

Disminución de la actividad antifúngica del fluconazol asociada a ibuprofeno y piroxicam en la histoplasmosis experimental del hámster (*Mesocricetus auratus*)

Jorge Luis Finkelievich, Cristina Iovanniti, Fernanda Landaburu, Gabriel Raffin, Norberto Sanjuan, María Rosa Elías Costa y Ricardo Negroni

Centro de Micología, Departamento Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Resumen

El propósito de nuestro trabajo fue determinar la actividad antifúngica del fluconazol asociada con piroxicam e ibuprofeno en la histoplasmosis experimental del hámster (*Mesocricetus auratus*)

Sesenta hámsters fueron inoculados por vía intracardiaca con un inóculo de 4×10^6 levaduras de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Los tratamientos comenzaron una semana después de la inoculación y se extendieron por tres semanas. Seis grupos de diez animales cada uno recibieron: 1- fluconazol 8 mg/kg/día; 2- ibuprofeno 20 mg/kg/día; 3- piroxicam 20 mg/kg/día; 4- fluconazol + ibuprofeno; 5- fluconazol + piroxicam y 6- recibió solo el solvente de los fármacos. Una semana después de concluidos los tratamientos, los animales fueron sacrificados y la eficacia terapéutica se evaluó por la realización de hemocultivos, determinación de UFC/g de bazo y estudios histopatológicos del mismo órgano. Se observó un aumento significativo del número de UFC/g de bazo en los grupos que recibieron fluconazol asociado a los antiinflamatorios ($3,9 \times 10^7$ y $3,3 \times 10^7$) comparándolos con el grupo que fue tratado solo con el azólico (9×10^6). En la histopatología, los animales que recibieron sólo fluconazol, mostraron granulomas bien definidos con escasos elementos fúngicos en el interior de macrófagos, mientras que en los que recibieron la asociación de antiinflamatorios con fluconazol, se evidenció la producción de granulomas más laxos con abundantes levaduras intracelulares.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten concluir que los antiinflamatorios no esteroideos utilizados, producen una disminución de la eficacia antifúngica del fluconazol en la histoplasmosis experimental del hámster.

Palabras clave

Histoplasmosis experimental, Fluconazol, Ibuprofeno, Piroxicam, Actividad antifúngica

Diminution of antifungal activity of fluconazole associated with ibuprofen and piroxicam in experimental histoplasmosis of hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Summary

The aim of this study was to determine if the association of non-steroid anti-inflammatory drugs (piroxicam and ibuprofen) with fluconazole, affects the antifungal activity of the azole compound, in an experimental model of histoplasmosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Sixty hamsters were intracardially inoculated with 4×10^6 yeasts of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Treatments began one week after the challenge and continued for three weeks. The hamsters were divided in six groups of ten animals each and received the following treatment: 1- fluconazole 8 mg/Kg/day; 2- ibuprofen 20 mg/Kg/day; 3- piroxicam 20 mg/Kg/day; 4- fluconazole+ibuprofen; 5- fluconazole+piroxicam

Dirección para correspondencia:

Dr. Jorge Finkelievich
Centro de Micología
Departamento Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires
Paraguay 2155 (1121) Buenos Aires
Argentina.
Fax: +54 11 4508 3708
E mail: ctromic@janssen.com.ar

Aceptado para publicación el 22 de Noviembre de 2001

and 6- only received the solvent of these drugs. One week after ending the treatment, all the animals were sacrificed and the evaluation of the treatments was based on the results of bloodcultures, on the determination of colony forming units / gram of spleen, and the histopathologic studies of the same organ. The animals treated with fluconazole plus ibuprofen or piroxicam showed more colony forming units / gram ($3,9 \times 10^7$ and $3,3 \times 10^7$) when compared with the animals treated with fluconazole alone ($0,9 \times 10^7$). The histopathologic results of the hamsters that received fluconazole showed well-organized granulomas with few yeast-like elements inside the macrophages. In contrast, those which received fluconazole associated with anti-inflammatory drugs presented lax granulomas containing numerous yeast-like elements. These findings let us to conclude that non-steroid anti-inflammatory drugs diminish the antifungal efficacy of fluconazole in this animal model.

