos de primeira escolha para a depressão. Os ADTs de amina terciária, em especial a amitriptilina, têm sido empregados em doses levemente baixas para o tratamento da insônia. Também, em função do papel da norepinefrina e da serotonina na propagação da dor, esses fármacos são normalmente usados para tratar uma diversidade de estados de dor (BRUNTON et al., 2012; RANG et al., 2012).

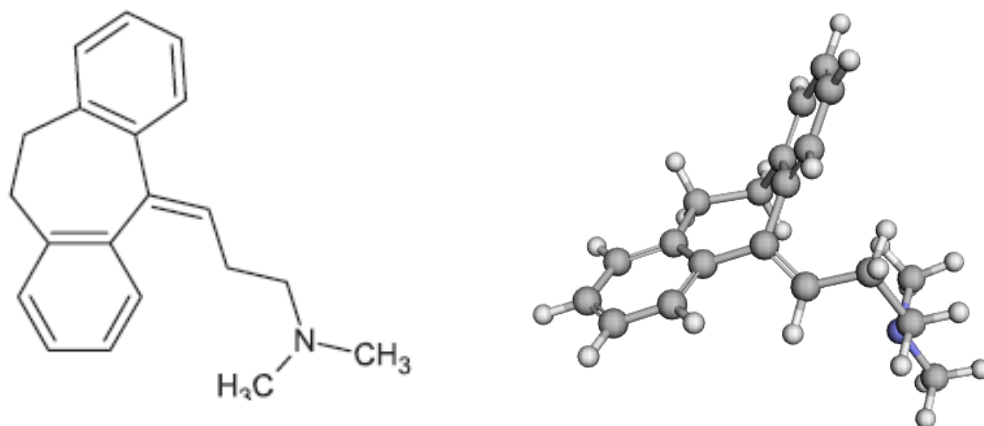
Mesmo com as evoluções na pesquisa, ainda não dispomos de um esclarecimento íntegro e apropriado sobre a ação dos antidepressivos. Desse modo aceitamos algumas hipóteses para compreender seu mecanismo de ação. Os medicamentos antidepressivos provocam um aumento na concentração de neurotransmissores na fenda sináptica pela inibição do metabolismo, causam um bloqueio de recaptura neuronal ou atuação em autoreceptores pré-

sinápticos (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

3.5. AMITRIPTILINA

A amitriptilina é um ADT que aumenta a concentração sináptica de serotonina e/ou norepinefrina no sistema nervoso central (SNC) pela inibição de sua recaptação pela membrana neuronal pré-sináptica. Sua estrutura química é composta por dois anéis benzeno, sendo uma amina terciária com dois grupos metila fixada ao átomo básico de nitrogênio estando relacionada à estrutura dos fenotiazídicos (RANG et al., 2012). É definida quimicamente como o cloridrato de 3-10,11-diidro-5-H-dibenzo[a,d] ciclohepteno-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina, trata-se de um composto facilmente solúvel em água e etanol, cujo peso molecular é 313,87 (AMYTRIL®, 2019).

Figura 1- Estrutura química e molecular da amitriptilina:



Fonte: Adaptado de DUARTE et al, 2014; DRUGBANK, 2019.

Apresenta metabolismo hepático, sendo a nortriptilina seu metabólito ativo, tem meia vida de eliminação em média de 15 horas e atinge pico plasmático em quatro horas. Sua excreção é via urinária, em torno de 18% como droga inalterada e pequenas quantidades pelas fezes (LACY et al., 2009; BRUNTON et al., 2012)

Nos últimos anos, a amitriptilina tem sido utilizada clinicamente em diversas terapias fora do escopo farmacológico da mesma, incluindo terapia profilática para enxaqueca, pois além de reduzir a frequência, a duração e a intensidade das crises de dor de cabeça, também

melhora a resposta ao tratamento agudo, sendo que em combinação com exercício aeróbico sua eficácia é maior (SANTIAGO et al., 2014). Essa ação ocorre pela inibição da expressão dos canais de sódio I e RNAm, contribuindo assim para a profilaxia da enxaqueca (YAN et al., 2010).

De acordo com Pelógia e colaboradores, os efeitos da amitriptilina na modulação da dor aguda indicam que, no modelo de lesão neural periférica, a noradrenalina auxilia na transdução do sinal lesivo, na nocicepção induzida pelo processo inflamatório e na modulação da via descendente inibitória da dor (PELÓGIA et al., 2011). Seu emprego também é recomendado na terapia preventiva pré-operatória em pacientes com amputação de membros, cujo propósito é minimizar a intensidade da dor, diminuindo assim o sofrimento dos pacientes (SILVA et al., 2008).

Diretrizes baseadas em evidência recomendam a amitriptilina como tratamento de primeira linha para a fibromialgia, pois ela reduz a dor, fadiga e o escore do Questionário de Impacto da Fibromialgia (FIQ), que avalia a qualidade de vida do paciente, através da inibição da recaptação de monoamina, modulação do receptor e modulação do canal iônico (LAWSON, 2017). Estudo feito com ensaios randomizados mostram que existem algumas evidências para segurar a eficácia em curto prazo da amitriptilina na dosagem de 25 mg/dia em pacientes com fibromialgia, porém, não há evidências em doses mais altas ou por períodos maiores que oito semanas (NISHISHINYA et al., 2008). As doses de amitriptilina sugeridas para atingir o alívio da dor, sono restaurador e relaxamento muscular são bem menores que as necessárias para ação antidepressiva (MORAES, 2012).

Um estudo de revisão realizado por Moore e colaboradores em 2015 revela que, no geral, não há evidências expressivas sobre a eficácia da terapia com amitriptilina para dor neuropática, pois é difícil realizar grandes ensaios randomizados com pacientes em condições específicas de dor, tornando-se improvável comprovar a eficácia do tratamento. Porém, médicos orientam que a amitriptilina deve continuar sendo usada como parte do tratamento de dor neuropática, mesmo tendo ciência de que apenas um pequeno número de pessoas conseguirá um alívio satisfatório da dor. (MOORE et al., 2015.)

Em distúrbios gastrointestinais funcionais, incluindo a dispepsia funcional, a amitriptilina reduziu mais de 90% os sintomas dos pacientes em oito semanas de tratamento, sem desenvolver reação adversa, quando os pacientes não respondiam ao tratamento com famotidina e mosapride (OTAKA et al., 2005).

Muthukumar e colaboradores constataram que a amitriptilina apresentou efeito antibacteriano, sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas como o

Staphylococcus aureus e Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Porém sua mais pronunciada atividade foi frente as Gram-positivas, possivelmente por ter melhor acessibilidade das paredes celulares destas bactérias (MUTHUKUMAR; JANAKIRAMAN, 2014). Mandal e colaboradores também demonstraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que a amitriptilina apresentou sensibilidade frente à *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Vibrio cholerae*, *Micrococcus* spp., *Lactobacillus sporogenes* e *Citrobacter* spp, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas* spp., mas foi resistente a *Enterococcus faecalis*, *Proteus* spp., *Enterobacter cloacae*, *Hafnia* spp. e *Providencias* pp. Apresentou também, atividade antifúngica frente à *Cryptococcus* spp. e *Candida albicans* (MANDAL et al., 2010).

Recente estudo mostra a atividade antitumoral dos antidepressivos tricíclicos, onde a amitriptilina, conseguiu reverter parcialmente as anormalidades do glioblastoma multiforme (BIELECKA-WAJDMAN et al., 2018), um tipo de tumor do SNC que tem praticamente a temozolamida como tratamento de escolha, pois houve um aumento dos mecanismos de resistência à mesma e a outros quimioterápicos (BASSO et al., 2018).

Em modelo murino de sepse, a amitriptilina melhorou a sobrevida, aumentou os níveis de interleucina 10, atenuou uma resposta pró-inflamatória durante a sepse, protegeu contra edema pulmonar, teve resposta leucocitária controlada, tornando-se uma terapia promissora para tratar a inflamação durante o choque séptico. Contudo, é necessário saber o estadiamento da sepse para determinar os pacientes que se beneficiariam mais com o tratamento com a amitriptilina (XIA et al., 2019).

3.6. CLIVAGEM DNA PLASMIDIAL

A clivagem do DNA (ácido desoxirribonucleico) é um processo vital de todos os sistemas vivos (GOWDA et al., 2014). As nucleases sintéticas que clivam os ácidos nucleicos, DNA e RNA (ácido ribonucleico), apresentam muitas aplicações significativas, como por exemplo, a síntese de enzimas diferenciadas e o desenvolvimento de novos agentes antitumorais (TAKASAKI; CHIN, 1994).

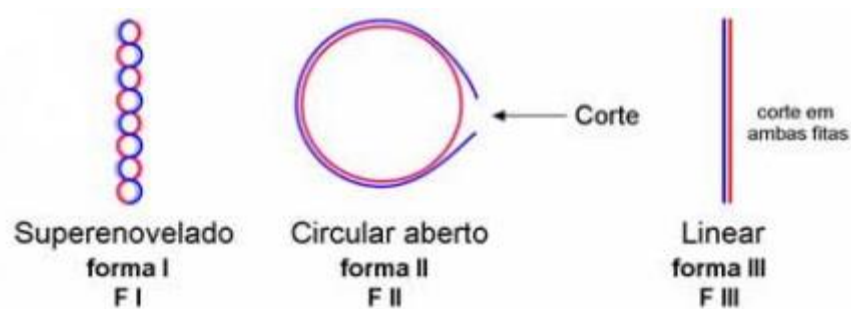
Os antibióticos da classe da fluorquinolonas, como por exemplo, o ciprofloxacino assim como outros agentes antitumorais possuem suas atividades devido ao fato deles provocarem a clivagem do DNA fita dupla, agindo nas enzimas topoisomerases e DNA girases (MUSTAIEV et al., 2014). Devido ao seu mecanismo de ação, as DNA topoisomerases têm-se tornado alvo aos medicamentos antimicrobianos e antitumorais. As DNA topoisomerases são enzimas

encontradas em todos os tipos de células e são essenciais para sua sobrevivência. Estas enzimas podem ser subdivididas em dois tipos: enzimas tipo I, as quais clivam uma fita do DNA e do tipo II, que clivam as duas fitas. As topoisomerases IIA humanas constituem o alvo dos agentes antineoplásicos amplamente usados na clínica, como o etoposídeo, doxorubicina, daunorubicina e mitoxantrona (LIU; LIU; ALBERTS, 1980; POMMIER et al., 2010).

Em geral, a clivagem do DNA pode acontecer de três maneiras: hidrólise do DNA, clivagem fitoquímica e a clivagem oxidativa. A cisplatina, medicamento oncológico derivado da platina, é um exemplo clássico de ligação de DNA e agente de clivagem, onde o DNA danificado provoca mecanismo de reparo do DNA levando a apoptose celular (GOWDA et al., 2014).

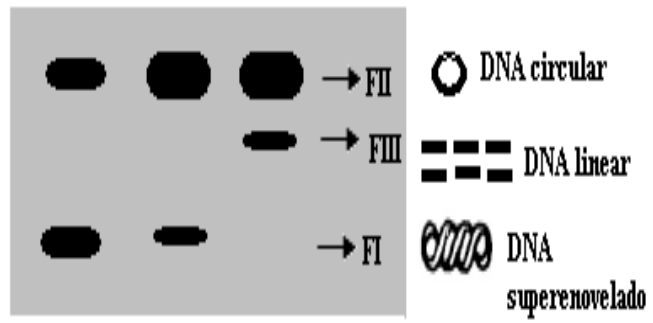
A clivagem do DNA plasmidial, nos mostra que o superenovelamento (forma I) da molécula de DNA tensionada pode sofrer um corte em uma das fitas, desenrolando a super-hélice e consequentemente, passando a forma circular aberta (forma II). Um segundo corte, agora na fita oposta, leva a abertura do DNA circular obtendo a forma linear do plasmídio (forma III). Estas três conformações de DNA plasmidial apresentam mobilidade diferente devido ao grau de compactação das moléculas, tornando possível a completa separação das fitas e quantificação das formas (OLIVEIRA, 2006).

Figura 2-Diferentes formas do DNA plasmidial:



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2006.

Figura 3- Representação das formas do DNA após a clivagem:



Fonte: Adaptado de AUSUBEL et al., 2003.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA:

3.1. MANUSCRITO 1

O manuscrito foi submetido ao periódico Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine (INSS 1678-9849), Qualis Capes B3, na forma de *Letter to the editor*.

