

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

Silvana Silveira Coelho

**REPOSICIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL *IN VITRO*
DOS NÃO ANTIBIÓTICOS ANLÓDIPINO E VALSARTANA**

**Santa Maria, RS
2019**

Silvana Silveira Coelho

**REPOSICIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL *IN VITRO* DOS NÃO ANTIBIÓTICOS
ANLODIPINO E VALSARTANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, 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

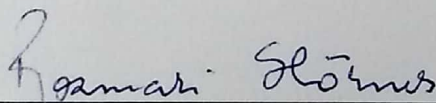
Santa Maria, RS
2019

Silvana Silveira Coelho

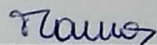
**REPOSICIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL *IN VITRO* DOS NÃO-ANTIBIÓTICOS
ANLÓDIPINO E VALSARTANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

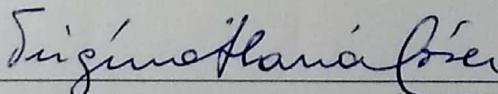
Aprovado em 19 de dezembro de 2019:



Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Daniela Fernandes Ramos, PhD. (FURG) – Parecer



Virgínia Maria Cóser, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe (in memoriam), que me ensinou valores importantes para vida toda, sendo um exemplo de dignidade e caráter para mim. Infelizmente não está mais entre nós, mas continua sendo minha maior força na vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou meu caminho durante esta jornada.

A minha mãe, Luciana (*in memoriam*), por todo apoio e dedicação que sempre me proporcionou ensinando a ser forte, seguir sempre em frente mesmo que o caminho seja difícil. Serei eternamente grata.

A minha vó Afonsina, a qual considero minha segunda mãe que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da vida dando apoio e força de forma incondicional.

Ao meu namorado Jorge, por ser meu melhor amigo, companheiro pra todas as horas, por todo amor e carinho concedidos e por me compreender em momentos de estresse. Tudo isso foi essencial pra mim.

A minha família, pelo apoio que me deram durante toda a minha vida.

A minha orientadora Rosmari Hörner, pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim que certamente contribuíram para o meu crescimento.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia, por todo aprendizado, conselhos, companheirismo, risadas e amizade. Foram essenciais, principalmente neste momento difícil.

A Natália, pela tua amizade, alegria contagiante, cumplicidade e apoio dado nesse momento.

A Roberta pelo companheirismo, pelos momentos fitness e por toda ajuda que me proporcionou.

Aos professores do curso, que foram muito importantes na minha trajetória.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão ao meu lado, incentivando e dando o suporte necessário.

RESUMO

REPOSICIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL *IN VITRO* DOS NÃO ANTIBIÓTICOS ANLODIPINO E VALSARTANA

AUTOR: Silvana Silveira Coelho
ORIENTADORA: Dr^a. Rosmari Hörner

Infecções causadas por microrganismos multirresistentes têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, chegando aproximadamente um quinto da mortalidade mundial, tornando-se um problema de saúde pública. Outro fator preocupante é a resistência a medicamentos antitumorais que levam ao fracasso terapêutico em pacientes com câncer. Assim, é essencial a busca por medicamentos mais potentes e seletivos com ação antibacteriana e antitumoral, através de alternativas mais rápidas e eficazes, como o reposicionamento de medicamentos, a fim de contornar estes desafios e limitações. Diferentes não antibióticos são relatados na literatura com potencial atividade antibacteriana e antitumoral, dentre eles a classe dos anti-hipertensivos. O anlodipino e valsartana são medicamentos não antibióticos comumente utilizados na clínica médica para tratamento da hipertensão arterial. Sendo assim, o objetivo deste estudo, no primeiro artigo, foi apresentar à comunidade científica uma seleção de estudos que abordem o reposicionamento do não antibiótico anlodipino e seus efeitos sinérgicos no tratamento de doenças infecciosas e neoplásicas. No manuscrito, objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* isoladamente e em associação ao ciprofloxacino dos fármacos anlodipino e valsartana, e ainda, avaliar a atividade de clivagem do DNA plasmidial dos medicamentos em estudo, bem como seu provável mecanismo de ação envolvido. No primeiro artigo, apresentamos dezesseis pesquisas envolvendo reposicionamento do anlodipino como alternativa na terapêutica de infecções microbianas e neoplásicas, demonstrando atividade sinérgica significativa quando associado a dez diferentes fármacos. No manuscrito, a atividade antibacteriana foi avaliada frente a dez cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e trinta e um isolados clínicos multirresistentes (MDR) provenientes de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Santa Maria, onde anlodipino sozinho foi ativo frente a todas as bactérias, especialmente frente as Gram-positivas como os *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à metilicina (MRSCoN). Diferente do que ocorre com valsartana, que foi ativa apenas frente a duas cepas e um isolado. Quando associados ao ciprofloxacino, anlodipino resultou em nove isolados sinérgicos, enquanto que valsartana não obteve resultados significativos. Ainda, ambos os medicamentos foram aptos a clivar o DNA plasmidial nas condições definidas de pH e temperatura, sendo que na investigação do provável mecanismo de ação envolvido, sugere-se que ambos atuem através do mecanismo hidrolítico pois não foram capazes de inibir a atividade de clivagem na presença de sequestradores de radicais livres. Sendo assim, evidenciamos o reposicionamento destes fármacos como forma eficaz na terapêutica de infecções ocasionadas por microrganismos multirresistentes.

Palavras-chave: Anlodipino. Valsartana. Reposicionamento de medicamentos. Terapia medicamentosa. Anti-hipertensivos. Antimicrobiano. Resistência.

ABSTRACT

REPOSITIONING AND EVALUATION THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND *IN VITRO* PLASMID DNA CLEAVAGE OF AMLODIPINE AND VALSARTAN NON-ANTIBIOTICS

AUTHOR: Silvana Silveira Coelho

ADVISER: Dr^a. Rosmari Hörner

Infections caused by multiresistant microorganisms have increased considerably in recent years, reaching approximately one fifth of worldwide mortality, becoming a public health problem. Another worrying factor is the resistance to antitumor drugs that lead to therapeutic failure in cancer patients. Thus, the search for more potent and selective drugs with antibacterial and antitumor action is essential, through faster and more effective alternatives, such as drug repositioning, in order to overcome these challenges and limitations. Different non-antibiotics are reported in the literature with potential antibacterial and antitumor activity, among them the antihypertensive class. Amlodipine and valsartan are non-antibiotic drugs commonly used in the medical clinic to treat high blood pressure. Thus, the aim of this study, in the first article, was to present to the scientific community a selection of studies that address the repositioning of the non-antibiotic amlodipine and its synergistic effects in the treatment of infectious diseases. The aim of the manuscript was to evaluate the antibacterial activity *in vitro* alone and in association with ciprofloxacin of the amlodipine and valsartan drugs, as well as to evaluate the cleavage activity of the plasmid DNA of the studied drugs, as well as their probable mechanism of action involved. In the first article, we present sixteen studies involving anlodipine repositioning as an alternative in the treatment of microbial and neoplastic infections, demonstrating significant synergistic activity when associated with ten different drugs. In the manuscript, antibacterial activity was evaluated against ten standard American Type Culture Collection (ATCC) reference bacterial strains and thirty-one multiresistant clinical isolates (MDR) from patients admitted to the University Hospital of Santa Maria, where anlodipine alone was active against all bacteria, especially against Gram-positive as the Coagulase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRSCoN). Unlike with valsartan, which was active only against two strains and one isolate. When combined with ciprofloxacin, amlodipine resulted in nine synergistic isolates, whereas valsartan did not yield significant results. Also, both drugs were able to cleave the plasmid DNA under the defined conditions of pH and temperature, and in the investigation of the probable mechanism of action involved, it is suggested that both act through the hydrolytic mechanism because they were unable to inhibit the activity of cleavage in the presence of free radical scavengers. Thus, we highlight the repositioning of these drugs as an effective way to treat infections caused by multiresistant microorganisms.

Keywords: Amlodipine. Valsartan. Drug repositioning. Drug therapy. Antihypertensives. Antimicrobial. Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 Estrutura química do anlodipino.....	17
Figura 2: Estrutura química da valsartana.....	18

MANUSCRITO

Figura 1 – Atividade do anlodipino frente às principais cepas consideradas sinérgicas, onde A: <i>Acinetobacter baumannii</i> (1), B: <i>Enterococcus faecium</i> (1), C: <i>Enterococcus faecium</i> (2), D: <i>Enterococcus faecium</i> (4), E: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1), F: <i>Staphylococcus aureus</i> (1) e G: <i>Staphylococcus aureus</i> (2). Os níveis de significância representam os asteriscos ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,001^{***}$), quando comparados aos medicamentos testados isoladamente. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.....	53
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (forma I) nas formas circular aberta (forma II) e linear (forma III).....	55
Figura 3. Clivagem do DNA plasmidial dos medicamentos A: anlodipino e B: valsartana apresentados no gel de agarose em diferentes pHs e temperaturas.....	56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 - Estudos científicos selecionados do bloqueador de canais de cálcio anlodipino como possíveis sugestões para reposicionamento no tratamento de várias doenças.....	23
--	----

MANUSCRITO

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos e índice de concentração inibitória fracionada (FICI).....	45
---	----

Tabela 2 - Concentração bactericida mínima (CBM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos.....	47
--	----

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do anlodipino (ANL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.....	49
---	----

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do valsartana (VAL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.....	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANL	Anlodipino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA II	Antagonistas dos receptores de angiotensina II
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCC	Bloqueadores dos canais de cálcio
CBM	Concentração bactericida mínima
CEPCD	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter sp.</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	Índice de Concentração Inibitória fracionada
GN	Gram-negativas
GP	Gram-positivas
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
MDR	Multi-droga resistentes
MH	Mueller-Hinton
MRSCoN	<i>Staphylococcus coagulase negativos resistentes a meticilina</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	Organização mundial de saúde
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
VAL	Valsartana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA.....	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS.....	14
3.2 REPOSICIONAMENTOS DE MEDICAMENTOS COMO ALTERNATIVA NA TERAPÊUTICA.....	15
3.3 IMPORTÂNCIA DO SINERGISMO DE MEDICAMENTOS EM INFECÇÕES MICROBIANAS.....	16
3.4 BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CÁLCIO: ANLÓDIPINO.....	17
3.5 ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II: VALSARTANA.....	18
3.6 CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL.....	19
4 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	21
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO - Reposicionamento do anlodipino: estudos científicos e efeitos sinérgicos.....	21
4.2 MANUSCRITO - Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana e sinérgica dos não antibióticos anlodipino e valsartana associados ao ciprofloxacino e potencial de nuclease química.....	31
5 DISCUSSÃO GERAL	57
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças infecciosas são responsáveis por cerca de um quinto da mortalidade mundial, constituindo uma ameaça para a saúde pública (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Ainda, microrganismos multi-droga resistentes (MDR) têm aumentado consideravelmente quando comparado com décadas passadas, sendo que a evolução desta resistência ocorre de forma tão acelerada que não tem sido possível o acompanhamento da pesquisa por novos antibióticos. Fato preocupante, pois interfere na eficácia clínica dos medicamentos com conseqüente redução do arsenal terapêutico disponível (KARAM et al., 2016; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Estima-se que aproximadamente 700 mil mortes por ano sejam ocasionadas devido à resistência aos antimicrobianos (ABD-EL-AZIZ, 2016; BONNET et al., 2019). Sendo assim, torna-se necessário a pesquisa por novos compostos mais eficazes com atividade antibacteriana (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

Outro problema de saúde pública mundial é a resistência a medicamentos antitumorais, já que as neoplasias estão em constante crescimento (HUANG et al., 2018; HUBER, 2010; MARKMAN, 2013). Esta resistência representa grande desvantagem à quimioterapia, levando a um fracasso no tratamento em cerca de 90% dos pacientes com câncer (CHOUDHURY et al., 2019). Esta realidade tem estimulado muitos pesquisadores a buscar novos esquemas terapêuticos, mais eficazes, potentes e seletivos (CHOUDHURY et al., 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

O processo de desenvolvimento de novos medicamentos antibióticos de amplo espectro tem se tornado cada vez mais difícil (KARAM et al., 2016; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Dessa forma, torna-se imprescindível a busca pelo redirecionamento de fármacos investigando os novos mecanismos de ação a fim de superar estes desafios e limitações, uma vez que promove a descoberta de novas propriedades dos medicamentos, sendo um processo mais econômico e trazendo menores riscos aos pacientes (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Ainda, a combinação de um não antibiótico com fármacos já aprovados que apresentem efeitos sinérgicos é importante, pois podem ser utilizados para o tratamento de infecções graves, uma vez que promovem maior eficácia tornando-se capazes de superar o problema de pouca atividade quando são administrados individualmente (CHENG; WILLIAMSON; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

Fármacos com a capacidade de clivar o DNA, especialmente através do mecanismo hidrolítico têm grande importância na área medicinal, biotecnológica e no desenvolvimento de medicamentos (DOUCET et al., 2006; AN et al., 2006). Ainda, nucleases sintéticas que

clivam o DNA de forma rápida e eficaz podem se tornar potenciais fármacos antitumorais (SHAO et al., 2009).

O medicamento anlodipino, pertencente à classe dos bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) e também uma di-hidropiridina, é indicado para tratamento da hipertensão sendo considerado medicamento de primeira escolha para este fim (ANVISA, 2016). Teve atividade bactericida relatada na literatura, frente a bactérias Gram-positivas (GP) e Gram-negativas (GN) (DUTTA et al., 2009; MAZUMDAR et al., 2010). Ainda, apresentou atividade antifúngica, antiparasitária e antitumoral frente a diferentes microrganismos e linhagens celulares tumorais (ELKHATIB; HAYNES; NOREDDIN, 2009; GODFRAIND, 2014; HU et al., 2018; MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010; SPADER et al., 2019; ZHANG et al., 2010).

