

Valoración de la actividad de diclofenac junto a ciprofloxacina frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* empleando un modelo dinámico.

Mostafá, M.M.; Diaz David, D.C.; Delgado, A.; Picco, E.J.

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
maggiemostafa90@gmail.com

Proyecto CAI+D 2011: “Caracterización de la actividad antimicrobiana *in vitro* del diclofenac frente a *Staphylococcus aureus* valorando su interacción con los antibióticos usados en el tratamiento de mastitis bovina”.

Son bien conocidas las propiedades del Diclofenac (DCF) como poderoso agente antiinflamatorio, por lo cual es ampliamente utilizado en medicina veterinaria, mientras que es mucho menos popular el hecho de que este fármaco posee cierta acción antibacteriana frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, entre ellas *S. aureus*⁽²⁾. Si bien no está completamente dilucidado, se postula que este accionar se debería a que reprime la expresión de genes que participan de la estabilidad y reparación del ADN bacteriano⁽⁴⁾. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la incorporación de DCF modificaba la actividad de ciprofloxacina (CPF) frente a una cepa de *S. aureus*, empleando un modelo farmacodinámico *in vitro*. Este estudio se desarrolló empleando como microorganismo de referencia a la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (*Newbould 305*), originalmente aislada a partir de un caso de mastitis, y estándares de DCF (97,6%) y CPF (98,3). En una primera etapa se caracterizó la interacción mediante macrodilución con caldo Mueller-Hinton, para lo cual los tubos se dispusieron conformando un tablero con diluciones de DCF y CPF en concentraciones inferiores y superiores a la CIM. De esta manera quedaron representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones, además de un control. Cada tubo del tablero presentó un volumen final de 1 mL, de los cuales 0,25 se incorporaron con la concentración de CPF y 0,25 con la de DCF para esa casilla, correspondiendo los restantes 0,5 mL al inóculo bacteriano (10^6 UFC/mL). A continuación se incubó a 35° C durante 24 horas, al cabo de las cuales se procedió a la lectura de los resultados. Con estos datos se determinó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (FICI), el cual se calculó de la siguiente manera: $FICI = FIC_{CPF} + FIC_{DCF}$, donde: $FIC_{CPF} = CIM_{CPF+DCF} / CIM_{CPF}$ y $FIC_{DCF} = CIM_{DCF+CPF} / CIM_{DCF}$. Si el FICI es menor o igual a 0,5 hay sinergismo, en tanto que si el FICI es superior a 4 hay antagonismo⁽¹⁾. En este ensayo la CIM de CPF descendió de 0,128 a 0,016 µg/mL luego de la incorporación de DCF a razón de 32 µg/mL, por lo que el Índice FICI fue de 0,25. Con estos resultados se procedió a caracterizar el comportamiento cinético de esta interacción empleando un modelo dinámico de curva de crecimiento bacteriano. El estudio se realizó exponiendo el inóculo de *S. aureus* a DCF y CPF a las concentraciones con las cuales se registró la interacción, esto es 0,016 µg/mL de CPF y 32 µg/mL de DCF, tanto en forma combinada como independiente, así como también a concentraciones iguales a la CIM individual de cada uno de ellos. Un inóculo fue cultivado en ausencia de fármaco e incubado en estufa bajo idénticas condiciones ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) para la construcción de la curva de crecimiento testigo. De cada cultivo se obtuvieron alícuotas de 0,1 mL al tiempo cero y luego de 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas de crecimiento. Éstas se diluyeron en solución salina isotónica a 4 °C y una alícuota de cada última dilución fue extendida sobre la superficie de una placa de agar e incubada $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Todas las curvas se construyeron por duplicado y los valores de UFC/mL fueron estimados por el factor de corrección correspondiente. El número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada repetición. En la figura 1 pueden evidenciarse las modificaciones en la CIM al aplicar en forma combinada los dos fármacos, en tanto que en la figura 2 puede verse como evoluciona esa población bacteriana al exponerse a diferentes concentraciones de estos medicamentos. Puede apreciarse que cuando se emplean concentraciones sub inhibitorias de DCF o de CPF se presenta una disminución inicial en el crecimiento de los microorganismos, pero esta actividad desaparece entre las 2 y 4 horas, presentando a partir de allí un crecimiento similar al del cultivo control. Por su parte, cuando se valora el crecimiento bacteriano de DCF o CPF a concentraciones iguales a la CIM se ve claramente