Key words Experimental histoplasmosis, Fluconazole, Ibuprofen, Piroxicam, Antifungal activity

La histoplasmosis es una micosis sistémica endémica cuya forma progresiva diseminada ha aumentado su incidencia en los pacientes con alteraciones en la inmunidad mediada por células [1].

El itraconazol (ITZ) es el azólico más eficaz en el tratamiento de la histoplasmosis, mientras que el fluconazol (FCZ), otro compuesto triazólico, presenta una menor eficacia terapéutica en esta afección [2]. Algunas características farmacocinéticas de esta última droga, tales como alcanzar altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo y utilizar una diferente vía de eliminación, la renal, hace atractivo su uso en pacientes con enfermedades fúngicas que comprometen las meninges y el riñón [3].

Los estudios de sinergismo de los antifúngicos están en permanente revisión. La combinación de anfotericina B y flucitosina en la candidiasis, en la criptococosis, así como la combinación de azoles y polienos en la histoplasmosis son algunos de los sinergismos estudiados [4-6]. La asociación de los azólicos con antiinflamatorios u otros antifúngicos, no son aún bien conocidos.

El ibuprofeno (IBU) es un derivado del ácido proiónico con una estructura similar a los salicilatos, que habitualmente se utiliza como antipirético, analgésico y antiinflamatorio, posee además capacidad fungistática sobre algunas especies de dermatofitos y *Candida albicans* y se postula que dicha actividad se produce por alteraciones en la membrana plasmática [7-8]. Estudios experimentales en la rata han demostrado que inhibe la prostaglandinosintetasa [8], pero en el hámster se desconoce si produce este efecto. El piroxicam (PIRO) es un derivado del oxicam y pertenece, como el ibuprofeno, a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) Es utilizado en los tratamientos de artritis reumatoidea y en procesos músculo-esqueléticos agudos [8]. No se conoce su actividad antifúngica.

Scott *et al.* [9] demostraron el efecto sinérgico *in vitro* de la asociación de antiinflamatorios no esteroideos como el IBU, ácido salicílico y propilparabeno con el FCZ sobre cepas de *C. albicans*, utilizando la técnica del NCCLS de acuerdo al protocolo M27 A para medir las concentraciones inhibitorias mínimas de los antifúngicos. Tariq *et al.* [10] observaron un efecto sinérgico entre antifúngicos como el econazol y la nikkomicina Z con el IBU, utilizando la técnica *decimal assay activity* (DAA) *in vitro* para cepas de *Candida albicans*.

En una investigación previa demostramos la utilidad del hámster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental de histoplasmosis diseminada subaguda para comprobar la eficacia de los tratamientos antifúngicos

[11-12]. *Histoplasma capsulatum* produce en este animal compromiso pluriparenquimatoso, similar a lo observado en los pacientes inmunocomprometidos [13]. El bazo fue el órgano blanco que se utilizó para la determinación de la carga fúngica (unidades formadoras de colonias / gramo de órgano) (UFC/g). Los hemocultivos demostraron ser útiles para determinar la eficacia terapéutica de distintos fármacos antifúngicos [14].

El propósito de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la acción antifúngica del FCZ asociado con antiinflamatorios, PIRO e IBU, en la histoplasmosis experimental del hamster.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales utilizados. Fueron utilizados 60 hámsters de ambos sexos, de aproximadamente 120 g de peso. Estos animales fueron criados en el Centro de Micología del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y se separaron en seis grupos de 10 animales cada uno. Se los mantuvo con agua y comida *ad libitum*.

Preparación del inóculo y vía de infección

Cepa. Se utilizó la fase levaduriforme de *Hi. capsulatum* var. *capsulatum*, cepa V, de la colección del Centro de Micología del Departamento de Microbiología Facultad de Medicina. La misma se mantuvo por repiques semanales en agar caldo glucosado al 2% incubada a 37 °C hasta el momento de su uso.

Inóculo. Las levaduras obtenidas a partir de cultivos de 72 h fueron suspendidas en solución salina isotónica estéril (SSIE) y homogeneizadas en un homogeneizador manual de tejidos. Se ajustaron a una concentración equivalente a 4×10^7 células por ml, por recuento en cámara de Neubauer. El 80 % de viabilidad de las células se controló por la técnica de exclusión del azul tripan.

