

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

Modelagem Farmacocinética Populacional do
Ciprofloxacino na Infecção por Bactérias Gram-Negativas

Porto Alegre, 2022.

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

Modelagem Farmacocinética Populacional do
Ciprofloxacino na Infecção por Bactérias Gram-Negativas

Tese apresentada por **Graziela de Araújo Lock** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Teresa Dalla Costa
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre, 2022.

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado/Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.09.2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andréa Diniz
Universidade Estadual de Maringá - Brasil

Profa. Dr. Francine Johansson Azeredo
University of Florida - USA

Profa. Dr. Izabel Almeida Alves
Universidade Federal da Bahia - Brasil

CIP - Catalogação na Publicação

Lock, Graziela de Araújo
Modelagem Farmacocinética Populacional do
Ciprofloxacino na Infecção por Bactérias
Gram-Negativas / Graziela de Araújo Lock. -- 2023.
151 f.
Orientadora: Teresa Dalla Costa.

Coorientadora: Bibiana Verlindo de Araújo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Ciprofloxacino. 2. Farmacocinética populacional. 3. Microdiálise. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5. Klebsiella pneumoniae. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Verlindo de Araújo, Bibiana, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Laboratório de Farmacocinética e Modelagem PK/PD da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) em Porto Alegre – RS.

“We know only too well that what we are doing is nothing more than a drop in the ocean. But if the drop were not there, the ocean would be missing something”.

Mother Teresa

AGRADECIMENTOS

Quatro anos de um espaço-tempo diferente devido a uma pandemia no meio. Para mim, um doutorado de autoconhecimento, de resiliência, e de descobrir o quanto eu posso ser forte. Posso dizer que tudo isso foi possível devido à força que meus familiares, amigos, professores e colegas me trouxeram. Começo agradecendo por me ensinarem que mesmo que as coisas sejam difíceis “a gente tem que dar jeito”. Que mesmo que estejamos em dúvida sobre o próximo passo, nós temos que dar o próximo passo. Que quando nós mesmos dizemos “não é possível”, podemos acrescentar: “entretanto, se eu tentar, existem 50% de chances de dar certo”. Durante as ansiedades, obrigada pelo ensinamento de particionar as etapas: funcionam em doutorados, viagens e atividades gerais. Obrigada por indicarem quando eu estava errada, seja em teorias, práticas ou vida. E obrigada por indicarem quando eu estava certa também. À minha orientadora, por todo apoio logístico antes, durante e pós- pandemia. Pelas reuniões que acabavam mais longas do que esperado, pelo tempo, pelo exemplo de profissional e por ter me apresentado à farmacocinética lá no início da graduação e aceitado conduzir o mestrado e o doutorado depois daquela extensa revisão do meu TCC. À minha coorientadora, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e me dado a oportunidade de ter aprendido farmacocinética na prática desde a graduação, pela coorientação, pelo exemplo, pelas longas discussões e pelo tempo. À professora Sídia, pelo exemplo de profissional, por um estágio voluntário que além de me nortear para o quanto eu gosto de dar aulas, ter sido uma motivação nesse tempo de pandemia. Ao PPGCF-UFRGS, à Faculdade de Farmácia, à UFRGS e à CAPES por terem me proporcionado todos esses anos de pesquisa e aprendizagem de qualidade. Às *Modelers* porque sem elas todo esse trabalho não existiria. Elas foram companheiras de experimento, de análise, de curva de calibração, de idas ao LANAGRO. Elas foram braços, pernas, chefs de cozinha, amigas de passeios à tarde, colo, ouvido. Obrigada também por todas as vezes que foram casa depois de experimentos longos. Amigas de pandemia, de apostilas, de indicação de podcast, de “vai ficar tudo bem”, de reformas, de pinturas, de refletir sobre coisas da vida, de “Graaazi”, amigas de “Ooláa”, de reclamação e de comemoração.

