

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Modelagem Farmacocinética Populacional na Avaliação
do Papel da Glicoproteína-P na Penetração Tecidual de
Fluoroquinolonas**

ESTEVAN SONEGO ZIMMERMANN

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Modelagem Farmacocinética Populacional na Avaliação
do Papel da Glicoproteína-P na Penetração Tecidual de
Fluoroquinolonas**

Tese apresentada por **Estevan Sonogo
Zimmermann** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a Dr^a. Teresa C.T. Dalla Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Whocely Victor de Castro

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.^aDr^a. Bibiana Verlindo de Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. François Germain Noël
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Sonego Zimmermann, Estevan
Modelagem Farmacocinética Populacional na
Avaliação do Papel da Glicoproteína-P na Penetração
Tecidual de Fluoroquinolonas / Estevan Sonego
Zimmermann. -- 2015.
153 f.

Orientadora: Teresa Dalla Costa.
Coorientador: Whocely Victor de Castro.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2015.

1. Fluoroquinolonas. 2. Farmacocinética. 3.
Transportadores de Efluxo. 4. Modelagem popPK. 5.
Microdiálise. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II.
de Castro, Whocely Victor, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES para doutorado sanduíche na *University of Florida (USA)* e do CNPq.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Prof. Teresa Dalla Costa pela oportunidade de desenvolver este trabalho e sua orientação científica, pelo profissionalismo, pela competência e o incentivo a sempre buscar e alcançar novos desafios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de desenvolver este trabalho de tese;

Aos professores da Faculdade de Farmácia por dividir o seu conhecimento e proporcionar discussões científicas, especialmente a Prof. Bibiana Verlindo de Araújo;

Ao Prof. Dr. Whocely Victor de Castro pela sua co-orientação durante o doutorado;

Ao Prof. Stephan Schmidt (*University of Florida*) e ao seu grupo de pesquisa pelo apoio e orientação deste trabalho na etapa realizada fora do Brasil;

Aos todos colegas do laboratório 405;

Aos colegas do grupo de Farmacocinética da UFRGS (PKs): Maiara, Bruna, João Victor, Fabiano, Fernanda, Fernando, Priscila, Carolina, Izabel, Andressa, Francine e Jaqueline pelo companheirismo, discussões científicas e pessoais, pela colaboração nas etapas experimentais deste trabalho;

Aos alunos de iniciação científica Camila, Graziela e Vitória pelo auxílio nos experimentos;

Às agência de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS pelas bolsa de pesquisa e auxílio financeiro;

À toda minha família pelo incentivo e apoio incondicional, especialmente aos meus pais Sady Martim e Josete exemplos de honestidade, garra e perseverança, e aos meus irmãos Samuel e Elisa;

À minha namorada Tiane Dias Canabarro pelo apoio nos momentos difíceis, carinho e amor. Por me ajudar a superar a distância, dificuldades e compartilhar suas felicidades.

Aos amigos sempre dispostos a compartilhar momentos bons, ajudar e participar do crescimento pessoal.

“Quando fizeres algo nobre e belo e ninguém notar, não fique triste. Pois o sol toda manhã faz um lindo espetáculo e no entanto, a maioria da plateia ainda dorme...”

John Lennon

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo farmacocinético (popPK) populacional para descrever simultaneamente as concentrações das fluoroquinolonas (levofloxacino – LEV e ciprofloxacino – CIP) no plasma, pulmão e próstata na presença e ausência do inibidor da P-gp tariquidar (TAR) visando determinar a contribuição desse transportador de efluxo na distribuição tecidual desses antimicrobianos. **Método:** Para alcançar este objetivo as seguintes etapas foram realizadas: i) foi validado o método analítico de HPLC-fluorescência para quantificação de CIP em amostras de plasma e microdialisado; ii) foram estabelecidas as condições para microdiálise para o CIP e as taxas de recuperação *in vitro*, por diálise e retrodiálise, e em tecido pulmonar e prostático *in vivo* por retrodiálise; iii) foi avaliada a farmacocinética do LEV após administração a ratos Wistar via *i.v. bolus* e por nebulização intratraqueal na dose de 7mg/kg na ausência e após administração prévia de TAR (15 mg/Kg *i.v.*); iv) foi desenvolvido um modelo popPK para prever as concentrações do LEV simultaneamente no plasma, pulmão e próstata após administração intravenosa e intratraqueal na presença e ausência do TAR; v) foi desenvolvido o modelo popPK para descrever as concentrações de CIP simultaneamente no plasma, pulmão e próstata após administração a ratos Wistar da dose de 7 mg/kg *i.v. bolus* na presença e ausência de TAR (15 mg/kg *i.v.*); vi) Para ambos os fármacos os dados foram avaliados por análise não-compartimental e modelados por modelo de quatro compartimentos modificado, com ajuda do software NONMEN[®]. **Resultados e Conclusões.** i) Método analítico foi desenvolvido e validado com sucesso para quantificação de CIP em HPLC/fluorescência mostrando-se linear na faixa de 10–2000 ng/mL em plasma e 5–1000 ng/mL em microdialisado com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99. Os valores obtidos de erro padrão relativo para ensaios de precisão intra e inter-dia foram entre 8,8 e 6,0 %, para microdialisado entre 11,1 e 7,4 % para plasma, respectivamente. Os valores de exatidão foram 86,1% entre 114,3% para microdialisado e 85,6% entre 108,2% para plasma; ii) A avaliação do CIP por microdiálise mostrou recuperação concentração independente (0,25 - 1,5 µg/mL). Além disso, não houve diferença entre as recuperações obtidas por diálise e retrodiálise para o mesmo fluxo. No fluxo selecionado para os experimentos (1,5 µL/min) as recuperações médias por diálise e retrodiálise foram $23,0 \pm 2,8\%$ e $22,8 \pm 1,6\%$, respectivamente. A recuperação relativa das sondas *in vivo* foi de $11,3 \pm$

1,9 e $13,1 \pm 2,7$ % para pulmão e próstata, respectivamente; iii) A análise dos perfis plasmáticos e teciduais LEV após dose intravenosa do grupo controle (sem TAR) mostrou boa penetração tecidual na próstata ($f_T = 0,68$) e no pulmão ($f_T = 0,69$). Para a mesma via de administração, o grupo TAR mostrou uma penetração praticamente inalterada para o pulmão ($f_T = 0,81$) e um aumento de mais de 2 vezes na penetração prostática ($f_T = 1,64$). Na dose intratraqueal houve um aumento significativo na biodisponibilidade para o grupo TAR ($F = 0,86$) em relação ao controle ($F = 0,4$). Nessa via de administração foi detectado um aumento significativo na exposição (ASC) do pulmão ao LEV no grupo TAR demonstrando que o transporte por efluxo no pulmão é mais relevante quando o fármaco é administrado pela via intratraqueal; iv) Para o LEV, o modelo popPK de quatro compartimentos foi capaz de descrever simultaneamente os dados no plasma, pulmão e próstata na presença e ausência do TAR. Além disso, o modelo para administração intravenosa foi estendido e adaptado para administração intratraqueal. Foi possível analisar o impacto do transporte por efluxo sobre a penetração tecidual do LEV por diferentes vias de administração utilizando o modelo popPK; v) A avaliação do perfil farmacocinético plasmático do CIP após administração intravenosa, na presença e ausência de TAR, demonstrou diferença significativa entre todos os parâmetros calculados por análise não-compartimental, exceto para a constante de velocidade de eliminação ($\alpha = 0,05$). Em relação à penetração tecidual do CIP na próstata e pulmão, não houve alteração significativa nos parâmetros de eliminação e exposição tecidual do fármaco na presença do inibidor de efluxo TAR ($\alpha = 0,05$), demonstrando que o transporte por efluxo possui papel minoritário no processo de distribuição do fármaco para os tecidos estudados. O modelo popPK de quatro compartimentos foi capaz de descrever as concentrações plasmáticas totais, livres no pulmão e próstata em presença e ausência de TAR, simultaneamente; vi) O modelo popPK desenvolvido permitiu o estudo mais profundo do processo de distribuição do LEV e do CIP no pulmão e próstata.

Palavras chave: Fluoroquinolonas, Farmacocinética, Transportadores de efluxo, Modelagem popPK, Microdiálise.

ABSTRACT

Population Pharmacokinetic Modeling on Evaluation of Role P-glycoprotein on Fluoroquinolones Tissue Penetration

Objectives: The aim of this study was to develop a population pharmacokinetic model (popPK) able to simultaneously describe fluoroquinolones (levofloxacin – LEV and ciprofloxacin – CIP) concentrations in plasma, lung and prostate in the presence and absence of the inhibitor of P-gp tariquidar (TAR) to determine the contribution of this efflux transporter on the tissue distribution of these antimicrobials. **Methods:** To achieve this goal the following steps were taken: i) An analytical method by HPLC-fluorescence was developed and validated for CIP analysis in plasma and microdialysate samples; ii) microdialysis conditions were established for CIP including determination of *in vitro* relative recovery by dialysis and retrodialysis. The relative recovery was also determined *in vivo*, in lung and prostate, by retrodialysis; iii) LEV pharmacokinetics was evaluated after intravenous (i.v.) *bolus* and intratracheal (i.t.) administration of 7 mg/kg dose alone and following TAR administration (15 mg/kg i.v.) to Wistar rats; iv) a popPK model was developed to describe and predict LEV concentrations in plasma, lung and prostate following i.v. and i.t. dosing with and without TAR co-administration; v) the popPK model developed was used to describe CIP concentrations in plasma, lung and prostate after *i.v.* *bolus* administration of 7 mg/kg in presence and absence of TAR; vi) For both drugs non-compartmental analysis was performed besides data modeling by four compartment model using NONMEN®. **Results and Conclusions** i) The analytical method was developed and successfully validated for quantification of CIP by HPLC/fluorescence. The method was linear in the range of 10-2000 ng/mL in plasma and 5-1000 ng/mL in tissues microdialysate samples with coefficients of determination (r^2) higher than 0.99. The relative standard error (RSD) obtained for intra and inter-day precision were lower than 8.8% and 6.0% for microdialysate and lower than 11.1 and 7.4% for plasma, respectively. The accuracy was 86.1% to 114.3% for microdialysate and 85.6 to 108.2 % for plasma samples; ii) the evaluation of CIP microdialysis probes relative recovery *in vitro* showed that the recovery was concentration independent (0.25 to 1.5 $\mu\text{g/mL}$). In addition, there was no statistical difference between the recoveries determined by dialysis and retrodialysis at the same flow rate. Using the selected flow rate (1.5