A valsartana, utilizada na terapêutica para hipertensão e insuficiência cardíaca, classifica-se como antagonista da angiotensina II (ARA II), representando uma das classes mais comuns utilizadas na clínica médica (FERNANDES et al., 2017). Pesquisadores sugerem atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica, entre outras, relacionadas ao anel tetrazol que está presente em sua estrutura química. Ainda, compostos que possuem o anel benzênico, como anlodipino e valsartana, tem capacidade de contribuir no aumento da atividade antibacteriana (MOURA, 2017). Pelo que é de nosso conhecimento, valsartana ainda não possui atividade antibacteriana e antitumoral relatada na literatura.

Tem sido demonstrada atividade antimicrobiana em diversas pesquisas de reposicionamento de diferentes classes de medicamentos não antibióticos, como anestésicos locais, tranquilizantes, psicotrópicos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e medicamentos anti-hipertensivos (CHAN et al., 2017; PALIT et al., 2013; RAMPELOTTO et al., 2018, MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010; SPADER et al., 2019). Medicamentos não antibióticos que exibem potencial atividade antimicrobiana atuando em infecções por microrganismos resistentes são considerados uma nova esperança para contornar estes desafios e limitações (MARTINS et al., 2008; HU et al., 2018). Sendo assim, o reposicionamento de medicamentos se mostra eficaz no tratamento de doenças infecciosas e neoplásicas, evidenciando sua importância.

1.1 JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos e antitumorais vêm crescendo significativamente com o tempo, fato preocupante, pois interfere consideravelmente na eficácia clínica destes

compostos. A dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos para uso clínico é grande principalmente devido ao tempo necessário e aos custos elevados para sua fabricação, limitando o arsenal terapêutico utilizado para o tratamento dessas doenças. Sendo assim, assume importância o redirecionamento de fármacos como método alternativo para a pesquisa de medicamentos, uma vez que é um dos mais empregados devido à rapidez, baixo custo e segurança para o paciente. Estudos demonstram que medicamentos anti-hipertensivos são agentes promissores para tratamentos de infecções microbianas, porém há necessidade de investigar cada vez mais seus efeitos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar estudos que abordem o reposicionamento do não antibiótico anlodipino e efeitos sinérgicos frente a cepas padrão de referência ATCC e isolados clínicos MDR, avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos fármacos anlodipino e valsartana sozinhos e em associação com o antibacteriano ciprofloxacino e estudar a capacidade dos compostos em clivar o DNA plasmidial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Apresentar uma seleção de estudos envolvendo o reposicionamento do medicamento anti-hipertensivo anlodipino e sinergismo como alternativa terapêutica em diferentes doenças infecciosas. Além disso, avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos medicamentos anti-hipertensivos anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com o antibacteriano ciprofloxacino, bem como avaliar a atividade de clivagem do DNA plasmidial destes fármacos determinando o provável mecanismo de ação envolvido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar uma seleção de estudos abrangendo o reposicionamento do medicamento anti-hipertensivo anlodipino e efeitos sinérgicos;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do anlodipino e valsartana frente a cepas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e a isolados clínicos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) MDR de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);

- Avaliar a associação dos medicamentos anlodipino e valsartana com o antibacteriano ciprofloxacino;
- Avaliar o potencial de clivagem do DNA plasmidial dos medicamentos por meio de reações em diferentes pHs (7,4 e 8,0) e temperaturas (37° e 50° C) utilizando o DNA plasmidial (pUC18);
- Investigar o mecanismo envolvido na atividade de clivagem do DNA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS

Uma nova era no tratamento de doenças infecciosas, que até então eram consideradas incuráveis, era anunciada com a descoberta da penicilina por Alexander Flemming em 1928, revolucionando a história da medicina. Este novo composto passou a ser utilizado com frequência e, conseqüentemente os índices de morbidade e mortalidade associadas a estas infecções reduziram consideravelmente. Porém, apesar do sucesso terapêutico, logo começaram a surgir microrganismos resistentes a esta nova classe de medicamentos (BONNET et al., 2019; O'CONNELL, 2013).

Atualmente, a incidência de resistência antimicrobiana vem aumentando progressivamente tornando-se uma ameaça à saúde pública mundial (CANTURRI; ALGABA; SMANI, 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Dessa forma, se antes os microrganismos eram considerados inofensivos, hoje são temidos como agentes potencialmente letais devido aos mecanismos de resistência que são capazes de adquirir. É estimado que a resistência aos antimicrobianos seja responsável por cerca de 700 mil mortes anualmente. Caso esse quadro não mude, até 2050 a resistência aos antimicrobianos podem causar mais mortes que o câncer (ABD-EL-AZIZ, 2016; BONNET et al., 2019; O'CONNELL, 2013).

Como consequência da resistência aos antibacterianos, há redução significativa do arsenal terapêutico disponível para tratamento de doenças infecciosas, aumento no tempo de internação especialmente quanto a pacientes em situações críticas, além de elevado custo financeiro, o que favorece no aumento dos índices de morbidade e mortalidade (ABD-EL-AZIZ, 2016; BONNET et al., 2019; O'CONNELL, 2013). Esses problemas do crescimento progressivo de microrganismos MDR já foram esclarecidos recentemente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (TACCONELLI et al., 2018) e algumas instituições (ARDAL et

al., 2018; O'NEILL, 2016). Assim, novas estratégias são necessárias para evitar que ocorra o que está previsto para 2050 segundo o economista britânico Jim O'Neill, que são taxas de óbitos causadas pela resistência antibacteriana chegando a dez milhões anuais e resultando em um impacto para a economia global em cerca de cem trilhões de dólares (O'NEILL, 2016).

3.2 REPOSICIONAMENTOS DE MEDICAMENTOS COMO ALTERNATIVA NA TERAPÊUTICA

O índice de microrganismos MDR tem crescido progressivamente representando um problema de saúde pública mundial, visto como prioridade global pela OMS e pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (CEPCD) (ROCA et al., 2015). A adaptação dos microrganismos aos antibacterianos ocorre de forma tão rápida que o acompanhamento do desenvolvimento de novos fármacos se torna difícil (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Outra barreira existente é a redução ao longo dos anos no investimento da pesquisa de novos antimicrobianos pelos laboratórios e empresas farmacêuticas, especialmente devido à baixa lucratividade proporcionada. Por isso, novos medicamentos e novas abordagens são de extrema relevância para contornar estas situações (ESTRELA, 2018; THAKARE, 2017).

Os termos “reposicionamento de drogas” e “reaproveitamento de drogas” surgiram primeiramente por Ashburn e Thor (2004) em seu artigo intitulado “Reposicionamento de drogas: identificando e desenvolvimento de novos medicamentos para drogas existentes” (ASHBURN; THOR, 2004), sendo este um processo de descoberta de novas propriedades de medicamentos já aprovados na clínica com diferentes mecanismos de ação podendo ser aplicados a uma nova indicação terapêutica, sendo denominado também de redirecionamento (SERAFIN et al., 2018, DA ROSA et al., 2019, FOLETTO et al., 2019).

O redirecionamento de medicamentos é uma abordagem promissora que se tornou campo de pesquisa ativa devido à rápida identificação de compostos, conhecimento prévio da farmacocinética, toxicidade e segurança dos medicamentos levando a um custo reduzido quando comparados com o processo tradicional de desenvolvimento de fármacos (CANTURRI; ALGABA; SMANI, 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

A pesquisa por medicamentos não antibióticos potentes e eficazes envolve a busca por outros mecanismos de ação como o aumento da atividade antibacteriana (sinergismo), capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular, reversão do quadro de resistência frente a bactérias MDR à sensibilidade anterior assim também pelo controle das bombas de efluxo (MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010).

3.3 IMPORTÂNCIA DO SINERGISMO DE MEDICAMENTOS EM INFECÇÕES MICROBIANAS

A combinação de medicamentos que possuam efeitos sinérgicos demonstram diferentes vantagens para o tratamento de doenças infecciosas. Dentre estas, a terapia combinada tem a capacidade de aumentar o espectro de ação destes medicamentos (ZILBERBERG et al., 2014) e ainda, além de superar pode reduzir o desenvolvimento de mecanismos de resistência que os patógenos adquirem através da combinação de diferentes mecanismos de ação dos medicamentos envolvidos (ALDEYAB et al., 2008; MAHAMAT et al., 2007; QIN et al., 2017).

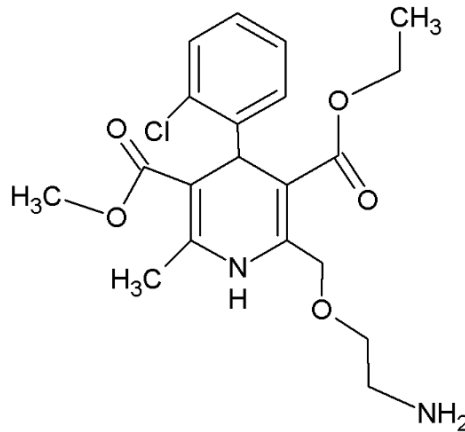
Ainda, a associação de dois ou mais fármacos já conhecidos na clínica podem ser mais potentes e eficazes e, conseqüentemente, as concentrações quando utilizados individualmente pode ser reduzida, aumentando a segurança destes medicamentos e mantendo a dosagem dentro da janela terapêutica (CHENG; WILLIAMSON; ZHENG, 2019). Na associação de antibióticos, autores demonstraram que antibacterianos como a linezolida, rifampicina ou a azitromicina são capazes de ressensibilizar patógenos resistentes à colistina. Dessa forma, quando são combinados sinergicamente, a dose subótima de colistina utilizada torna-se satisfatória e eficaz (KROHN; PIRONTI; KIRBY, 2018).

O desenvolvimento de novos antibióticos é atualmente limitado e difícil, sendo assim, embora o sinergismo de antibióticos seja útil, há a combinação com não antibióticos como uma alternativa eficaz no tratamento de infecções por microrganismos MDR (CHENG; WILLIAMSON; ZHENG, 2019; GONZALEZ, 2017; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Há diferentes relatos na literatura de não antibióticos como cardiovasculares, psicotrópicos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos que quando combinados com diferentes antimicrobianos e antineoplásicos, tenham sua atividade aumentada em decorrência do sinergismo destes fármacos (CHAN et al., 2017; HU et al., 2018; LI et al., 2006; PALIT; ALI, 2008; PEREIRA et al., 2011; QIN et al., 2017; RAMPELOTTO et al., 2018; SPADER et al., 2019; VERMA et al., 2017; ZHANG et al., 2010).

Segundo Zhang e colaboradores (2010), o anlodipino quando associado ao quimioterápico daunorrubicina, possam atuar de forma sinérgica em linhagens celulares resistentes de câncer de mama (ZHANG et al., 2010).

3.4 BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CÁLCIO: ANLÓDIPINO

Figura 1: Estrutura química do anlodipino



Fonte: Adaptado de Silva; Lourencao; Filho, 2015.

O anlodipino (Ilustração 1) é considerado fármaco de primeira escolha para tratamento da hipertensão e na maioria das vezes utilizado como único agente de controle da pressão arterial. Além disto, também é direcionado para tratamento de angina estável crônica como fármaco de primeira linha, tanto isoladamente como em politerapia com outros agentes antianginosos (ANVISA, 2016).

Este fármaco, pertencente à classe dos BCC ou antagonista do íon cálcio, atua inibindo a entrada do íon cálcio através de canais do tipo L (de longa duração) para o interior da musculatura lisa vascular e cardíaca. Os efeitos são a diminuição da força de contração e consequentemente redução do débito cardíaco, redução da excitabilidade das células responsáveis pelo impulso elétrico (células nodais) e vasodilatação periférica. Por pertencerem à classe de di-hidropiridinas, surtem efeitos principalmente quanto à vasodilatação (CHARLTON; THOMPSON, 2018).

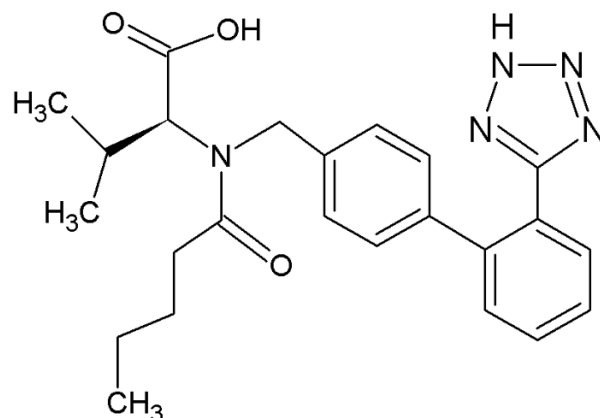
É documentado na literatura que este medicamento apresenta atividade antibacteriana significativa *in vitro* frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp e *Acinetobacter baumannii* e em com maior eficácia em testes *in vivo* em camundongos fêmeas por via oral (KUMAR et al., 2014; LI et al., 2013; MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010). Ainda, este não antibiótico demonstra potencializar sua atividade quando associado a outros medicamentos,

resultando em um agente promissor com frente a bactérias GP e GN (KUMAR et al., 2014; MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010).

É sugerido por pesquisadores utilizar a molécula do anlodipino (seu anel fenil-1,4-diidropiridina), como “composto base” na síntese de novos agentes eficazes contra os microrganismos MDR, como maneira de evitar possíveis efeitos hipotensivos. (MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010). Além disto, exerce atividade citotóxica em células cancerosas provenientes de carcinoma epidermóide e de mama (LEE; KAG; KIM, 2016; YOSHIDA; ISHIBASHI; NISHIO, 2007; TAYLOR; SIMPSON, 1992).

3.5 ANTAGONISTAS DOS REPECTORES DE ANGIOTENSINA II: VALSARTANA

Figura 2: Estrutura química da valsartana



Fonte: Adaptado de Snodin; Elder, 2019.

Os ARA II são muito utilizados atualmente apresentando um mecanismo de ação capaz de bloquear os receptores da angiotensina II inibindo-a completamente. Como consequência, há o relaxamento dos vasos sanguíneos reduzindo a força de contração do coração e diminuindo o bombeamento do sangue para o corpo, resultando na redução da pressão arterial (FERNANDES et al., 2017).