Repositioning of drugs: an alternative to cancer treatment

Catrine de Souza Machado^{I,II}, Tacieli Fagundes da Rosa^{I,II}, Angelita Bottega^{I,II}, Marissa Bolson Serafin^{I,II}, Vitoria Segabinazzi Foletto^{I,II}, Silvana Silveira Coelho^{I,II}, Rosmari Horner^{I,II,III}

^IFederal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^{II} Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^{III} Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

* **Corresponding Author:** PhD Rosmari Hörner. Bacteriology Laboratory- Department of Clinical and Toxicological Analysis (DACT)- Health Sciences Center (CCS). Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Building 26, Room 1201, UFSM, Zip code: 97015-900, Phone: (55) 3220-8751; E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

Dear Editor:

Cancer in 2018 was the second leading cause of death in the world (one in six deaths), with 9.6 million deaths¹. High incidence, mortality rates, growth-related aggressiveness, global population aging, increased exposure to risk factors, adverse effects, and chemoresistance² urgently call for new treatment alternatives³. In this way, drug repositioning emerged as an

alternative. The repositioning or redirection of drugs is a way to find new uses outside the scope of the original therapeutic indication for drugs already used in clinical practice⁴.

Drug repositioning is advantageous as it reduces costs in relation to drug development, time to market and presents minimal risk due to the availability of pharmacological, pharmacokinetic, dosage, toxicological and safety data to the patient. It is considered an innovative strategy to benefit patients, since it offers safer and more effective treatment from drugs already approved by regulatory agencies^{5,6,7}.

In Table 1, we present a selection of recent studies about drug repositioning in oncology, in which non-oncological drugs such as antiarrhythmics, psychotropics, antidepressants, anti-inflammatories, antiparasitics, antidiabetics, antibiotics, among others, were investigated for possible repositioning in cancer therapy.

Table 1: Selection of drug repositioning studies with anticancer effect.

Drug	Pharmacological class	New indication	Reference
Albendazole	Antiparasitic	Breast cancer; Antitumor agente	Priotti J <i>et al.</i> , 2018 ⁸ ; Castro LSEPW, 2017 ⁹
Amiodarone	Antiarrhythmic	Ovary câncer	Nagaraj AB <i>et al.</i> , 2018 ¹⁰
Amitriptyline	Tricyclic antidepressant	Glioblastoma multiforme	Bielecka-Wajdman AM <i>et al.</i> , 2018 ¹¹
Azlocillin	Antibiotic	Prostate cancer	Turanli B <i>et al.</i> , 2019 ¹²
Budesonide	Corticosteroid	Lung câncer	Lee WH <i>et al.</i> , 2018 ¹³
Citalopram	Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant	Neuroblastoma	Sakka L <i>et al.</i> , 2017 ¹⁴
Clofazimine	Bactericide	Triple negative breast câncer	Ahmed K <i>et al.</i> , 2019 ¹⁵
Escitalopram	Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant	Neuroblastoma	Sakka L <i>et al.</i> , 2017 ¹⁴

Fluphenazine	Antipsychotic	Breast cancer, brain metastasis	Xu F <i>et al.</i> , 2019 ¹⁶
Imipramine	Tricyclic antidepressant	Glioblastoma multiforme	Bielecka- Wajdman AM <i>et al.</i> , 2018 ¹¹
Indomethacin	Non-steroidal anti- inflammatory	Ovary câncer	Nagaraj AB <i>et al.</i> , 2018 ¹⁷
Ifenprodil	NMDA Receptor Selective Antagonist	Prostate cancer	Turanli B <i>et al.</i> , 2019 ¹²
Isoniazid	Antibiotic	Prostate cancer	Qingzhi Lv <i>et al.</i> , 2019 ¹⁸
Hydroflumethiazide	Diuretic	Prostate cancer	Turanli B <i>et al.</i> , 2019 ¹²
Mebendazole	Anthelmintic	Antitumor agent	Rubin J <i>et al.</i> , 2018 ¹⁹
Metformin	Antidiabetic	Cancer of the endometrium; Breast câncer	Chu D <i>et al.</i> , 2018 ²⁰ ; Guimarães IS <i>et al.</i> , 2018 ²¹
Paroxetine	Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant	Colorectal cancer	Jang WJ <i>et al.</i> , 2019 ²²
Pioglitazone	Hypoglycemic	Lung câncer	Lee WH <i>et al.</i> , 2018 ¹³
Sertraline	Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant	Acute myeloid leucemia	Xia D <i>et al.</i> , 2017 ²³
Sulfamethoxypyridazine	Antimicrobial	Prostate cancer	Turanli B <i>et al.</i> , 2019 ¹²

Prepared by the author, 2019.

The main problems and challenges of cancer treatment are related to the diversity of cancers. Advances in pharmacology and genetics have shown that many older drugs have activity in new oncogenic targets²⁴. The case of antineoplastic therapy has its therapeutic efficacy, in order to direct and direct the disease, to have a higher safety profile than current chemotherapy regimens²⁵.

However, the implementation of drug reutilization faces difficulties, such as the lack of prospective clinical studies²⁴ and financial and regulatory problems for adherence in the clinic²⁶. The Anticancer Fund published in 2016 that cancer drug prices have risen 7 times in

the last 20 years, with new cancer drugs costing more than 100,000 euros per year in treatment. On the other hand, reused drugs cost around 10-1000 euros per year²⁷.

Based on the selection of studies presented, we can suggest that drug repositioning is a promising alternative for oncological treatment, making these therapeutic agents clinically relevant to new targets. This will certainly contribute to oncology needs, with more efficient, effective agents targeting cancer cells exclusively, and at very low prices, compared to immunobiologicals.

Financing: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References:

1. Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO / WHO) Brazil. Available in: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094, accessed April 10, 2019.
2. Globocan. Global cancer incidence. 2018. Available at: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>, accessed April 10, 2019.
3. Wiggins HL, Wymant JM, Solfa F, Hiscox SE, Taylor KM, Westwell AD, *et al.* Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2015; 93: 332–342; DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.014.

4. Ashburn TT , Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 673-683 <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1468>
5. Mehndiratta MM, Wadhai SA, Tyagi BK, Gulati NS, Sinha M. Drug repositioning. *Int J Epilepsy.* 2016; 3: 91-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijep.2016.09.002>
6. Rosa TF, Machado CS, Serafin MB, Bottega A, Foletto, VS, Coelho SS, *et al.* Repositioning or redirection of antidepressant drugs in the treatment of bacterial and fungal infections. *American Journal of Therapeutics*, 2019 (*in press*).
7. Foletto VS, Serafin MB, Rosa TF, Bottega A, Coelho SS, Machado CS, *et al.* Fluoxetine and paroxetine: repositioning as a therapeutic alternative in the treatment of various diseases. *American Journal of Therapeutics*, 2019 (*in press*).
8. Priotti J, Baglioni MV, García A, Rico MJ, Leonardi D, Lamas MC, *et al.* Repositioning of Anti-parasitic Drugs in Cyclodextrin Inclusion Complexes for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19 (8). <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-018-1169-y>
9. Castro, LSEPW. Repositioning study of the anthelmintic albendazole: antitumor and genotoxic effects. [PhD thesis in Biochemistry] Federal University of Santa Catarina, Florianópolis. 2017, 203 p.
10. Nagaraj AB, Joseph P, Kovalenko O, Wang Q, Xu R, DiFeo A. Evaluating class III antiarrhythmic agents as novel MYC targeting drugs in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018; 151 (3): 525-532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.09.019>
11. Bielecka-Wajdman AM, Ludyga T, Machnik G, Gołyszny M, Obuchowicz E. Tricyclic Antidepressants Modulate Stressed Mitochondria in Glioblastoma Multiforme Cells. *Cancer Control.* 2018, 25: 1-9.

12. Turanli B, Zhang C, Kim W, Benfeitas R, Uhlen M, Arga KY, *et al.* Discovery of therapeutic agents for prostate cancer using genome-scale metabolic modeling and drug repositioning. *EBioMedicine*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.009>
13. Lee WH, Loo CY, Ghadiri M, Leong CR, Young PM, Traini D. The potential to treat lung cancer via inhalation of repurposed drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018; 133: 107–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.012>
14. Sakka L, Delétage N, Chalus M, Aissouni Y, Sylvain-Vidal V, Gobron S, *et al.* Assessment of citalopram and escitalopram on neuroblastoma cell lines: Cell toxicity and gene modulation. *Oncotarget*. 2017; 8 (26): 42789-42807; DOI: 10.18632/oncotarget.17050.
15. Ahmed K, Koval A, Xu J, Bodmer A, Katanaev VL. Towards the first targeted therapy for triple-negative breast cancer: Repositioning of clofazimine as a chemotherapy-compatible selective Wnt pathway inhibitor. *Cancer Letters*. 2019; 449: 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.018>
16. Xu F, Xia Y, Feng Z, Lin W, Xue Q, Jiang J, *et al.* Repositioning antipsychotic fluphenazine hydrochloride for treating triple negative breast cancer with brain metastases and lung metastases. *Am J Cancer Res*. 2019; 9(3): 459-478.
17. Nagaraj AB, Wang QQ, Joseph P, Zheng C, Chen Y, Kovalenko O, *et al.* Using a novel computational drug-repositioning approach (DrugPredict) to rapidly identify potent drug candidates for cancer treatment. *Oncogene*. 2018; 37: 403–414. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.328>
18. Lv Q, Wang D, Yang Z, Yang J, Zhang R, Yang X, *et al.* Repurposing antitubercular agent isoniazid for treatment of prostate cancer. *Biomater. Sci.*, 2019, 7, 296–306. <http://dx.doi.org/10.1039/c8bm01189c>

19. Rubin J, Mansoori S, Blom K, Berglund M, Lenhammar L, Andersson C, *et al.* Mebendazole stimulates CD14+ myeloid cells to enhance T-cell activation and tumour cell killing. *Oncotarget*. 2018; 9 (56); DOI: 10.18632/oncotarget.25713.
20. Chu D, Wu J, Wang K, Zhao M, Wang C, Li L, *et al.* Effect of metformin use on the risk and prognosis of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2018; 18: 438. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4334-5>
21. Guimarães IS, Ladislau-Magescky T, Tessarollo NG, Santos DZ, Gimba ERP, Sternberg C, *et al.* Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines. *Pharmacological Reports*. 2018; 70: 409–417; DOI: 10.1016/j.pharep.2017.11.007.
22. Jang WJ, Jung SK, Vo TTL, Jeong CH. Anticancer activity of paroxetine in human colon cancer cells: Involvement of MET and ERBB3. *J Cell Mol Med*. 2019; 23: 1106–1115. DOI: 10.1111/jcmm.14011
23. Xia D, Zhang YT, Xu GP, Yan WW, Pan XR, Tong JH. Sertraline exerts its antitumor functions through both apoptosis and autophagy pathways in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2017.1287358>
24. Shah RR, Stonier PD. Repurposing old drugs in oncology: Opportunities with clinical and regulatory challenges ahead. *J Clin Pharm Ther*. 2019; 44: 6–22. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpt.12759>
25. Dott, J., Abila, B. e Wuerthner, JU. Current Trends in the Clinical Development of Antibody-Drug Conjugates in Oncology. *Pharm Med*, 2018; 32: 259. <https://doi.org/10.1007/s40290-018-0238-6>

26. Verbaanderd C, Meheus L, Huys I, Pantziarka P. Repurposing Drugs in Oncology: Next Steps. *Trends in Cancer*. 2017; 3 (8): 543-546. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.007>

27. *Anticancer Fund*. Repurposing Drugs for Cancer Treatment: Unlocking the Potential. 2016.

3.2. MANUSCRITO 2

O manuscrito foi submetido ao periódico Medicinal Chemistry Research (INSS 1054-2523), Qualis Capes B2, na forma de *Original Article*.

In vitro evaluation of the antibacterial activity of amitriptyline and its synergistic effect with ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and colistin as an alternative in drug repositioning

Catrine de Souza Machado^{I,II}, Tacieli Fagundes da Rosa^{I,II}, Marissa Bolson Serafin^{I,II}, Angelita Bottega^{I,II}, Silvana Silveira Coelho^{I,II}, Vitoria Segabinazzi Foletto^{I,II}, Roberta Filipini Rampelotto^{I,II}, Vinicius Victor Lorenzoni^{III}, Sara de Lima Marion^{IV}, Rosmari Horner^{I,II,V}✉

^I Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^{II} Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^{III} Master of Pharmaceutical Sciences; ^{IV} Student of Pharmacy; ^V Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

✉ PhD Rosmari Hörner: Bacteriology Laboratory. Department of Clinical and Toxicological Analysis (DACT)-Health Sciences Center (CCS). Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS)-Building 26, Room 1201, UFSM. Zip code: 97015-900. Phone: (55) 3220-8751; E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

1. Introduction:

Multidrug resistance to antibiotics has led to a global crisis in the public health worldwide due to the excessive and indiscriminate use of these substances in human medicine as well as veterinary medicine (Morehead et al 2018). This fact represents a significant threat to human health, since antibiotic abuse and misuse increase the risk of lack of an appropriate drug to treat infections (Zawacka et al. 2018).