$\mu\text{L}/\text{min}$) the recoveries by dialysis and retrodialysis were $23.0 \pm 2.8\%$ and $22.8 \pm 1.6\%$, respectively. CIP relative recoveries *in vivo* by retrodialysis were 11.3 ± 1.9 and $13.1 \pm 2.7\%$ for lung and prostate, respectively; iii) the analysis of LEV plasma and tissues concentration-time profiles after i.v. dosing showed a good tissue penetration of LEV in the prostate ($f_T = 0.68$) and lung ($f_T = 0.69$). For the same route of administration, TAR group showed virtually the same penetration into lung ($f_T = 0.81$) and an increase of over 2 fold in drug levels in prostate ($f_T = 1.64$). For the i.t. dose, there was a significant increase on LEV bioavailability for TAR group ($F = 0.86$) compared to control ($F = 0.4$). Furthermore, a significant increase was detected on lung exposure to LEV for TAR group indicating that efflux transport in the lung is more relevant when the drug is administered by the i.t. route; iv) For LEV, a four compartment model was able to describe the data simultaneously in plasma, lung and prostate in the presence and absence of TAR. Moreover, the intravenous model was extended to adapt the intratracheal dosing route. The popPK model allowed to analyze the impact of efflux transport on tissue LEV penetration of different routes of administration; v) the evaluation of plasma CIP profiles after i.v. dosing with and without TAR showed a significant difference in all parameters determined by non-compartmental analysis in the TAR group, except the elimination rate constant ($\alpha = 0.05$). The CIP tissue penetration in prostate and lung, no significant difference was observed in tissues exposure and elimination rate when TAR was present demonstrating that efflux transporter play a minor role on CIP distribution to tissues investigated ($\alpha = 0.05$). The popPK model with four compartments was able to describe CIP concentrations in plasma, lung and prostate in the presence and absence of TAR, simultaneously; vi) the popPK model developed allowed a more detailed investigation of LEV and CIP distribution process in lung and prostate.

Keywords: Fluoroquinolones, Pharmacokinetic, efflux transporters, popPK modeling, Microdialysis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	19
REVISÃO DA LITERATURA	23
1. Glicoproteína-P e o Transporte por Efluxo.....	25
2. Fluoroquinolonas.....	27
3. Estudos de Permeação <i>in vitro</i>	30
4. Microdiálise.....	33
5. Modelagem Farmacocinética Populacional.....	37
CAPITULO 1:	41
CAPITULO 2:	63
CAPITULO 3:	103
6.DISSCUSSÃO GERAL	135
7.CONCLUSÕES	141
8.REFERÊNCIAS GERAIS	145
9.ANEXO	153

INTRODUÇÃO

O transporte de moléculas através das membranas celulares em organismos vivos é um aspecto crítico da vida. O transporte inclui tanto a inclusão de nutrientes do meio extracelular (influxo) como a exclusão de compostos tóxicos (efluxo). Quando o efluxo envolve fármacos, concentrações sub-terapêuticas no local de ação podem comprometer os tratamentos farmacológicos.

A importância dos transportadores de efluxo tornou-se cada vez mais evidente nos últimos anos em função do grande impacto que causam nos processos de absorção, disposição e eliminação de fármacos (AYRTON *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2003; SCHINKEL & JONKER, 2003, FROMM, 2004). Transportadores ABC, dentre os quais destaca-se a glicoproteína-P (P-gp), formam uma das maiores famílias de proteínas de membrana responsáveis pela resistência aos antineoplásicos e antibióticos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2003).

As fluoroquinolonas são antimicrobianos com propriedades farmacocinéticas favoráveis, o que têm incentivado sua utilização no tratamento de infecções em diferentes tecidos do organismo, com maior ênfase no trato respiratório e urinário. Elas são bem absorvidas e possuem boa penetração tecidual facilitando sua utilização clínica (BALL, 2003, O'DONNELL & GELONE, 2004). Há evidências na literatura, no entanto, de que as fluoroquinolonas são substratos de sistemas transportadores de efluxo, incluindo a P-gp, em vários tecidos e linhagens de células (ALVAREZ *et al.*, 2008), com atividades diferenciadas na dependência do tecido sob investigação. Além disso, devido a características estruturais, algumas quinolonas são mais suscetíveis a esse transportador de efluxo o que pode reduzir a biodisponibilidade do fármaco quando administrado por vias alternativas como a pulmonar, por exemplo, ou a penetração tecidual no sítio de ação que são protegidos por transportadores de efluxo como a próstata e o cérebro.

Em estudos *in vitro*, o uso de inibidores da P-gp como PSC 833 e verapamil, reduziu significativamente o efluxo do ciprofloxacino e norfloxacino

das células epiteliais humanas de pulmão (Calu-3) proporcionando, portanto, uma maior penetração pulmonar desses fármacos e evidenciando o envolvimento da P-gp no efluxo das fluoroquinolonas desse tecido. Os dados obtidos revelaram ainda que a permeabilidade aparente das fluoroquinolonas resultou de transporte ativo e difusão, sendo altamente variável entre as quinolonas investigadas e, principalmente, regido pela lipofilicidade (BRILLAULT *et al.*, 2010).

Embora vários trabalhos empregando modelos celulares e tecidos isolados indicam a participação da P-gp no processo de transporte das fluoroquinolonas através de barreiras celulares (ALVAREZ *et al.*, 2008), poucos são os estudos *in vivo* que corroboram a importância dos achados *in vivo*, o que dificulta o estabelecimento de uma correlação *in vitro-in vivo*.

Diante do exposto, o presente trabalho visa contribuir para o entendimento da participação de transportadores de efluxo, especialmente da P-gp, na distribuição tecidual de diferentes fluoroquinolonas visando aumentar o conhecimento sobre essa classe terapêutica e, conseqüentemente, contribuir para a utilização terapêutica mais eficaz da mesma.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo farmacocinético (popPK) populacional para descrever simultaneamente as concentrações das fluoroquinolonas (levofloxacino – LEV e ciprofloxacino – CIP) no plasma, pulmão e próstata na presença e ausência do inibidor de P-gp tariquidar (TAR). Para assim, determinar a contribuição desse transportador de efluxo na distribuição tecidual desses antimicrobianos.

Os objetivos específicos são:

- Estabelecer e validar métodos analíticos para quantificar as quinolonas (LEV e CIP) em plasma e microdialisado de tecido de ratos, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência a partir de métodos descritos na literatura;
- Avaliar, por microdiálise, a penetração prostática e pulmonar (fluido extracelular) da fluoroquinolona LEV em ratos Wistar sadios após administração de dose única (7mg/Kg) intravenosa e intratraqueal do fármaco e correlacionar os níveis livres teciduais com os níveis plasmáticos totais através de modelagem farmacocinética populacional (popPK);
- Avaliar, por microdiálise, a penetração prostática e pulmonar da fluoroquinolona CIP em ratos Wistar sadios após administração de dose única (7mg/Kg) intravenosa dos fármacos e correlacionar os níveis livres teciduais com os níveis plasmáticos totais através de modelagem farmacocinética populacional (popPK);
- Avaliar a influência da P-gp no transporte dos fármacos estudados, comparando os dados de microdiálise tecidual obtidos nos grupos controle com os dados obtidos após a administração concomitante de inibidor da P-gp (tariquidar 15mg/Kg);

REVISÃO DA LITERATURA

1. Glicoproteína-P e o Transporte por Efluxo

A P-gp, produto codificado do gene de *Multidrug Resistance-1* em humanos (MDR1, ABCB1), foi inicialmente identificada em células tumorais por Juliano e Ling em 1976. O gene recebeu este nome em virtude da observação que as células tumorais que expressavam altos níveis de P-gp desenvolviam resistência cruzada a vários quimioterápicos, ou seja, o gene da múltipla resistência a fármacos (JULIANO & LING 1976; SCHINKEL & JONKER, 2012). Com o passar do tempo, a P-gp passou a ser estudada em condições fisiológicas e tecidos saudáveis. Sua expressão foi detectada em tecidos como intestino delgado, fígado, rim, pulmões e barreiras biológicas. Ela limita a entrada de fármacos no organismo após a administração oral, promove a eliminação do fármaco na bile e urina e dificulta penetração de fármacos no cérebro e em outros tecidos através do transporte por efluxo (FROMM, 2004; LIN, 2004; SUN *et al.*, 2003).

O transporte por efluxo ou por contrafluxo mediado pela P-gp pode ocorrer no sentido inverso de consideráveis gradientes de concentração sendo caracterizado por transporte ativo, dependente do consumo de energia, que no caso da P-gp é proveniente da hidrólise de ATP. O mecanismo de transporte por efluxo da P-gp não está completamente esclarecido, porém de maneira geral, o processo inclui as seguintes etapas (Figura1): captação do substrato (vermelho) pela P-gp nos sítios de domínios transmembranas (TMD), reorientação dos nucleotídeos de ligação (NBD) e mudança conformacional da glicoproteína, liberação do substrato no meio extracelular, hidrólise dos nucleotídeos, retorno a conformação inicial da glicoproteína (CALLAGHAN *et al.* 2006; SCHINKEL & JONKER, 2012).