Dada a importância dos ARA II para o controle da pressão arterial, em 1971, a saralásina[®] foi introduzida como primeiro fármaco representado desta classe. Porém, seu uso foi limitado devido sua baixa biodisponibilidade e especificidade. Em 1990, a losartana foi

introduzida e, atualmente devido ao sucesso terapêutico desta classe existem outros como valsartana, irbesartana, candesartana. São considerados medicamentos com potência relevante para a terapêutica (FEITOSA; CARVALHO, 2000; FERNANDES et al., 2017).

Alguns medicamentos antitumorais possuem efeitos colaterais significativos que resultam em disfunção cardíaca, especialmente as antraciclínicas, as quais são os agentes mais comuns responsáveis por cardiotoxicidade (ROCHETTE et al., 2015). A utilização de um agente cardiovascular na quimioterapia, além de estar associado à maior potência na terapêutica, poderá auxiliar a minimizar efeitos de cardiotoxicidade (MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010).

Fármacos que possuem anel tetrazol, como a valsartana (Ilustração 2), tem relevância significativa, uma vez que são documentadas na literatura atividades hipotensiva, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, citostática e antifúngica relacionados ao anel. Ainda, diversos medicamentos de alta eficácia que possuem o anel tetrazol já são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (MORJAN et al., 2015).

3.6 CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

A pesquisa por moléculas sintéticas capazes de clivar o DNA constitui um dos principais interesses para a química medicinal, biotecnologia e engenharia genética (PARAGINSKI et al., 2014). A descoberta de interações entre fármaco e DNA é importante para o reposicionamento de novos compostos quimioterápicos (ZEINAB MIRZEI-KALAR, 2018) capazes de clivar o DNA promovendo apoptose das células e assim, conferindo atividade antitumoral ao composto (PARAGINSKI et al., 2014).

Estas moléculas são denominadas nucleases sintéticas, artificiais, químicas ou quimioenzimas por serem capazes de agirem de forma semelhante às enzimas naturais. Ainda, constituem uma opção mais barata quando comparadas às nucleases naturais (PARAGINSKI et al., 2014).

Quando submetido ao método padrão de eletroforese em gel de agarose, na ocorrência de clivagem numa fita, o DNA em sua forma superenovelada (forma I) sofre relaxamento passando a forma circular aberta (forma II), já na ocorrência da segunda quebra, ocorre abertura do DNA convertendo-se na forma linear (forma III) (ARJMAND; SAYEED; MUDDASSIR, 2011; PARAGINSKI et al., 2014). As diferentes formas do DNA separam-se completamente permitindo sua identificação e quantificação (PARAGINSKI et al., 2014).

Fármacos que possuam mecanismo de ação através da hidrólise do DNA constituem objeto de ativa pesquisa, uma vez que compostos naturais ou sintéticos com essa capacidade podem ser potenciais antibacterianos ou anticancerígenos (PARAGINSKI et al., 2014).

Reposicionamento de fármacos anti-hipertensivos com ação antineoplásica já é relatado na literatura, como a prazosina, um receptor de monoamina considerados agentes promissores, atuando em células que iniciam o glioblastoma, induzindo a apoptose. Este fármaco representa um provável agente promissor utilizado em terapia adjuvante para pacientes com glioblastoma (ASSAD et al., 2016).

Sendo assim, devido aos problemas emergentes da resistência bacteriana e antitumoral e, ainda pela dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos, o reposicionamento de fármacos torna-se um meio eficaz na busca de potenciais não antibióticos para o tratamento destas doenças infecciosas e tumorais, uma vez que é mais rápido, econômico e seguro ao paciente quando comparado ao processo tradicional.

4 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo foi aceito para publicação no periódico “*American Journal of Therapeutics*” classificado de acordo com o Qualis Capes como B2.

Date: Sep 22, 2019
To: "ROSMARI HÖRNER" rosmari.ufsm@gmail.com
From: "American Journal of Therapeutics" PManu@nshs.edu
Subject: AJT Decision

Sep 22, 2019

RE: AJT-2019333R1, entitled "Amlodipine repositioning: scientific studies and synergistic effects"

Dear Dr HÖRNER,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in American Journal of Therapeutics. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

With Kind Regards,

Dr. Peter Manu
Editor-in-Chief
American Journal of Therapeutics

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.

Reposicionamento do anlodipino: estudos científicos e efeitos sinérgicos

Silvana S. Coelho¹, Taciéli F. da Rosa², Roberta F. Rampelotto³, Marissa B. Serafin²,
Angelita Bottega², Vitória S. Foletto¹, Catrine S. Machado⁴, Rosmari Hörner^{5*}

Caro editor,

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento envolve investimentos significativos e longo tempo de pesquisa, variando de 10 a 15 anos.^{1,2} Com o tempo, houve redução na produção de novos medicamentos por laboratórios e empresas farmacêuticas, principalmente antimicrobianas e antitumorais, devido à evolução acelerada da resistência a esses compostos, além da baixa rentabilidade fornecida.³⁻⁶ O reposicionamento de medicamentos surgiu como uma abordagem alternativa, uma estratégia de saúde promissora no tratamento de várias doenças.^{2,6,7}

O reposicionamento de medicamentos, que envolve a pesquisa de compostos já utilizados na prática clínica, mas com uma nova indicação terapêutica, tornou-se um campo ativo de pesquisa por sua eficácia quando comparado ao processo tradicional de desenvolvimento de novos medicamentos.^{1,2,6} Esse processo pode impedir que um terço das pesquisas de novos medicamentos falhem devido aos efeitos citotóxicos e outro terço devido a ineficiências.⁸ Além disso, trata-se de um processo ágil e seguro para o paciente, pois já são conhecidos dados de eficácia e pré-clínicos.^{1,2,6,7} Ainda, pode superar desafios significativos que envolvem tratamento e falta de recursos, especialmente em face de doenças autoimunes, infecções por microrganismos multirresistentes e cânceres raros.^{1,2}

Medicamentos reposicionados estão sendo usados em sinergia com antibióticos para tratar infecções graves, pois aumentam fortemente a atividade antibacteriana e geram menos resistência.⁶⁻¹¹

A literatura já consolidou o uso de fármacos reposicionados pertencentes a diferentes classes farmacológicas com novas indicações terapêuticas, como anestésicos locais, tranquilizantes, cardiovasculares, psicotrópicos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos, entre eles o anlodipino.¹²⁻¹⁴

O anlodipino pertence à classe dos bloqueadores dos canais de cálcio e também à hidropiridina, constituindo sua indicação ou controle estatístico da hipertensão arterial, angina e arritmias cardíacas, sendo frequentemente a droga de primeira escolha.¹⁵ Estudos relacionados ao anlodipino apresentam potencial atividade antifúngica^{16,17} e antiparasitária.^{13,18-20} Além disso, possui atividade antibacteriana e antineoplásica, que não é totalmente

elucidada, mas sugere-se que atue inibindo a bomba de efluxo e/ou como um composto auxiliar que atua sobre os macrófagos. A atividade antineoplásica pode ocorrer por indução apoptótica, alteração da permeabilidade celular e inibição da fase G1 do ciclo celular.²¹⁻³⁰

Diante desses relatos, apresentamos na Tabela 1 uma seleção de estudos científicos desse bloqueador de canais de cálcio, anlodipino, e suas respectivas atividades de reposicionamento no tratamento de várias doenças.

Com base nos estudos selecionados, sugerimos que o redirecionamento do anlodipino e o estudo sinérgico sejam eficazes no tratamento de várias doenças, principalmente em infecções causadas por microrganismos multirresistentes e antitumorais. A pesquisa *in vivo* e em humanos envolvendo esse fármaco é escassa, demonstrando a necessidade de novas investigações para verificar seu comportamento e elucidar os possíveis mecanismos de ação desse fármaco.

Tabela 1 - Estudos científicos selecionados do bloqueador de canais de cálcio anlodipino como possíveis sugestões para reposicionamento no tratamento de várias doenças.

Nova indicação no redirecionamento	Atividade	Efeito sinérgico	Provável mecanismo de ação	Tipo(s) de estudo(s)	Referências
Antibacteriano	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Imipenem	Não elucidado	<i>In vitro</i>	Li et al., 2013 <i>BMC Infect Dis</i> ¹²
Antibacteriano	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Imipenem	Inibição da bomba de efluxo <i>AdeABC</i>	<i>In vitro</i>	Hu et al., 2018 <i>PLoS One</i> ¹³
Antibacteriano	<i>Bacillus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Hafnia</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pasteurella séptica</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i>	Estreptomicina	Composto auxiliar que age nos macrófagos promovendo a morte intracelular, evitando respostas de mutação que resultariam em resistência	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>	Mazumdar; Kumar; Dutta, 2010 <i>Int J Antimicrob</i> ¹⁴

	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i>				
Antibacteriano	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571 <i>Escherichia coli</i> K12-Row <i>Salmonella typhimurium</i> NCTC74 <i>Shigella dysenteriae</i> NCTC 519/66 <i>Shigella sonnei</i> NCTC 5/59 <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> NCTC 254/66 <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Não elucidado	<i>In vitro</i>	Kumar et al., 2003 <i>Acta Microbiol Pol</i> ¹⁵
Antibacteriano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Levofloxacino	Não elucidado	<i>In vitro</i>	Elkhatib; Haynes; Noreddin, 2009 <i>J Chemother</i> ¹⁶
Antifúngico	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Anfotericina B	Alteração da homeostase do cálcio ou o crescimento da hifa podem levar uma resposta de estresse em algumas leveduras e interferir no seu crescimento	<i>In vitro</i>	Spader et al., 2019 <i>Mycopathologia</i> ¹⁷
Antifúngico	<i>Candida albicans</i>	Fluconazol	A associação com o antifúngico inibiu a expressão CNA1, CNB1 e YVC1, reduzindo a calcineurina e inibindo a regulação do	<i>In vitro</i>	Liu et al., 2016 <i>PLoS One</i> ¹⁸

			cálcio em células fúngicas. Ainda, o aumento da concentração de cálcio nestas células inibiu o crescimento de <i>Candida albicans</i>		
Antiparasitário	<i>Plasmodium Falciparum</i>	Cloroquina/ Azitromicina	Provável inibição da glicoproteína-P ou outros transportadores em <i>P. falciparum</i> e, assim, aumento da concentração intracelular de azitromicina	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>	Pereira et al., 2011 <i>Antimicrob Agents Chemother</i> ²⁰
Antiparasitário	<i>Leishmania Donovanii</i>	-	Redução do consumo de oxigênio e morte celular programada por ativação tipo caspase-3	<i>In vivo</i>	Palit et al.; 2008 <i>Antimicrob Agents Chemother</i> ⁸
Antiparasitário	<i>Leishmania Donovanii</i>	Paromicina	Não elucidado	<i>In vitro</i>	Verma et al., 2017 <i>Int J Parasitol Drugs Drug Resist</i> ²¹
Antiparasitário	<i>Leishmania (L.) chagasi</i> (promastigotas) <i>L. (L.) chagasi</i> (amastigotas) <i>L. (L.) amazonensis</i> (promastigotes) <i>L. (L.) major</i> (promastigotes) <i>L. (V.) braziliensis</i> (tpromastigotes) <i>Trypanosoma cruzi</i>	-	Características estruturais das 1,4-dihidropiridinas como presença de grupos difenilpropil e difenilmetilazetidin na posição 4 do anel 1,4-dihidropiridinas, que são necessárias para atividade antiparasitária, sendo investigações adicionais necessárias	<i>In vitro</i>	Reimão; Scotti; Tempone, 2010 <i>Bioorgan Med Chem</i> ²²

Antitumoral	Leucemia mielôgênica crônica K562, leucemia promielocítica HL-60 e MDR HL-60	Topotecano	Indução apoptótica através da caspase 8 e via de sinalização 3/7	<i>In vivo e in vitro</i>	Li et al., 2006 <i>Eur J Clin Invest</i> ²³
Antitumoral	Câncer de mama MCF-7 e células MCF-7 resistentes	Daunorrubicina	Promoção de inchaço e rompimento de mitocôndrias, aumentando a permeabilidade desta, com início da cascata de reações das caspases 8 e 3	<i>In vitro</i>	Zhang et al., 2010 <i>Mol Pharm</i> ²⁴
Antitumoral	Células A431 do carcinoma epidermóide humano	-	Ação antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> potencial que poderia resultar, em parte, através da inibição do influxo de cálcio recorrido pela depleção passiva de estoques internos de cálcio e pelo agonista ligado a fosfolipase C	<i>In vitro e in vivo</i>	Yoshida; Ishibashi; Nishio, 2004 <i>Eur J Pharmacol</i> ²⁵
Antitumoral	Células A431 do carcinoma epidermóide humano	-	Parada do ciclo G1 e inibição do crescimento em células A431 através da indução da expressão de p21 ^{Waf1/Cip1} , inibição das atividades de quinase associada a CDK /ciclina e redução da fosforilação da proteína retinoblastoma	<i>In vitro</i>	Yoshida; Ishibashi; Nishio, 2007 <i>Biochem Pharmacol</i> ²⁶
Antitumoral	Células MDA-MB-231 de carcinoma mamário humano	-	Indução da apoptose, com consequente redução da expressão da	<i>In vitro</i>	Lan et al., 2008 <i>Journal of Medical Colleges of</i>

proteína
antiapoptose Bcl-
2 e do antígeno
nuclear de
proliferação
celular

PLA²⁷

(-) Não determinado

REFERENCES

- [1] Kulkarni NS, Guerro Y, Gupta N, et al. Exploring potential of quantum dots as dual modality for cancer therapy and diagnosis. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019; 49(5):352–364. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.12.010.
- [2] Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, et al. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today.* 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.06.014.
- [3] Estrela TS. Antimicrobial resistance: multilateral approach and Brazilian response. *Health and External Policy: 20 years of the Office of International Health Affairs of the Ministry of Health of Brazil (1998-2018).* 1ed. Brasília: Ministry of Health Publisher. 2018; 1:11-364. Available at: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/salud_politica_externa_20anos_espanhol.pdf. Accessed September 9 2018.
- [4] Huang J, Zhao D, Liu Z, et al. Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agentes. *Cancer Lett.* 2018; 419:257-265. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.058 0304-3835.
- [5] Thakare R, Singh AK, Das S, et al. Repurposing Ivacaftor for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50(3):389–392. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.020.
- [6] Zheng W, Sun W, Simeonov A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br J Pharmacol.* 2018; 175(2):181-191. DOI: 10.1111/bph.13895.