Several studies have reported this intense growth of bacterial resistance, which is evidenced in the most frequent microorganisms involved in infections, such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* (Pitout et al. 2015; Loureiro et al. 2016; Federico and Furtado 2018).

Given these circumstances, the scientific community has been searching to develop modern antimicrobial therapies to prevent and treat multidrug resistant infections (Abd-El-Aziz et al. 2017), since the development of antibiotics is a slow and costly process. Thus, studies involving drugs that have already been approved by regulatory agencies consist of a beneficial basis for the discovery of new clinical uses.

The investigation of new mechanisms of action, therapeutic use and dosage for these drugs have encouraged researchers since cost, time invested and scientific challenges to discover these drugs create a shortcut between the pharmaceutical laboratory and the clinic (Palit et al. 2013). This way, drug repositioning has become an alternative to the fast identification of drug efficacy to treat infectious diseases (Serafin and Hörner 2018), in other words, to find a new use out of the scope of the original medical indication for existing drugs (Ashburn and Thor 2004; Pushpakom et al. 2018; Xue et al. 2018).

Researchers have investigated the antimicrobial activity of some pharmacological classes of non-antibiotics such as anti-hypertensives, antihistamines, tranquilizers, antipsychotics, anti-inflammatories, since various of these compounds have two to three benzene rings in their chemical structure, what can provide antibacterial activity (Dastidar et al. 1976; Manna and Dastidar 1984; Kristiansen and Blom 1981; Dastidar et al. 1986; Dastidar et al. 1988; Chakrabarty et al. 1989; Dastidar et al. 1995; Kristiansen and Amaral 1997; Annadurai et al. 1998; AsokKumar et al. 2003; Sarkar et al. 2003; Pal et al. 2006; Mandal et al. 2010; Muthukumar and Janakiraman 2014; Rodrigues 2019;). Thus, amitriptyline was chosen

for the study of new studies of antibacterial activity (Mandal et al. 2010; Muthukumar and Janakiraman 2014), becoming a candidate for repositioning for the treatment of infectious diseases, which reduced the time of research and development when the production and development of new medicines (Ashburn and Thor 2004).

Amitriptyline is a tricyclic antidepressant (TAD) which is not commonly chosen as the first-choice drug to treat depression. It has been used as prophylaxis for migraine because it leads to a decrease in the frequency, duration and intensity of migraine attacks in addition to improving the response in acute treatment and showing higher efficacy when combined with aerobic exercises (Santiago et al. 2014). Moreover, it has effects on the modulation of chronic pain, being recommended for the preoperative preventative therapy in patients with limb amputation, because the softening of intensity decreases suffering for patients (Pelógia et al. 2011). The dose of amitriptyline recommended for pain relief, restful sleep and muscle relaxation is smaller than the necessary for the antidepressant action (Moraes 2012). Its antifungal activity (Mandal et al. 2010), ability to partially revert glioblastoma multiforme (GBM) abnormalities (Bielecka-Wajdman et al. 2018), and antimicrobial activity (Mandal et al. 2010; Muthukumar and Janakiraman 2014) have recently been reported.

In addition, there is the fact that antibacterial compounds can frequently have anticancer activity. Mustaev and colleagues have shown that antibiotics of the fluoroquinolone class such as ciprofloxacin as well as other antitumoral agents act because they trigger double-strand DNA cleavage, acting on the topoisomerase enzymes and DNA gyrases (Mustaev et al. 2014).

In light of this, this study has sought to evaluate the *in vitro* bacterial activity of amitriptyline both isolated and in association with standard antibiotics that are already being used in clinical practice, and its probable capacity to cleave plasmid DNA, as an alternative in drug repositioning.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs and bacterial strains:

The drugs amitriptyline (Crystalline Chemicals and Pharmaceuticals Ltda, Irapira, SP, Brazil), ciprofloxacin (Cimed Indústria Farmacêutica Ltda, Pouso Alegre, MG, Brazil), sulfametoazol-trimethoprim (Roche Chemical and Pharmaceutical Products S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and colistin (Sigma-Aldrich Brazil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) were commercially purchased.

Eleven bacterial strains purchased from the *American Type Culture Collection* (ATCC / USA) obtained commercially and forty clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from carbapenemase (KPC) collected from blood, rectal swabs, feces, tracheal secretion and abdominal fluid were used in medical and laboratory units. *Staphylococcus coagulase negative* (SCoN) collected from newborn blood cultures collected at the intensive care unit (ICU-NB) of a university hospital.

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), being registered under the number 38850614.4.0000.5346.

The isolates were identified and characterized in the Laboratory of Microbiology of the referred hospital, and then stored in Tryptone Soy Broth (TSA) with 15% glycerol at -80°C in the bacterial database of the Department of Clinical and Toxicological Analysis of Federal University of Santa Maria, until the accomplishment of this study. The Gram-positive strains used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Micrococcus luteus* ATCC 7468. Gram-negative strains were: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Of the

clinical isolates, 15 were *Klebsiella pneumoniae*, 15 were *Staphylococcus epidermidis*, 6 *Staphylococcus haemolyticus* and 4 *Staphylococcus hominis*.

2.2. Minimum inhibitory concentration (MIC):

The determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of the drugs was determined using the broth microdilution method based on *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) document M100-S2617 (CLSI 2012). Amitriptyline was dissolved and diluted in ethanol to a concentration of 512 µg/mL to obtain stock solutions. To verify the absence of inhibitory activity of the solvent, 10% of methanol and ethanol were used in tests performed in isolation. The bacterial inoculum was performed in sterile saline solution, reaching standard turbidity of the McFarland 0.5 scale. In 96-well U-bottom polystyrene microplates containing Mueller Hinton broth, the drugs were serially diluted 512- 0.5 µg/mL and together with the bacterial inoculum (1×10^5 CFU/well), incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours. After this incubation period, MIC was determined by visual reading as the lowest concentration in which there was no visible bacterial growth of the microorganisms.

2.3. Minimum bactericidal concentration (MBC):

It was performed according to the method described in document M26-A of the *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) in 1999 (NCCLS 1999), with some changes.

After the visual reading of the MIC, approximately 10 µL of the contents of the wells where there was no visible bacterial growth and of the last well where there was visible bacterial growth (positive control) were removed. This volume was seeded into petri dishes containing Mueller Hinton agar, which were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24/48 hours. After incubation, the MBC was determined as the lowest concentration required to kill the microorganism.

2.4. Interpretation of the synergistic effect:

To standardize the interpretation of the synergistic effect of the drugs, the sum of the fractional inhibitory concentration indexes (FICI), whose interpretation was classified as "synergic" ($FICI \leq 0.5$), "without interaction" ($FICI > 0.5$ and ≤ 4.0) and "antagonistic" ($FICI > 4.0$) (Konaté et al. 2012; Odds 2003). This method shows us that combinations of agents may exert greater inhibitory effects than the sum of their effects alone (synergism) or less than the sum of their effects alone (antagonism) (Odds 2003).

2.5. Tolerance level:

Tolerance levels of the ATCC standard strains and the MDR clinical isolates against amitriptyline were determined according to Das et al., Using a standard method using the following formula (Das et al. 2016):

$$\text{Tolerance} = \text{MBC} / \text{MIC}.$$

2.6. Statistical analysis:

Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test using *GraphPad Prism 7* software (GraphPad, San Diego, CA). Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

2.7. Plasmid DNA cleavage:

Plasmid DNA cleavage analysis was performed with the aim of analyzing the chemical nuclease potential of amitriptyline. Thus, plasmid DNA inserted in *Escherichia coli* strain (puC 18) was extracted using the large-scale preparation of plasmid DNA, described in the protocol book of Ausubel and collaborators (Ausubel et al. 2003). After extraction of plasmid DNA, it was incubated with amitriptyline at concentrations of 3.75mM, 1.875mM and 0.375mM. Then the DNA and the drug were incubated in microtubes for 24 hours at 37°C and 50°C at two different pHs: 7.4 and 8.0. After the incubation period, 4µL loading buffer was added. For

detection of plasmid DNA cleavage, 0.8% agarose gel electrophoresis was used, and the occurrence of cleavage was identified through the analysis of the DNA bands, where the occurrence of the decrease of this band indicates the form I of the DNA (supercoiled), the increase to form II (open circular), and in the case of a highly efficient cleavage, the formation of form III (linear).

3. Results and Discussion:

Amitriptyline is a non-antibiotic drug whose structure is closely related to phenothiazines since it is a tertiary amine with two methyl groups attached to the basic nitrogen atom (Rang & Dale 2012) (Figure 1). Several non-antibiotics show antibacterial activity because they have specific chemical groups in their structure (Muthukumar and Janakiraman 2014), a fact that has led to the acknowledgement of phenothiazines as a drug class with high potential for antimicrobial activity. These drugs are used to treat pathologies of non-infectious aetiology, however they alter cell permeability and show to have broad spectrum antimicrobial activity (Kristiansen and Amaral 1997).

A study developed with 253 bacterial strains, being 72 Gram-positive and 181 Gram-negative, has shown that amitriptyline exerted antibacterial activity both against Gram-positive and Gram-negative strains, with MIC 25 µg/mL for 28 strains, 50 µg/mL for 16 strains, 100 µg/mL for 55 strains, 200 µg/mL for 86 strains, and 68 strains with MIC higher than 200µg/mL (Mandal et al. 2010). These results were lower than the results found in our study, especially when compared to the MICs of amitriptyline obtained in the strains of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (MIC 64µg/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 7468 (MIC 32µg/mL) and the clinical isolates *Staphylococcus epidermidis*-25 (MIC 64µg/mL) and *Staphylococcus epidermidis*-27 (MIC 32µg/mL) shown in Table 1.

Muthukumar and colleagues have detected that amitriptyline inhibited the bacterial growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, but the most considerable activity was evidenced in Gram-positive strains, where the MIC varied between 1–2 mg/mL possibly due to the accessibility to their cell wall (Muthukumar and Janakiraman 2014), which is less complex and has a thick layer of peptidoglycan. Thus, antibacterial activity could be associated to the inhibition of peptidoglycan synthesis that could lead to cell death (Yeo et al. 2013), corroborating our study in which the antibacterial activity of amitriptyline alone was better in the ATCC strains of Gram-positive microorganisms (Table 1).

The antibiotics used to achieve the synergic effect with amitriptyline were chosen through their clinical importance: ciprofloxacin and sulfametoaxol-trimethoprim are widely used broad spectrum antimicrobials and colistin, as a drug of choice for the treatment of MDR (Silva 2010; Naeem et al. 2016; Olaitan et al. 2016). In our study, the combination of amitriptyline with antibiotics showed better antibacterial activity against the tested strains when compared to its isolated activity. Moreover, it was possible to observe that *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (MIC 64 µg/mL), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (MIC 128 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MIC 64 and 128 µg/mL) combined with the antibiotics ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim, the MIC was lower than amitriptyline alone, evidencing the occurrence of a synergistic effect of the combination of a non-antibiotic with an antibiotic drug. It was also possible to observe that the highest antibacterial activity occurred against the carbapenem-producer clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. The combination of amitriptyline with colistin showed MIC 4 µg/mL against two isolates, *Klebsiella pneumoniae*-8 and *Klebsiella pneumoniae*-10, evidencing strong antibacterial activity (Table 3). Colistin represents a “last-resource” antibiotic in the treatment of acute infections caused by MDR Gram-negative microorganisms such as carbapenem-resistant *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Enterobacteriaceae* (Olaitan et al. 2016).

The interpretation analysis of the effect of amitriptyline combination with the antibiotics through the FICI has shown the occurrence of synergism in two combinations with ciprofloxacin (FICI: 0,5 and 0,375), and two combinations with sulfamethoxazole-trimethoprim (FICI: 0,375 and 0,3125) (Table 1). Moreover, when amitriptyline was associated with colistin (Table 3), the occurrence of six synergistic events was observed (FICI: 0,25; 0,25; 0,25; 0,5; 0,25; 0,5).

The statistical analysis has shown that amitriptyline interfered in the activity of *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* ATCC 25923, *S. hominis*-23, *S. epidermidis*- 32, 34, 38; *S. haemolyticus*- 36, *K. pneumoniae*-2, 12, 16, 17, 18 and 20, as shown in Figure 2. MIC values decreased significantly, leading us to assume that the association of amitriptyline with the studied antibiotics would be promising for therapeutic use, since its efficacy increased against standard strains as well as clinical isolates.