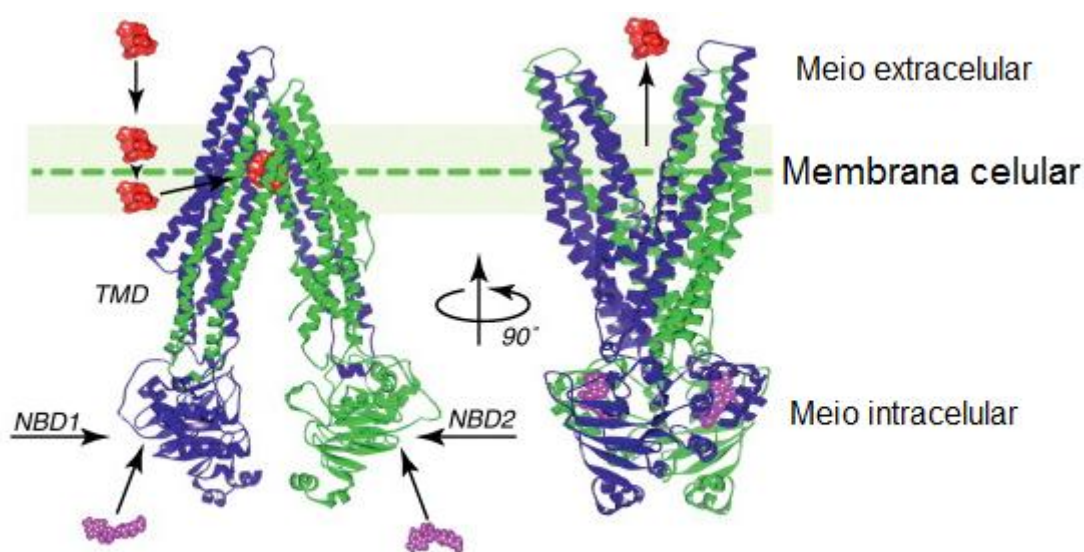


Figura 1: Esquema representativo do mecanismo de efluxo da P-gp (Adaptado de Chen *et al.* 2012).

Por se tratar de um transportador, a P-gp pode ser induzida ou inibida. Existem inúmeros inibidores da P-gp relatados na literatura, sendo os mesmos divididos em diferentes gerações de acordo com a sua potência e especificidade (Figura 2).

Os inibidores de primeira geração são fármacos usados na clínica para diversas finalidades que apresentavam como efeito colateral importante a inibição dos transportadores ABC. Os representantes desta geração incluem diversos fármacos sendo os principais verapamil, quinidina e ciclosporina A. Os inibidores de primeira geração não obtiveram sucesso em ensaios clínicos como moduladores de glicoproteína, devido principalmente a dose efetiva ser muito elevada, ou seja, baixa potência e seletividade. Desta forma, os efeitos tóxicos muito pronunciados inviabilizaram a continuidade dos estudos (HIGGINS *et al.*, 1997, ENDRES *et al.*, 2006).

Os inibidores de segunda geração, surgiram a partir do estudo de compostos quirais dos compostos de primeira geração, como o dexverapamil

(derivado do verapamil) e o PSC-833 ou valspodar (derivado ciclosporina A). Embora estes apresentem maior potência e menor toxicidade que os de primeira geração, efeitos citotóxicos importantes (citocromo P450) e interações farmacocinéticas resultaram em insucesso destes compostos em estudos clínicos(GOTTESMAN *et al.*, 2002; PALMEIRA *et al.*, 2012).

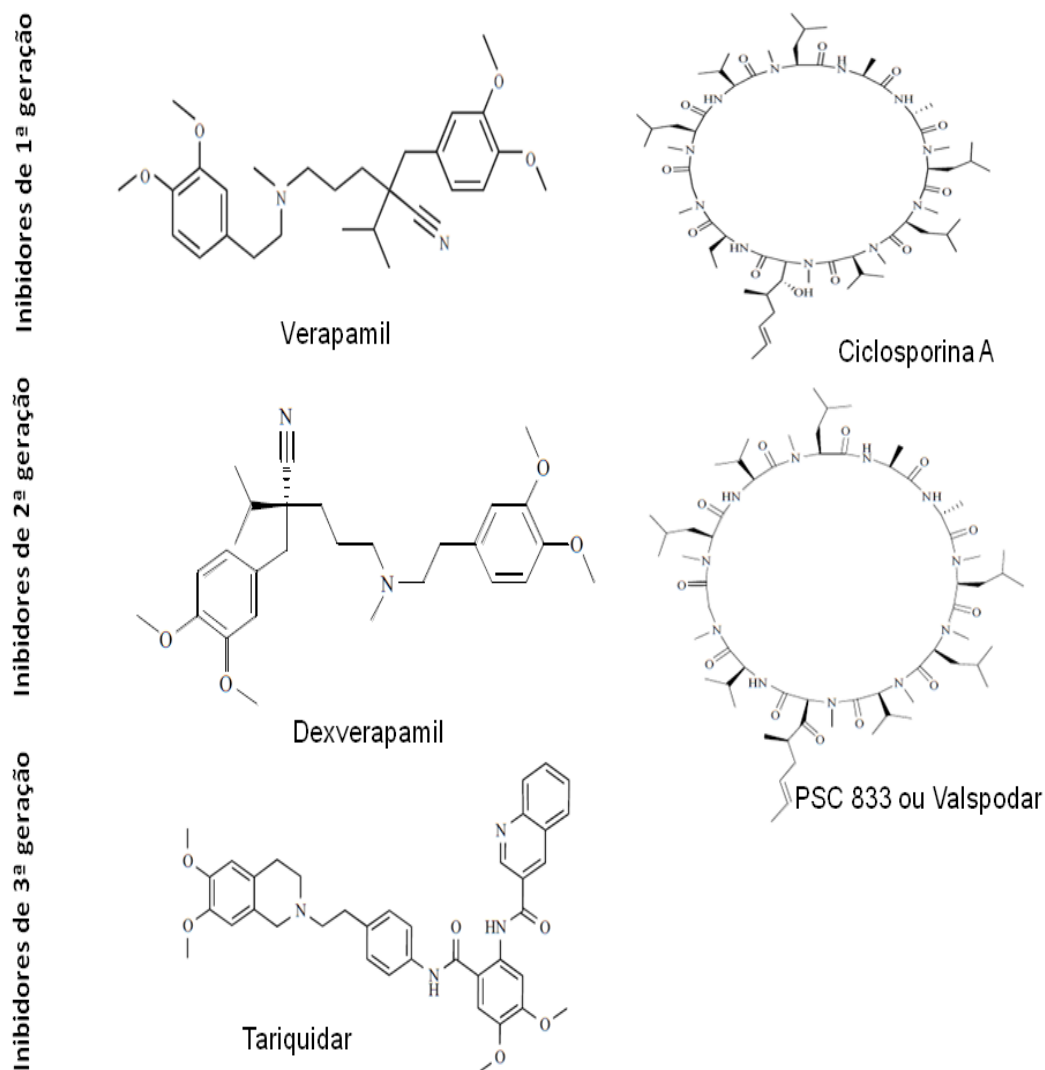


Figura 2. Estruturas químicas de alguns representantes de inibidores de P-gp.

Em função dos avanços nos estudos quantitativos da relação estrutura química e atividade biológica (QSAR), foi possível o desenvolvimento da

terceira geração dos modulares da P-gp. Os representantes desta geração possuem características próprias como a lipofilia e presença de anéis aromáticos na estrutura química que os tornam mais específicos para a P-gp (KRISHNA & MAYER 2000; PALMEIRA *et al.*, 2012). Dentre os moduladores de terceira geração destaca-se o tariquidar, que apresentou boa potência, na ordem de nanomolar, efeito modulador prologando e alta seletividade para a P-gp em estudos *in vitro* (MISTRY *et al.*, 2001). Os resultados promissores do tariquidar como modulador da P-gp, fortalece a importância de mais estudos pré-clínicos e clínicos deste composto para melhor caracterizar a sua atividade e toxicidade. Desta forma, devido a ampla gama de substratos e inibidores da P-gp, há grande possibilidade de interações fármaco-fármaco que podem ter significância clínica

O que torna a P-gp um transportador de efluxo de particular relevância clínica é a infinidade de compostos que são seus substratos. Dentre os substratos estão fármacos estruturalmente distintos como quimioterápicos, imunossupressores, esteróides, inibidores da protease do HIV, fármacos utilizados para tratamento de doenças cardíacas, agentes hipolipemiantes, agentes antidiarreicos, agentes antigota e os antimicrobianos quinolônicos, foco do presente trabalho. A compreensão dos mecanismo de resistência contra quinolonas envolvendo transportadores de efluxo tem se tornado mais importante na medida em que mutações na P-gp são cada vez mais detectadas em humanos. Essas mutações afetam o transporte seletivo dos fármacos para diferentes tecidos podendo resultar em doenças e casos de hipersensibilidade a fármacos. Em tecidos mais sensíveis, como o sistema nervoso central, altas concentrações de quinolonas podem potencializar efeitos colaterais comuns relacionados a essa classe de fármacos como tonturas, dores de cabeça, distúrbio do sono, agitação e neurotoxicidade. Por outro lado, em concentrações sub-terapêuticas, pode-se ter como consequências a não erradicação do microrganismo e o rápido desenvolvimento de resistência (ALVAREZ *et al.*, 2008; ENDRES *et al.*, 2006).

2. Fluoroquinolonas

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste em interferir na replicação de células bacterianas, transcrição e reparação do DNA, desativando as duas enzimas bacterianas essenciais para esses processos, DNA girase (ex-topoisomerase II) e a DNA topoisomerase IV. Essas enzimas são necessárias para o crescimento bacteriano e duplicação do material genético (SORGEL, 1989; MOELLERING, 1996; HAWKEY, 2003).

As fluoroquinolonas são utilizadas na quimioterapia de várias doenças infecciosas devido à sua ampla e forte atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-negativas. Fluoroquinolonas tendem a distribuir-se rapidamente nos tecidos periféricos, fluidos biológicos e atingem concentrações muitas vezes superiores às encontradas no soro ou plasma.

As fluoroquinolonas possuem amplo espectro tendo atividade bactericida contra microrganismos Gram-positivos (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*) e Gram-negativos (*C. jejuni*, *P. mirabilis*, *C. diversus*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *Salmonella typhi*, *H. parainfluenzae*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *S. boydii*, *M. catarrhalis*, *Shigella spp.*, *M. morgani*, *N. gonorrhoeae*). As fluoroquinolonas tem como principais indicações clínicas o tratamento de infecções bacterianas do trato urinário, cistite aguda, prostatite bacteriana crônica, infecções do trato respiratório inferior, sinusite aguda, infecções na pele e febre tifóide. Embora as fluoroquinolonas apresentem baixa penetração no cérebro, são relatados importantes efeitos adversos no sistema nervoso central relacionados à classe. Entre os principais efeitos colaterais estão: convulsões, aumento da pressão intracraniana, psicose tóxica, tonturas, confusão, tremores e depressão (FDA, 2004).