- [7] Serafin MB, Hörner R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22:252-256. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.
- [8] Petrova E. Innovation in the pharmaceutical industry: the process of drug discovery and development. In: Ding M, Eliashberg J, Stremersch S, SpringerLink (Online service) (eds). *Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry Emerging Practices, Research, and Policies.* Springer New York: New York. 2014: 1122-1149.
- [9] Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, et al. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. *Crit Care.* 2014; 18:596. DOI: 10.1186/s13054-014-0596-8.
- [10] Aldeyab MA, Monnet DL, Lopez-Lozano JM, et al. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:593–600. DOI: 10.1093/jac/dkn198.
- [11] Qin X, Tran BG, Kim MJ, et al. A randomised, double-blind, phase 3 study comparing the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem for complicated intra-abdominal infections in hospitalised adults in Asia. *Int J Antimicrob Agents.* 2017. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.010.
- [12] Chan EWL, Yee ZY, Raja I, 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 Re.* 2017; 10:70-74. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.03.012.
- [13] Palit P, Ali N. Oral Therapy with Amlodipine and Lacidipine, 1,4-Dihydropyridine Derivatives Showing Activity against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1):374–377. DOI: 10.1128/AAC.00522-07.
- [14] Rampelotto RF. 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.* 2018; 54(2):e17369. DOI: 10.1590/s2175-97902018000217369.

[15] Godfraind T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014; 19(6):501-15. DOI: 10.1177/1074248414530508.

[16] Spader TB, Castrillón MR, Valente P, et al. *In Vitro* Interactions of Amphotericin B Combined with Non-antifungal Agents Against *Rhodotorula mucilaginosa* Strains. *Mycopathologia.* 2019. DOI: 10.1007/s11046-019-0317-6.

[17] Liu S, Yue L, Gu W, et al. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0150859. DOI: 10.1371/journal.pone.0150859.

[18] Pereira MR, Henrich PP, Sidhu ABSS, et al. *In vivo* and *in vitro* Antimalarial Properties of Azithromycin-Chloroquine Combinations That Include the Resistance Reversal Agent Amlodipine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(7):3115–3124. DOI: 10.1128/AAC.01566-10.

[19] Verma A, Bhandaria V, Deep DK, et al. Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist.* 2017; 7:370-377. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.10.004.

[20] Reimão JQ, Scotti MT, Tempone AG. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: *In vitro* evaluation and structure–activity relationship study. *Bioorgan Med Chem.* 2010; 18:8044–8053. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.09.015.

[21] Li YJ, Pan CZ, Zhao ZW, et al. Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:548. DOI: 10.1186/1471-2334-13-548.

- [22] Hu C, Li Y, Zhao Z, et al. *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the AdeABC efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2018; 13(6):e0198061. DOI: 10.1371/journal.pone.0198061.
- [23] Mazumdar K, Kumar KA, Dutta NK. Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: scope and hope for the future. Int J Antimicrob. 2010; 36:295–302. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.003
- [24] Kumar KA, Ganguly K, Mazumdar K et al. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. Acta Microbiol Pol 2003, 52:285–292.
- [25] Elkhatib WF, Haynes VL, Noreddin AM: Microbiological appraisal of levofloxacin activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in combination with different calcium channel blockers *in vitro*. J Chemother 2009, 21:135–143. DOI: 10.1179/joc.2009.21.2.135.
- [26] Li X, Lu WL, Liang GW, et al. Effect of stealthy liposomal topotecan plus amlodipine on the multidrug-resistant leukaemia cells *in vitro* and xenograft in mice. Eur J Clin Invest. 2006; 36:409–418. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2006.01643.x.
- [27] Zhang Y, Li RJ, Ying X, et al. Targeting Therapy with Mitosomal Daunorubicin plus Amlodipine Has the Potential To Circumvent Intrinsic Resistant Breast Cancer. Mol Pharm. 2010; 8:162-175. DOI: 10.1021/mp100249x.
- [28] Yoshida J, Ishibashi T, Nishio M. Antitumor effects of amlodipine, a Ca²⁺ channel blocker, on human epidermoid carcinoma A431 cells *in vitro* and *in vivo*. Eur J Pharmacol. 2004; 492:103–112. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.04.006.
- [29] Yoshida J, Ishibashi T, Nishio M. G1 cell cycle arrest by amlodipine, a dihydropyridine Ca²⁺ channel blocker, in human epidermoid carcinoma A431 cells. Biochem Pharmacol. 2007; 73:943–953. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.04.006.
- [30] Lan L, Xinghua X, Wenjuan S, et al. Effect of amlodipine on apoptosis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. Journal of Medical Colleges of PLA. 2008; 23:358–363. DOI: 10.1016/S1000-1948(09)60007-1.

4.2 MANUSCRITO

O manuscrito intitulado “**Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e sinérgica dos não antibióticos anlodipino e valsartana associados ao ciprofloxacino frente a microrganismos multi-droga resistentes**” será submetido ao periódico “Medicinal Chemistry Research”, classificado de acordo com o Qualis Capes como periódico B2.



Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e sinérgica dos não antibióticos anlodipino e valsartana associados ao ciprofloxacino frente a microrganismos multi-droga resistentes

Resumo

Infecções por microrganismos multirresistentes e neoplasias têm aumentado consideravelmente, reduzindo o arsenal terapêutico disponível na terapêutica. Com isso, há a necessidade da busca por novas alternativas mais rápidas, econômicas e eficazes, como o reposicionamento de medicamentos. Anti-hipertesivos como o anlodipino já demonstraram potente atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O anlodipino e valsartana são não antibióticos muito utilizados para tratamento da hipertensão arterial. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do anlodipino e valsartana sozinhos e em associação ao antibiótico ciprofloxacino, investigar o potencial de nuclease química bem como seu provável mecanismo. A atividade antibacteriana foi avaliada frente a dez cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e trinta e um isolados clínicos multirresistentes. Anlodipino sozinho foi ativo frente a todos os isolados, especialmente frente a bactérias Gram-positivas, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 32 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diferente do que ocorreu com valsartana que foi ativa apenas frente a três microrganismos com CIM=1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando associados ao ciprofloxacino, anlodipino resultou em nove isolados sinérgicos. Ambos os medicamentos foram aptos a clivar o DNA plasmidial nas condições definidas de pHs e temperaturas, sendo que na investigação do provável mecanismo de ação envolvido na clivagem do DNA plasmidial, sugere-se que atuem através do mecanismo hidrolítico. Sendo assim, evidenciamos o reposicionamento destes fármacos como forma eficaz na terapêutica de infecções ocasionadas por microrganismos multirresistentes.

Palavras-chave: Anlodipino; Valsartana; Reposicionamento de medicamentos; Sinergismo de drogas; Infecções bacterianas; Tratamento farmacológico.

Introdução

Nas últimas décadas, as infecções bacterianas aumentaram consideravelmente, constituindo uma grande ameaça à saúde pública mundial. Isto está relacionado à maior frequência de patógenos oportunistas que estão se tornando resistentes aos fármacos utilizados na clínica (Gao et al. 2019; Masci et al. 2019). Diversos fatores influenciam essa problemática, dentre eles o uso excessivo e inadequado dos antimicrobianos e a redução de investimentos em pesquisas por novos medicamentos (Estrela 2018; Masci et al. 2019). Assim, há urgência na descoberta de novos fármacos potentes e eficazes a fim de contornar estes desafios e limitações (Masci et al. 2019; Zheng et al. 2018).

Outra barreira existente é a resistência a múltiplas drogas quimioterápicas, devido a alterações genéticas e epigenéticas nas células que levam a resistência e conseqüentemente ao insucesso terapêutico dos medicamentos antitumorais disponíveis (Choudhury et al. 2019). Ainda, elevados custos financeiros no desenvolvimento de medicamentos, bem como o aumento dos fatores agravantes relacionados ao câncer, tornam essa situação alvo de pesquisa ativa na busca de novos fármacos antitumorais (Huang et al. 2018).

O redirecionamento de fármacos tornou-se uma estratégia mais eficaz quando comparada ao processo de introdução de um novo fármaco na clínica. Envolve a busca por compostos que já são utilizados, porém com uma nova indicação terapêutica (Serafin e Horner 2018; Zheng et al. 2018). É um processo mais rápido, econômico e seguro ao paciente, uma vez que já se tem conhecimento dos dados pré-clínicos e de eficácia desses fármacos (Domalaon et al. 2019; Zheng et al. 2018). Parcerias na área química são relevantes, de forma que após identificação do princípio ativo, sua característica físico-química, eficácia e especificidade possam ser melhoradas através de seus derivados, e assim, ser promissor no tratamento de diversas patologias, especialmente cânceres, doenças emergentes e raras (Schein 2019).

Anlodipino, medicamento anti-hipertensivo classificado como uma di-hidropiridina, pertence à classe dos bloqueadores dos canais de cálcio, é amplamente utilizado na clínica. Já tem sido relatado na literatura como um potente antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antitumoral (Elkhatib et al. 2009; Godfraind 2014; Hu et al. 2018; Kumar et al., 2003; Li et al., 2013; Mazumdar et al. 2010; Spader et al. 2019; Zhang et al. 2010).

Valsartana também é utilizada comumente como anti-hipertensivo, pertencente a classe dos antagonistas dos receptores de angiotensina II. Sabe-se que a presença do anel tetrazol em sua estrutura confere-lhe atividade antimicrobiana (Gao et al. 2019). Apesar disto,

pelo que é de nosso conhecimento, ainda não há relatos de sua atividade antibacteriana e antitumoral na literatura.

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana sinérgica *in vitro* dos medicamentos anti-hipertensivos anlodipino e valsartana e investigar o potencial de nuclease química bem como o mecanismo de ação envolvido.

Materiais e métodos

Medicamentos utilizados

Os medicamentos utilizados anlodipino, valsartana (ambos adquiridos comercialmente na forma de seu sal) e ciprofloxacino (Cimed Indústria de medicamentos Ltda., Pouso Alegre, MG, Brasil). Para obtenção da solução estoque, anlodipino e ciprofloxacino foram dissolvidos em metanol (Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) enquanto que valsartana em etanol (Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil). Para comprovação da inexistência de atividade inibitória do solvente foi utilizado etanol e metanol a 10% em teste realizado isoladamente.

Cepas bacterianas utilizadas

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a cepas bacterianas padrão de referência da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e frente a isolados clínicos multirresistentes (MDR) obtidos de pacientes admitidos em um hospital universitário, os quais foram identificados através de provas fenotípicas manuais e automatizadas pelo aparelho Vitek® 2 (*BioMérieux, MarcyL'Etoile, França*), no laboratório de microbiologia do referido hospital. As amostras estavam armazenadas em caldo TSB (*Tryptic SoyBroth*) contendo 15% de glicerol a - 80 °C.

As cepas ATCC Gram-positivas (GP) utilizadas foram: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Já as Gram-negativas (GN): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Salmonella typhimurium* ATCC 52117. Os isolados clínicos MDR utilizados foram vinte e dois isolados

ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) coletados no ano de 2019 e nove *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a meticilina (MRSCoN) no período de 2016/2017.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo, descrita no documento M100-S26 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI 2012). Os medicamentos foram diluídos na concentração de 1 a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril, obtendo turbidez padrão da escala 0,5 de McFarland. Em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo em U, contendo caldo Mueller Hinton (MH), os medicamentos juntamente com o inóculo bacteriano (1×10^5 UFC/poço), foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas (h). Após o período de incubação, a CIM foi definida por meio de leitura visual como a menor concentração do fármaco que impediu o crescimento visível do microrganismo nos poços de diluição.

Determinação do índice de concentração inibitória fracionada (FICI)

Para a análise do sinergismo dos medicamentos em estudo juntamente com os antibacterianos, foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), o qual foi interpretado como: “sinérgico” ($\text{FICI} \leq 0,5$), “sem interação” ($\text{FICI} > 0,5$ e $\leq 4,0$) e “antagônico” ($\text{FICI} > 4,0$) (Odds 2003; Konaté et al. 2012).

$$\text{FICI do agente A} = \frac{\text{CIM do agente A em combinação}}{\text{CIM do agente A sozinho}}$$

$$\text{FICI do agente B} = \frac{\text{CIM do agente B em combinação}}{\text{CIM do agente B sozinho}}$$

$$\Sigma\text{FICI} = \text{FICI do agente A} + \text{FICI do agente B}$$

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A análise da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada conforme o método descrito no documento M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (1999), com adaptações. Após a leitura visual da CIM, foram retiradas alíquotas de aproximadamente 10µL dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível e também do último poço onde houve crescimento visível, sendo esse utilizado como controle positivo. Este volume foi semeado em placas de Petri contendo ágar MH, as quais foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C pelo período de 24/48 h. Após a incubação, a concentração CBM foi determinada como a menor concentração necessária capaz de matar os microrganismos.

Índice de tolerância

O índice de tolerância dos medicamentos em estudo frente às cepas padrão e isolados clínicos foi determinado de acordo com o método padrão descrito por Das e colaboradores (2016), cuja interpretação foi classificada como bacteriostático (≥ 16) e bactericida (≤ 4).

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

Clivagem do DNA plasmidial

O objetivo deste método foi investigar o potencial de nuclease química dos fármacos. Sendo assim, foi extraído o DNA plasmidial inserido em cepa de *Escherichia coli* (pUC18) utilizando procedimento padrão por lise alcalina (“*large-scale preparation of plasmid DNA*”), descrito no livro de protocolos de Ausubel et al. em 2003. Após a extração do DNA plasmidial, este foi incubado com os medicamentos em estudo separadamente. Primeiramente, foram solubilizados obtendo-se as concentrações de 3,75 mM, 1,875 mM e 0,375 mM. Posteriormente o DNA e os medicamentos em estudo foram incubados em microtubos por 24h em duas diferentes temperaturas (37°C e 50°C) em dois diferentes pHs (7,4 e 8,0). Após o período de incubação, adicionou-se *loading buffer*. Para a detecção da clivagem do DNA plasmidial, utilizou-se eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Para investigação do provável

mecanismo de ação na ocorrência de clivagem, os ensaios foram repetidos, nas mesmas condições de incubação já descritas, na presença de sequestradores de radicais livres (tiourea 0,4M, solução de glicerol 10% e 1% e dimetilsulfóxido 0,4M). Se a presença desses sequestradores for capaz de inibir a clivagem, prediz que as espécies reativas são essenciais para que esta ocorra, sugerindo que o mecanismo envolvido é oxidativo e depende de radicais livres. Caso essa clivagem não seja inibida, o provável mecanismo é o hidrolítico (Domingues et al. 2010).