The combinations of drugs are proposed as a way to fight the resistance of multi-resistant microorganisms, enhance the spectrum of activity of antimicrobials and consequently trigger synergistic effects. A study has shown that drug combinations with non-antibiotics have become a relevant alternative to extend and increase the therapeutic efficacy of drugs against extensively drug-resistant microorganisms (XDR) such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumonia* (Schneider et al. 2017). They have also become a hope for the development of antimicrobials against resistant microorganisms, since they tend to decrease the side effects on the intestine microbiota (Ejim et al. 2011).

It can be seen from the resistance profile (Table 5) that all clinical isolates are MDR strains, since they present resistance to most of the antibiotics used for testing, and in 13 strains were not sensitive to any antibiotic used tested. Also, 28 of the 40 clinical isolates are blood

samples from patients with septicemia admitted to the intensive care unit (ICU), 15 in the adult ICU and 25 in the newborn ICU.

Furthermore, a variety of non-antibiotic drugs can kill microorganisms and decrease the MIC of antibiotics when associated with them in several cases of acute infections (Brown 2015). In relation to bactericidal activity, amitriptyline was effective when associated with ciprofloxacin (Table 2) and colistin (Table 3). In the MBC 64 μ g/mL, the combination of amitriptyline and ciprofloxacin was able to kill the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis*-1 and *Staphylococcus epidermidis*-27; as for the isolates of *Klebsiella pneumoniae*-11 and *Klebsiella pneumoniae*-15, the concentration was 16 μ g/mL, evidencing a bactericidal synergistic effect on both microorganisms.

Thus, the tolerance level of amitriptyline has been verified through the MBC/MIC ratio that reflects the bactericidal capacity of the analysed compound, which can be interpreted as bacteriostatic when ≥ 16 , and bactericidal when ≤ 4 . Bactericidal agents are characterized for killing total microbes, whereas bacteriostatic agents simply inhibit bacterial growth (Das et al. 2016). In our study, amitriptyline performed as a bactericidal agent against both ATCC strains and MDR clinical isolates (Table 4).

Furthermore, in this study we sought to investigate whether amitriptyline was able to cleave plasmid DNA (pUc18), and the cleavage occurred in concentrations 3,75mM and 1,875mM in pH 7,4 at 50°C (Figure 3). It did not occur in the lowest concentration (0,375mM), as well as in the concentrations at 37°C, and in this case, it caused cell damage to the DNA. DNA cleavage is a vital process in all living systems, and for this reason, several drugs can cause long-lasting damage to the cell DNA. The cleavage capacity of a drug can occur in three ways: DNA hydrolysis, photochemical cleavage and oxidative cleavage. Cisplatin, an oncological drug derived from platin, is a classic example of DNA and cleavage agent linkage,

where the damaged DNA triggers the repair mechanism of DNA leading to cell apoptosis (Gowda et al. 2014).

4. **Conclusion:**

The results obtained in the present study allow us to infer that amitriptyline showed significant antibacterial activity, and may be related to its chemical structure containing two benzene rings and its similarity to the structure of phenothiazines that can provide modification in the cellular permeability of bacteria. However, when associated to the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and colistin, amitriptyline showed the highest activity, especially with colistin. Thus, the synergistic effect observed of a non-antibiotic with an antibiotic drug can be promising to treat MDR, allowing us to suggest this association as an option for drug repositioning. Nevertheless, additional studies are still necessary to understand the probable mechanisms of action involved in this association as well as its toxicity, among other effects, for its safe use and application in clinical practice.

Acknowledgements (Funding): This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest: Authors report no declarations of interest.

5. **References:**

- Abd-El-Aziz AS, Agatemor C, Etkin N (2017) Antimicrobial resistance challenged with metal-based antimicrobial macromolecules. *Biomaterials*. 118: 27 e 50.
- Annadurai S, Basu S, Ray S, Dastidar SG, Chakrabarty NA (1998). Antibacterial activity of the anti-inflammatory agente diclofenac sodium. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 86-90.
- Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 673–683.

AsokKumar K, Ganguly K, Mazumdar K, Dutta NK, DastidarSG, Chakrabarty NA (2003). Amlodipine: a cardiovascular drug with power ful antimicrobial property. *Acta Microbiologica Polonica*. 52 (3): 285-292.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, StruhlK (2003) Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons Inc*. 5. ed.

Bielecka-Wajdman AM, Ludyga T, Machnik G, Gołyszny M, Obuchowicz E (2018) Tricyclic Antidepressants Modulate Stressed Mitochondria in Glioblastoma Multiforme Cells. *Cancer Control*. 25: 1-9.

Brown D (2015) Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat Rev*. 14: 821-832.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: CLSI.

Chakrabarty AN, Acharya DP, Niyogi D, Dastidar SG (1989).Drug interaction of some non conventional antimicrobial chemotherapeutic agentes with special reference to promethazine. *Indian J. Med. Res*. 89: 233-237.

Das B, Mandal D, Dash SK, Chattopadhyay S, Tripathy S, Dolai DP, Dey SK, Roy S(2016) Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Infectious Diseases: Research and Treatment*. 9, 11–19.

Dastidar SG, Saha PK, Sanyamat B, Chakrabarty AN (1976). Antibacterial activities of Ambodryl and Benadryl. *J. Appl. Bacteriol*. 41, 209-214.

Dastidar SG, Mondal U, Niyogi S, Chakrabaty NA (1986).Antibacterial property of methyl-DOPA and development of cross resistance in m-DOPA mutants. *Indian J. Med. Res*. 84, 142-147.

Dastidar SG, Das S, Mookerjee M, Chattopadhyay D, Ray S, Chakrabarty AN (1988). Antibacterial activity of local anaesthetics procaine and lignocaine. *Indian J. Med. Res.* 87, 506-508.

Dastidar SG, Chaudhuri A, Annadurai S, Ray S, Mookherjee M, Chakrabarty AN (1995). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial action of fluphenazine. *J. Chemother.* 7, 201-206.

Duarte EH, Gorla FA, Sartori ER and Tarley CRT (2014) Voltammetric determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations with boron doped diamond electrode exploiting measurements in acid medium. *New Chemistry.* 37 (9): 1496-1502.
<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140225>

Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD (2011) Combinations of antibiotics and non antibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature chemical biology.* 7: 348–350.

Gowda KRS, Mathew BB, Sudhamani CN, Naik HSB (2014) Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *J Biomed and Biotechnol.* 2(1): 1-9.

Federico MP, Furtado GH (2018) Immediate and later impacts of antimicrobial consumption on carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp. in a teaching hospital in Brazil: a 10-year trend study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 37(11): 2153-2158.

Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RRR, Hilou A, Souza A, Dicko MH, M'Batchi B (2012) Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 11: 1-12.

Kristiansen JE, Amaral L (1997) The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 40: 319–327.

Kristiansen JE, Blom J (1981). Effect of Chlorpromazine on the ultra structure of *Staphylococcus aureus*. *Acta Path. Microbiol.* 89: 399-405.

Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E (2016) The use of antibiotics and bacterial resistance: brief notes on its evolution. *Portuguese Journal of Public Health*. 34(1): 77–84.

Mandal A, Sinha C, Jena AK, Ghosh S, Samanta A (2010) An investigation on *in vitro* and *in vivo* antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. *Braz J Microbiol*. 41(3): 635-45.

Manna KK, Dastidar SG (1984).The anti-hypertensive drug propranolol hydrochloride (carditap): its anti-bacterial property. In: *Proceeding sof the 6th National Congress of the Indian Association of Medical Microbiologists (IAMM)*.137-141.

Moraes FLL (2012) Evaluation of antidepressants as an adjuvant in the treatment of cancer pain. [Completion of course work]. Paraíba: State University of Paraíba, Center for Biological and Health Sciences.

Morehead MS, Scarbrough C (2018) Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Prim Care*. 45(3): 467-484.

Mustaev A, Malik M, Zhao X, Kurepina N, Luan G, Oppegard LM, Hiasa H, Marks KR, Kerns RJ, Berger JM, Drlica K(2014) Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: Two modes of drug binding. *J. Biol. Chem*. 289(18): 12300 –12312.

Muthukumar V, Janakiraman K (2014) Evolution Of Antibacterial Activity Of Amitriptyline Hydrochloride. *International Journal of ChemTech Researc*. 6(11): 4878-4883.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents.Approved Guideline M26-A. Wayne, USA: NCCLS.

Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K (2016) The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules* 2016, 21, 268; doi: 10.3390 / molecules21040268

Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 52 (1): 1.

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM (2016) Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents.* 47(1): 1-3.

Pal T, Dutta NK, Mazumder K, Dasgupta A, Jeyaseeli L, Dastidar SG (2006). Assessment of antibacterial activity of the cardiovascular drug Nifedipine. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 6(2), 126-133.

Palit PP, Mandal SC, Mandal NB (2013) Reuse of Old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as antimicrobial Agents: a New Emerging Therapeutic Approach. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.* A. Méndez-Vilas, Ed. 1883-1892.

Pelógia NCC, Machado BG, Almeida FCB, Constantino E, Pires OC (2011) Effects of amitriptyline on the modulation of acute pain in rats submitted to sciatic nerve ligation. *Journal of Pain.* 12(3): 245-249.

Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L (2015) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 59: 5873–5884.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doing A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M (2018). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery.* doi: 10.1038 / nrd.2018.168

Rang & Dale Farmacologia (2012) 7ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, XXV, 778p.

Rodrigues SA. Chlorpromazine, C₁₇H₁₉N₂SCl. *Interativa New Chemistry.* Available at: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.264> Accessed on: 18 July 2019.

Santiago MDS, Carvalho DS, Gabbai AA, Pinto MMP, Moutran ARC, Villa TR (2014) Amitriptyline and aerobic exercise or amitriptyline alone in the treatment of chronic migraine: a randomized comparative study. *Arq Neuropsiquiatria*. 72: 851-855.

Sarkar A, Kumar KA, Dutta NK, Chakraborty P, Dastidar SG(2003). Evaluation of in vitro and in vivo antibacterial activity of dobutamine hydrochloride. *Indian J. Med. Microbiol.* 21(3), 172-178.

Schneider EK, Reyes-Ortega F, Velkov T, Li J (2017) Antibiotic–non-antibiotic combinations for combating extremely drug-resistant Gram-negative ‘superbugs’. *Essays in Biochemistry*. 61: 115–125.

Serafin MB, Hörner R (2018) Drug repositioning, a new alternative in infectious *Diseases.braz j infect dis.* 22 (3): 252–256.

Silva, RF e. Chapter 8 - Fungal infections in immunocompromised animals. *J. bras. pneumol.* São Paulo, v.36, n.1, p.142-147, Feb. 2010. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132010000100019&lng=en&nrm=iso Access on 19 July 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132010000100019>

Xue H, Li J, Xie H, Wang Y (2018) Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*. 14(10): 1232-1244. doi: 10.7150/ijbs.24612

Zawacka K, Love W, Lanzas C, Booth JG, Gröhn YT (2018) Inferring the interaction structure of resistance to antimicrobials. *Preventive Veterinary Medicine*.152: 81–88.

Yeo CY, Sim JH, Khoo CH, Goh ZJ, Ang KP, Cheah YK, Fairuz ZA, Halim SNBA, Ng SW, Seng HL, Tiekink ERT(2013) Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane-gold(O-alkylthiocarbamates), Ph₃PAu[SC(OR)=N(p-tolyl)] (R = Me, Et and iPr). *Gold Bull.* 46(3):145-52.

Table 1: Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of amitriptyline, ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim, and Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and its associations against standard strains and clinical MDR isolates.