3 Estudos de Permeação *in vitro*

A investigação da penetração de substâncias através de barreiras do organismo, como a barreira hemato-encefálica (BHE), tem sido muito relatada na literatura através de estudos *in vitro* que possibilitam tanto a elucidação de mecanismos quanto a identificação e determinação de transportadores de influxo e efluxo, além de possibilitar o estabelecimento da cinética do processo de transporte.

Dentre os modelos *in vitro* existentes para avaliar a permeabilidade através de membranas destaca-se o uso de células MDCK (células epiteliais de rim canino), MDCK_{MDR-1} (células transfectadas com marcadores humanos de MDR1 - P-gp) e células Caco-2 (derivada de um carcinoma de cólon humano). As células MDCK são muito utilizadas como modelo para avaliar o transporte passivo de fármacos, são de fácil manipulação e possuem curto tempo de incubação. Porém, como não são células de origem humana, pode tornar-se difícil estabelecer correlação com dados *in vivo* de humanos. As vantagens das células MDCK_{MDR-1} são o rápido crescimento e boa adesão intercelular que possibilita diminuir tempo de incubação das células. Uma desvantagem é que transfecção (gene MDR1) nas células não é um processo simples (WANG *et al.* 2005; HAKKARAINEN *et al.*, 2010).

As células Caco-2 são amplamente utilizadas como modelos de absorção, apresentam boa correlação com a fração absorvida em humanos, expressam transportadores de membrana e citocromo P450, permitindo avaliar a contribuição dos mesmos no transporte e metabolismo pré-sistêmico. As principais desvantagens de sua utilização são o longo tempo de incubação e a alta variabilidade intra e inter-laboratorial por variações nos meios de cultura e das condições de incubação. Da mesma forma, por se tratar de células derivadas do colón, apresentam zonas de oclusão mais unidas o que pode subestimar o transporte celular (GARBERG *et al.*, 2005; HAKKARAINEN *et al.*, 2010).

Fedoruk e colaboradores (2004) avaliaram o impacto da P-gp e os mecanismos envolvidos no transporte e acúmulo de andrógenos celulares em

modelos *in vitro* de barreira prostática utilizando células PC-3 (carcinoma de próstata humano), LNCaP e HeLa, ambas provenientes de adenocarcinoma de próstata humano. Essas linhagens apresentam como vantagem a fácil proliferação e os curtos períodos de incubação. A desvantagem do uso de células neoplásicas para avaliação de permeação ou absorção é que essas apresentam suas características fisiológicas alteradas em relação às células saudáveis, inclusive sua permeabilidade. Desta forma, este modelo pode apresentar baixa correlação com o modelo *in vivo*.

As células Calu-3 (células epiteliais pulmonares) representam uma alternativa compatível *in vitro* ao epitélio respiratório e para avaliação de penetração de fármacos no pulmão. Estas células apresentam a formação de junções intercelulares justapostas, ideais para determinação da permeabilidade de compostos de baixa massa molecular. Além disso, demonstrou-se que essas células possuem a P-gp funcionalmente ativa devido a sua posição apical (HAMILTON *et al.*, 2001; BRILLAULT *et al.*, 2010).

Alguns estudos descritos na literatura avaliam os transportadores de influxo e efluxo na permeação celular de fluoroquinolonas.

De Lange e colaboradores (2000) avaliaram *in vitro* e *in vivo* o papel da P-gp no transporte de várias fluoroquinolonas (lomefloxacino, cinoxacino, fleroxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, pefloxacino e sparfloxacino) através da BHE utilizando a linhagem MDR1-LLC-PK1 (com expressão do gene MDR1) e LLC-PK1 (células epitelial de rim de porco). O sparfloxacino foi a única fluoroquinolona a apresentar diferença significativa entre o transporte nos dois sentidos (apical-basolateral - AP-BL - e basolateral-apical - BL-AP) entre as duas linhagens. Desta forma, o sparfloxacino foi testado no estudo *in vivo* com camundongos modificados geneticamente (sem a expressão do gene MDR1) frente aos animais normais, sendo a microdiálise cerebral a ferramenta escolhida para avaliar as diferenças de penetração. Após 4 h de infusão (50 nmol/min), as concentrações médias atingidas no fluido extracelular cerebral para os camundongos normais e sem o gene MDR1 foram de 5,1 e 26 μM , respectivamente. Em ambos os modelos *in vitro* e *in vivo*, comprovou-se que

quando a P-gp não é expressa (gene MDR1), os níveis do sparfloxacino aumentam de forma significativa. O estudo concluiu que o sparfloxacino tem pequena capacidade de penetração cerebral, principalmente devido a atuação da P-gp sobre a BHE.

Brillault e colaboradores (2010) utilizaram as células CALU-3 para avaliar *in vitro* a permeabilidade aparente (Papp) de seis fluoroquinolonas. Os resultados demonstraram que existe uma relação linear entre Log D (coeficiente de partição octanol/solução tampão PBS) e Papp na presença de PSC-833 (inibidor da P-gp). As fluoroquinolonas mais hidrofílicas (norfloxacino, ciprofloxacino), sofrem mais influência do transporte por efluxo mediado pela P-gp no processo de permeação *in vitro* (Figura 3 e Tabela 1).

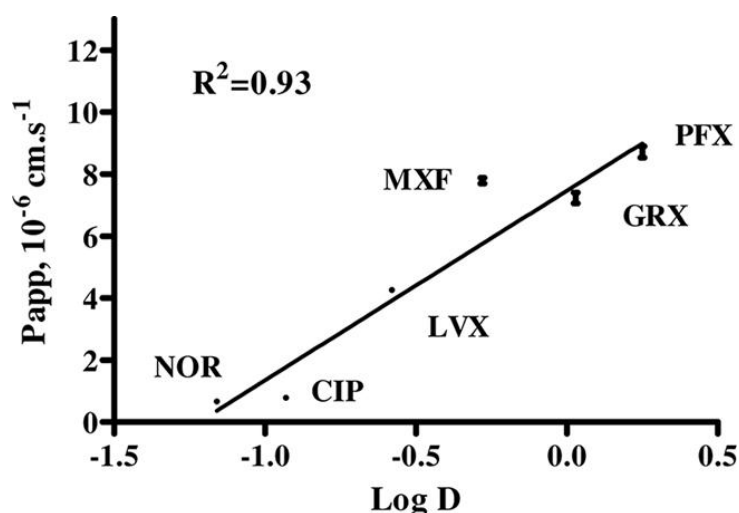


Figura 3. Relação linear entre permeabilidade aparente (Papp) de seis fluoroquinolonas na presença do PSC-833 e log D (Retirado de BRILLAULT *et al.*, 2010). NOR = norfloxacino, CIP = ciprofloxacino, LVX = levofloxacino, MXF = moxifloxacino, GRX = grepafloxacino e PFX = pefloxacino.

Tabela 1. Permeabilidade aparente para seis diferentes fluoroquinolonas na ausência e na presença do PSC-833.

TABLE 1. Permeability (P_{app} , 10^{-6} cm \cdot s $^{-1}$) for the six FQs in the absence and presence of PSC-833

Drug	Log <i>D</i>	In the absence of PSC-833 (total P_{app})			In the presence of PSC-833 (passive P_{app})			PSC-833-sensitive (active P_{app}) difference ^b		% of active contribution (BL-AP secretary)
		AP-BL absorptive	BL-AP secretary ^a	Efflux ratio	AP-BL absorptive	BL-AP secretary	Efflux ratio	AP-BL absorptive	BL-AP secretary	
CIP	-0.93	0.7 ± 0.02	2.7 ± 0.07**	4	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.01	0.9	0.1	2.0	73
NOR	-1.16	0.6 ± 0.05	2.0 ± 0.04*	3.3	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.01	0.8	0.1	1.4	70
LVX	-0.41	2.4 ± 0.10	6.2 ± 0.12**	2.6	4.2 ± 0.05	4.3 ± 0.10	1.0	1.8	1.9	30
MXF	-0.28	5.0 ± 0.20	10.4 ± 0.20**	2.1	8.3 ± 0.12	7.8 ± 0.09	0.9	3.3	2.6	25
GRX	0.03	3.1 ± 0.12	11.8 ± 0.78**	3.8	7.3 ± 0.26	7.2 ± 0.28	1.0	4.2	4.6	40
PFX	0.25	7.1 ± 0.28	9.8 ± 0.19**	1.4	8.7 ± 0.36	8.7 ± 0.20	1.0	1.6	1.1	11

^a *, $P < 0.01$, **, $P < 0.001$.

^b Calculated as the absolute difference between P_{app} in the presence and absence of PSC-833. Data are expressed as the means ± SEM of results of three experiments.

*Retirado de BRILLAULT *et al.*, 2010. NOR = norfloxacin, CIP = ciprofloxacin, LVX = levofloxacin, MXF = moxifloxacin, GRX = grepafloxacin e PFX = pefloxacin.

Ong e colaboradores (2013) usaram o modelo de permeação *in vitro* com as células CALU-3 para estudar o transporte do ciprofloxacin. No estudo, foram utilizados os inibidores cloreto de tetraetilamonio (OCT), sulfato-3 - estrona (OTP2B1), verapamil (P-gp e MRPs), PSC-833 (P-gp) e probenecida (MRPs) para avaliar a contribuição dos transportadores de efluxo (P-gp e MRPs) e de influxo (OATPs e OCTs). A inibição pelo verapamil (inibidor da P-gp e MRPs) culminou em maior diferença na permeabilidade aparente em relação ao controle. Os resultados demonstraram que o ciprofloxacin é substrato para transporte ativo sugerindo uma participação dos transportadores OCTs, OATP2B1 e MRPs na sua penetração pulmonar.

4. Microdiálise

A eficácia clínica de um antimicrobiano depende, em parte, da sua capacidade de penetrar e de atingir concentrações adequadas no local da infecção. Baixas concentrações no sítio de ação podem ter importantes implicações clínicas, podendo ser a explicação para o insucesso terapêutico de alguns tratamentos, além de aumentar o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana (HYATT *et al.*, 1995; BRUNNER *et al.*, 2000; JOUKHADAR *et al.*, 2001).