Conceitos éticos

A utilização dos isolados para pesquisa clínica provenientes dos pacientes admitidos no hospital foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob CAAE 38850614.4.0000.5346.

O cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) está registrado sob o número AE78E18 – Universidade Federal de Santa Maria.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey usando o software *GraphPad Prism 7.0* (*GraphPad*, San Diego, CA). Diferenças com $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,001^{***}$ foram consideradas significativas.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 apresentamos os valores de CIM do anlodipino e valsartana, bem como os valores de FICI frente às cepas bacterianas e isolados clínicos MDR testados. Em nosso estudo, valsartana apresentou atividade antibacteriana apenas frente a três microrganismos com CIM=1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Acinetobacter baumannii* (2). Já o anlodipino foi ativo frente a todos os isolados, especialmente frente a bactérias GP. Apresentou melhor atividade quando avaliado isoladamente principalmente frente aos SCoN com CIM=32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para um isolado de *S. hominis*, CIM=64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para quatro *S. epidermidis*, dois *S. haemolyticus* e um *S. hominis*. Quanto aos isolados ESKAPE, foi ativo frente a três microrganismos com CIM=64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$,

dentre eles dois de *A. baumannii* e um *E. faecium*. Quando anlodipino foi associado ao ciprofloxacino, houve sinergismo em nove isolados ESKAPE, sendo três de *A. baumannii* (FICI=0,5), três *E. faecium* (FICI=0,16; 0,5 e 0,19), uma *K. pneumoniae* (FICI=0,37) e dois *S. aureus* (FICI=0,5 e 0,25). Ainda, foi observado que anlodipino apresentou concentrações menores ou iguais isoladamente quando comparado à associação em alguns microrganismos.

A pesquisa realizada por Li e colaboradores (2013), avaliou a atividade do anlodipino tanto isoladamente quanto associado ao imipenem frente a 42 isolados clínicos de *A. baumannii* oriundos de um hospital na China. Neste estudo, anlodipino sozinho apresentou CIM entre 40 a 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Já quando associado ao antibacteriano, a atividade aumentou consideravelmente com CIM variando de 0,5 a 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ainda, anlodipino apresentou sinergismo frente à metade das cepas testadas (Li et al. 2013). Quando associado ao aminoglicosídeo estreptomicina mostrou uma redução da CIM de duas a oito vezes, apresentando efeito sinérgico frente a alguns isolados como de *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Staphylococcus aureus* NCTC 8530, *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* NCTC 74 (Kumar et al. 2004).

A Tabela 2 apresenta os resultados de CBM do anlodipino e valsartana, bem como de suas associações com ciprofloxacino frente às cepas padrão ATCC e aos isolados clínicos. Em nosso estudo, valsartana não apresentou efeito bactericida. Já em relação ao anlodipino, quando foi avaliado isoladamente, apresentou atividade bactericida frente a todas as cepas padrão ATCC e isolados testados, com CBM variando de 64 a 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Na associação com o antibacteriano, obteve-se o melhor resultado frente à cepa de *S. aureus* (4) com CBM de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kumar et al. (2004) também relatam que este anti-hipertensivo possui atividade bactericida com CBM entre 50–64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a bactérias GP, ressaltando novamente sua atividade.

Os índices de tolerância do anlodipino e valsartana são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Anlodipino, obteve resultados ≤ 4 quando testado frente a todos os patógenos avaliados, caracterizando-se como efeito bactericida. Em relação à valsartana, apenas frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Acinetobacter baumannii* (2) apresentou atividade bactericida (IT=1).

Estudos sugerem que o anlodipino possa atuar como um composto auxiliar, promovendo a morte intracelular de microrganismos e assim, reduzir prováveis respostas de mutação que resultariam em resistência aos medicamentos. Ainda, sua estrutura principal, fenil-1,4-di-hidropiridina, pode ser utilizada para síntese de futuros compostos, a fim de excluir seus possíveis efeitos colaterais anti-hipertensivos quando administrado nos pacientes

(Mazumdar et al. 2010). Além disto, provavelmente este fármaco também estaria associado à inibição da bomba de efluxo *AdeABC* (Hu et al. 2018).

Na Figura 1 são apresentados os gráficos efetuados por meio do programa estatístico *GraphPad Prism 7*, onde demonstram que anlodipino apresentou valores de *p* significativos quando associado ao ciprofloxacino, frente a maioria dos patógenos considerados sinérgicos, sendo: A: *Acinetobacter baumannii* (1), B: *Enterococcus faecium* (1), C: *Enterococcus faecium* (2), D: *Enterococcus faecium* (4), E: *Klebsiella pneumoniae* (1), F: *Staphylococcus aureus* (1) e G: *Staphylococcus aureus* (4).

A avaliação da atividade de nuclease química dos medicamentos em estudo, anlodipino e valsartana, foi realizada através da utilização do DNA plasmidial (pUC 18), como descrito anteriormente. A Figura 2 apresenta a eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA, onde a ocorrência de clivagem é identificada através da diminuição da banda referente à forma I do DNA (superenovelada ou FI) e aumento da forma II (circular aberta ou FII). Ainda, em alguns casos, na presença de uma clivagem altamente eficiente, poderá ser observada a formação da forma III (linear ou FIII) (Ausubel et al. 1999; Domingues et al. 2010); podendo também ser ocorrer uma clivagem em pedaços muito pequenos que não podem ser observados nesta técnica de gel de eletroforese utilizada.

Conforme evidenciamos na Figura 3, ambos os medicamentos foram aptos a clivar o DNA plasmidial, sendo que o anlodipino teve essa capacidade na concentração 3,75mM e pH 7,4 e 8,0, e condições de temperaturas de 37 e 50°C, sendo nitidamente sua atividade acentuada a 37°C, onde foi apto a clivar também na concentração de 1,875mM. Valsartana além de ter atividade em 3,75mM nas duas temperaturas e pHs, clivou também nos dois pHs, na temperatura de 37°C na concentração 1,875mM. Quando investigado o provável mecanismo de nuclease dos fármacos, verificou-se que a presença de sequestradores de radicais livres (glicerol, tiouréia e DMSO) não foi capaz de inibir a atividade de clivagem destes fármacos, podendo inferir que o provável mecanismo de ação seja o hidrolítico, semelhante às nucleases naturais.

Medicamentos que atuam no DNA são comumente utilizados na terapêutica dos tumores, porém sua toxicidade e fenômenos de resistência constituem problemas que necessitam ser contornados (Almeida et al. 2019). A bleomicina, por exemplo, é um fármaco antitumoral que atua através da clivagem do DNA mediada pelo mecanismo oxidativo (Ali et al. 2019). Nesta pesquisa, anlodipino e valsartana foram aptos a clivar o DNA plasmidial podendo resultar em candidatos promissores na terapêutica.

Conclusão

Diante dos resultados apresentados, ressaltamos que o anti-hipertensivo anlodipino apresentou atividade bactericida frente a todos os microrganismos testados, especialmente contra bactérias GP, o que não ocorreu de forma significativa com a valsartana. Ainda, anlodipino demonstrou sinergismo em nove isolados quando associado ao antibiótico ciprofloxacino. Com isso, sugerimos o reposicionamento deste fármaco como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas por bactérias MDR. Embora a valsartana tenha apresentado nesse estudo atividade antibacteriana menor quando comparada ao anlodipino, ambos foram aptos a clivar o DNA plasmidial em condições definidas de diferentes pHs e temperaturas, através do mecanismo hidrolítico, uma vez que a clivagem não foi inibida na presença de radicais livres. Fato de extrema relevância, pois podem apresentar atividade antitumoral.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Ali TFS, Ciftci HI, Radwan MO, Koga R, Ohsugi T, Okiyama Y, Honma T, Nakata A, Ito A, Yoshida M, Fujita M, Otsuka M (2019) New SIRT2 inhibitors: Histidine-based bleomycin spin-off. *Bioorg Med Chem* 27(9):1767-1775. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.003>.

Almeida LC, Bauermeister A, Rezende-Teixeira P, Santos EAD, Moraes LAB, Machado-Neto JA, Costa-Lotufo LV (2019) Pradimicin-IRD exhibits antineoplastic effects by inducing DNA damage in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 168:38-47. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.016>

Asok Kumar K, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar SG, Ray R (2004) Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. *Biol Pharm Bull* 27(7):1116-20. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1116>

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003) *Current protocols in molecular biology*. 5th edn. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA; ISBN: 978-0-471-50338-5

Choudhury H, Pandey M, Yin TH, Kaur T, Jia GW, Tan L, Weijie H, Yang EKSY, Keat CG, Bhattamishra SK, Kesharwani P, Md S, Molugulu N, Pichika MR, Gorain B (2019) Rising horizon in circumventing multidrug resistance in chemotherapy with nanotechnology *Mater Sci Eng C* 101:596-613. <https://doi.org/doi:10.1016/j.msec.2019.04.005>.

CLSI (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 11th edn. CLSI standard M07-A9. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, PA. ISBN: 1-56238-836-3

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. *Infect Dis* 9:11-19. <https://doi.org/10.4137/IDRT.S31741>

Domalaon R, Okunnu O, Zhanel GG, Schweizer F (2019) Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxyclozanide, rafoxanide, and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli. *J Antibiot* 72(8):605-616. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0186-8>

Domingues VO, Horner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN, Bauchspiess R, Pereira WV, Paraginski GL, Locatelli A, Fank JO, Giglio VF, Hörner M (2010) *In Vitro* Evaluation of Triazines: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. *J Braz Chem Soc* 21(12): 2226-2237. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010001200009>.

Elkhatib WF, Haynes VL, Noreddin AM (2009) Microbiological appraisal of levofloxacin activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in combination with diferente calcium Chanel blockers in vitro. *J Chemother* 21:135–143. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2009.21.2.135>

Estrela TS (2018) Antimicrobial resistance: multilateral approach and Brazilian response. *Health and External Policy: 20 years of the Office of International Health Affairs of the Ministry of Health of Brazil (1998-2018)*. 1ed. Brasília: Editora Ministério da Saúde 1:11-364.

Gao F, Xiao J, Huang G (2019) Current scenario of tetrazole hybrids for antibacterial activity. *Eur J Med* 184:111744. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111744>.

Godfraind T (2014) Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 19(6):501-15. <https://doi.org/10.1177/1074248414530508>.

Hu C, Li Y, Zhao Z, Wei S, Zhao Z, Chen H, Wu P (2018) *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the *AdeABC* efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 13(6):e0198061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198061>.

Huang J, Zhao D, Liu Z, Liu F (2018) Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agentes. *Cancer Lett* 419:257-265. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.058>.

Konaté K, Movoungou 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* 11:18. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-18>.

Kumar AK, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar SG, Ray R (2004) Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. *Biol Pharm Bull* 27(7):1116-20. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1116>

Li X, Lu WL, Liang GW, Ruan GR, Hong HY, Long C, Zhang YT, Liu Y, Wang JC, Zhang X, Zhang Q (2006) Effect of stealthy liposomal topotecan plus amlodipine on the multidrug-resistant leukaemia cells *in vitro* and xenograft in mice. *Eur J Clin Invest* 36:409–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01643.x>

Masci D, Hind C, Islam MK, Toscani A, Clifford M, Coluccia A, Conforti I, Touitou M, Memdough S, Wei X, La Regina G, Silvestri R, Sutton JM, Castagnolo D (2019) Switching on the activity of 1,5-diaryl-pyrrole derivatives against drug-resistant ESKAPE bacteria: Structure-activity relationships and mode of action studies. *Eur J Med Chem* 178:500-514. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.087>.

Mazumdar K, Kumar KA, Dutta NK (2010) Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: scope and hope for the future. *Int J Antimicrob* 36:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.003>.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26-A. vol. 19; No. 8. NCCLS, Wayne, USA. https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf.

Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52:1–1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>.

Saibert, C (2015) Interação e clivagem de DNA por complexos binucleares de cobre (II) com ligantes contendo o grupo triazina e cadeias laterais funcionalizadas. Dissertação de mestrado. Florianópolis.

Schein CH (2019) Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. *Med Res Rev* 1–20. <https://doi.org/10.1002/med.21627>.

Serafin MB, Hörner R (2018) Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *Braz J Infect Dis* 22:252–256. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.05.007>.

Spader TB, Ramírez-Castrillón M, Valente P, Alves SH, Severo LC (2019) *In Vitro* Interactions of Amphotericin B Combined with Non-antifungal Agents Against *Rhodotorula mucilaginosa* Strains. *Mycopathologia* 184(1):35-43. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-0317-6>.

Zhang Y, Li RJ, Ying X, Tian W, Yao HJ, Men Y, Yu Y, Zhang L, Ju RJ, Wang XX, Zhou J, Chen JX, Li N, Lu WL (2010) Targeting therapy with mitosomal daunorubicin plus amlodipine has the potential to circumvent intrinsic resistant breast cancer. *Mol Pharm* 8(1):162-175. <https://doi.org/10.1021/mp100249x>.