la actividad bactericida de la CPF, ya que se aprecia una disminución en el crecimiento de 3 logaritmos. En el caso del DCF se evidencia un claro efecto bacteriostático, ya que el número de UFC se mantiene constante. Cuando se caracteriza la evolución de la población bacteriana enfrentándola en forma conjunta a DCF y CPF en las concentraciones en las cuales se registró el efecto sinérgico en el modelo de macrodilución se aprecia que si bien disminuye el crecimiento bacteriano, no llega a ser un efecto bactericida. Dado que ciprofloxacina interfiere la síntesis de ADN, es factible que la mayor sensibilidad de este microorganismo se deba a la menor capacidad para restaurar o estabilizar el ADN originada por el DCF, con lo cual la bacteria sería más sensible al accionar de la ciprofloxacina. Cabe señalar que si bien se ha demostrado que el DCF puede modificar la CIM de cloxacilina y vancomicina frente a *S. aureus*, este efecto es dependiente de la cepa empleada, por lo que este sería otro factor a tener en cuenta al momento de interpretar los resultados. Similares resultados fueron reportados para otras quinolonas, como ser ofloxacina o norfloxacina⁽⁴⁾. Por otra parte, dado las propiedades inmunoreguladoras del DCF⁽³⁾, es que se requieren de estudios complementarios empleando modelos *in vivo* para determinar la importancia clínica de esta interacción.

Diclofenac (µg/mL)	256					
	128	■				
	64	■	■			
	32	■	■	□		
	16	■	■	■		
	8	■	■	■	■	
	0	■	■	■	■	■
	0	0,008	0,016	0,032	0,064	0,128
	Ciprofloxacina (µg/mL)					

Figura 1: Representación gráfica de la interacción entre DCF y CPF frente a *S. aureus*. (■) Con crecimiento bacteriano (□) Sin crecimiento bacteriano

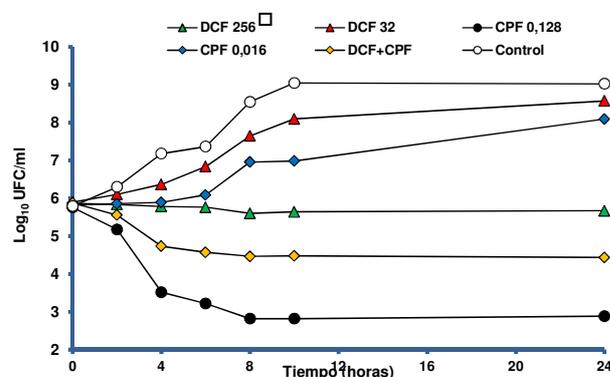


Figura 2: Evolución de la masa bacteriana de *S. aureus* expuesta a DCF y/o CPF. Los valores se hallan expresados como log₁₀ UFC/mL.

Bibliografía

- 1- **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** (2006). Instructions to authors. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1-21.
- 2- **Annadurai, S.; Basu, S.; Ray, S.; Dastidar, S.G.; Chakrabarty, A.N.** (1998). Antibacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium. Indian J. Exp. Biol., 36: 86-90.
- 3- **Ravel, G.; Christ, M.; Horand, F.; Descotes, J.** (2004). Cytokine release does not improve the sensitivity and specificity of the direct popliteal lymph node assay. Toxicol., 200: 247- 254.
- 4- **Riordan, J.; Dupre, J.; Cantore-Matyi, S.; Kumar-Singh, A.; Song, Y.; Zaman, S.; Horan, S.; Helal, N.; Nagarajan, V.; Elasri, M.; Wilkinson, B.; Gustafson, J.** (2011). Alterations in the transcriptome and antibiotic.