Obrigada por serem quem são e pela força que me passam. A todos que já passaram e estão iniciando no nosso laboratório, foi uma honra ter trabalhado com vocês, ter ajudado e ter sido ajudada. Vocês me ensinaram o que é unidade de grupo, e que farmacocinética não se faz sozinho e que pode ser leve, divertida e com muito a aprender nos aspectos mais diversos. Aqueles que já defenderam, mas mantemos contato ainda que por consultorias-tira-dúvidas-me-ajuda-com-o-nonmem-olaa-etc e pelas festinhas online, sempre com um bom papo, risadas e troca de experiências, nesse tópico em especial obrigada aos internacionais (do Brasil e fora dele) por mostrarem que a distância fortalece as amizades. Ao Fabiano pela sempre grande ajuda com as análises. À minha mãe por me entender e apoiar, mesmo que às vezes seja difícil e doloroso e pela força que tem e que me passa. Ao meu pai por suas invenções/adaptações com madeira visando ergonomia. Ao meu irmão por estar aqui. À fiel escudeira da minha avó e minha sempre amiga, pelo apoio e por entender minha ausência enquanto presente. Aos meus familiares, obrigada por tudo. Obrigada Moza, Luke, Malhadinho, Barão e Milkshake: sempre um olhar, um pulo, um arranhão, uma bolinha ou uma quase mordida de afeto. Queria agradecer também aquelas que contribuíram para que eu voltasse a andar sem dor e que todas as vezes que precisei eram uma injeção de ânimo sempre me lembrando que sou capaz. Aquela que cuidou da minha saúde mental por me ajudar a manter a vida leve. Às amigas concurseiras, de chá revelação e MC, à minha dentista, e arquiteta favoritas, minha amiga LDGênia pelo apoio, risadas e um chá quentinho. Às minhas irmãs de aniversário por todas as discussões em inglês (funcionaram). À minha nova amiga profe, foi uma experiência muito legal descobrir que amo dar aulas e ter uma duplinha nessa etapa foi essencial. Aos meus amigos da UPSS 2022, obrigada por compartilharem tanto, serei sempre eternamente grata por essa oportunidade transformadora pessoal e profissionalmente. Às duas famílias do meu namorado, pelo acolhimento, pelo carinho, pelos dominós e jogos em geral. Ao meu namorado, por estar no seu laboratório naquele dia em que lá estava eu autoclavando meus materiais do mestrado. E de lá para cá todo esse tempo compartilhando experiências da vida científica, da vida fora da academia, por me incentivar, me fazer rir, estar ao meu lado, me fazer tão bem e me mostrar como o horizonte pode ser grande.

