INTERAÇÕES IN VITRO ENTRE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS E FLUCONAZOL FRENTE A CANDIDA SPP.

Gabriela Seibert [1]

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia [2]

Resumo:

As últimas décadas testemunharam um aumento dramático nas infecções fúngicas, especialmente a candidíase. Apesar do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, o fluconazol ainda é amplamente utilizado na clínica devido à sua eficácia e baixa toxicidade. No entanto, à medida que o número de pacientes tratados com fluconazol aumentou, os isolados de Candida albicans resistentes ao fluconazol surgiram com mais frequência. Assim, a terapia baseada na combinação de fármacos pode representar uma perspectiva promissora frente aos isolados resistentes. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia in vitro de AINES (ibuprofeno e diclofenaco sódico) isolados e em combinação com fluconazol frente a isolados de C. albicans. Foram utilizados dois isolados de C. albicans, oriundos da micoteca do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Pampa. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos AINES e do antifúngico foram testadas usando o método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute. Para os efeitos dos AINES e do fluconazol em combinação foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo do tabuleiro de xadrez. Esta técnica se refere ao padrão de diluições dos fármacos distribuídos na placa de microtitulação. A interpretação das interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação FICI = (Ac / Aa) + (Bc / Ba), onde Ac e Bc são as CIM dos fármacos A e B em combinação, respectivamente, e Aa e Ba são as CIM dos fármacos isolados, respectivamente. O FICI foi interpretado como sendo sinérgico quando o valor foi 0,5; FICI maiores que 4 indicaram antagonismo e FICI > 0,5 e 4 indicaram nenhuma interação. Os resultados obtidos demostraram que o ibuprofeno inibiu o crescimento do isolado C. albicans ATCC 18804 em uma concentração de 0,5 mg/mL e no isolado C. albicans ATCC 28367 em 2 mg/mL. Para diclofenaco sódico, a concentração inibitória mínima foi >8 mg/mL para C. albicans ATCC 28367, e 4 mg/mL para C. albicans ATCC 18804. Em combinação, o isolado C. albicnas ATCC 28367 demostrou sinergismo com ibuprofeno e com diclofenaco, já o isolado C. albicans ATCC 18804 na associação com os AINEs apresentou-se indiferente. São necessários ensaios com mais isolados, no entanto, com estes resultados preliminares foi possível observar que a combinação terapêutica de fluconazol com AINES pode constituir uma nova abordagem para o tratamento de terapias antifúngicas.

Palavras-chave: Candida spp., antifúngico, anti-inflamatórios não esteroidais.

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

INTERAÇÕES IN VITRO ENTRE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS E FLUCONAZOL FRENTE A CANDIDA SPP.

[1] Aluno de pós-graduação. gabiseibert91@gmail.com. Autor principal

[2] Docente. cheilastopiglia@unipampa.edu.br. Orientador

INTERAÇÕES *IN VITRO* ENTRE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS E FLUCONAZOL FRENTE A *CANDIDA* SPP.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é composto por micro-organismos comensais comuns na microbiota da pele e do intestino. No entanto, rupturas nas barreiras cutâneas e gastrointestinais podem causar a candidíase, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo esta a infecção fúngica mais frequente neste grupo (YAPAR, 2014).

As últimas décadas testemunharam um aumento dramático nas infecções fúngicas invasivas, especialmente a candidíase, sendo a *Candida albicans* a espécie mais comum. A apresentação da candidíase invasiva pode variar desde uma candidemia minimamente sintomática a sepse fulminante, associada com uma mortalidade superior a 70% (PAPAS, 2018). Apesar do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos mais eficazes, o fluconazol ainda é amplamente utilizado na clínica devido à sua eficácia e baixa toxicidade. No entanto, à medida que o número de pacientes tratados com fluconazol aumentou, os isolados de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol surgiram com mais frequência. Assim, a terapia baseada na combinação de fármacos pode representar uma perspectiva promissora frente aos isolados resistentes (LIU et al., 2014).

Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* de anti-inflamatórios não esteroidais (ibuprofeno e diclofenaco sódico) isolados e em combinação com fluconazol (FLU) frente a isolados de *Candida albicans*.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados dois isolados de *Candida albicans* oriundos da micoteca do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Pampa. Previamente, os isolados foram repicados em ágar batata dextrose e incubados a 35 °C durante 24 horas. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e do antifúngico foram testadas usando o método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2008).

Para os efeitos dos AINES e antifúngicos em combinação foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo do tabuleiro de xadrez, descrita por Martinez et al. (1996). Esta técnica se refere ao padrão de diluições dos antifúngicos e AINES distribuídos na placa de microtitulação, como se fosse um tabuleiro de xadrez. Na vertical, cada poço continha uma diferente concentração do antifúngico diluído de forma decrescente, e na horizontal foram adicionados os AINES a cada poço da microplaca, da esquerda para a direita de forma crescente. Cada poço continha concentrações diferentes de cada um dos medicamentos testados em um mesmo volume final.