Bacterial Strains	MIC (µg/mL)						
	AMI	CIP	AMI+CIP	FICI	ST	AMI+ST	FICI
Bacterial Strains ATCC							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	512	1	128	128,25	256	128	0,75
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128	1	128	129	8	128	17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	0,25	128	513	1	128	129
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128	0,5	128	257	4	128	33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64	512	128	2,25	1024	64	1,0625
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	512	512	128	0,5	1024	128	0,375
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	512	1	128	128,05	1	128	128,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128	2	128	65	32	128	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	128	4	128	33	1	128	129
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	32	64	128	6	256	512	18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	512	256	64	0,375	256	128	0,75
Clinical isolates							
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 1	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 2	512	512	256	1	512	512	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 3	256	512	128	0,75	512	128	0,75
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 4	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 5	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 6	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 9	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 10	256	512	256	1,5	512	256	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 11	512	512	256	1	512	512	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 12	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 13	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 14	512	512	256	1	512	256	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 15	512	512	256	1	512	512	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 16	128	256	64	0,75	256	128	1,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 17	128	256	128	1,5	512	512	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 18	128	512	64	0,625	512	64	0,625
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -19	128	512	128	1,25	512	128	1,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 20	128	256	128	1,5	512	128	1,25
<i>Staphylococcus hominis</i> - 21	128	512	64	0,625	512	64	0,625
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 22	128	256	256	3	512	256	2,5
<i>Staphylococcus hominis</i> - 23	128	256	64	0,75	512	32	0,3125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 24	128	512	128	1,25	512	128	1,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 25	64	256	64	1,25	512	64	1,125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 26	128	256	128	1,5	512	128	1,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 27	32	256	16	0,5625	512	16	0,53125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 28	512	512	256	1	512	256	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -29	256	512	128	0,75	128	256	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 30	512	512	256	1	512	256	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -31	128	256	128	1,5	512	64	0,625
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 32	512	512	128	0,5	256	256	1,5
<i>Staphylococcus hominis</i> - 33	256	512	128	0,75	256	128	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 34	512	256	128	0,75	512	128	0,5
<i>Staphylococcus hominis</i> - 35	512	512	256	1	512	256	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -36	512	512	128	0,5	512	128	0,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -37	256	512	256	1,5	512	256	1,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 38	512	128	128	1,25	512	128	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 39	128	512	128	1,25	512	128	1,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 40	256	512	128	0,75	512	256	1,5

AMI, amitriptyline; CIP, ciprofloxacin; ST, sulfamethoxazole-trimethoprim; AMI+CIP, combination of amitriptyline and ciprofloxacin; AMI+ST, combination of amitriptyline and sulfamethoxazole-trimethoprim; FICI, Index of Fractional Inhibitory Concentration; MDR, multidrug-resistant clinical isolates.

Prepared by the author, 2019.

Table 2: Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of amitriptyline, ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim and their associations against standard strains and clinical MDR isolates.

Bacterial Strains	MBC ($\mu\text{g/mL}$)				
	AMI	CIP	AMI+CIP	ST	AMI+ST
Bacterial Strains ATCC					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	1	256	256	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	512	>512	256	>512	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512	2	128	>512	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	256	1	256	>512	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	512	>512	256	>1024	256
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	-	>512	128	>1024	256
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	>512	128	>512	512
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	1	256	>512	512
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	256	>512	256	>512	256
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	512	>512	512	>512	>512
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	>512	64	>512	256
Clinical isolates					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 1	>512	>512	>512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 2	-	-	512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 3	512	>512	512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 4	>512	-	512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 5	>512	-	512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 6	512	-	>512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	512	-	256	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	>512	-	512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 9	>512	-	512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 10	512	-	512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 11	-	>512	512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 12	>512	>512	512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 13	>512	-	512	-	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 14	>512	-	512	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 15	>512	-	256	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 16	128	>512	64	>512	128
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 17	256	>512	256	-	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 18	128	>512	128	>512	256
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> –19	256	>512	128	>512	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 20	128	>512	256	>512	512
<i>Staphylococcus hominis</i> - 21	256	512	128	>512	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 22	256	>512	256	>512	256
<i>Staphylococcus hominis</i> - 23	256	>512	256	-	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 24	256	>512	128	>512	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 25	128	>512	128	-	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 26	256	>512	256	>512	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 27	128	>512	64	>512	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 28	512	512	512	512	512
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> –29	512	-	512	>512	>512
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 30	512	-	512	-	512
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> –31	256	>512	256	>512	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 32	512	-	512	>512	>512
<i>Staphylococcus hominis</i> - 33	>512	-	128	>512	256
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 34	256	>512	512	>512	>512
<i>Staphylococcus hominis</i> - 35	512	>512	>512	>512	>512
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> –36	512	>512	>512	>512	>512

<i>Staphylococcus haemolyticus</i> –37	>512	>512	>512	-	>512
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 38	>512	512	>512	>512	>512
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 39	512	>512	>512	>512	512
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 40	>512	>512	>512	>512	>512

AMI, amitriptyline; CIP, ciprofloxacin; ST, sulfamethoxazole-trimethoprim; AMI+CIP, combination of amitriptyline and ciprofloxacin; AMI+ST, combination of amitriptyline and sulfamethoxazole-trimethoprim; MDR, multidrug-resistant clinical isolates.

Prepared by the author, 2019.

Table 3- Minimum inhibitory concentrations (MIC) of amitriptyline, alone and in combination with colistin against clinical isolates MDR and FICI and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

Bacterial Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				MBC ($\mu\text{g/mL}$)		
	AMI	COL	AMI+COL	FICI	AMI	COL	AMI+COL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 2	512	512	64	0,25	-	-	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 3	256	256	256	1,5	512	-	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 4	512	512	16	1,03	>512	16	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 6	512	512	16	0,53	512	32	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	512	512	16	0,53	512	32	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	512	512	4	1	>512	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 9	512	512	32	1,06	>512	32	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 10	256	256	4	1,01	512	64	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 11	512	512	16	1,03	-	64	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 12	512	512	64	0,25	>512	-	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 13	512	512	8	1,01	>512	8	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 14	512	512	16	1,03	>512	32	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 15	512	512	8	1,01	>512	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 16	512	512	64	0,25	-	-	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 17	512	512	128	0,5	-	-	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 18	512	512	64	0,25	-	-	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 19	512	512	128	0,5	-	-	128

AMI, amitriptyline; COL, colistin; AMI+COL, combination of amitriptyline and colistin; FICI, Index of Fractional Inhibitory Concentration; MDR, multidrug-resistant clinical isolates.

Prepared by the author, 2019.

Table 4 - Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and determination of tolerability level (CBM / MIC) of amitriptyline against standard strains and clinical isolates.

Bacterial Strains	MIC AMI	MBC AMI	Tolerance index	Interpretation
Bacterial Strains ATCC	(µg/mL)	(µg/mL)	(MBC/MIC)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	512	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128	512	4	Bactericidal
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	512	4	Bactericidal
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64	512	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	512	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	512	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	128	256	2	Bactericidal
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	32	512	16	Bacteriostatic
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	512	-	-	-
Clinical isolates				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 1	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 2	512	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 3	256	512	2	Bactericidal
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 4	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 5	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 6	512	512	1	Bactericidal
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	512	512	1	Bactericidal
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 9	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 10	256	512	2	Bactericidal
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 11	512	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 12	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 13	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 14	512	>512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 15	512	>512	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 16	128	128	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 17	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 18	128	128	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 19	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 20	128	128	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus hominis</i> - 21	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 22	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus hominis</i> - 23	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 24	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 25	64	128	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 26	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 27	32	128	4	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 28	512	512	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 29	256	512	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 30	512	512	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - 31	128	256	2	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 32	512	512	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus hominis</i> - 33	256	>512	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 34	512	256	0,5	Bactericidal
<i>Staphylococcus hominis</i> - 35	512	512	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -36	512	512	1	Bactericidal
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> -37	256	>512	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 38	512	>512	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 39	128	512	4	Bactericidal
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 40	256	>512	-	-

Prepared by the author, 2019.

Table 5-Resistance profile of clinical isolates of KPC and SCoN.

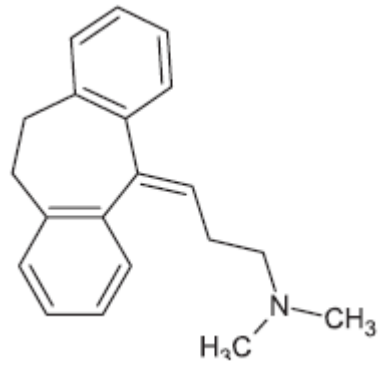
Clinical isolates	Clinical Material	Sensitivity	Resistance
<i>Klebsiella pneumoniae-1</i>	Stool	AMI, COL, GEN, POL, TOB	AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFTA, CEFU, CEFTR, CIP, ERT, IMI, MER, PIP/TAZ, TIG
<i>Klebsiella pneumoniae-2</i>	Rectal swab	AMI, COL	AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFTA, CEFU, CEFTR, CIP, GEN, ERT, IMI, MER, PIP/TAZ,
<i>Klebsiella pneumoniae-3</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-4</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-5</i>	Blood	Not sensitive to any antibiotic	AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-6</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-7</i>	Tracheal secretion	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-8</i>	Blood	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-9</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-10</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-11</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-12</i>	Abdominal fluid	Not sensitive to any antibiotic	AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-13</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-14</i>	Rectal swab	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, AMP, CEFE, CEFU, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER,
<i>Klebsiella pneumoniae-15</i>	Blood	Not sensitive to any antibiotic	AMI, AMP/SUL, CEFE, CEFTA, CEFTR, CIP, COL, GEN, ERT, IMI, MER, PIP/TAZ, TIG
<i>Staphylococcusepidermidis- 16</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus haemolyticus- 17</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 18</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus haemolyticus – 19</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 20</i>	Blood	LNZ, TEL, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus hominis- 21</i>	Blood	LNZ, TEL, TIG, VAN	CLI, ERY, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 22</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus hominis- 23</i>	Blood	LNZ, TEL, TIG, VAN	CLI, ERY, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 24</i>	Blood	LNZ, SUT, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN
<i>Staphylococcusepidermidis- 25</i>	Blood	LNZ, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 26</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 27</i>	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis- 28</i>	Blood	GEN, LNZ, TEL, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus haemolyticus -29</i>	Blood	CLI, LNZ, TEL, TIG, VAN	CIP, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT

<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 30	Blood	CLI, ERY, LNZ, TEI, TIG, VAN	CIP, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus</i> haemolyticus – 31	Blood	CIP, LNZ, NOR, SUT, TEI, TIG, VAN	CLI, ERY, OXA, PEN
<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 32	Blood	CIP, LNZ, NOR, SUT, TIG, VAN	CLI, ERY, GEN, OXA, PEN
<i>Staphylococcus</i> hominis- 33	Blood	GEN, LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 34	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus</i> hominis- 35	Blood	GEN, LNZ, TEI, TIG, VAN	CLI, ERY, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcus</i> haemolyticus – 36	Blood	CLI, LNZ, SUT, TEI, TIG, VAN	CIP, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN
<i>Staphylococcus</i> haemolyticus – 37	Blood	CLI, LNZ, SUT, TEI, TIG, VAN	CIP, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN
<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 38	Blood	CLI, ERY, LNZ, TEI, TIG, VAN	CIP, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 39	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT
<i>Staphylococcusepidermidis</i> - 40	Blood	LNZ, TIG, VAN	CIP, CLI, ERY, GEN, NOR, OXA, PEN, SUT

AMI, amikacin; AMP / SUL, ampicillin - sulbactam; AMP, ampicillin; CEFE, cefepime; CEFU, cefuroxime; CEFTA, ceftazidime; CEFTR, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; COL, colistin; GEN, gentamycin; ERI, erythromycin; ERT, ertapenem; IMI, imipenem; LNZ, linezolid; MER, meropenem; NOR, norfloxacin; OXA, oxacillin; PEN, penicillin; PIP / TAZ, piperacillin - tazobactam; POL, polymyxin B; SUT, sulfamethoxazole - trimethoprim; TEI, teicoplanin; TIG, tigecycline; VAN, vancomycin.

