

Influencia del pH sobre la actividad antimicrobiana de la combinación diclofenac + enrofloxacin frente a *Staphylococcus aureus*

Claudio Larrateguy

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral
Ciencias de la salud – Veterinaria

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, varios medicamentos antibacterianos han sido desarrollados, y las compañías farmacéuticas han suministrado, generación tras generación, antibióticos mejorados. No obstante, el uso masivo y con frecuencia irracional, durante períodos prolongados ha dado lugar al problema de resistencia microbiana. Este fenómeno sigue su marcha inexorable, por lo que se postula que el descubrimiento de antibióticos más potentes no es la única solución a esta amenaza (Mazumdar y col., 2009). Una alternativa a este problema puede ser el empleo de compuestos “no antibióticos” existentes en el mercado, y que poseen propiedades antibacterianas. La aplicación conjunta con fármacos antimicrobianos podría resultar en un mejor efecto en comparación a la aplicación de un antibiótico como agente único, posiblemente debido a que los mecanismos de acción son diferentes (Kristiansen y col., 2007). La búsqueda sistemática entre los fármacos “no antibióticos” reveló que un agente antiinflamatorio como diclofenac (DCF) posee actividad antibacteriana moderada a fuerte frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Annadurai y col., 1998; Dutta y col., 2008). Si bien la mayoría de los “no antibióticos” descritos hasta el momento presentan valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) superiores a las se alcanzan en la aplicación clínica, hay que tener en cuenta que muchos de ellos se concentran hasta 100 veces dentro de los macrófagos, quienes en última instancia tienen la capacidad de fagocitar bacterias. Es por ello que la aplicación de un fármaco “no antibiótico” siguiendo un régimen de dosificación clínicamente aceptable puede resultar en un efecto antimicrobiano *in situ* similar al observado *in vitro*.

La modificación del pH del medio de cultivo puede alterar la actividad antimicrobiana *in vitro* de muchos fármacos, afectando además las posibles interacciones entre ellos.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH del medio de crecimiento sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de diclofenac + enrofloxacin (EFX) frente a una cepa de referencia de *S. aureus*.

METODOLOGÍA

El ensayo se dividió en dos etapas:

En la Etapa 1 se evaluó el efecto ejercido por la incorporación de DCF sobre la actividad de EFX mediante la técnica de macrodilución en tubo con caldo Mueller-Hinton a pH normal (7,2). Para ello, los tubos se dispusieron conformando un tablero

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 Picco

Director del becario: Dr. Diego Diaz David

con diluciones de DCF y EFX en concentraciones inferiores y superiores a la CIM. En el eje X se colocaron las diluciones de DCF en concentraciones iguales a 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 y 1 x CIM; en tanto que en el eje Y se colocaron diluciones de EFX en las siguientes concentraciones: 0; 0,064; 0,12; 0,25; 0,50, 1 y 2 x 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 mL se incorporaron con la concentración de DCF y 0,25 mL con la de EFX para esa casilla, correspondiendo los restantes 0,5 mL al inóculo bacteriano (10^6 UFC/mL, cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213). 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:

$$FICI = FIC_{EFX} + FIC_{DCF}$$

donde: $FIC_{EFX} = CIM_{EFX+DCF} / CIM_{EFX}$
 $FIC_{DCF} = CIM_{DCF+EFX} / CIM_{DCF}$

Si el FICI es menor o igual a 0,5 hay sinergismo, en tanto que si el FICI es superior a 4 hay antagonismo (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006).

En la Etapa 2, se repitió el mismo procedimiento, pero utilizando caldo Mueller-Hinton con pH ajustado a 5,5 con ácido ortofosfórico.

RESULTADOS

Etapa 1:

La CIM determinada en este ensayo para DCF fue de 128 µg/mL, mientras que para EFX fue de 0,125 µg/mL. Al aplicar en forma conjunta DCF + EFX se determinó que la CIM de DCF descendió a 64 µg/mL y la de EFX descendió a 0,062 µg/mL (Tabla 1). No obstante, basándose en el cálculo del FICI no se evidenció un efecto sinérgico, ya que el mismo arrojó un resultado de 0,99.

Tabla 1: Representación gráfica de la interacción entre Diclofenac y Enrofloxacin frente a *S. aureus* a pH 7,2, empleando la técnica del tablero. (■ Con crecimiento bacteriano; □ Sin crecimiento bacteriano).