A interpretação das interações entre AINES e antifúngicos foi realizada através do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação FICI = (Ac / Aa) + (Bc / Ba), onde Ac e Bc são as CIM dos fármacos A e B em combinação, respectivamente, e Aa e Ba são as CIM dos fármacos isolados, respectivamente. O FICI foi

interpretado como sendo sinérgico quando o valor for ≤ 0,5; FICI maiores que 4 indicaram antagonismo e FICI > 0,5 e ≤ 4 indicaram nenhuma interação (YANG et al., 2016).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demostraram que o ibuprofeno inibiu o crescimento do isolado *C. albicans* ATCC 18804 em uma concentração de 0,5 mg/mL e no isolado *C. albicans* ATCC 28367 em 2mg/mL. Para diclofenaco sódico, a CIM foi >8 mg/mL para *C. albicans* ATCC 28367 e 4 mg/mL para *C. albicans* ATCC 18804. A CIM dos fármacos isolados e em associação está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima dos fármacos isolados e em associação.

	CIM isolado			**CIM associação**		**CIM associação**	
	FCZ (μg/mL)	**IBU** (mg/mL)	**DIC** (mg/mL)	**FCZ** (μg/mL)	**IBU** (mg/mL)	**FCZ** (μg/mL)	**DIC** (mg/mL)
***C. albicans* ATCC 28367**	>16	2	>8	4	0,5	4	0,5
***C. albicans* ATCC 18804**	>16	0,5	4	4	0,5	>16	4

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FCZ: fluconazol; IBU: ibuprofeno; DIC: diclofenaco sódico

Os dois isolados avaliados apresentaram resistência ao fluconazol. Em combinação, o isolado *C. albicans* ATCC 28367 demostrou sinergismo com ibuprofeno e com diclofenaco, já o isolado *C. albicans* ATCC 18804 na associação com os AINEs apresentou-se indiferente, como apresentado na Tabela 2. Estudo *in vivo* realizado com modelo de infecção sistêmica por *Candida albicans* em camundongos tratados com ibuprofeno e fluconazol mostrou que o ibuprofeno potencializa a atividade antifúngica do fluconazol contra cepa resistente ao fluconazol, reduzindo drasticamente a carga fúngica e a morbidade (COSTA et al., 2015).

Tabela 2: Efeito da interação entre anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e fluconazol.

	Ibuprofeno		**Diclofenaco sódico**	
	FICI	**Interação**	**FICI**	**Interação**
***C. albicans* ATCC 28367**	0,5	Sinérgico	0,31	Sinérgico
***C. albicans* ATCC 18804**	1,25	Indiferente	2	Indiferente

FICI: Índice da Concentração Inibitória Fracionada

Em estudo realizado, Rosato et al. (2016) demonstraram resultados sinérgicos entre equinocandinas associadas a anti-inflamatórios não esteroidais frente a quatro isolados de *C. albicans*, dois isolados de *C. glabrata* e três isolados de *C. guilliermondii*.

Outros autores também relataram efeito sinérgico entre AINES e antifúngicos (YANG et al., 2016; ARAI et al., 2005; Pina-Vaz et al., 2000), demonstrando assim, que a terapia combinada de AINES e fluconazol pode alcançar uma cobertura antimicótica mais ampla e tornar-se uma nova opção terapêutica.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

São necessários ensaios com um maior número de isolados, no entanto, com estes resultados preliminares foi possível observar que a combinação terapêutica de fluconazol com ibuprofeno pode constituir uma nova abordagem para o tratamento de terapias antifúngicas.

REFERÊNCIAS

ARAI, R., Sugita, T., Nishikawa, A. Reassessment of the *in vitro* synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. Mycoses, v.48, p.38–41, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3(28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

COSTA, O. S., Miranda, I.M., Silva-Dias, A., Silva, A.P., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C. Ibuprofen potentiates the *in vivo* antifungal activity of fluconazole against *Candida albicans* murine infection. Antimicrobial agents and chemotherapy, v.59, n.7, p.4289-4292, 2015.

LIU, S., Hou, Y., Chen, X., Gao, Y., Li, H., Sun, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. International journal of antimicrobial agents, v.43, n.5, p.395-402, 2014.

MARTINEZ-IRUJO, Juan, J., Villahermosa M.L., Alberdi E., Santiago E. A checkerboard method to evaluate interactions between drugs. Biochemical pharmacology, v.51, n.5, p.635-644, 1996.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. Nature Reviews Disease Primers, v. 4, p. 18026, 2018.

PINA-VAZ, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Martinez-De-Oliveira, J., Fonseca, A.F., Mårdh, P.A. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. Journal of medical microbiology, v.49, n.9, p.831-840, 2000.

ROSATO, A., Catalano, A., Carocci, A., Carrieri, A., Carone, A., Caggiano, G., et al. *In vitro* interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. Bioorganic & medicinal chemistry, v.24, n.5, p.1002-1005, 2016.

YANG, S., Liao, Y., Cong, L., Lu, X., Yang, R. *In Vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. PLoS ONE, v.11, n.6, 2016.

YAPAR, Nur. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Therapeutics and clinical risk management, v. 10, p. 95, 2014.