Vía de infección. La infección experimental se llevó a cabo por vía intracardiaca de acuerdo a los resultados obtenido en un trabajo previo [13], que se realizó bajo anestesia con éter etílico. Cada animal recibió 0,1 ml de la suspensión antes mencionada (total de levaduras por dosis 4×10^6).

Preparación de los fármacos. El FCZ (Pfizer Argentina), el IBU (Roux-Ocefa Argentina 31195) y el PIRO (Pfizer Argentina) fueron suspendidos en una solución acuosa de dextrosa al 5% con 0,3% de agar a una

concentración final de 2 µg/ml para el azólico y 4 µg/ml para cada uno de los antiinflamatorios. El antifúngico y los antiinflamatorios fueron administrados una vez por día a razón de 8 mg/Kg y 20 mg/Kg respectivamente.

Esquema terapéutico. El tratamiento comenzó siete días después de la infección experimental, administrando los fármacos diariamente por gastroclisis durante tres semanas.

El grupo 1 recibió FCZ, el grupo 2 recibió IBU, el grupo 3 recibió PIRO, el grupo 4 recibió FCZ más IBU, el grupo 5 recibió FCZ más PIRO; el grupo 6 se utilizó como control de la infección experimental recibiendo la solución en la que fueron disueltos los fármacos.

Crterios de evaluacin:

Hemocultivos. Una semana posterior a la finalizacin del tratamiento todos los animales fueron anestesiados con éter etílico, sangrados por punción cardíaca y sacrificados; 1 ml de sangre de cada animal se sembró por duplicado en tubos de agar glucosado de Sabouraud (AGS) y se incubaron a 28 °C durante un mes [14]. Los animales sacrificados fueron autopsiados y se extrajeron los bazos. Los mismos fueron cortados en dos trozos, uno para el estudio histopatológico, que se fijó en formaldehído tamponado y el otro, para cultivos, se colocó en un recipiente estéril.

Histopatológico. Los cortes histológicos fueron teñidos con PAS/hematoxilina. La observación microscópica se realizó con 40x y se registró el patrón histopatológico de las lesiones. Se semi-cuantificó el número de levaduras observados en 20 campos microscópicos en: escasos elementos, cuando el número promedio fue entre 6-12, moderado entre 13-30 y abundantes más de 30 elementos fúngicos.

Cultivos. El trozo de bazo de cada animal fue pesado, triturado en un homogeneizador de tejido y suspendido en SSIE a razón de 100 mg/ml, a partir del cual se realizaron diluciones 1/1000 y 1/10000 en SSIE [15-16]. Para la determinación de UFC/gde órgano, se sembró por diseminación, 0,1 ml de cada dilución sobre la superficie de placas de Petri que contenían AGS. Para el control de infección experimental se sembraron por estría, en cuatro tubos que contenían AGS, con 0,2 ml del homogeneizado de bazo diluido 1/1000. Todos los cultivos se incubaron a 28 °C durante un mes debido a la mayor recuperación de la fase saprofitica de *H. capsulatum* [13].

Análisis estadístico. Los datos fueron evaluados estadísticamente utilizando el análisis de la varianza de un factor y las comparaciones fueron hechas mediante el test de Tukey.

RESULTADOS

Los resultados están expresados en la Tabla 1.

Hemocultivos. Los grupos 2 y 3, que recibieron sólo los antiinflamatorios, presentaron 100% de hemocultivos positivos al igual que los controles (grupo 6). Los animales que recibieron sólo el antifúngico (grupo 1) o asociado con los antiinflamatorios (grupo 4 y 5) presentaron entre 50 a 70% de hemocultivos positivos.

Cultivos de bazo. Los animales que fueron tratados solo con FCZ (grupo 1) presentaron el menor promedio de UFC (0,9x10⁷). Los que recibieron la asociación de FCZ con algunas de las drogas antiinflamatorias (grupo 4 y 5) mostraron un incremento significativo del número de UFC (3,9x10⁷ y 3,3x10⁷) (p<0,05) con respecto al grupo 1 y 50% menos que los animales controles (7,9x10⁷) (p<0,05).