Zheng W, Sun W, Simeonov A (2018) Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br J Pharmacol* 175(2):181-191. <https://doi.org/10.1111/bph.13895>.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos e índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

(continua)

Cepas bacterianas ATCC	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	ANL	CIP	ANL + CIP	FICI	VAL	VAL+CIP	FICI
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128	2	2	1,015	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64	1	1	1,015	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	64	512	64	1,125	>1024	512	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	128	64	64	1,5	>1024	512	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64	512	64	1,125	>1024	512	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	128	4	4	1,031	1024	256	64,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	1	1	1,007	>1024	512	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128	1	1	1,007	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128	0,5	1	2,007	1024	256	512,2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 52117	64	16	8	0,625	>1024	256	-
Isolados clínicos MDR							
SCoN (1)	64	128	128	3	>1024	512	-
SCoN (2)	64	128	64	1,5	>1024	128	-
SCoN (3)	64	256	64	1,25	>1024	512	-
SCoN (4)	128	64	64	1,5	>1024	256	-
SCoN (5)	64	128	128	1,25	>1024	512	-
SCoN (6)	64	256	64	1,25	>1024	128	-
SCoN (7)	64	128	128	3	>1024	128	-
SCoN (8)	32	64	64	3	>1024	256	-
SCoN (9)	64	256	64	1,25	>1024	1024	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	256	256	64	0,5	>1024	256	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	256	256	64	0,5	1024	128	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)	128	256	64	0,75	>1024	256	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	256	256	64	0,5	>1024	256	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (5)	64	256	128	2,5	>1024	512	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (6)	64	128	64	1,5	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	256	1024	32	0,16	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecium</i> (2)	512	512	128	0,5	>1024	512	-

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos e índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

(continuação e conclusão)

Isolados clínicos MDR	ANL	CIP	ANL + CIP	FICI	VAL	VAL+CIP	FICI
<i>Enterococcus faecium</i> (3)	128	2	2	1,015	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecium</i> (4)	64	1	1	1,015	>1024	512	-
<i>Enterococcus faecium</i> (5)	64	512	64	1,125	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	128	64	64	1,5	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	64	512	64	1,125	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	128	4	4	1,031	1024	256	64,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	128	1	1	1,007	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	128	1	1	1,007	>1024	512	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6)	128	0,5	1	2,007	1024	256	512,2
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	64	16	8	0,625	>1024	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	128	256	64	0,75	>1024	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	128	256	128	1,5	>1024	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (4)	256	256	32	0,25	>1024	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (5)	256	256	128	1	>1024	512	-

ATCC, *American Type Culture Collection*; ANL, anlodipino; CIP, ciprofloxacino; ANL + CIP, associação de anlodipino e ciprofloxacino; VAL, valsartana; VAL + CIP, associação de valsartana e ciprofloxacino; FICI, índice de concentração inibitória fracionada; MDR, multirresistente; SCoN, *Staphylococcus coagulase* negativos.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Tabela 2 – Concentração bactericida mínima (CBM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos.

(continua)

Cepas bacterianas ATCC	CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	ANL	CIP	ANL + CIP	VAL	VAL+CIP
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128	2	128	>1024	1024
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64	>1024	128	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	128	>1024	128	>1024	>1024
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	128	>1024	64	>1024	>1024
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	128	>1024	128	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	256	1024	128	>1024	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	2	128	>1024	1024
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	256	>1024	128	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128	1	128	>1024	1024
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 52117	64	512	128	>1024	>1024
Isolados clínicos MDR					
SCoN (1)	128	128	128	>1024	>1024
SCoN (2)	64	128	128	>1024	>1024
SCoN (3)	128	256	256	>1024	>1024
SCoN (4)	128	64	128	>1024	>1024
SCoN (5)	64	128	256	>1024	>1024
SCoN (6)	64	>1024	128	>1024	>1024
SCoN (7)	64	128	256	>1024	>1024
SCoN (8)	64	128	64	>1024	>1024
SCoN (9)	64	256	256	>1024	>1024
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	256	512	128	>1024	512
<i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	256	512	64	>1024	1024
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)	256	256	128	>1024	>1024
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	256	>1024	64	>1024	>1024
<i>Acinetobacter baumannii</i> (5)	128	>1024	128	>1024	>1024
<i>Acinetobacter baumannii</i> (6)	128	>1024	128	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	512	>1024	64	>1024	1024
<i>Enterococcus faecium</i> (2)	1024	>1024	128	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecium</i> (3)	128	>1024	256	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecium</i> (4)	256	>1024	128	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecium</i> (5)	512	>1024	128	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	512	>1024	128	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	256	>1024	64	>1024	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	256	>1024	128	>1024	>1024

Tabela 2 – Concentração bactericida mínima (CBM) do anlodipino e valsartana isoladamente e em associação com ciprofloxacino frente a cepas padrão e isolados clínicos.

(continuação e conclusão)

Isolados clínicos MDR	CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	ANL	CIP	ANL + CIP	VAL	VAL+CIP
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	256	512	256	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	256	>1024	256	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6)	128	>1024	256	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	256	>1024	128	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	128	>1024	64	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	128	>1024	128	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (4)	256	>1024	32	>1024	>1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (5)	256	>1024	512	>1024	>1024

ATCC, *American Type Culture Collection*; ANL, anlodipino; CIP, ciprofloxacino; ANL + CIP, associação de anlodipino e ciprofloxacino; VAL, valsartana; VAL + CIP, associação de valsartana e ciprofloxacino; FICI, índice de concentração inibitória fracionada; MDR, multirresistente; SCoN, *Staphylococcus coagulase negativos*.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do anlodipino (ANL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.

(continua)

Cepas bacterianas ATCC	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de Tolerância (CBM/CIM)	Interpretação
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128	128	1	Bactericida
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64	64	1	Bactericida
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	64	128	2	Bactericida
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	128	128	1	Bactericida
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64	128	2	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	128	256	2	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	128	1	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128	256	2	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128	128	1	Bactericida
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 52117	64	64	1	Bactericida
Isolados clínicos				
SCoN (1)	64	128	2	Bactericida
SCoN (2)	64	64	1	Bactericida
SCoN (3)	64	128	2	Bactericida
SCoN (4)	128	128	1	Bactericida
SCoN (5)	64	64	1	Bactericida
SCoN (6)	64	64	1	Bactericida
SCoN (7)	64	64	1	Bactericida
SCoN (8)	32	64	2	Bactericida
SCoN (9)	64	64	1	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	256	256	1	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	256	256	1	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)	128	256	2	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	256	256	1	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (5)	64	128	2	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (6)	64	128	2	Bactericida
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	256	512	2	Bactericida
<i>Enterococcus faecium</i> (2)	512	1024	2	Bactericida
<i>Enterococcus faecium</i> (3)	64	128	2	Bactericida
<i>Enterococcus faecium</i> (4)	256	256	1	Bactericida
<i>Enterococcus faecium</i> (5)	256	512	2	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	512	512	1	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	256	256	1	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	256	256	1	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	256	512	2	Bactericida

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do anlodipino (ANL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.

(continuação e conclusão)

Isolados clínicos MDR	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de Tolerância (CBM/CIM)	Interpretação
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	256	256	1	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6)	128	256	2	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	256	256	1	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	128	128	1	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	128	128	1	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (4)	256	256	1	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (5)	256	512	2	Bactericida

ATCC, *American Type Culture Collection*; ANL, anlodipino; MDR, multirresistente; SCoN, *Staphylococcus coagulase negativus*.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do valsartana (VAL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.

(continua)

Cepas bacterianas ATCC	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de Tolerância (CBM/CIM)	Interpretação
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	>1024	>1024	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1024	1024	1	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>1024	>1024	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1024	1024	1	Bactericida
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 52117	>1024	>1024	-	-
Isolados clínicos				
SCoN (1)	>1024	>1024	-	-
SCoN (2)	>1024	>1024	-	-
SCoN (3)	>1024	>1024	-	-
SCoN (4)	>1024	>1024	-	-
SCoN (5)	>1024	>1024	-	-
SCoN (6)	>1024	>1024	-	-
SCoN (7)	>1024	>1024	-	-
SCoN (8)	>1024	>1024	-	-
SCoN (9)	>1024	>1024	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	>1024	>1024	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	1024	1024	1	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)	>1024	>1024	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	>1024	>1024	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (5)	>1024	>1024	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (6)	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (2)	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (3)	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (4)	>1024	>1024	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (5)	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	>1024	>1024	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	>1024	>1024	-	-

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do valsartana (VAL) frente a cepas padrão e isolados clínicos.

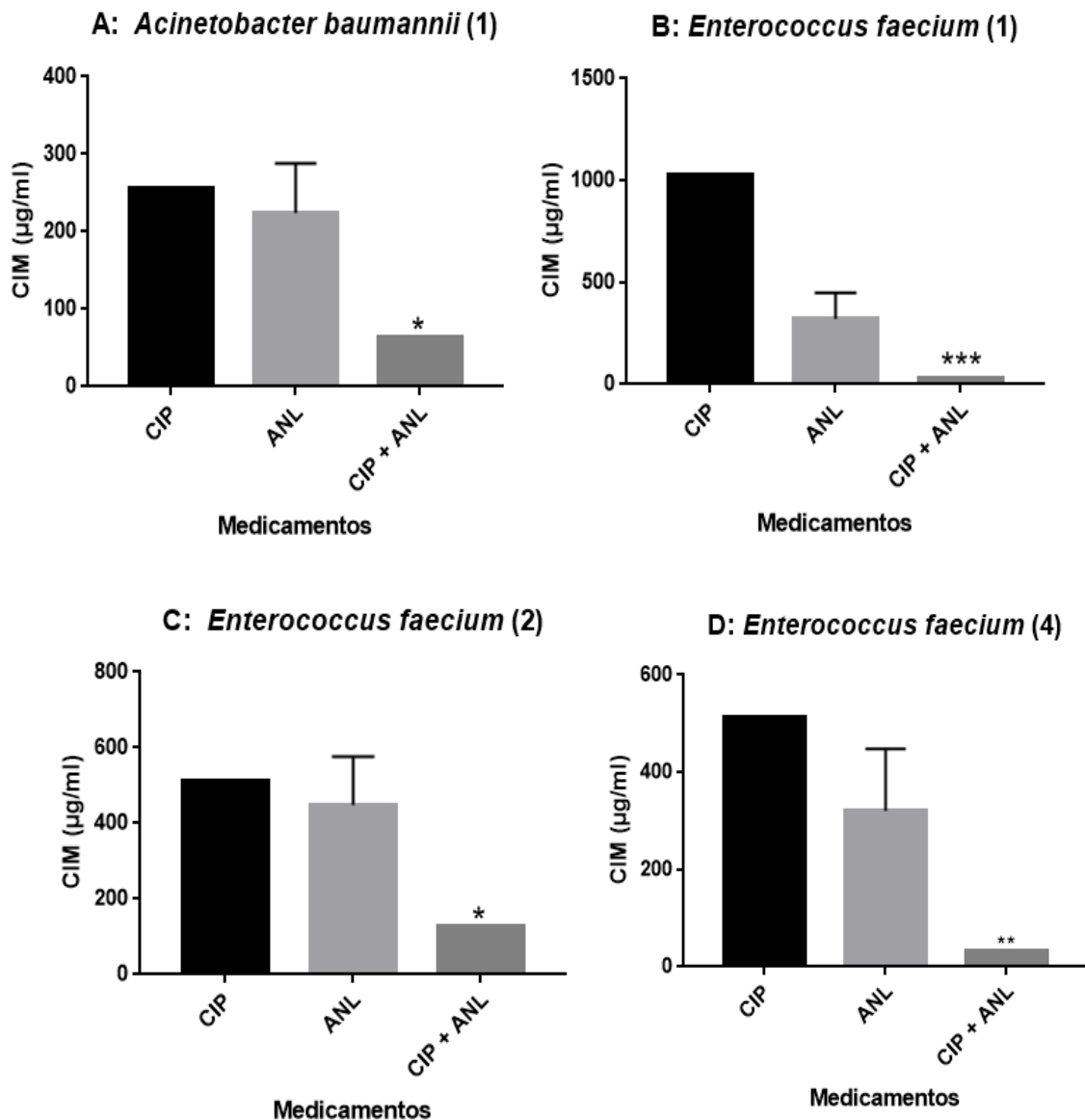
(continuação e conclusão)

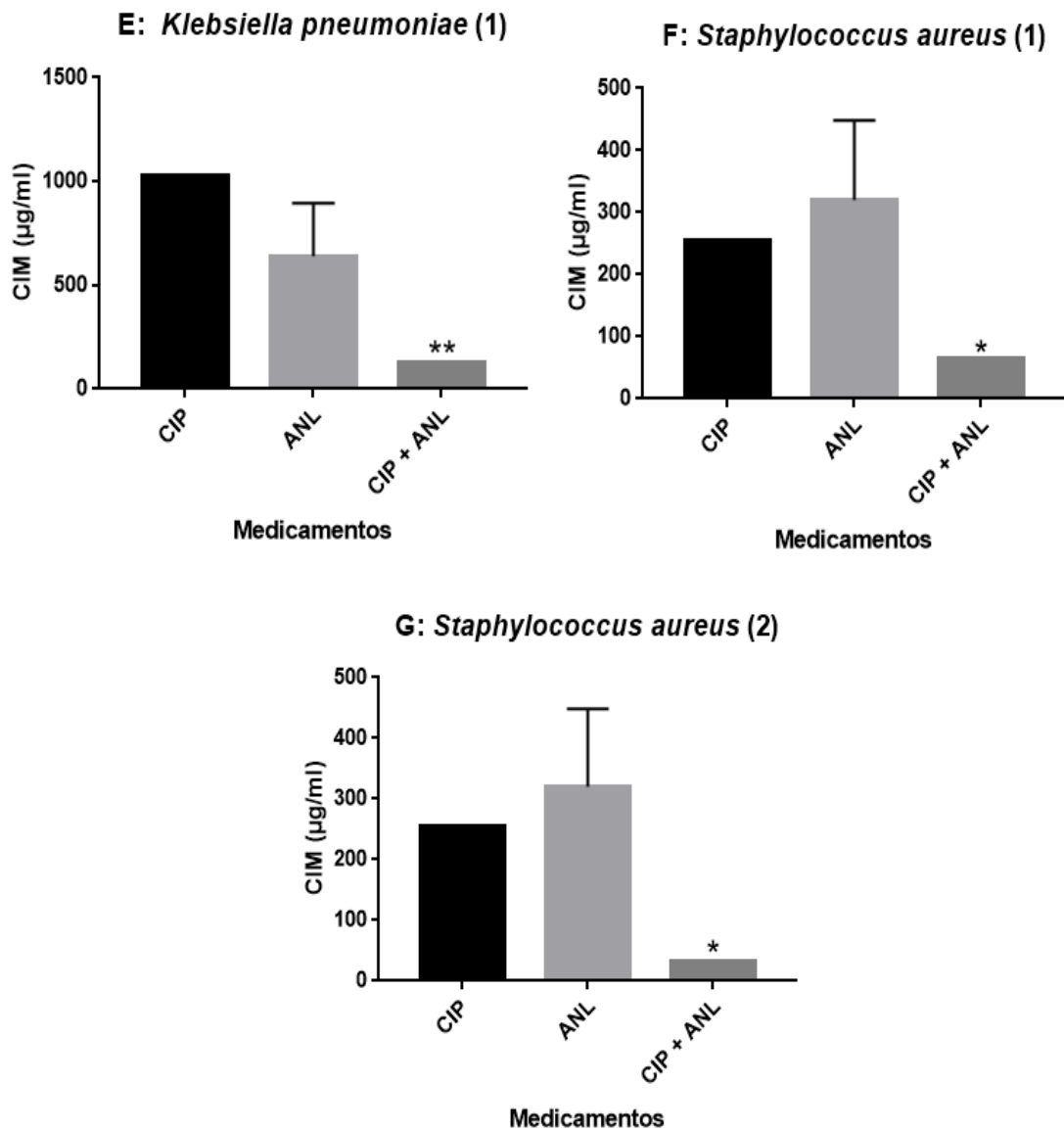
Isolados clínicos MDR	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de Tolerância (CBM/CIM)	Interpretação
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6)	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (4)	>1024	>1024	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (5)	>1024	>1024	-	-