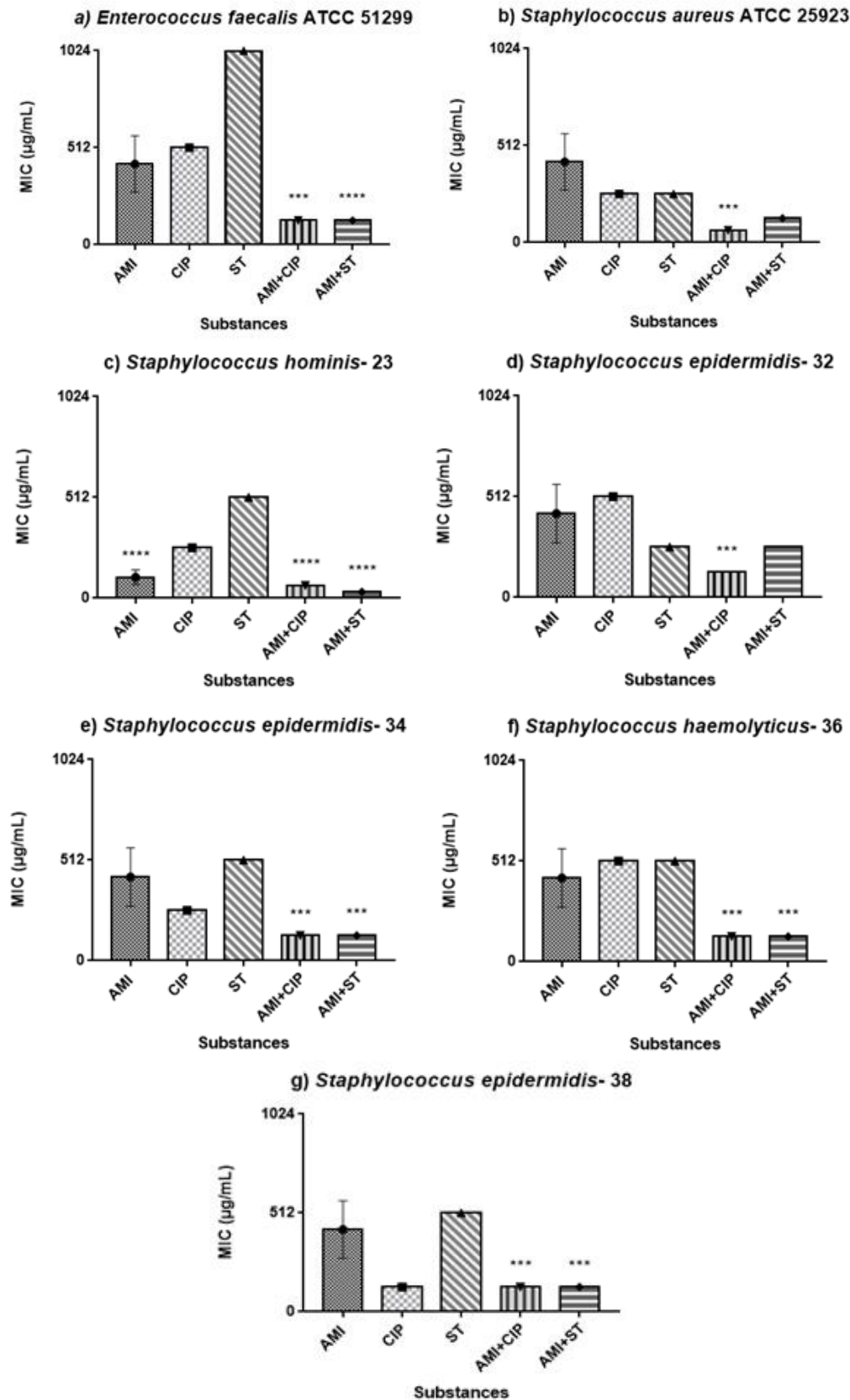
Prepared by the author, 2019.

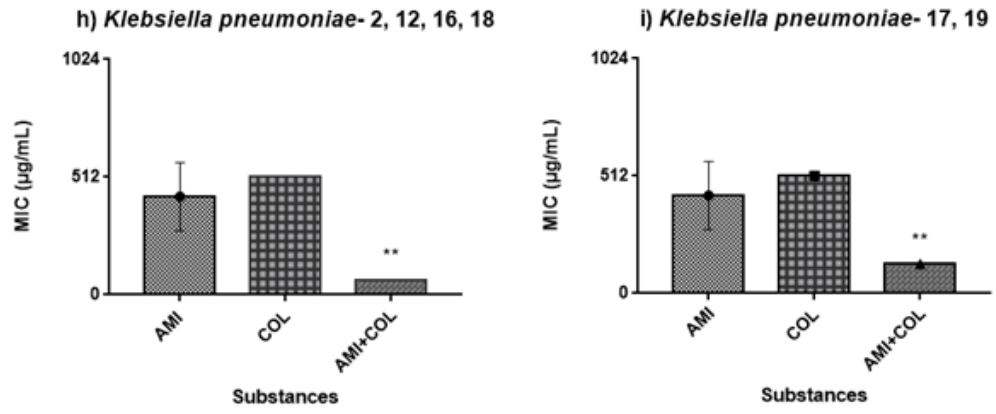
Figure 1. Chemical structure of amitriptyline.



Source: Adapted from Duarte EH, Gorla FA, Sartori ER et al, 2014.

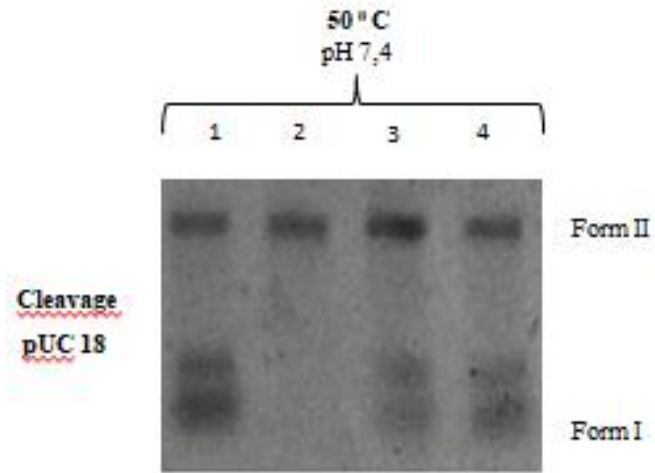
Figure 2. Comparison of amitriptyline in combination with ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim and colistin in standard ATCC strains and clinical isolates MDR.





Prepared by the author, 2019.

Figure 3. Agarose gel with amitriptyline showing a cleavage of plasmid DNA.



Prepared by the author, 2019.

4. DISCUSSÃO GERAL

A gravidade do problema de resistência bacteriana e cancerígena, e a sua preocupante ameaça a saúde pública mundial, representam um estímulo para o estudo do reposicionamento de drogas. Com isso, primeiramente, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o redirecionamento de fármacos, buscando suas vantagens e pesquisas já elucidadas para a prática clínica. A partir disso, buscou-se investigar a atividade biológica *in vitro* e a capacidade de clivar o DNA plasmidial da amitriptilina, um ADT muito utilizado para diversas patologias. Inicialmente, verificou-se a atividade antibacteriana através da determinação da CIM da amitriptilina isolada. A presença de atividade antibacteriana frente a algumas cepas ATCC e isolados clínicos MDR levou à investigação do sinergismo de fármacos, com antibióticos já utilizados na prática clínica. Obtivemos um aumento significativo na atividade antibacteriana da amitriptilina associada aos antibióticos ciprofloxacino, sulfametoxazol-trimetropima e colistina. Apresentou melhor atividade associada à colistina frente a isolados clínicos provenientes do HUSM de pacientes com KPC. Este cenário nos motivou na pesquisa, levando-nos a verificar e a comprovar a capacidade de clivagem do DNA da amitriptilina, como potencial mecanismo.

O reaproveitamento de drogas não antibióticos já empregadas na clínica tem sido utilizado na busca de efeitos antibióticos eficazes e como uma alternativa para o tratamento de infecções graves (ASHBUM; THOR, 2004; PALIT; MANDAL; MANDAL, 2013). A atividade antibacteriana dos medicamentos chamados, não-antibióticos, esta relacionada com a presença de anéis benzênico em sua estrutura (KRISTIANSEN; AMARAL, 1997; MUTHUKUMAR; JANAKIRAMAN, 2014). Quando usados associados a antimicrobianos, estas combinações trazem vantagens ao tratamento de doenças infecciosas, como o aumento da atividade antibacteriana, aumento do espectro de ação, diminuição da resistência bacteriana e uso moderado de antibióticos (KRISTIANSEN; AMARAL, 1997; EJIM et al., 2011; ZHENG; SUN; SIMEONO, 2018).

A prática do reposicionamento de fármacos é vantajosa, reduz os custos de desenvolvimento da droga, diminui o tempo de introdução no mercado, diminui os riscos relacionados a farmacologia, porque estes aspectos já são completamente elucidados pelo laboratório que desenvolveu o fármaco. Estudo mostra que o reposicionamento de drogas é responsável por aproximadamente 30% dos novos medicamentos e vacinas aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos últimos anos (JIN; WONG, 2014).

Um medicamento reposicionado não precisa dos seis a nove anos iniciais comumente necessários para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois vai diretamente para testes

pré-clínicos e ensaios clínicos, reduzindo assim o risco e os custos da pesquisa (ASHBURN, THOR, 2004). As taxas de compostos reaproveitados que chegam ao mercado são 25% da Fase II e 65% dos ensaios clínicos de Fase III (AGRAWAL, 2015).

Os estudos de redirecionamento de drogas precisam ser solidamente fundamentados no conhecimento prévio do medicamento e nas informações disponíveis sobre a patologia indicada, pois estas complexidades determinam em grande parte, as taxas de sucesso do reposicionamento de drogas (JIN; WONG, 2014).

Alguns medicamentos possuem usos distintos daqueles que naturalmente foram identificados e servem como alternativa no tratamento de muitas doenças. São exemplos de fármacos reposicionados, a talidomida, originalmente utilizada no tratamento de náusea na gravidez, foi aprovada pelo FDA para o tratamento do mieloma múltiplo; o ácido zoledrônico, utilizado no tratamento de osteoporose foi aprovado para o tratamento de doença óssea metastática; o metotrexato, indicado para tratamento da leucemia, teve efeito antitumoral em vários tipos de malignidade, como osteossarcoma, linfoma Hodgkin; a bleomicina, indicado como antibiótico apresentou efeito nos linfomas de Hodgkin, câncer de pulmão, entre outros; o everolimo, um imunossupressor aprovado para tumores pancreático e neuroendócrino; a gencitabina, um antiviral utilizado para tratamento do câncer de mama, pulmão não pequenas células, pâncreas e ovários; entre outros (MEYER et al., 1950; MACKIEWICZ-WYSOCKA et al., 2012; GUPTA et al., 2013).

Diante disso, a amitriptilina é considerada uma alternativa ao reposicionamento de drogas por apresentar em sua estrutura, dois anéis benzeno o que lhe confere atividade antibacteriana e por ter clivado o DNA plasmidial inserido em cepa de *Escherichia coli* (puC 18) através da técnica da lise alcalina, atividade esta que justifica-se pela molécula ser considerada pequena e por apresentar grupamento metil em sua estrutura química.

5. CONCLUSÃO

- A amitriptilina apresentou atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas ATCC e isolados clínicos de pacientes do HUSM. Sua atividade mais pronunciada de forma isolada através da concentração inibitória mínima foi frente a microrganismos Gram-positivo, como por exemplo, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CIM: 64 µg/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 7468 (CIM: 32µg/mL) e nos isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* 25 e 27 (CIM: 64 e 32µg/mL respectivamente).
- Em relação a concentração bactericida mínima, a amitriptilina mostrou-se capaz de matar o microrganismo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CBM: 64µg/mL) e nos isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* 16 e 27 (CBM:64µg/mL em ambos) somente quando associada ao ciprofloxacino.
- Na avaliação da atividade da amitriptilina associada a antibióticos, houve efeito sinérgico com ciprofloxacino frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM:64µg/mL), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (CIM:128µg/mL) e nos isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* 3 (CIM:128µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* 16, 18, 25, 27, 32 e 34 (CIM: 64, 64, 64, 16, 128 e 128µg/mL respectivamente). Quando associada a sulfametoxazol-trimetoprima, a amitriptilina apresentou sinergismo frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CIM:64µg/mL), *Enterococcus faecalis* ATCC 51229 (CIM:128µg/mL) e aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* 3 (CIM:128µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* 18, 25, 27,34 e 38 (CIM:64, 64, 16, 128 e 128 respectivamente). Já nas cepas de KPC houve significativo efeito sinérgico na maioria dos isolados clínicos, variando a CIM de 4 a 128µg/mL.
- Em relação ao Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) houve sinergismo em quinze combinações da amitriptilina com os antibióticos estudados, onde o FICI foi menor que 0,5.
- O nível de tolerância demonstrou que a amitriptilina apresentou atividade bactericida frente a maioria das cepas estudadas.
- A amitriptilina também mostrou-se capaz de clivar o DNA plasmidial nas concentrações de 3,75mM e 1,875mM em pH 7,4 a 50°C.
- Sendo assim, propomos a amitriptilina como uma opção promissora para o tratamento de infecções MDR, pois demonstrou significativa atividade antibacteriana frente a microrganismos multirresistentes utilizados nesse estudo quando associada a antibióticos já usados na clínica, principalmente com a colistina, onde apresentou