A microdiálise *in vivo* é uma técnica de amostragem que tem sido utilizada para avaliar a concentração livre de fármacos (farmacologicamente ativa) no fluido intersticial de tecidos periféricos, que é o local da maioria das infecções bacterianas em seres humanos (MÜLLER, 2000; JOUKHADAR *et al.*, 2001). As concentrações livres de fármacos em tecidos específicos do organismo podem ser diferentes daquelas encontradas na circulação sistêmica e, possivelmente, mais representativas da penetração dos fármacos no sítio de ação quando comparadas com as concentrações totais determinada em homogeneizados de tecidos (ELMQUIST & SAWCHUK, 2000).

A técnica de microdiálise consiste basicamente na implantação de uma pequena sonda no tecido a ser estudado, que é continuamente irrigada com líquido de perfusão (Figura 3). A parte da sonda que fica em contato direto com o órgão possui uma membrana semipermeável, que funciona como um filtro, impedindo a passagem de moléculas maiores que seu ponto de corte para o líquido de perfusão. O fluido de perfusão (perfundido), geralmente uma solução fisiológica (salina, Ringer, ou Ringer lactato) passa pela sonda a um fluxo baixo e constante (1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Apenas moléculas pequenas, não ligadas a proteínas, presentes no fluido intersticial sofrem difusão passiva pela membrana e são recolhidas pelo perfundido. O líquido recolhido pela outra extremidade da sonda é chamado de dialisado e está pronto para ser utilizado, sem necessidade de processamento da amostra (BRUNNER *et al.*, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007).

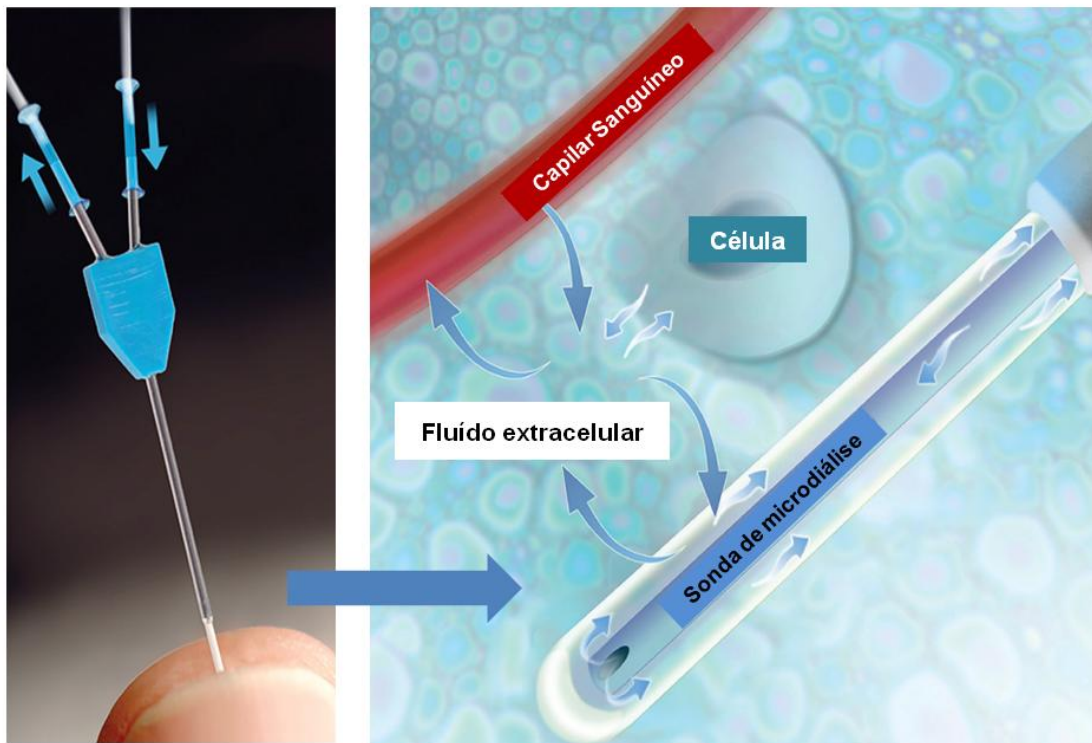


Figura 3: Representação da sonda de microdiálise e de como ocorre o princípio de difusão entre a sonda e o tecido no espaço extracelular (Adaptado <http://www.microdialysis.com/us/products/products>).

Brunner e colaboradores (2001) avaliaram por microdiálise a penetração do ciprofloxacino no músculo esquelético e tecido adiposo de humanos após administração de 400 mg por infusão intravenosa durante 60 min e após via oral de 500 mg. O estudo demonstrou que ASC no fluido intersticial foi inferior a ASC do plasma, sendo a relação $ASC_{\text{fluido intersticial}}/ASC_{\text{plasma total}}$ de 0,38 e 0,68 para músculo e tecido adiposo subcutâneo, respectivamente, após dose oral e 0,57 nos dois tecidos após dose intravenosa. O estudo concluiu que, apesar das diferenças farmacocinéticas das duas vias de administração, não há diferenças de efeito no sítio de infecção.

Hollenstein e colaboradores (2001) utilizaram a técnica de microdiálise para estudar a penetração do ciprofloxacino no músculo esquelético de obesos e indivíduos com peso proporcional à altura. A penetração tecidual expressa pela relação $ASC_{\text{tecido}}/ASC_{\text{plasma}}$ foi inferior em média no obesos $0,45 \pm 0,27$ em

relação aos indivíduos de peso normal $0,82 \pm 0,36$. Os resultados demonstram uma penetração reduzida do ciprofloxacino em obesos, sendo necessário um ajuste de dose diferenciado para os pacientes com excesso de peso.

Schuck e colaboradores (2005) estudaram o efeito da microgravidade sobre a farmacocinética do ciprofloxacino em humanos. Neste estudo, foram coletadas amostras de sangue, urina e do fluido intersticial do músculo esquelético. O fator de penetração tecidual (*ft*) do ciprofloxacino foi calculado com base na relação $ASC_{\text{livre tecido}}/ASC_{\text{livre plasma}}$ e os valores foram semelhantes ($0,61 \pm 0,36$) em microgravidade e ($0,92 \pm 0,63$) em ambiente normal. Os autores concluíram que a disposição do ciprofloxacino não é afetada em ambiente de microgravidade, pois não foi detectada diferença estatística significativa entre os valores de *ft* obtidos nas duas condições.

Marchand e colaboradores (2008) avaliaram por microdiálise após infusão contínua a penetração do levofloxacino no pulmão e músculo de ratos. As relações de concentrações livres em cada tecido/concentrações livres no plasma no *steady-state* foram de $1,00 \pm 0,15$ e $1,06 \pm 0,41$ para o músculo e pulmão, respectivamente. Os resultados sugeriram que o levofloxacino distribui-se para os tecidos apenas por difusão passiva.

Nosso grupo vem utilizando a técnica com sucesso para estudar a penetração de antibacterianos e antifúngicos nos mais diversos órgãos, destacando-se o estudo da penetração das quinolonas norfloxacino em músculo esquelético (FREDDO & DALLA COSTA, 2002), gatifloxacino em músculo e pulmão (TASSO *et al.*, 2008), e levofloxacino na próstata de ratos (HURTADO *et al.*, 2014).

Hurtado e colaboradores (2014) estudaram a penetração do levofloxacino no tecido prostático de ratos Wistar utilizando a técnica de microdiálise. As concentrações livres no tecido atingiram apenas 78% das concentrações livres no plasma. Na discussão, os autores apresentam três mecanismos descritos na literatura para explicar a distribuição tecidual de fluoroquinolonas: a difusão passiva, que é dependente da lipofílica do fármaco; o mecanismo de *ion-trapping*, que acumularia as fluoroquinolonas, molécula

anfóteras, nos tecidos na dependência do pKa do fármaco e pH do tecido; o fato das fluoroquinolonas serem substrato para transportador de efluxo. Devido às concentrações de levofloxacino livres na próstata serem inferiores às concentrações livres plasmáticas os autores modelaram a penetração tecidual do fármaco assumindo difusão (cinética de primeira ordem) associada à transporte de efluxo (cinética de Michaelis-Menten), o que permitiu descrever adequadamente os níveis teciduais encontrados. Os autores, no entanto, sugeriram que estudos complementares seriam necessários para confirmar a participação e o tipo de transportador de efluxo envolvido na distribuição das fluoroquinolonas na próstata.

5 Modelagem Farmacocinética Populacional

Um modelo é a descrição de uma hipótese usando termos matemáticos para estabelecer relações quantitativas de forma concisa. A modelagem farmacocinética busca descrever em termos matemáticos a complexidade biológica da disposição e distribuição do fármaco no organismo em relação à ordem temporal. Desta forma, os modelos farmacocinéticos matemáticos podem ser concebidos com o objetivo de descrever os processos de absorção, distribuição e eliminação de fármacos visando fazer previsões de concentrações em situações não investigadas. Os modelos farmacocinéticos podem ser usados para prever os níveis plasmáticos, teciduais e urinários de fármacos. Em termos farmacocinéticos, a capacidade preditiva de um modelo está intimamente relacionada ao conhecimento das variáveis que podem influenciar os processos cinéticos. Tradicionalmente, os modelos compartimentais são adotados para descrever perfis farmacocinéticos plasmáticos, sendo o organismo representado por um ou mais compartimentos interconectados. O compartimento não é um local fisiológico ou uma região anatômica, mas é considerado um tecido ou grupo de tecidos que tem semelhantes fluxo sanguíneo e afinidade pelo fármaco (SHARGEL *et al.*, 2012). Na modelagem compartimental tradicional, avalia-se os perfis de concentração por tempo de cada indivíduo do grupo experimental,

determinando-se os parâmetros farmacocinéticos individuais. Apesar da variabilidade dos parâmetros ser determinada pela avaliação do desvio padrão e coeficiente de variação dos mesmos, essa variabilidade não é considerada nas modelagens individuais.

