

# EFFECTO POSTANTIBIÓTICO DE DICLOFENAC FRENTE A UNA CEPA DE REFERENCIA DE *Staphylococcus aureus*

María Magdalena Mostafá

*Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral*

Área temática: Ciencias de la Salud

Sub-área: Veterinaria

## INTRODUCCIÓN

El diclofenac es un fármaco ampliamente utilizado tanto medicina humana como veterinaria por sus propiedades antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Este medicamento, al igual que otros compuestos que se emplean en el tratamiento de afecciones de etiología no infecciosa ha demostrado poseer cierta acción antibacteriana frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, entre ellas *S. aureus* (Annadurai *et al*, 1998; Dutta *et al.*, 2008). 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 (Riordan *et al.*, 2011).

Desde los orígenes de la era antibiótica hasta nuestros días, la concentración inhibitoria mínima (CIM) ha sido el principal parámetro farmacodinámico en el que se han basado los diseños de regímenes posológicos de agentes antibacterianos, no obstante es preciso señalar que la CIM es calculada a concentraciones constantes del antimicrobiano, por lo que en realidad está determinando un valor umbral de actividad, e implica la existencia de una respuesta concentración-efecto del tipo todo o nada. Esto es, todas las concentraciones por debajo de la CIM son consideradas igualmente inefectivas, y bien está demostrado que concentraciones ligeramente inferiores a la CIM presentan algún efecto antibacteriano, aconteciendo lo mismo con las que se encuentran ligeramente por encima del valor de CIM, ya que el máximo de efecto solamente acontece con concentraciones más altas (Mueller *et al.*, 2004). A fin de poder valorar estos efectos es donde cobran importancia los modelos dinámicos basados en curvas de crecimiento y muerte bacteriana, los cuales pueden evaluar el crecimiento y la muerte tanto en función del tiempo como de la concentración del antimicrobiano. También en base a estos modelos puede determinarse el efecto posantibiótico (EPA), al cual se lo define como a la supresión temporal del crecimiento bacteriano, luego de una limitada exposición de un inóculo a un agente antimicrobiano, siendo otro postulado sobre el que se sustenta el éxito en la terapia en base a regímenes de aplicación de dosis múltiples.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue determinar si el diclofenac presenta efecto postantibiótico frente a una cepa ATCC de *S. aureus*.

## METODOLOGÍA

Para realizar este estudio se utilizó un estándar de diclofenac sódico (97,6%), la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (*Newbould 305*), microorganismo de referencia aislado a partir de un caso de mastitis, y caldo Mueller Hinton (MHB). La CIM de diclofenac sobre esta cepa bacteriana (256 µg/mL) se determinó por el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008), en tanto que el ensayo de EPA se realizó a partir de una

Proyecto CAI+D 2011 Resol. C.S. n° 245/13 "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".

Director del proyecto: Dr. Eduardo J. Picco

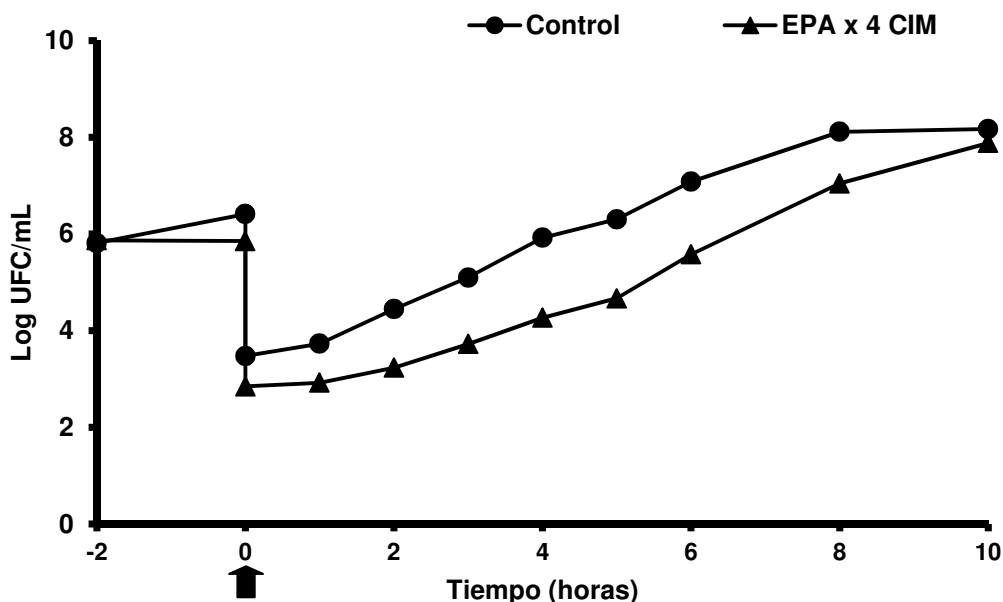
Director del autor: Dr. Eduardo J. Picco

modificación de la técnica reportada por Wang & Zhang (2009), para lo cual se emplearon seis inóculos ( $0,5 \times 10^6$  UFC/mL); tres fueron controles y tres se expusieron a una concentración de diclofenac equivalente a 4 veces la CIM durante 2 horas incubándose a 35 °C. Al cabo de ese tiempo los seis cultivos se diluyeron con MHB a razón de 1/1000 con el fin de eliminar la actividad del antibacteriano, para luego volver a mantenerse en estufa por 10 horas. Los conteos de bacterias viables se realizaron por extensión de una alícuota del medio de cultivo al inicio del ensayo (hora -2), inmediatamente luego de haber realizado la dilución (hora 0), y posteriormente a intervalos de una o dos horas hasta transcurridas diez horas de iniciado el ensayo.