melhor atividade. Sugerimos que essa atividade pode estar relacionada à sua estrutura química, pois apresenta dois anéis benzeno, sendo similar aos fenotiazídicos, precursores do reposicionamento de fármacos. Com tudo, estudos complementares são necessários para entender os possíveis mecanismos de ação, toxicidade, efeitos *in vivo*, entre outros, para que tenha segurança e eficácia tornando-se útil na clínica.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resistência Microbiana: Mecanismos e impacto clínico**. Brasília, 2019. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Antibióticos: uso indiscriminado deve ser controlado**. 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/uso-indiscriminado-de-antibioticos-deve-ser-controlado/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Brasília, DF, 2017.
- AGRAWAL P. Advantages and Challenges in Drug Re-Profiling. **J Pharmacovigil**, v.S2 , n. e002, 2015. Disponível em: < <https://www.longdom.org/open-access/advantages-and-challenges-in-drug-reprofiling-2329-6887-S2-e002.pdf> >. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI:10.4172/2329-6887.S2-e002
- AMYTRIL®: cloridrato de amitriptilina. Itapira, SP: Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda. 2018. Bula de remédio.
- ASHBURN, T. T., THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat Rev Drug Discov.**, v.3, p.673–83, 2004. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrd1468> >. Acesso em: 15 jan. 2018. DOI: 10.1038/nrd1468.
- AUSUBEL, F. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, v. 5, 2003.
- AZEVEDO, C. P., SILVA, J. D. Avaliação do perfil de resistência da Escherichia coli isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. **Rev. Multidiscip. Saúde**, v.4, p. 2-17, 2012. Disponível em: <http://www.portal.anchieta.br/revistas-e-livros/saudeemfoco/pdf/revistamultidisciplinardasaude_07.pdf >. Acesso em: 10 fev. 2018.
- BACTRIM®: sulfametoxazol-trimetoprima. Rio de Janeiro, RJ. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. 2019. Bula de remédio.
- BASSO, J., et al. Repurposing drugs for glioblastoma: From bench to bedside. **Cancer Letters** v.428, p.173-183, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29729291> >. Acesso em: 25 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.04.039.
- BIELECKA-WAJDMAN, A. M. et al. Tricyclic Antidepressants Modulate Stressed Mitochondria in Glioblastoma Multiforme Cells. **Cancer Control.**, v.25, p.1-9, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30213208>>. Acesso em: 01 jun. 2019. DOI: 10.1177/1073274818798594.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos**. Brasília: 2001, 36p.
BROWN, D. Antibiotic resistance breakers: repurposed drugs fill the antibiotic discovery avoid? **Nature reviews**, v. 14, p. 821-832, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493767>>. Acesso em: 10 out. 2018. DOI: 10.1038/nrd4675.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012, 2112p.

CIPRO®: cloridrato de ciprofloxacino. Socorro, SP: Bayer S.A. 2019. Bula de remédio.

CHAN, E. W. L., et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Glob Antimicrob Resist**, v.10, p. 70-74, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213716517300784?via%3Dihub>> Acesso em: 10 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.03.012

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: **CLSI**, 2012.

DA SILVA, R. P. P., MANÇANO, S. M. C. N., PICÃO, R. C. Cronologia da emergência global de carbapenemases em bacilos gram-negativos. **Saber Digital**, v. 10, n. 2, p. 43-61, 2018. ISSN 1982-8373. Disponível em: <<http://revistas.faa.edu.br/index.php/SaberDigital/article/view/276>>. Acesso em: 08 jul. 2019.

DRUGBANK. Amitriptyline: DB00321. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00321>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

DUARTE, E. H., et al. Determinação voltamétrica de amitriptilina em formulações farmacêuticas com eletrodo de diamante dopado com boro explorando medidas em meio ácido. **Quim. Nova**, v. 37, n. 9, p.1496-1502, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000900013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 jun. 2018. DOI: 10.5935/0100-4042.20140225

EJIM, L. et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nat Chem Biol**, v.7, p. 348-350, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nchembio.559>>. Acesso em: 10 jun. 2018. DOI: 10.1038/nchembio.559

FALAGAS, M. E., RAFAILIDIS, P. I., MATTHAIIOU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v.13, p.132-138, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843473>>. Acesso em: 20 out. 2018. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e como prevenir**. Rio de Janeiro, 2017.15 p. Disponível em

<http://www.fiocruz.br/ioc/media/resistencia_bacteriana_antibioticos_ioc_fiocruz.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2019.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). História: "É um milagre!". 2006. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=811&sid=7>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

GOWDA, K. R. S. et al, 2014. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **J Biomed and Biotechnol.**, v. 2, n.1, p.1-9, 2014. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/bb/2/1/1>>. Acesso em: 03 jun. 2019. DOI:10.12691/bb-2-1-1.

GREENE, R. J., HARRIS, N. D. **Patologia e terapêutica para farmacêuticos: bases para a prática da farmácia clínica.** 3. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2012. 968p.

GUAIANA, G., BARBUI, C., HOTOPF, M. Amitriptyline for depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.3, 2007. Disponível em: <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004186.pub2/abstract>>. Acesso em: 05 mai. 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD004186.

GUPTA, S. C., et al. Cancer drug discovery by repurposing:teaching new tricks to old dogs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 34, p.508-517, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928289>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI:10.1016/j.tips.2013.06.005.

HIGUITA-GUTIÉRREZ, L. F., QUICENO, J. N. J. Brotes hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: revisión sistemática de la literatura. **Infectio**, v.21, n.4, p.214-222, 2017. Disponível em: <<http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/684/0>>. Acesso em: 05 abr. 2019. DOI: 10.22354/in.v21i4.684.

JIN, G., WONG, S. T. C. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug Discov Today**, v.19, p. 637-644, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644613003991?via%3Dihub>> . Acesso em: 30 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.005.

KRISTIANSEN, J. E, AMARAL, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p.319–327, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9338482>>. Acesso em: 10 out. 2018. DOI: 10.1093/jac/40.3.319.

LACY, C. F. et al. Medicamentos Lexi-Comp Manola: uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde. Barueri, São Paulo: Manole, 2009.

LAWSON, K. A Brief Review of the Pharmacology of Amitriptyline and Clinical Outcomes in Treating Fibromyalgia. **Biomedicines**, v.5, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28536367>>. Acesso em: 20 jun, 2019. DOI: 10.3390/biomedicines5020024.

LIU, L. F., LIU, C. C., ALBERTS, B. M. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. **Cell**,

v.19, p.697–707, 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6244895>>. Acesso em: 30 mai. 2019. DOI: 10.1016/s0092-8674(80)80046-8.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087090251500067X>>. Acesso em: 05 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.

LU, Z. N., TIAN, B., GUO, X. L. Repositioning of proton pump inhibitors in cancer therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.80, p.925–937, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861639>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1007/s00280-017-3426-2

MACEDO, D. et al. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal of Affective Disorders**, v.208, p. 22–32, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744123>>. Acesso em: 05 mai. 2018. DOI: 10.1016/j.jad.2016.09.012.

MACKIEWICZ-WYSOCKA, M. et al. Progress in the treatment of bone metastases in cancer patients. *Expert Opin. Investig. Drugs*, v. 21, p. 785–795, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500564> >. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1517/13543784.2012.679928.

MANDAL, A. et al. An investigation on in vitro and in vivo antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 635-642, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031539>>. Acesso em: 10 fev. 2018. DOI: 10.1590/S1517-83822010000300014.

MATSUNAGA, N., HAYAKAWA, K. Estimating the impact of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 6, 2008. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(18\)30325-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(18)30325-5/fulltext)>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30325-5.

MEYER, L. M. et al. Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroylglutamic acid). **Acta Haematol**, v. 4, p. 157–167, 1950. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14777272>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1159/000203749.

MORENO, R. A., MORENO, D. H., SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de Antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr. Depressão**, v. 21, p. 24-40, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44461999000500006>. Acesso em: 05 out. 2018. DOI: 10.1590/S1516-44461999000500006.

MORAES, F. L. L. **Avaliação de antidepressivos como adjuvante no tratamento da dor oncológica**. 2012. 41p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia), Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

MOREHEAD, M. S., SCARBROUGH, C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. **Prim Care.**, v.45, n.3, p.467-484, 2018. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30115335>>. Acesso em: 10 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.pop.2018.05.006.

MOORE, R. A., et al. Amitriptyline for neuropathic pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.7, 2015. Disponível em: <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008242.pub3/abstract>>. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI: 10.1002/14651858.CD008242.pub3

MOURA, W. C. S. et al. Perfil antibacteriano de novos derivados n-acilidrazônicos substituídos. **Biofarm** v. 13, n. 4, p. 59-66, 2017. Disponível em: <<http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/3279/2373>>. Acesso em: 15 out. 2018.

MUNOZ-BELLIDO, J. L., MUNOZ- CRIADO. S., GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A. In-vitro activity of psychiatric drugs against *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). **J Antimicrob Chemother**, v.37, n.5, p. 1005-1009, 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/37/5/1005/749677>>. Acesso em: 05 mai. 2019. DOI: 10.1093/jac/37.5.1005.

MUNOZ-BELLIDO, J. L., MUNOZ- CRIADO. S., GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs selective serotonin reuptake inhibitors. **Int J Antimicrob Agents**, v.14, n.3, p. 177-180, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773485>>. Acesso em: 05 mai. 2019. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00154-5.

MUSTAEV, A. et al. Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: Two modes of drug binding. **J. Biol. Chem.**, v.289, n.18, p.12300-12312, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497635>>. Acesso em: 02 set. 2018. DOI: 10.1074/jbc.M113.529164.

MUTHUKUMAR, V., JANAKIRAMAN, K. Evolution Of Antibacterial Activity Of Amitriptyline Hydrochloride. **International journal of chem tech research**, v.6, n.11, p. 4878-4883, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287769663_Evaluation_of_antibacterial_activity_of_amitriptyline_hydrochloride>. Acesso em: 02 fev de 2018.

NAEEM, A. et al. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. **Molecules**, v.21, n.4, p.268, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043501>>. Acesso em: 10 abr. 2018. DOI:10.3390/molecules21040268.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents; Approved Guideline, **NCCLS** document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NG, S. M. S. et al. Repurposing Zidovudine in combination with Tigecycline for treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 37, p. 141-148, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29019016>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: 10.1007/s10096-017-3114-5.

NISHISHINYA, B. et al. Amitriptyline in the treatment of fibromyalgia: a systematic review of its efficacy. **Rheumatology**, v.47, n.12, p.1741–1746, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/rheumatology/article/47/12/1741/1784529>>. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI:10.1093/rheumatology/ken317

NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, p. 314–316, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27306171>>. Acesso em: 10 jun. 2018. DOI: 10.1038/534314a.

OGUNDEJI, A. O., POHL, C. H., SEBOLAI, O. M. The Repurposing of Anti-Psychotic Drugs, Quetiapine and Olanzapine, as Anti-Cryptococcus Drugs. **Front. Microbiol**, v.8, n.815, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00815/full>>. Acesso em: 20 fev. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00815.

OLIVEIRA, M. C. B. Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre o DNA. **Tese de doutorado**. Florianópolis, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS Brasil). 2016. **Na ONU, líderes mundiais se comprometem a agir em relação à resistência antimicrobiana**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5231:na-onu-lideres-mundiais-se-comprometem-a-agir-em-relacao-a-resistencia-antimicrobiana&Itemid=838>. Acesso em: 14 jun. 2019.

OTAKA, M. et al. New strategy of therapy for functional dyspepsia using famotidine, mosapride and amitriptyline. **Aliment Pharmacol Ther**, v.21, p.42–46, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2036.2005.02473.x>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2005.02473.x

PALIT, P., MANDAL, S. C., MANDAL, N. B. Reuse of Old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as antimicrobial Agents: a New Emerging Therapeutic Approach. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, A. Méndez-Vilas, Ed., p.1883-1892, 2013. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Reuse-of-Old%2C-Existing%2C-Marketed-Non-antibiotic-as-Palit-Mandal/a9846e9eb457b0b97bf55b48bc49d448fc05bba5>>. Acesso em: 05 mai de 2018.

PARK, J. H., et al. Repositioning of the antipsychotic drug TFP for sepsis treatment. **Journal of Molecular Medicine**, v.97, n.5, p.647-658, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-019-01762-4>>. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI: 10.1007/s00109-019-01762-4.

PELÓGIA, N. C. C. et al. Efeitos da amitriptilina sobre a modulação da dor aguda, em ratos submetidos à ligadura do nervo ciático. **Rev Dor. São Paulo**, v.12, p. 245-249, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-00132011000300010&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 set. 2018. DOI: 10.1590/S1806-00132011000300010.

PINTO, E. G., TEMPONE, A. G. Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.24, n.29, 2018. Disponível em: <<https://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-018-0166-7>>. Acesso em: 5 mai. 2019. DOI:10.1186/s40409-018-0166-7.

POMMIER, Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chem Biol**, 2010, v.17, n.5, p.421–433. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534341>>. Acesso em: 10 mai. 2018. DOI 10.1016/j.chembiol.2010.04.012

PROMIXIN®: colistimetato de sódio. Consolação, SP. Opem Representação Importadora Exportadora e Distribuidora Ltda. 2019. Bula de remédio.