A farmacocinética populacional (popPK) é o estudo das fontes de variabilidade e de que forma essas afetam os perfis de concentração por tempo do fármaco nos indivíduos da população alvo (voluntário, pacientes, animais) que receberem uma dose clínica relevante do mesmo. As fontes de variabilidade podem ser demográficas (idade, sexo, peso corporal), informações biológicas (valores de biomarcadores), informações genéticas ou condições patológicas. A melhor compreensão de como esses fatores se relacionam com a exposição do indivíduo ao fármaco pode significar a chave para o sucesso da terapia. A farmacocinética populacional é capaz de simular regimes alternativos de dosagem, levando em conta a variabilidade populacional, permitindo obter uma avaliação prévia dos mesmos antes do estudo propriamente dito.

A popPK é uma ferramenta que fornece importantes informações sobre segurança e eficácia de novos compostos durante as etapas pré-clínicas, melhorando o delineamento experimental nas sucessivas etapas do desenvolvimentos de novos fármacos bem como dos estudos de fase clínica I, II e III. Além disso, a abordagem populacional permite estudar e prever o comportamento do fármaco em populações especiais como crianças, idosos, indivíduos metabolizadores rápidos do fármaco e indivíduos com altas expressões de P-gp (SHEINER & WAKEFIELD, 1999; MOULD & UPTON, 2013).

Na literatura podem-se encontrar modelos compartimentais que descrevem a relação entre as concentrações plasmáticas totais e livres teciduais de algumas fluoroquinolonas. Freddo e Dalla Costa (2002) usaram o modelo de 2 compartimentos para descrever as concentrações plasmáticas totais e livres musculares do norfloxacino em ratos. Os autores assumiram que as concentrações livres no músculo correspondiam às concentrações no

compartimento periférico. Para a modelagem, no entanto, foi necessário calcular um fator de proporcionalidade, pois os níveis obtidos por microdiálise no tecido foram inferiores aos previstos pelos dados de plasma levando-se em consideração a ligação às proteínas plasmáticas. Tasso e colaboradores (2008), estudaram a penetração do gatifloxacino no músculo esquelético e no pulmão. Assumindo a mesma premissa do estudo anterior, os autores conseguiram modelar dados de plasma e fazer previsão das concentrações livres nos dois tecidos usando modelo de dois compartimentos.

Recentemente, Hurtado e colaboradores (2014) usaram a abordagem popPK para descrever a penetração prostática do levofloxacino. O modelo desenvolvido utilizou três compartimentos para descrever o perfil plasmático, sendo a próstata considerada o terceiro compartimento. Como as concentrações livres teciduais foram inferiores às livres plasmáticas, assumiu-se distribuição plasma/tecido com cinética de primeira ordem e redistribuição tecido/plasma com a associação de cinética de primeira ordem e ordem zero (Michaelis-Menten), devido à possibilidade de transporte de efluxo. O modelo foi aplicado com sucesso, sendo capaz de prever dados no tecido prostático para os perfis individuais de cada animal. A abordagem populacional, forneceu dados relevantes sobre a variabilidade inter-individual dos parâmetros do modelo, indicando que os parâmetros são mais dependentes das características dos indivíduos investigados.

A parte experimental deste trabalho, incluindo breve revisão de cada tema, materiais e métodos, resultados e discussão, foi dividida em três capítulos sendo cada um correspondente a um artigo científico. Os artigos encontram-se na sequência do texto conforme a seguir.

- **Capítulo 1**

" Validation of a sensitive HPLC/fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats"

Estevan Sonogo Zimmermann, Bruna Gaelzer Silva Torres, Teresa Dalla Costa.

- **Capítulo 2**

"A simultaneous semi-mechanistic population analysis of levofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous and intratracheal administration"

Estevan Sonego Zimmermann; João Victor Laureano, Camila Neris; Stephan Schmidt; Chakriadhar Lagishetty; Whocely Victor de Castro; Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 3**

" Population Pharmacokinetic modeling of ciprofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous administration"

Estevan Sonego Zimmermann, Bruna Torres, Stephan Schmidt, Chakriadhar Lagishetty, Whocely Victor de Castro, Teresa Dalla Costa.

CAPÍTULO 1

"Validation of a Sensitive HPLC/Fluorescence Method for Assessment of Ciprofloxacin Levels in Plasma and Prostate Microdialysate Samples from Rats"

**VALIDATION OF A SENSITIVE HPLC/FLUORESCENCE METHOD FOR
ASSESSMENT OF CIPROFLOXACIN LEVELS IN PLASMA AND PROSTATE
MICRODIALYSATE SAMPLES FROM RATS**

Estevan Sonogo Zimmermann^{1,2}, Bruna Gaelzer Silva Torres^{1,2},
Teresa Dalla Costa^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFRGS;

²Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS;

ABSTRACT

Bacterial prostatitis treatment consists of broad-spectrum antibiotic therapy for a long time. Pathogen identification, its susceptibility to the antimicrobial and the drug penetration to the prostate makes the treatment, specially of chronic bacterial prostates, a challenged. Ciprofloxacin, a second generation fluoroquinolone, is one of the most prescribed drugs for this treatment. In the present study, we developed and validated a liquid chromatography method with fluorescence detection for determination of ciprofloxacin concentrations in two different matrices: plasma and prostate microdialysate. Ciprofloxacin was separated on a C₁₈ column eluted with a mobile phase constituted of a mixture of 0.4% aqueous triethylamine:methanol:acetonitrile (75:15:10, v/v/v) and 0.4% aqueous triethylamine:acetonitrile (88:12, v/v) for microdialysate and plasma samples analyses, respectively. The limit of quantitation was found to be 5 and 10 ng/mL for microdialysate and plasma samples, respectively. Linearity was obtained over a concentration range of 5-1000 ng/mL (microdialysate) and 10-2000 ng/mL (plasma), with coefficients of determination greater or equal to 0.9956. The precision was determined from the analysis of six quality control samples and showed R.S.D. values lower than 11.1% and 7.4% for intra and inter-assay precision, respectively. The accuracy (R.E.%) ranged from 85.6 to 114.3%. The method was applied to a preliminary pharmacokinetic study to investigate ciprofloxacin concentrations in prostate, sampled by microdialysis, and plasma after a 7 mg/kg intravenous dose to Wistar rats. The method showed high sensibility using only protein precipitation as plasma sample clean-up and was successfully applied to investigate ciprofloxacin prostate penetration.

Keywords: Liquid chromatography/fluorescence; Ciprofloxacin; Microdialysis; Validation; Pharmacokinetics

CAPÍTULO 2

"A simultaneous semi-mechanistic population analysis of levofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous and intratracheal administration"

A simultaneous semi-mechanistic population analysis of levofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous and intratracheal administration

Estevan Sonogo Zimmermann^{1*}; João Victor Laureano¹, Camila Neris¹; Stephan Schmidt²; Chakriadhar Lagishetty²; Whocely Victor de Castro³; Teresa Dalla Costa¹

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Center for Pharmacometrics & Systems Pharmacology, School of Pharmacy, University of Florida at Lake Nona, Orlando, USA

³ Federal University of São João del-Rei, Divinópolis, Brazil

ABSTRACT

Levofloxacin (LEV) is a broad spectrum fluoroquinolone antimicrobial commonly used to treat infections such as pneumonia, urinary tract infections, chronic bronchitis and prostatitis. The target site tissue (prostate and lung) exposure of LEV is vital for therapeutic activity and to avoid bacterial resistance. Studies indicate that efflux transporters primarily P-glycoprotein (P-gp) are involved in LEV tissue penetration. If the P-gp is able to limit or reduce the tissue penetration of LEV the direct consequence might be bacterial resistance if inadequate doses are used. In the present work we evaluated lung and prostate LEV (7mg/kg) penetration in Wistar rats. Microdialysis was applied to determine free tissues profiles and characterize LEV pharmacokinetics after intravenous and intratracheal administration in presence and absence of P-gp inhibitor tariquidar (TAR, 15 mg/kg *i.v.*). Plasma and microdialysate samples were analyzed by HPLC-fluorescence validated method. Noncompartmental analysis (NCA) and population PK analysis were performed. A four compartment model was found to be appropriate to simultaneously characterize and predict concentrations in total plasma as well as in the interstitial fluid of prostate and lung showing the best curve fitting, precision of parameter estimates and model stability. Statistically significant differences were observed in lung penetration, prostate penetration and kidney active secretion in the TAR group compared to control group (LEV alone). The following parameters were estimated by the population model: volume of the central compartment ($V_1 = 0.412$ L); total plasma clearance ($CL = 0.241$ L/h and $CL_{TAR} = 0.164$ L/h); and the inter-compartmental distribution rate constants K_{12} (5.06 h⁻¹), K_{21} (4.78 h⁻¹), K_{13} (0.099 h⁻¹), K_{31} (9.14 h⁻¹), K_{14} (0.659 h⁻¹), K_{41} (0.553 h⁻¹), K_{21LTAR} (7.32 h⁻¹), K_{31PTAR} (5.73 h⁻¹). The inter-individual variabilities were reasonably small for the parameters in the model. The intravenous model was extended and adapted to describe the intratracheal route of administration. The intratracheal model was adequate to fit simultaneously plasma and lung levels in presence and absence of TAR. Our results indicate P-gp impact on renal active secretion of LEV, but in lung the transport mediated by efflux transporters are relevant only on the intratracheal route. In the prostate, our findings strongly support the role of efflux transporters besides P-gp participating in LEV tissue penetration.

Keywords: Levofloxacin, P-glycoprotein, efflux transporters, popPK modeling; microdialysis.