Con respecto a la acción de los antiinflamatorios no-esteroides sin la asociación con el antifúngico, el grupo 2 (IBU) mostró un aumento significativo en las

Tabla 1. Resultados de los hemocultivos y UFC / g de los cultivos de bazo.

Grupos	Fármaco	UFC/g	Hemocultivos positivos (%)
1	FCZ ¹	0,9 x 10 ⁷	5 (50)
2	IBU ²	40 x 10 ⁷	10 (100)
3	PIRO ³	9,9 x 10 ⁷	10 (100)
4	FLU+ IBU ⁴	3,9 x 10 ⁷	5 (50)
5	FLU+ PIRO ⁵	3,3 x 10 ⁷	7 (70)
6	CONTROL	7,9 x 10 ⁷	10 (100)

Se expresa el promedio de 10 animales estudiados por grupo.

1: fluconazol; 2: ibuprofeno; 3: piroxicam; 4: fluconazol más ibuprofeno; 5: fluconazol más piroxicam.

UFC (40x10⁷) (p<0,05) con respecto a los animales del grupo control (7,9x10⁷), mientras que los del grupo que recibieron solo PIRO (9,9x10⁷) no mostró diferencias significativas frente al grupo testigo (7,9x10⁷).

Histopatología de bazo. Los estudios histopatológicos mostraron en los animales del grupo control, múltiples granulomas, constituidos mayoritariamente por macrófagos de aspecto epiteliode, con escasas células gigantes y limitada repuesta linfocitaria. En el interior de los macrófagos se observó un número moderado de levaduras intracelulares de *H. capsulatum*. En los animales tratados solo con PIRO ó IBU los granulomas fueron menos definidos, los macrófagos estaban más esparcidos y la mayoría presentó abundantes levaduras en su interior.

Los animales que recibieron FCZ solamente, mostraron granulomas bien organizados con escasos elementos fúngicos en el interior de los macrófagos.

DISCUSIÓN

La acción de los antiinflamatorios no esteroideos, relacionada con su capacidad de inhibir la síntesis de las prostaglandinas, altera la respuesta inflamatoria y en particular la diapedesis leucocitaria [14-17]. Esta acción se evidenció en nuestro trabajo por la modificación del cuadro histológico de los granulomas y por el alto número de UFC/g de bazo en los cultivos, que presentaron los animales tratados solo con los antiinflamatorios cuando se los comparó con los del grupo control.

Observamos nuevamente la eficacia del FCZ (grupo 1) en el tratamiento de la histoplasmosis experimental, ya que fue el grupo que presentó el menor número de UFC/g y en el estudio se observaron los granulomas bien constituidos, con escasos *H. capsulatum* [11]. Este efecto fue evidenciado a los siete días de suspendido el tratamiento, período durante el cual se aseguró la eliminación de los fármacos de los tejidos [11-12].

Demostramos, una vez más, que los hemocultivos son un parámetro útil para evaluar la eficacia terapéutica y la evolución de esta enfermedad experimental [14]. El rendimiento de los hemocultivos en la recuperación del *H. capsulatum*, no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Scott y Tariq [9-10] comprobaron *in vitro*, que la asociación de los AINE con el FCZ incrementaba la acción de este último fármaco. En este modelo experimental no comprobamos el sinergismo observado *in vitro*. Los animales tratados con antiinflamatorios y FCZ, con dosis mínimas (IBU) o 50 veces mayores que las indicadas en terapéutica humana (PIRO), evidenciaron un incremento de 20 o 30 veces el número de UFC/g, cuando se los comparó con aquellos que recibieron sólo el FCZ. Esta disminución de la eficacia terapéutica del FCZ se manifestó además por el abundante número de levaduras de *H. capsulatum* observadas en el estudio histopatológico y, para-

lamente, pudo detectarse una alteración en la estructura de los granulomas, que se presentaron más laxos. Es muy probable que la discordancia entre los datos obtenidos *in vitro* y los que comprobamos en nuestro estudio se deban, fundamentalmente, a las alteraciones estructurales de los granulomas provocadas por los fármacos antiinflamatorios no-esteroides.