ATCC, *American Type Culture Collection*; ANL, anlodipino; MDR, multirresistente; SCoN, *Staphylococcus coagulase negativos*.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

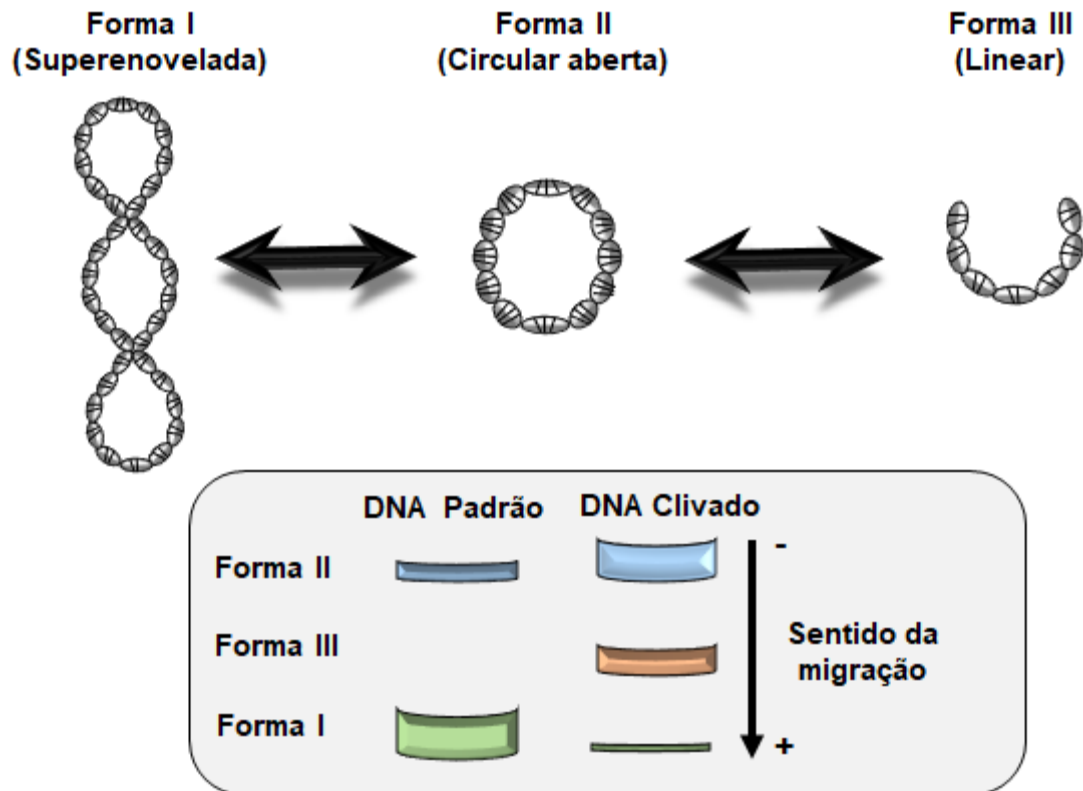
Figura 1 – Atividade do anlodipino frente às principais cepas consideradas sinérgicas, onde A: *Acinetobacter baumannii* (1), B: *Enterococcus faecium* (1), C: *Enterococcus faecium* (2), D: *Enterococcus faecium* (4), E: *Klebsiella pneumoniae* (1), F: *Staphylococcus aureus* (1) e G: *Staphylococcus aureus* (2). Os níveis de significância representam os asteriscos ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,001^{***}$), quando comparados aos medicamentos testados isoladamente. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.





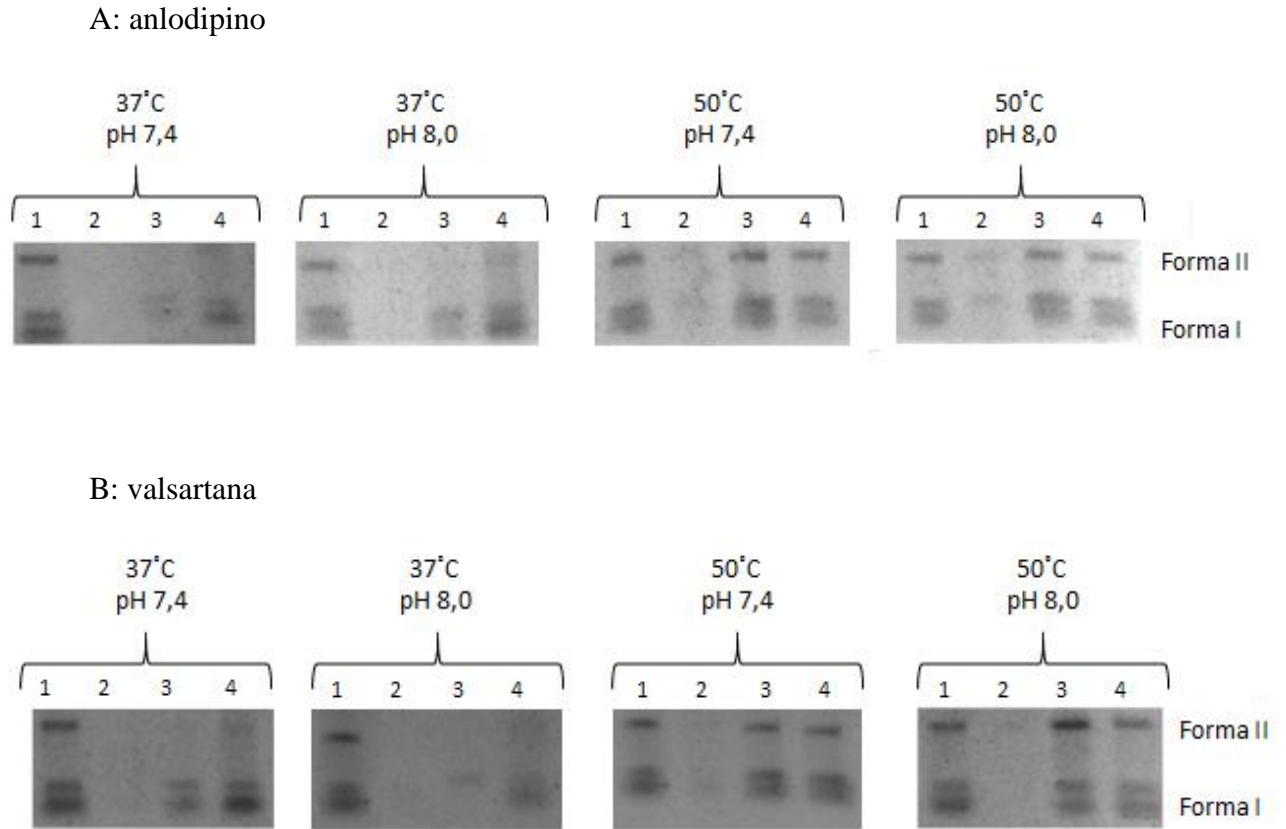
Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (forma I) nas formas circular aberta (forma II) e linear (forma III).



Fonte: Adaptado de Saibert, 2015.

Figura 3. Clivagem do DNA plasmidial dos medicamentos A: anlodipino e B: valsartana apresentados no gel de agarose em diferentes pHs e temperaturas.



1, Água Milli-Q; 2, Solução estoque (3,75 mM); 3, Diluição do composto 1:2 (1,875 mM); 4, Diluição do composto 1:10 (0,375 mM).

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

5 DISCUSSÃO GERAL

Diferentes estudos sobre reposicionamento relatam a potente atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antineoplásica do não antibiótico anlodipino. Ainda, sugerem sua utilização em associação a outros fármacos, devido sua atividade sinérgica quando comparado com a sua atividade isoladamente (ELKHATIB; HAYNES; NOREDDIN, 2009; HU et al., 2018; KUMAR et al., 2003; LAN et al., 2008; LI et al., 2006; LI et al., 2013; LIU et al., 2016; MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010; PALIT et al., 2008; PEREIRA et al., 2011; REIMÃO; SCOTTI; TEMPONE, 2010; SPADER et al., 2019; VERMA et al., 2017; YOSHIDA; ISHIBASHI; NISHIO, 2004; YOSHIDA; ISHIBASHI; NISHIO, 2007; ZHANG et al., 2010). Com isso, evidenciamos o reposicionamento do anlodipino, especialmente quando associado a outros fármacos, como um meio alternativo e eficaz no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias, fungos, parasitas e ainda em neoplasias.

Em nosso estudo, valsartana foi ativa apenas frente a três bactérias (CIM= 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto que anlodipino foi ativo frente a todos os isolados testados com CIM entre 32-512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, principalmente frente a bactérias GP. Quando associados, valsartana não apresentou efeitos significativos, já o anlodipino resultou em nove isolados sinérgicos. Fato este que corrobora com algumas pesquisas realizadas, onde o anlodipino demonstrou atividade frente a diferentes isolados clínicos, como de *A. baumannii*, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Staphylococcus aureus* NCTC 8530, *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* NCTC 74. Ainda, quando associado a outros antibacterianos, resultou sinergismo ocorrendo redução significativa da CIM (KUMAR et al., 2004; LI et al., 2006; LI et al., 2013; MAZUMDAR; KUMAR; DUTTA, 2010; PALIT et al., 2008). Seu mecanismo de ação ainda não é bem elucidado, porém autores sugerem que o anlodipino promova a apoptose intracelular de microrganismos (MAZUMDAR; KUMAR. DUTTA, 2010) e através da inibição da bomba de efluxo *AdeABC* (HU et al., 2018). Ainda, que sua estrutura principal possa ser utilizada no desenvolvimento de derivados potentes e com ausência do seu efeito anti-hipertensivo (MAZUMDAR; KUMAR. DUTTA, 2010).

Ainda, quando investigada a atividade de nuclease química dos medicamentos, ambos foram aptos a clivar o DNA plasmidial (pUC 18) nas condições de temperatura e pH definidas. Na determinação do provável mecanismo de ação que estes fármacos agem, verificou-se a ausência de inibição da clivagem do DNA na presença de sequestradores de radicais livres, sugerindo que atuem pelo meio hidrolítico, o que ocorre de forma semelhante

as nucleases naturais. Medicamentos que agem através deste mecanismo de ação são relevantes, uma vez que podem ser candidatos promissores com atividade antibacteriana ou antineoplásica (PARAGINSKI et al., 2014)

Diante dos resultados apresentados, evidenciamos a importância do reposicionamento de fármacos e sua atividade sinérgica na terapêutica, especialmente quanto a anti-hipertensivos, os quais vêm demonstrando potencial atividade antibacteriana e antineoplásica frente a diferentes isolados clínicos multirresistentes e em linhagens celulares tumorais.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, sugerimos o reposicionamento de medicamentos anti-hipertensivos, anlodipino e valsartana, como uma nova alternativa terapêutica promissora no tratamento de patologias causadas por bactérias, fungos, parasitas e também quanto a neoplasias. Sendo assim, nesta pesquisa:

- a) Relatamos 16 pesquisas envolvendo reposicionamento do anti-hipertensivo anlodipino como uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias; ainda, que este medicamento apresentou atividade antineoplásica frente a diferentes linhagens celulares tumorais. Demonstrou sinergismo quando associado a dez fármacos diferentes, dentre eles antimicrobianos e antineoplásicos.
- b) O anlodipino sozinho foi ativo frente a todos os isolados, especialmente frente a bactérias GP, como os SCoN com CIM variando de 32 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; valsartana apresentou menor atividade antibacteriana significativa neste estudo, sendo ativa apenas frente a três microrganismos com CIM=1024: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Acinetobacter baumannii* (2).
- c) O anlodipino, quando associado com o ciprofloxacino, resultou sinergismo em nove isolados ESKAPE, sendo três de *A. baumannii* (FICI=0,5), três *E. faecium* (FICI=0,16; 0,5 e 0,19), uma *K. pneumoniae* (FICI=0,37) e dois *S. aureus* (FICI=0,5 e 0,25); a associação com a valsartana não resultou em atividade sinérgica frente aos microrganismos testados.
- d) Ambos os medicamentos foram aptos a clivar o DNA plasmidial, sendo que o anlodipino teve essa capacidade na concentração 3,75mM, pH 7,4 e 8,0, e temperaturas de 37 e 50°C, sendo nitidamente sua atividade mais acentuada a 37°C, onde foi apto a clivar também na

concentração de 1,875mM; valsartana além de ter atividade em 3,75mM nas duas temperaturas e pHs, clivou também nos dois pHs, na temperatura de 37°C na concentração 1,875mM.