CAPÍTULO 3

"Population Pharmacokinetic modeling of ciprofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous administration"

Population Pharmacokinetic modeling of ciprofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats following intravenous administration

Estevan Sonogo Zimmermann^{1*}; Bruna Torres¹, Stephan Schmidt²;
Chakriadhar Lagishetty²; Whocely Victor de Castro³; Teresa Dalla Costa¹

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Center for Pharmacometrics & Systems Pharmacology, School of Pharmacy, University of Florida at Lake Nona, Orlando, USA

³Federal University of São João del-Rei, Divinópolis, Brazil

ABSTRACT

Ciprofloxacin (CIP), a second generation fluoroquinolone, is indicated for clinical treatment of urinary and respiratory tract infections. Despite CIP good antibacterial activity, therapeutic failures are still prevalent for these diseases. It is possible that poor infection site penetration and consequent insufficient exposure to the antimicrobial agent may be the reason for some failures. Literature reports indicate that efflux transporters such as P-glycoprotein (P-gp) might play a role on CIP tissue distribution and could represent the main reason for sub-therapeutic concentration at the infection site. In the present work we evaluated lung and prostate CIP (7 mg/kg) penetration in Wistar rats. Microdialysis was applied to determine free tissues concentration-time profiles and characterize CIP pharmacokinetics after intravenous administration in presence and absence of P-gp inhibitor tariquidar (TAR 15 mg/kg *i.v.*). Plasma and microdialysate samples were analyzed by HPLC-fluorescence validated method. Non-compartmental analysis (NCA) and population PK analysis (popPK) were performed. A four compartment model was found to be appropriate to simultaneously characterize and predict concentrations in total plasma as well as in the interstitial fluid of prostate and lung showing the best curve fitting, precision of parameter estimates and model stability. Statistically significant differences were observed comparing CIP parameters determined from plasma control and TAR groups indicating that TAR decreased the fluoroquinolone total clearance by interfering with the drug active renal secretion ($\alpha = 0.05$). No differences were observed in lung and prostate exposure and elimination rate in the TAR group compared with control group (CIP alone). The following parameters were estimated by the popPK model: volume of the central compartment ($V_1 = 0.482$ L); total plasma clearance ($CL = 0.313$ L/h and $CL_{TAR} = 0.223$ L/h); and the inter-compartmental distribution rate constants K_{12} (1.62 h⁻¹), K_{21} (8.47 h⁻¹), K_{13} (2.84 h⁻¹), K_{31} (6.22 h⁻¹), K_{14} (1.06 h⁻¹), K_{41} (0.61 h⁻¹). The inter-individual variabilities were reasonably small for the parameters in the model. Our results indicate P-gp impact on renal active secretion of CIP, but in lung and prostate the transport mediated by efflux transporters is negligible following intravenous administration. The popPK model developed can be used to optimize dosing regimens for this fluoroquinolone.

Keywords: Ciprofloxacin, P-glycoprotein, Efflux transporters, popPK modeling, Microdialysis.

DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, os transportadores de efluxo são considerados um dos fatores determinantes da farmacocinética, eficácia e segurança de fármacos utilização na terapêutica. No contexto regulatório, o FDA sugere que sejam realizados estudos para avaliar, em etapas pré-clínicas, o impacto de transportadores de efluxo sobre a cinética de candidatos a novos fármacos (FDA, 2012). Caso o composto seja identificado com forte substrato de importantes transportadores como, por exemplo, a P-gp, este é um fator determinante para o composto não prosseguir para as etapas clínicas de investigação.

No contexto clínico, *The International Transporter Consortium* é uma organização internacional formada com o objetivo de investigar mais profundamente o papel dos transportadores de membrana na distribuição de fármacos atualmente aplicados na terapêutica. A organização busca identificar os principais transportadores, fazer recomendações sobre metodologias de avaliação (*in vitro* e *in vivo*) e analisar o impacto clínico desses transportadores sobre fármacos.

As fluoroquinolonas são uma classe terapêutica amplamente utilizada na prática clínica devido principalmente a suas características farmacocinéticas favoráveis e amplo espectro de atividade bacteriana. Porém, os casos resistência bacteriana relacionada à classe aumentam de forma preocupante. Um fator que pode estar intimamente ligado à resistência bacteriana de fluoroquinolonas são o fato de serem substrato para transportadores de efluxo, que atuam limitando ou diminuindo a penetração de fármacos nos tecidos. A investigação do impacto desse transportadores de efluxo, especialmente P-gp, na penetração tecidual de fluoroquinolonas é fundamental para o ajuste posológico e a previsão de interações medicamentosas.

No presente trabalho, foram inicialmente estabelecidos os métodos analíticos pra quantificação de ciprofloxacino em plasma e microdialisado de tecidos. No processo de desenvolvimento, procurou-se um método simples, rápido e com sensibilidade adequada para viabilizar os estudos farmacocinéticos pré-clínicos nos tecidos alvo do trabalho: pulmão e próstata.

O método analítico foi validado de acordo com os guias atuais cumprindo critérios nacionais e internacionais pré-estabelecidos. Os resultados do método analítico desenvolvido e validado para quantificação de ciprofloxacino em amostras de plasma e microdialisado no pulmão e próstata foram apresentados na forma de artigo científico no Capítulo 1. A metodologia demonstrou-se adequada para aplicação pretendida e foi adotada nas etapas sucessivas do estudo de penetração tecidual do fármaco.

O capítulo 2 apresentou os estudos de farmacocinética do LEV, utilizando metodologia analítica previamente validada no grupo de pesquisa. O estudo de penetração tecidual do LEV foi conduzido em ratos Wistar saudáveis, com administração do fármaco em dose única intravenosa e intratraqueal de 7 mg/kg. A determinação das concentrações livres teciduais foi realizada utilizando-se microdialise na presença e ausência do inibidor da P-gp TAR. Após a análise dos dados de plasma, pulmão e próstata foram calculados os parâmetros farmacocinéticos para o LEV em cada grupo de animais por análise não-compartimental.

Após dose *i.v. bolus*, o LEV apresentou uma penetração tecidual muito semelhante na próstata ($f_T = 0,68$) e no pulmão ($f_T = 0,69$) para o grupo controle. Na mesma via de administração, a administração prévia de TAR representou importante aumento nos níveis prostáticos ($f_T = 1,64$) e insignificante alteração na penetração pulmonar ($f_T = 0,81$). No pulmão, a inibição do transporte por efluxo não representou importantes mudanças na penetração tecidual quando o fármaco foi administrado pela via intravenosa. Por outro lado, na próstata o transporte por efluxo desempenha papel relevante na penetração tecidual do LEV.

Na administração intratraqueal foram avaliados os dados de plasma total e pulmão livre após dose de 7 mg/kg na presença e ausência do TAR. Os resultados mostraram que a biodisponibilidade foi alterada significativamente na presença de TAR ($F = 0,86$) em relação ao grupo controle ($F = 0,4$). A inibição do processo de efluxo (grupo TAR) levou a um aumento de quase 2 vezes na exposição do pulmão ao LEV após dose intratraqueal. No pulmão de

maneira geral, o impacto do transporte por efluxo depende da direção com que o fármaco penetra no tecido. Quando a penetração ocorre pelo lado basolateral das células (administração *i.v. bolus*), a P-gp desempenha um efeito mínimo no transporte do LEV. Contudo, quando o fármaco é administrado no sentido apical das células (administração intratraqueal) a P-gp desempenha um papel importante de efluxo do fármaco. Os resultados obtido *in vivo* corroboram relatos prévios da literatura sobre a participação da P-gp na penetração pulmonar do LEV (BRILLAULT *et al.*, 2010).

A etapa seguinte incluiu o desenvolvimento de modelo de farmacocinético populacional (popPK) para descrever os dados simultaneamente no plasma, pulmão e próstata na presença e ausência do TAR. O modelo de 4 compartimentos demonstrou os melhores resultados em termos de correlação entre concentrações previstas e observadas, estabilidade do modelo e ajuste dos dados experimentais (Capítulo 2). Para o grupo TAR foram adotados 3 parâmetros extras (K_{21LTAR} , K_{31PTAR} and CL_{TAR}) que proporcionaram melhora no ajuste, previsão e significância estatística. Além disso, o modelo para administração intravenosa foi estendido e adaptado para administração intratraqueal. O modelo semi-mecanístico desenvolvido permite avaliar com maior riqueza de detalhes a cinética de distribuição do LEV nos tecidos investigados. Além disso, é possível analisar o impacto do transporte por efluxo sobre a penetração tecidual do LEV por diferentes vias de administração. Os resultados contribuem para elucidação do mecanismo cinético de distribuição do LEV e otimização da terapêutica objetivando redução da resistência bacteriana observada para o fármaco.

O capítulo 3 apresenta os resultados dos estudos farmacocinéticos de penetração tecidual (pulmão e próstata) do CIP após administração *i.v. bolus* 7mg/kg a ratos Wistar saudáveis na presença e ausência de TAR. Na análise comparativa entre grupo controle (CIP sozinho) e grupo TAR (CIP + TAR) foi observado diferença significativa entre todos os parâmetros calculados por análise não-compartimental quando TAR foi administrado em combinação com a fluoroquinolona, exceto na constante de eliminação. Tal fato demonstra que tanto a eliminação quanto a distribuição plasmática do CIP foram alterados na

presença de TAR. A eliminação do CIP provavelmente foi afetado devido a expressão de P-gp no lado apical das células renais, que participa no processo de secreção tubular ativa. O CIP é eliminado principalmente pela via renal (filtração glomerular + secreção tubular ativa). Na presença de TAR o processo de secreção tubular ativa provavelmente foi inibido, diminuindo o *clearance* do CIP e sua taxa eliminação.

Em relação à penetração tecidual do CIP na próstata e pulmão, para ambos os tecidos a administração prévia de TAR não resultou em alteração significativa nos parâmetros farmacocinéticos de eliminação e de exposição, indicando que o transporte por efluxo possui papel minoritário no processo de distribuição do CIP para esses tecidos. O CIP é também descrito na literatura como substrato de transportadores de influxo (ONG *et al.*,2013), os quais provavelmente desempenham papel mais relevante no transporte do fármaco para os tecidos estudados do que os transportadores de efluxo.

Foi desenvolvido um modelo popPK capaz de descrever simultaneamente as concentrações plasmáticas totais, livres no pulmão e próstata do CIP, em presença e ausência de TAR. O modelo de 4 compartimentos foi selecionado como melhor baseado em critérios estatísticos, correlação entre dados previsto e observados e ajuste do perfis. Para adequar as diferenças observadas entre os grupos (controle e TAR) adotou-se um parâmetro extra (CL_{TAR}), com melhora significativa do modelo. O modelo desenvolvido permitiu o estudo mais detalhado do processo de distribuição do CIP no pulmão e próstata após administração intravenosa do fármaco.