En este modelo experimental la posología de los tratamientos antiinflamatorios fue adaptada a su aplicación en monodosis diarias, debido a que la única vía factible de administración fue la gastroclisis.

Por todo lo antedicho podemos concluir que la asociación de antiinflamatorios no-esteroides con el FCZ provoca una mala evolución de la histoplasmosis experimental en el hámster y que este efecto es independiente de la dosis de antiinflamatorios utilizada. Se necesitará ampliar el presente trabajo en otros animales, para comprobar si estos hallazgos están vinculados o no a la especie animal utilizada.

Agradecimientos al Prof. Dr. Rodolfo Rothling por la corrección del manuscrito y a la Dra. María Teresa Mújica por la realización del estudio estadístico.

Bibliografía

1. Sarosi GA, Davies SF. Clinical manifestations and management of histoplasmosis in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson MD (Eds.) Fungal infections in the compromised patient. (2nd Ed.) Chichester, John Wiley & Sons 1991: 191-206.
2. Díaz M, Negroni R, Montero-Gei F, et al. A panamerican five years study of fluconazole therapy of deep mycoses in the non-compromised host. Clin Infect Dis 1992; 14 : 68-76.
3. Bennett J, Grant S. Fluconazole: An overview. Longhorne ADIS Press 1990.
4. Bennett J. Micosis. En: Mandell G, Douglas RG, Bennett JE (Eds.) Enfermedades Infecciosas-Principios y Práctica, 3^a Ed. Editorial Médica Panamericana 1991: 2057-2072.
5. LeMonte AM, Kimberly EW, Smedema ML, Schnizlein-Bick C, Kohler SM, Wheat LJ. Amphotericin B combined with itraconazole or fluconazole for treatment of histoplasmosis. J Inf Dis 2000; 182: 545-550.
6. Connolly P, Wheat LJ, Schnizlein-Bick C, et al. Comparison of a new triazole, posaconazole, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in immunocompromised mice. Antimicrob Agent Chemother 2000; 44: 2604-2608.
7. Sanyal AK, Roy D, Chowdhury B, Banerjee AB. Ibuprofen a unique anti-inflammatory compound with antifungal activity against dermatophytes. Lett Appl Microbiol 1993; 17: 109-111.
8. Lasala FG, Sagasta LC. Temas de terapéutica clínica. Buenos Aires, Editorial Akadia, 1983: 214-216.
9. Scott EM, Tariq VN, Roisin MM. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate or propylparaben against *Candida albicans in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 13: 2610-2614.
10. Tariq VN, Scott EM, McCain NE. Use of decimal assay for additivity to demonstrate synergy in pair combinations of econazole, nikkomycin Z, and ibuprofeno against *Candida albicans in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 13: 2615-2619.
11. Finquelievich JL, Elias Costa MR, Negroni R, Iovannitti C, Agorio IL, Tiraboschi IN. Compuestos triazólicos en el tratamiento de la histoplasmosis diseminada experimental del hámster. Rev Arg Micol 1990; 13: 5-11.
12. Finquelievich JL, Negroni R, Iovannitti C, Bava AJ. Treatment of disseminated histoplasmosis in hamsters. Mycopathologia 1989; 105: 75-78.
13. Iovannitti C, Negroni R, Finquelievich JL, Bava AJ. Histoplasmosis diseminada experimental del hámster Rev Arg Micol 1988; 11: 11-17.
14. Finquelievich JL, Elias Costa MR, Iovannitti C, Negroni R. Bloodculture as a parameter of treatment effectiveness in experimental histoplasmosis of the hamsters (*Mesocricetus auratus*) Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1995; 37: 99-102.
15. Iovannitti C, Negroni R, Bava AJ. Experimental cryptococcosis in hamster. J Mycol Med 1994; 4: 67-71.
16. Negroni R, Elias Costa MR, Finquelievich JL, et al. Treatment of experimental cryptococcosis with SCH 39304 and fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1460-1463.
17. Flower RJ, Moncada S, Vane JR. Drug therapy of inflammation. In: Goodman and Gilman's (Eds.) The pharmacology basis of therapeutics. Gilman AG, Goodman LS, Goodman A, Rall TW, Murad F (7th Ed.) New York, Macmillan Publishing Company, 1985: 675-715.