El EPA fue definido como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano. Para el cálculo de la duración del EPA se utilizó la siguiente ecuación:  $EPA = T - C$ , donde  $T$  es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar el número de bacterias viables en  $1 \log_{10}$  respecto del conteo realizado al momento de haber removido el antibacteriano por dilución y  $C$  es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar  $1 \log_{10}$  el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo (Craig & Gudmundsson, 1996). La comparación estadística entre los valores se realizó mediante el test de  $t$  de diferencia de medias de Student de dos colas, fijando el nivel de significancia en un 5% ( $p = 0,05$ ).

## RESULTADOS

La evolución temporal de la población bacteriana de esta cepa luego de haber sido expuesta a concentraciones suprainhedoras de diclofenac ( $4 \times$  CIM) durante dos horas (EPA) respecto al crecimiento control se muestran representadas gráficamente en la Figura 1.



**Figura 1.** Evolución de la masa bacteriana de *Staphylococcus aureus* en ensayo de EPA. La flecha negra indica el tiempo en el que se realizó la dilución del antibiótico. Los valores se hallan expresados como  $\log_{10}$  UFC/mL.

Los resultados obtenidos, muestran que el EPA de diclofenac sobre las cepa de *S. aureus* fue de corta duración ( $1,177 \pm 0,489$  horas). También puede evidenciarse que durante las dos horas de incubación con diclofenac no descendió el número de bacterias, sino que se mantuvo en el número registrado al inicio del ensayo, lo cual revela que este fármaco ejerce un efecto bacteriostático, tal como se ha reportado anteriormente. Estas diferencias en el número de UFC entre controles y tratados se mantuvo hasta las 8 horas de iniciado al ensayo, ya que en el muestreo siguiente, el de las 10 horas, no se registraron diferencias entre las dos poblaciones en estudio.

## DISCUSIÓN

A pesar que el EPA de diclofenac fue demasiado corto como para considerar que este efecto de persistencia pudiese llegar a tener impacto en el diseño de un esquema terapéutico dirigido a tratar una infección provocada por *S. aureus*, debemos tener en cuenta que se trata de un fármaco empleado clínicamente por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, por lo cual debería considerarse este accionar en el caso de emplearlo junto a antimicrobianos, con lo cual podría potenciar el efecto de los mismos y tener interés terapéutico en el caso de microorganismos resistentes.

Por otra parte, desde hace mucho tiempo se ha observado que las bacterias en fase postantibiótica son más sensibles a la fagocitosis y muerte por la acción de leucocitos y se llamó a esto; efecto postantibiótico estimulador de leucocitos (PALE) (Mc Donald *et al.* 1981). A esto debe de adicionarse las propiedades inmunoregulatoras que presenta el diclofenac (Ravel *et al.*, 2004),

No obstante la persistencia de la actividad de diclofenac sobre *S. aureus* observada en este ensayo, son necesarios más estudios para obtener información que permita incorporar el EPA como parámetro farmacocinético-farmacodinámico en el diseño de los regímenes terapéuticos de este fármaco.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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.
- Craig, W.A.; S. Gudmundsson.** (1996). Postantibiotic effect, In *Antibiotics in laboratory medicine*. Ed. Lorian, V. pp. 296-329. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Dutta, N.K.; Mazumdar, K.; Baek, M.W.; Kim, D.J.; Na, Y.R.; Park, S.H.; Lee, H.K.; Lee, B.H.; Park, J.H.** (2008). *In vitro* efficacy of diclofenac against *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 27: 315-319.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards) 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. M26-A, Wayne, Pennsylvania USA.
- Mc Donald, P.J., Wetherall, B.L.; Prull, H.** (1981). Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 3: 38-44.
- Mazumdar, K.; Dastidar, S.G.; Park, J.H.; Dutta, N.K.** (2009). The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 28(8):881-891.
- Mueller, M.; de la Peña, A.; Derendorf, H.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 369-377.
- 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.

Proyecto CAI+D 2011 Resol. C.S. nº 245/13 "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".

Director del proyecto: Dr. Eduardo J. Picco

Director del autor: Dr. Eduardo J. Picco

- 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 susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 10:30 1-11.
- Wang, I.; Zhang, Y.** (2009). Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin, and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. *Braz. J. Microb.* 40:980-987.