RAMPELOTTO, R. F., et al. Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazene N3-oxide-κ2 N1, O4](dimethylbenzylamine-κ2 C1, N4)palladium(II)}. **Braz J Pharm Sci**, v.54, n.2, e.17369, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v54n2/2175-9790-bjps-54-02-e17369.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1590/s2175-97902018000217369.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale** Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Elsevier, 2012. XXV, 778p

REGULSKA, K. et al. Can cardiovascular drugs support cancer treatment? The rationale for drug repurposing. **Drug Discovery Today**, v.24, n.4, p.1059-1065, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135964461830535X?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.03.010.

RODRIGUES, T. S. et al. Resistência Bacteriana á Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v.4, p. 7360, 2018. Disponível em: <<http://www.ojs.ufpi.br/index.php/nupcis/article/view/7350>>. Acesso em: 12 out. 2018.

SANTIAGO, M. D. S. et al. Amitriptyline and aerobic exercise or amitriptyline alone in the treatment of chronic migraine: a randomized comparative study. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 72, p. 851-855, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2014001100851>. Acesso em: 06 mai. 2018. DOI: 10.1590/0004-282X20140148.

SERAFIN, M. B., HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **Braz J Infect Dis.**, v. 22, n. 3, p. 252–256, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29963991>>. Acesso em: 10 mai. 2019. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.

SILVA, C. D., SILVA JÚNIOR, M. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein**, v.13, n.3, p.448-53, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-45082015000300448&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2019. DOI: 10.1590/S1679-45082015RW3145.

SILVA, F. C. et al. Prevenção da dor fantasma com uso de cloridrato de amitriptilina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.54, p. 345-349, 2008. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_54/v04/pdf/345_350_Prevencao_da_Dor_Fantasma.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2018.

SPITIA, J. D. C. et al. Etiología y perfil de resistência antimicrobiana en pacientes con infección urinaria. **Infectio**, v.23, n.1, p.45-51, 2019. Disponível em: <<http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/755>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.22354/in.v23i1.755.

TAKASAKI, B. K., CHIN, J. Cleavage of the Phosphate Diester Backbone of DNA with Cerium (III) and Molecular Oxygen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 3, p. 1121-1122, 1994. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00082a040>>. Acesso em: 25 out. 2018. DOI: 10.1021/ja00082a040.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2014, 143p.

THAKARE, R. et al. Repurposing Ivacaftor for treatment of Staphylococcus aureus infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, p. 389–392, 2017. Disponível em: <[https://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(17\)30249-2/abstract](https://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(17)30249-2/abstract)>. Acesso em: 20 out. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.020.

THANGAMANI, S., YOUNIS, W., SELEEM, M. N. Repurposing celecoxib as a topical antimicrobial agent. **Front. Microbiol**, v.6, p.750, 2015. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00750/full> >. Acesso em: 25 jun. 2019. DOI:10.3389/fmicb.2015.00750.

XIA, B. T. et al. Amitriptyline Reduces Inflammation and Mortality in a Murine Model of Sepsis. Brent T. **Cell Physiol Biochem**, v.52, n.3, p.565-579, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30897322>>. Acesso em: 10 jul. 2019. DOI: 10.33594/0000000

WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERAGENCY COORDINATION GROUP (WHO, IACG). **Report To The Secretary-General Of The United Nations. No Time To Wait: Securing The Future From Drug-Resistant Infections**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_EN.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2019.

YAN, L. et al. Amitriptyline inhibits currents and decreases the mRNA expression of voltage-gated sodium channels in cultured rat cortical neurons. **Brain research**, v. 13, n.36, p. 1-9, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398637>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.04.016.

ZAWACKA, K. et al. Inferring the interaction structure of resistance to antimicrobials. **Preventive Veterinary Medicine**. 2018, v.152, p.81–88. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716307127>>. Acesso em: 02 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.007.

ZHENG, W., SUN, W., SIMEONO, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, p.181–191, 2018. Disponível em: <
<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/bph.13895>>. Acesso em: 10 fev. 2019. DOI: 10.1111/bph.13895.

ANEXOS

**ANEXO A- TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DA CIM E CBM.**

**PROTOCOLO ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA
CIM e CBM**

1. TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

- Concentração de bactérias preconizada no CLSI: 5×10^5 UFC/mL
- Concentração inicial do composto: **5120 µg/mL**
- Volume final em cada poço: **200 µL**
- Bactérias por poço: 1×10^5 UFC

Diluição do Composto Químico (CQ)

1. Pesar o Composto Químico e dissolver como recomendado: **5120 µg/mL** (concentração inicial requerida pelo CLSI)

$0,00512 \text{ g} = 5,12 \text{ mg} = 5120 \text{ µg}$
2. Pipetar **180 µL** de caldo MH nos primeiros poços (P1) da microplaca e **100µl** nos 10 poços seguintes (P2 a P11);
3. Adicionar **20 µL do CQ** diluído nos primeiros poços (P1) da microplaca ($180 \text{ µL} + 20 \text{ µL} = \text{dilui } 1:10 \text{ o CQ} = 512 \text{ µg/mL}$).
4. Deve-se homogeneizar com a pipeta multicanal no primeiro estágio (10 vezes) e transferir 100 µL destes para os poços seguintes (P2) e assim sucessivamente, até o 11^o poço da microplaca (P11), sendo que os últimos 100 µL devem ser descartados (faz-se 11 diluições).
5. Os seguintes controles devem ser empregados:
 - **Controle do Composto Químico (CCQ):** serve para descartar uma possível contaminação do composto e facilitar a leitura visual da CIM. Deve-se pipetar **180 µL de CaldoMH** e adicionar **20 µL do CQ** diluído, homogeneizar, diluir em série e desprezar 100 µL no final. A seguir, deve-se adicionar **100 µL de CaldoMH puro** em cada poço.
 - **Controle do crescimento (C+):** avaliar a qualidade do inóculo e fornecer um padrão de crescimento na avaliação visual da CIM. Deve-se pipetar **100 µL de Caldo MH + 100 µL de inóculo**.
 - **Controle negativo (C-):** descartar contaminação do Caldo MH. Deve-se pipetar **200 µL de Caldo MH puro**.

Diluição das Bactérias

1. Preparar um tubo de ensaio estéril com tampa contendo **solução salina estéril (4 mL)** e inoculá-lo com a cepa bacteriana crescida em TSA (*overnight*) a fim de obter turvação visual equivalente à escala 0,5 de McFarland. Inocular colônias bacterianas de \pm **mesmo tamanho, morfologia e cor**.
2. Homogeneizar, verificar a turvação visualmente e ler a absorbância da solução no espectrofotômetro em comprimento de onda de **625 nm**.
3. A turvação padrão da **escala 0,5 de McFarland** possui aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Para chegar a este valor, a leitura da turvação deverá ficar entre **0,08 a 0,10** de absorbância. Caso a leitura seja inferior ou superior a essa faixa, prepara-se um novo inóculo.
4. Quando alcançada a turvação padrão, deve-se preparar o inóculo bacteriano que será semeado nas placas. Este pode ser utilizado apenas 15 minutos após a sua preparação.

5. Pipeta-se **40 μL (0,04 mL)** da solução com turvação padrão 0,5 de McFarland (inóculo inicial) e transfere-se para um tubo de inóculo estéril contendo **3960 μL (3,96 mL)** de caldo Mueller Hinton estéril, **totalizando 4 mL de inóculo final**. Dessa maneira, dilui-se o inóculo inicial 100 vezes, ou seja, de 1×10^8 UFC/mL para **1×10^6 UFC/mL** (1:100 \rightarrow 4000 : 40 = 100).
6. Devem ser adicionados exatamente **100 μL do inóculo final** (1×10^6 UFC/mL) nos poços **teste e C +**, os quais já conterão 100 μL de Caldo MH pipetado anteriormente. Dessa forma, dilui-se o inóculo 1:2, ficando **$0,5 \times 10^6$ UFC/mL** (5×10^5 UFC/mL ou em 200 μL tenho 1×10^5 UFC por poço).

$$5 \times 10^5 \text{ UFC} = 1 \text{ mL}$$

$$x = 0,2 \text{ mL}$$

$$x = 1 \times 10^5 \text{ UFC por poço}$$

1) Resumo dos principais passos:

- \rightarrow Pipetar primeiro o caldo em todos os poços com a pipeta multicanal;
- \rightarrow Fazer a diluição em série nos poços **teste e CCQ**
- \rightarrow Pipetar **100 μL** de Caldo MH puro nos **C - e CCQ**
- \rightarrow Preparar o inóculo bacteriano
- \rightarrow Pipetar **100 μL** do inóculo final nos poços **teste e C +**
- \rightarrow Colocar as placas na estufa a 35 ± 2 °C e ler o resultado da CIM após 20 horas de incubação.

- 2) Deve-se realizar o teste em triplicata para cada composto e para cada cepa bacteriana.

ANEXO B: FÓRMULA PARA CALCULAR O ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FICI), SEGUNDO ODDS, 2003.

$$\text{FICI} = \left(\frac{\textit{combinação1}}{\textit{substância 1}} \right) + \left(\frac{\textit{combinação1}}{\textit{substância 2}} \right)$$

Elaborado pelo autor, 2019.

**ANEXO C: FÓRMULA PARA CALCULAR O NÍVEL DE TOLERÂNCIA, SEGUNDO
DAS E COLABORADORES, 2016.**

$$\text{Tolerância} = \frac{CBM}{CIM}$$

Elaborado pelo autor, 2019.

ANEXO D: TÉCNICA PARA REALIZAÇÃO DA CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL.

PROTOSCOLOS EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO DNA PLASMIDIAL

CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

A extração do DNA plasmidial pUC18 foi efetuada utilizando a técnica da lise alcalina (“large-scale preparation of plasmid DNA”), do livro de protocolos de Ausubel e colaboradores (AUSUBEL et al., 2003).

ENSAIO *SCREENING* DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL:

1º DIA

- 1) O primeiro passo é diluir os compostos químicos testes de acordo com a sua solubilidade em etanol ou água (geralmente 1 mL de etanol + 1 mL de água, ou 2 mL de etanol).
- 2) Calculada a massa, pesa-se o composto em um eppendorf novo e estéril e procede-se a sua diluição na capela de fluxo vertical com auxílio de uma pipeta automática (utilizar a ponteira para macerar as partículas).
- 3) A primeira diluição representa a solução estoque (SE) que contém 3,75 mM. A partir desta, preparam-se as soluções nas diluições de 1:2 (1,875 mM) e 1:10 (0,375 mM).

- Solução 1:2, pipetar 100µL de SE + 50µL de água + 50µL de etanol.
- Solução 1:10, pipetar 50µL de SE + 475µL de água + 475µL de etanol.

- 4) Para o ensaio *screening* de clivagem, em um volume final de 21 µL, os seguintes reagentes foram adicionados em microtubos eppendorffs:

Padrão: DNA plasmidial + água Milli Q a pH 6,5 (tampão Pipes) e pH 8,0 (tampão Tris HCl).

Compostos: DNA plasmidial + diferentes concentrações dos compostos testados (3,75; 1,875 e 0,375 mM), a pH 6,5 e 8,0 (tampões).

- Tubo 1 à 2µL do DNA + 4µL do tampão + 15 µL de água Milli Q
- Tubo 2 à 2µL do DNA + 4µL do tampão + 15 µL de SE
- Tubo 3 à 2µL do DNA + 4µL do tampão + 15 µL diluição composto 1:2
- Tubo 4 à 2µL do DNA + 4µL do tampão + 15 µL diluição composto 1:10

OBS: Para facilitar a execução da técnica, pode-se fazer um *pool* de tampão + DNA plasmidial. Colocar em cada eppendorf que se vai incubar 6µL desse pool + 15µL de água, SE, 1:2 ou 1:10.

- 5) Os eppendorffs serão preparados em duplicata e incubados em estufas a 37 e 50 °C por 24 horas. Antes de incubá-los vedá-los com parafilme.

2º DIA

- 6) Retirar os eppendorffs das estufas, adicionando na parede de cada eppendorf **4mL de loading buffer**.

- 7) Colocar os eppendorffs na centrífuga, esperar a velocidade alcançar 40 rpm e desligar em seguida. Retirar da centrífuga e aplicar o seu conteúdo nos poços do gel de agarose 0,8%.

- 8) A capacidade de clivagem do DNA plasmidial pelo composto teste será analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão de corrida TBE 0,5X, com aplicação de uma voltagem de 50-70 V por 2-3 horas.
- 9) As bandas do DNA plasmidial serão visualizadas em um transiluminador UV (312 nm), fotografadas utilizando uma câmera fotográfica digital e quantificadas usando o programa de computador Scion Image Beta 4.03 (Scion Corp).
- 10) Através desta análise será possível verificar se o composto cliva o DNA plasmidial e analisar a temperatura(s) e pH(s) em que a clivagem ocorre.