CONCLUSÕES

- A metodologia analítica desenvolvida e validada para quantificação do CIP em plasma e microdialisado se mostrou adequada para aplicação nos estudos farmacocinéticos de penetração pulmonar e prostática do fármaco em ratos Wistar;
- Os estudos de farmacocinéticos mostraram que o LEV e o CIP possuem diferenças em relação à farmacocinética no plasma e a influência de transportadores de efluxo, especialmente P-gp, na penetração pulmonar e prostática;
- Para o LEV, a modelagem matemática simultânea dos dados de plasma e microdialisado de tecidos sugerem a participação mais intensa de transportadores de efluxo para distribuição na próstata quando o fármaco é administrado por via intravenosa. No pulmão, os transportadores de efluxo influenciam a penetração do LEV apenas quando esse é administrado por via intratraqueal;
- Para o CIP, a modelagem matemática simultânea dos dados de plasma e microdialisado de tecidos sugere que o transporte por efluxo tem impacto importante na eliminação plasmática do fármaco. Contudo, o transporte por efluxo é insignificante na penetração do CIP na próstata e no pulmão após administração intravenosa do fármaco.

REFERÊNCIAS GERAIS

ALVAREZ, A. I.; PÉREZ, M.; PRIETO J.G.; *et al.* Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. **J. Pharma. Sci.** v. 97, p. 3483-3493, 2008.

AYRTON, A., MORGAN, P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. **Xenobiotica.** v. 31, p. 469–497, 2001.

BALL, P. Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 51, p. 21–27, 2003.

BARRETT, S.J.; FOSSLER, M.J., CADIEU, K.D. *et al.* Pharmacometrics: A multidisciplinary field to facilitate critical thinking in drug development and translational research settings. **J. Clin. Pharmacol.** v.48 p.632-649, 2008.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; MCKEEGAN, K.S.; WALMSLEY, A.R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. **Biochem. J.** v. 376, p. 313–338, 2003.

BRILLAULT, J.; DE CASTRO, W.V.; COUET, W. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54, p. 543–545, 2010.

BRUNNER, M.; DERENDORF, H.; MÜLLER, M. Microdialysis for *in vivo* pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 5, p. 495-499, 2005.

BRUNNER, M.; STABETA, H., MÖLLER, J.G.; *et al.* Target site concentrations of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46(12), p.3724-3730, 2002.

BRUNNER, M.; PERNERSTORFER, T.; MAYER, B.X.; *et al.* Surgery and intensive care procedures affect the target site distribution of piperacillin. **Crit. Care Med.** v. 28, p. 1754–1759, 2000.

CALLAGHAN, R.; FORD, R.C.; KERR, I. D. The translocation mechanism of P-glycoprotein. **FEBS Letters**, 580, 1056–1063, 2006.

CHANG, G. Multidrug resistance ABC transporters. **FEBS Letters.** v. 555, p. 102–105, 2003.

CHAURASIA, C.S.; MÜLLER, M.; BASHAW, E.D.; *et al.* Microdialysis principles, application and regulatory perspectives. **The AAPS Journal.** v. 9, p. E48-E59, 2007.

CHEN, L.; LI, Y.; YU, H.; *et al.* Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. **Drug Discovery Today**, 17(7-8):343-351, 2012.

DE LANGE, E.C.M.; MARCHAND, S.; VAN DEN BERG, D.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 12, p. 85-93, 2000.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Use of microdialysis in drug delivery studies. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v. 45, p. 123-124, 2000.

ENDRES, C.J.; HSIAO, P.; CHUNG, F.S.; *et al.* The role of transporters in drug interactions. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 27, p. 501-517, 2006.

ETTE, E.I.; WILLIAMS, P.J. Pharmacometrics: The Science of quantitative Pharmacology. New York: Wiley-Interscience, 2007. 1205 p.

FEDORUK, M.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; GUNS, E.S.; *et al.* P-glycoprotein Increases the efflux of the androgen dihydrotestosterone and reduces androgen responsive gene activity in prostate tumor cells. **Prostate.** v. 59, p. 77-90, 2004.

FREDDO, R. J.; DALLA COSTA, T. Determination of norfloxacin free interstitial levels in skeletal muscle by microdialysis. **J. Pharm. Sci.** v. 91, p. 2433-2440, 2002.

FROMM, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 25, p. 423–429, 2004.

GARBERG, P. *et al.* *In vitro* models for the blood–brain barrier. **Toxicol. in Vitro.** v. 19, p. 299–334, 2005.

FDA – Food and Drug Administration. Drug Safe and Availability. CIPRO® FULL PRESCRIBING INFORMATION. Initial U.S. Approval: 1996. Rockville, 2004.http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/019537s057,020780s019lbl.pdf. Acesso em: 25 Abril 2014

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012.<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>. Acesso em: 09 Fevereiro 2015

GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, S.E., Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, v.2(1), p.48-58, 2002.

HAKKARAINEN, J.; JALKANEN, A.J.; KÄÄRIÄINEN, T.M.; *et al.* Comparison of *in vitro* cell models in predicting *in vivo* brain entry of drugs. **Int. J. Pharm.** v. 402, p. 27-36, 2010.

HAMILTON, O.; BACKSTROM, G.; YAZDANIAN, M.A.; *et al.* P-Glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells. **J. Pharm. Sci.** v. 90, p. 647-658, 2001.

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 51, p. 29–35, 2003.

HIGGINS, C.F.; CALLAGHAN, R.; LINTON, K.J.; *et al.* Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. **Semin Cancer Biol**, v. 8, (3), 135-142, 1997.

HOLLENSTEIN, U.M.; BRUNNER, M.; SCHMID, M.R. *et al.* Soft tissue concentrations of ciprofloxacin in obese and lean subjects following weight-adjusted dosing. **International Journal of Obesity**, v.25, p.354-358, 2001.

HURTADO, F.; WEBER, B.; DERENDORF, H.; *et al.* Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin Concentrations in Rat Plasma and Prostate Tissue Measured by Microdialysis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.58(2):678, 2014.

HYATT, J.M.; MCKINNON, P.S.; ZIMMER, G.S.; *et al.* The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. **Clin. Pharmacokinet.** v. 28, p. 143–160, 1995.

JOUKHADAR, C.; DERENDORF, H., MÜLLER M.; *et al.* Microdialysis, a novel tool for clinical studies of anti-infective agents. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** v. 57, p. 211–219, 2001.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, **Biochim. Biophys. Acta** 455 152–162, 1976.

KNIBBE, C.A.J.; DANHOF, M. Individualized dosing regimens in children based on population PKPD modelling: Are we ready for it? **International Journal of Pharmaceutics**, v.415, p. 9– 14, 2011.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Eur J Pharm Sci.** v.11(4):265-83, 2000.

LESKO, L. J.; ZHENG, S.; SCHMIDT, S. Systems Approaches in Risk Assessment. **Clinical pharmacology & Therapeutics.** v.93 (5), 2013.

LIN, J.H. How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake? **Drugs Today.** v. 40, p. 5–22, 2004.

MARCHAND, S.; FRASCA, D.; DAHYOT-FIZELIER, C.; *et al.* Lung microdialysis study of levofloxacin in rats following intra venous infusion at steady state. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:3074–3077, 2008.

MISTRY, P.; STEWART, A.J.; DANGERFIELD, W.; *et al.* *In Vitro and in Vivo* Reversal of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by a Novel Potent Modulator, XR9576. **Cancer research** v.61, p.749–758, 2001

MOELLERING, R.C. The place of quinolones in everyday clinical practice. **Chemotherapy**. v. 42, p. 54–61, 1996.

MOULD, D. R.; UPTON, R.N. Introductory Overview of Population Pharmacokinetic Modeling. **Pharmacometrics & Systems Pharmacology** v.2, e38, 2013.

MÜLLER, M. Microdialysis in clinical drug delivery studies. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 45, p. 255–269, 2000.

O'DONNELL J.A., GELONE, S.P. The newer fluoroquinolones. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** v. 18, p. 691–716, 2004.

ONG, H. X.; TRAINI, D.; BEBAWY, M.; *et al.* Using a Calu-3 Air Interface Cell Model across Bronchial Lung Epithelial Cells Ciprofloxacin Is Actively Transported. **Antimicrob. Agents Chemother.** 57(6):2535, 2013.

PALMEIRA, A.; SOUSA, E.; VASCONCELOS, M.H.; *et al.* Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, 1946-2025, 2012.

SCHUCK, E. L.; GRANT, M.; DERENDORF, H. Effect of Simulated Microgravity on the Disposition and Tissue Penetration of Ciprofloxacin in Healthy Volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology** v. 45, Issue 7, p. 822–831, 2005.

SCHINKEL, A.H.; JONKER, J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64: 138–153, 2012.

SCHINKEL, A.H.; JONKER, J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 55, p. 3-29, 2003.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2012. 811 p

SHEINER, L; WAKEFIELD, J. Population modelling in drug development. **Stat. Methods Med. Res.** v.8, p.183-193, 1999.

SORGEL, F. Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. **Clin. Pharmacokinet.** v. 16, p. 5–24, 1989.


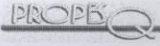
SUN, H.; DAI, H.; SHAIK, N.; *et al.* Drug efflux transporters in the CNS. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 55, p. 83–105, 2003.

TASSO, L.; BETTONI, C.C.; OLIVEIRA, L.K.; *et al.* Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. **Int. J. Pharm.** v. 358, p. 96-101, 2008.

WANG, Q.; RAGER, J.D.; WEINSTEIN, K. *et al.* Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood–brain barrier. **Int. J. Pharm.** 288, 349–359, 2005.

ANEXO

Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21169
Título: Avaliação do Papel da Glicoproteína-P sobre a Penetração Tecidual de Fluoroquinolonas

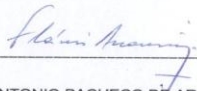
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/04/2011
Estevan Sonego Zimmermann - Aluno de Doutorado desde 01/04/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 01/08/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar, do Prédio da Reitoria, do Campus Central da UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 10 de Agosto de 2011



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

Prof. Dr. Flávio A.P. de Araujo
Presidente da CEUA/UFRGS

1