		Diclofenac (µg/ml)					
		256	128	64	32	16	0
Enrofloxacin (µg/ml)	0,25	□	□	□	□	□	□
	0,125	□	□	□	□	□	□
	0,062	□	□	■	■	■	■
	0,031	□	□	■	■	■	■
	0,015	□	□	■	■	■	■
	0,008	□	□	■	■	■	■
	0	□	□	■	■	■	■

Etapa 2:

Cuando se modificó el pH del medio, la CIM para DCF fue de 16 µg/mL, mientras que la CIM de EFX no pudo ser determinada en el rango de diluciones utilizado (Tabla 2). Por ello el cálculo del FICI no se pudo realizar para este ensayo.

Tabla 2: Representación gráfica de la interacción entre Diclofenac y Enrofloxacin frente a *S. aureus* a pH 5,5, empleando la técnica del tablero. ☐ Con crecimiento bacteriano; ☒ Sin crecimiento bacteriano).

		Diclofenac (µg/ml)					
		256	128	64	32	16	0
Enrofloxacin (µg/ml)	0,25						☒
	0,125						☒
	0,062						☒
	0,031						☒
	0,015						☒
	0,008						☒
	0						☒

CONCLUSIONES

La incorporación de diclofenac a pH normal redujo la CIM de enrofloxacin frente a esta cepa de referencia de *S. aureus*, aunque sin lograr un efecto sinérgico. En ensayos anteriores se demostró actividad sinérgica entre diclofenac y ciprofloxacina (Canalis y Larrateguy, 2014), mientras que Riordan y col. (2011) determinaron que la CIM de ofloxacin y norfloxacina se reduce en presencia de diclofenac. Estos autores determinaron que el crecimiento de *S. aureus* en presencia de diclofenac regula negativamente un número sustancial de genes importantes para la estabilidad del ADN y su reparación. Considerando que las fluoroquinolonas son fármacos bactericidas que interfieren con la actividad de la enzima ADN girasa o de la topoisomerasa IV dando lugar a roturas en el ADN, una explicación para el aumento de la sensibilidad de *S. aureus* a las fluoroquinolonas cuando crece en un medio con diclofenac, puede incluir una disminución de la capacidad para la reparación del ADN dañado, conduciendo a la muerte celular.

En la Etapa 2 se demostró que la modificación del pH del medio tiene influencia sobre la actividad antimicrobiana de diclofenac y enrofloxacin, reduciendo significativamente la CIM del antiinflamatorio pero aumentando la del antimicrobiano. El grado de ionización de las moléculas podría ser el responsable de la modificación en la CIM determinada. La fracción no ionizada de un fármaco es la que posee capacidad para difundir a través de matrices lipídicas, por lo que la modificación de esta fracción por el pH puede alterar la penetración del fármaco a nivel intracelular. Diclofenac es un ácido débil con un pKa de 4,15, por tanto la utilización de un medio ácido posiblemente favoreció su ingreso al microorganismo aumentando su potencia. Por otra parte, debido a la presencia de un grupo carboxílico ácido y uno o varios grupos funcionales amínicos básicos, las fluoroquinolonas son fármacos anfóteros y se comportan como zwitteriones. Cuando el pH del medio se encuentra entre el pKa de ambos grupos funcionales (6 y 8,7 respectivamente para enrofloxacin), estos compuestos son suficientemente solubles en lípidos para ser capaces de atravesar membranas biológicas. Por tanto, el pH=5,5 en el medio de cultivo utilizado pudo favorecer la ionización de EFX y reducir su capacidad de ingreso a la bacteria.

La utilidad potencial de la combinación de diclofenac con enrofloxacin u otros antimicrobianos debe seguir siendo estudiada. Variables como la modificación de la cepa de estudio, otros valores pH del medio de cultivo y el estudio de la participación del sistema inmunológico *in vivo* se proponen como ensayos a futuro.

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.
- Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** (2006). Instructions to authors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1-21.
- Canalis M.,Larrateguy C.** 2014. Sinergismo en la actividad antimicrobiana *in vitro* entre diclofenac y ciprofloxacina frente a *Staphylococcus aureus*. XVIII Encuentro de jóvenes investigadores de la UNL. 3 y 4 de setiembre de 2014, Santa Fe.

- 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.
- Kristiansen, J.E.; Hendricks, O.; Delvin, T.; Butterworth, T.S.; Aagaard, L.; Christensen, J.B.; Flores, V.C.; Keyzer, H.** (2007). Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. J. Antimicrob. Chemother, 59:1271-1279.
- 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.
- 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.