e) Na investigação do provável mecanismo de ação envolvido na clivagem do DNA plasmidial, anlodipino e valsartana mantiveram sua capacidade de clivagem na presença de radicais livres, sugerindo que atuem através do mecanismo hidrolítico.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-AZIZ, A. S; AGATEMOR, C.; ETKIN, N. Antimicrobial resistance challenged with metal-based antimicrobial Macromolecules. **Biomater.**, v. 118, p.27-50, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940381>>. Acesso em: 21/out. 2019.
- ALDEYAB, M. A.; MONNET, D.L.; LOPEZ-LOZANO, J.M. et al. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p.593–600, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467307>>. Acesso em: 19/out. 2019.
- ANVISA. Besilato de anlodipino comprimidos. Aurobindo Pharma Indústria Farmacêutica Ltda. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=28990932016&pIdAnexo=4310050>. Acesso em: 12/out. 2019.
- ANVISA. Valsartana comprimidos revestidos. Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4901302015&pIdAnexo=2660812>. Acesso em: 14/out. 2019.
- ARDAL, C.; BARALDI, E; THEURETZBACHER, U. et al. Insights into early stage of antibiotic development in small- and medium-sized enterprises: a survey of targets, costs, and durations. **J Pharm Policy Pract**, v.11, n. 8, eCollection, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632669>>. Acesso em: 22/out. 2019.
- ARJMAND, F.; SAYEED, F.; MUDDASSIR, M. Synthesis of new chiral heterocyclic Schiff base modulated Cu(II)/Zn(II) complexes: Their comparative binding studies with CT-DNA, mononucleotides and cleavage activity. **J. Photochem. Photobiol.**, v.103, p.166-179, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459607>>. Acesso em: 18/nov. 2019.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 673-683, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286734>>. Acesso em: 11/out. 2019.
- ASSAD, K. S. et al. The anti-hypertensive drug prazosin inhibits glioblastoma growth via the PKC δ -dependent inhibition of the AKT pathway. **EMBO Mol Med**, v. 8, n. 5, p. 511-26, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27138566>>. Acesso em: 14/out. 2019.
- AUSUBEL, F. et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, v. 5, 2003.
- BONNET, V.; DUPONT, H.; GLORION, S. et al. Influence of bacterial resistance on mortality in intensive care units: A registry study from 2000 to 2013 (ICU Study). **J Hosp Infect**, (in press). Disponível em: <[https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(19\)30013-1/abstract](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(19)30013-1/abstract)>. Acesso em: 21/out. 2019.

CANTURRI, M. A.; ALGABA, A. R.; SMANI, Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. **Front. Microbiol.**, v.28, p.10-41, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30745898>>. Acesso em: 21/nov. 2019.

CHAN, E. W. L, YEE, Z. Y.; RAJA, I. 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.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28673701>>. Acesso em: 24/set. 2019.

CHARLTOT, M.; THOMPSON, J. P. Drugs acting on the heart: antihypertensive drugs. **Anaesth. Crit. Care. Med.**, v. 16, n. 5, p. 227-231, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472029915000569>>. Acesso em: 24/set. 2019.

CHENG, Y.S.; WILLIAMSON, P.R.; ZHENG, W. Improving therapy of severe infections through drug repurposing of synergistic combinations. **Curr Opin Pharmacol**, v.48, p. 92-98, 2019. [Epub ahead of print] Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31454708>>. Acesso em: 09/set. 2019.

CHOUDHURY, H.; PANDEY, M.; YIN, T. H. et al. Rising Horizon in Circumventing Multidrug Resistance in Chemotherapy with Nanotechnology. **Mater. Sci. Eng. C.**, v. 101, p. 596-613, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119304941>>. Acesso em: 11/set. 2019.

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 ROSA, T. F.; DE SOUZA, C. M.; SERAFIN, M. B. et al. Repositioning or redirection of antidepressant drugs in the treatment of bacterial and fungal infections. **Am. J. Ther.**, 2019 [in press]. Disponível em: <https://journals.lww.com/americantherapeutics/Citation/publishahead/Repositioning_or_Redirection_of_Antidepressant.98451.aspx>. DOI: 10.1097/MJT.0000000000001001.

DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. K. et al. Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage- associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Infect. Dis. (Auckl)**, v.16, n. 9, p. 11–19, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756864/>>. Acesso em: 13/out. 2019.

DUTTA, N. K.; MAZUMDAR, K.; DASGUPTA, A. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of amlodipine against *Listeria monocytogenes*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 7, p. 849-53, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184140>>. Acesso em: 13/jun. 2019.

ELKHATIB, W.F.; HAYNES, V.L.; NOREDDIN, A.M. Microbiological appraisal of levofloxacin activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in combination with different calcium channel blockers in vitro. **J. Chemother.**, v. 21, p. 135–143, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423465>>. Acesso em: 21/jun. 2019.

ESTRELA, T. S. Resistência Antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde: (1998-2018). 1ed. **Brasília: Editora Ministério da Saúde**, v. 1, p. 11-364, 2018. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/22/18_Tatiana_Estrela.pdf>.

Acesso em: 29/jul. 2019.

FEITOSA, G. S.; CARVALHO, E. N. Sistema renina-angiotensina e insuficiência cardíaca: o uso dos antagonistas do receptor da Angiotensina II. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 7, n. 3, p. 250-54, 2000. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/7-3/010.pdf>>. Acesso em: 13/set. 2019.

FERNANDES, G. O. R.; FERNANDES, D. R.; FILHO, R. D. C. et al. Efeitos farmacológicos decorrentes ao bloqueio dos receptores AT1. **Rev. Cient. Fac. Educ. M. Amb.** v. 8, n. 2, p. 138-150, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.31072/rcf.v8i2.588>

GODFRAIND T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 19, n. 6, p. 501-15, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872348>>. Acesso em: 12/nov. 2019. DOI:

10.1177/1074248414530508.

GONZALEZ-BELLO. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28827113>>.

HU, C.; LI, Y.; ZHAO, Z. et al. *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the AdeABC efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.

PLoS One. 2018; 13(6):e0198061. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29856791>>. Acesso em: 11/nov. 2019.

HUANG, J.; ZHAO, D.; LIU, F. et al. Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agentes. **Cancer Lett**, v. 419, p. 257-265, 2018. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414306>>. Acesso em: 15/nov. 2019.

HUBER, C. P. et al. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. **Quim Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148- 2154, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000027>.

Acesso em: 15/nov. 2019.

KARAM, G.; CHASTRE, J.; WILCOX, M. H. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Crit Care**, v. 20, p. 2-9, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27329228>>. Acesso em: 19/nov. 2019.

KUMAR, K. A.; GANGULY, K.; MAZUMDAR, K. et al. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. **Acta Microbiol Pol**, v. 52, p. 285–292, 2003.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743981>>. Acesso em: 12/nov.

2019.

KUMAR, R.; KAUR, M.; BAHIA, M. S. et al. Synthesis, cytotoxic study and docking based multidrug resistance modulator potential analysis of 2-(9-oxoacridin-10(9H)-yl)-N-phenyl

acetamides. **Eur J Med Chem**, v. 80, p. 83-91, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769346>>. Acesso em: 15/nov. 2019.

LAN, L.; XINGHUA, X.; WENJUAN, S. et al. Effect of amlodipine on apoptosis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 23, p. 358–363, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769346>>. Acesso em: 21/out. 2019.

LEE, H.; KANG, S.; KIM, W. Drug Repositioning for Cancer Therapy Based on Large-Scale Drug-Induced Transcriptional Signatures. **PLoS One**, v. 11(3), p.e0150460, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150460>>. Acesso em: 29/out. 2019.

LI, X.; LU, W.L.; LIANG, G. W. et al. Effect of stealthy liposomal topotecan plus amlodipine on the multidrug-resistant leukaemia cells *in vitro* and xenograft in mice. **Eur J Clin Invest**. v. 36, p. 409–418, 2006. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150460>>. Acesso em: 29/out. 2019.

LI, Y. J.; PAN, C. Z.; ZHAO, Z. W. et al. Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 548, 2013. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-548>>. Acesso em: 29/out. 2019.

LIU, S.; YUE, L.; GU, W. et al. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 11, n. 3:e0150859, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150859. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/arti00cle/file?type=printable&id=10.1371/journal.pone.0150859>>. Acesso em: 13/out. 2019.

MARKMAN, M. Current standards of care for chemotherapy of optimally cytoreduced advanced epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 131, p. 241–245, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726888>>. Acesso em: 29/out. 2019.

MARTINS, M.; DASTIDAR, S. G.; FANNING, S. et al. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, p. 198–208, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857907005572?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/out. 2019.

MAZUMDAR, K.; KUMAR, K.; DUTTA, N. K. Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: scope and hope for the future. **Int J Antimicrob**, v. 36, p. 295-302, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20591629>>. Acesso em: 29/nov. 2019.

MORJAN, R. Y.; AL-ATTAR, N. H.; ABU-TEIM, O. S. et al. Synthesis, antibacterial and QSAR evaluation of 5-oxo and 5-thio derivatives of 1,4-disubstituted tetrazoles. **Bioorg Med**

Chem Lett, v. 25, n. 18, p. 4024-8, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26243367>>. Acesso em: 29/out. 2019.

MOURA, W. C. S., PEREIRA, D. N.; LIMA, Z. N. et al. Perfil antibacteriano de novos derivados n-acilidrazônicos substituídos. **Biofarm – Universidade Estadual da Paraíba**, v. 13, n. 4, p. 59-66, 2017. Disponível em:

<<http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/3279/2373>>. Acesso em: 13/out. 2019.

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

O'CONNELL et al. Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 10706-10733, 2013.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24038605>>. Acesso em: 17/out. 2019.

O'NEILL. Tackling drug-resistant infections globally: final report and 766 recommendations.

The review on antimicrobial resistance. **AMR Review**, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 13/out. 2019.

PALIT, P.; MANDAL, S. C.; MANDAL, N. B. Reuse of Old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as Antimicrobial Agents: a New Emerging Therapeutic Approach.

Formatex, p.1883-1892, 2013. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/a984/6e9eb457b0b97bf55b48bc49d448fc05bba5.pdf>>. Acesso em: 19/out. 2019.

PARAGINSKI, G. L. et al. In vitro antibacterial activity and toxicity toward *Artemia salina* Leach. of some triazene compounds. **Quím Nova**, v.37, n.7, p.1138-1144, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000700006>. Acesso em: 17/out. 2019.

PEREIRA, M. R.; HENRICH, P. P.; SIDHU, A. B. S. S. et al. *In vivo* and *in vitro*

Antimalarial Properties of Azithromycin-Chloroquine Combinations That Include the Resistance Reversal Agent Amlodipine. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011; 55(7):3115–

3124. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464242>>. Acesso em: 19/nov. 2019.

QIN, X.; TRAN, B.G.; KIM, M. J. et al. A randomised, double-blind, phase 3 study comparing the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem for complicated intra-abdominal infections in hospitalised adults in Asia. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 5, p. 579-588, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917300961>>. Acesso em: 13/out. 2019.

RAMPELOTTO, R. F.; LORENZONI, V. V.; SILVA, D. C. 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**, v. 54(2), p.e17369,

2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v54n2/2175-9790-bjps-54-02-e17369.pdf>>. Acesso em: 13/out. 2019.

REIMÃO, J. Q.; SCOTTI, M. T.; TEMPONE, A. G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: *In vitro* evaluation and structure–activity relationship study. **Bioorgan Med Chem**, v. 18, p. 8044–8053, 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20934347>>. Acesso em: 22/nov. 2019.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes New infect**, v. 8, p. 175, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446399/>>. Acesso em: 7/nov. 2019.

ROCHETTE, L.; GUENANCIA, C.; GUDJONCIK, A. et al. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v.36(6), p. 326-48, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895646>>. Acesso em: 21/out. 2019.

SPADER, T. B.; CASTRILLÓN, M. R.; VALENTE, P, et al. *In Vitro* Interactions of Amphotericin B Combined with Non-antifungal Agents Against *Rhodotorula mucilaginosa* Strains. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 35-43, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30632048>>. Acesso em: 27/out. 2019.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO 813 priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis**. v. 18, n. 3, p.318-327, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29276051>>. Acesso em: 29/set. 2019.

TAYLOR, J. M.; SIMPSON, R. U. Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. **Cancer Res**, v. 52, p. 2413–2418, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1533173>>. Acesso em: 29/jul. 2019.

THAKARE, R.; SINGH, A. K.; DAS, S. et al. Repurposing Ivacaftor for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 50(3), p. 389–392, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28694231>>. Acesso em: 23/jul. 2019.

VERMA, A.; BHANDARIA, V.; DEEP, D. K. et al. Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in *Leishmania donovani*. **Int J Parasitol: Drugs Drug Resist**, v. 7, p. 370-377, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29035735>>. Acesso em: Acesso em: 13/out. 2019.

YOSHIDA, J.; ISHIBASHI, T.; NISHIO, M. G1 cell cycle arrest by amlodipine, a dihydropyridine Ca²⁺ channel blocker, in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Biochem Pharmacol England**, v. 73, p. 943– 953, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217918>>. Acesso em: 12/nov. 2019.

YOSHIDA, J.; ISHIBASHI, T.; NISHIO, M. Antitumor effects of amlodipine, a Ca²⁺ channel blocker, on human epidermoid carcinoma A431 cells *in vitro* and *in vivo*. **Eur J Pharmacol**, v. 492, p. 103–112, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15178352>>. Acesso em: 17/nov. 2019.

ZEINAB, M. K. In vitro binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies. **J Pharmaceut Biomed**, v. 161, p. 101-109, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708518311117?via%3Dihub>>. Acesso em: 12/nov. 2019.

ZHANG, Y.; LI, R.J.; YING, X. et al. Targeting Therapy with Mitosomal Daunorubicin plus Amlodipine Has the Potential To Circumvent Intrinsic Resistant Breast Cancer. **Mol Pharm**, v. 8, p. 162-175, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062083>>. Acesso em: 24/nov. 2019.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **Br J Pharmacol**, v. 175, n. 2, p.181-191, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28685814>>. Acesso em: 12/nov. 2019.