RESUMO

O objetivo geral do projeto foi investigar as alterações na penetração pulmonar do ciprofloxacino (CIP), tanto no interstício como no líquido de revestimento pulmonar (ELF), na dependência do estágio da infecção (agudo ou crônico) e de diferentes espécies bacterianas Gram-negativas formadoras de biofilme infectantes: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Inicialmente avaliou-se as concentrações plasmáticas, livres intersticiais pulmonares e livres no ELF do CIP após administração i.v. *bolus* de 20 mg/kg a ratos Wistar saudáveis, aguda (2 dias) e cronicamente (14 dias) infectados com *P. aeruginosa*. As concentrações livres pulmonares e no ELF foram determinadas por microdiálise. Um modelo farmacocinético populacional (popPK) foi desenvolvido para descrever a disposição pulmonar do CIP nas diferentes condições usando NONMEM® (versão 7.4.3) com FOCE+I. Os dados plasmáticos foram descritos como um modelo de três compartimentos com eliminação de primeira ordem. Para a inclusão de dados pulmonares, o modelo foi expandido para quatro compartimentos e as concentrações no ELF foram descritas como uma fração dos níveis intersticiais pulmonares, estimada como um fator de distribuição (*fD*), uma vez não foram impactadas pelo processo infeccioso. Não foram observadas alterações significativas nas concentrações plasmáticas e pulmonares do CIP em decorrência da infecção aguda, possibilitando juntar esse grupo aos grupos sadio/bead branco no desenvolvimento do modelo. Determinou-se variabilidade interindividual em *fD*, *clearance* do compartimento central, *clearance* intercompartimental do primeiro compartimento periférico e do compartimento pulmonar e no volume do compartimento pulmonar. Para descrever o grupo com infecção crônica, que mostrou aumento nas concentrações plasmáticas e redução de 4 vezes nas concentrações livres intersticiais pulmonares, adicionou-se ao modelo a covariável infecção crônica no *clearance* central e um *clearance* pulmonar. Simulações geradas pelo modelo popPK foram utilizadas para avaliar a probabilidade de as concentrações atingirem eficácia terapêutica utilizando como alvo o índice PK/PD área sob a curva de concentração livre/concentração inibitória mínima (MIC) - $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ – para a dose de 20 mg q8h, equivalente a 400 mg q8h utilizada em humanos. Os resultados mostraram que, apesar da redução das concentrações intersticiais pulmonares devido à infecção crônica, as mesmas foram suficientes para tratar pneumonias com *P. aeruginosa* com MIC até 0,125 mg/L (probabilidade de atingir o alvo - PTA > 90%), que é o MIC mais prevalente para esse microrganismo, mas são insuficientes para tratar pneumonias causadas por cepas menos susceptíveis. As concentrações livres no ELF em infecções pulmonares crônicas podem ser insuficientes para resultar num tratamento eficaz. Na sequência, avaliou-se o impacto da alteração do agente infectante na distribuição pulmonar do CIP na infecção crônica. Determinou-se as concentrações de CIP no plasma e livre no interstício pulmonar de ratos Wistar

machos cronicamente (14 d) infectados com *K. pneumoniae* após administração da dose de 20 mg/kg i.v. *bolus*. Os resultados mostraram que a infecção por *K. pneumoniae* produz a mesma alteração nas concentrações plasmáticas do CIP observada na infecção por *P. aeruginosa*, mas as concentrações livres no interstício pulmonar foram menores do que as observadas nos animais saudáveis ou infectados por *P. aeruginosa*. Usando o mesmo modelo popPK desenvolvido para *P. aeruginosa*, avaliou-se comparativamente os dados plasmáticos e pulmonares da infecção por *K. pneumoniae*, sendo determinada diferença apenas no *clearance* pulmonar entre as duas espécies bacterianas. Apesar da redução mais pronunciada nas concentrações livres intersticiais pulmonares de CIP causadas pela infecção crônica por *K. pneumoniae*, a probabilidade de atingir o alvo $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ para a dose de 20 mg/kg q8h foi $> 90\%$ para a MIC mais prevalente dessa espécie bacteriana (0.03 mg/L). Para infecções com cepas menos susceptíveis, a PTA cai drasticamente, sendo necessário investigar outras posologias. Em resumo, foi possível concluir que a infecção crônica por ambas as espécies bacterianas causa alterações na disposição plasmática e pulmonar do CIP e que as concentrações no ELF são dependentes das concentrações pulmonares intersticiais. A dose de 20 mg/kg q8h gera concentrações pulmonares eficazes para tratar infecções crônicas para os MICs mais prevalentes de ambas as bactérias, mas não para cepas menos susceptíveis. As concentrações livres de CIP no ELF não são eficazes para produzir erradicação bacteriana das cepas menos susceptíveis de ambas as bactérias.

Palavras-chave: Ciprofloxacino; farmacocinética populacional; microdiálise; infecção pulmonar; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Population Pharmacokinetic Modeling of Ciprofloxacin in Gram-Negative Bacterial Infection

The main objective of this project was to investigate alterations on ciprofloxacin (CIP) lung penetration, on the interstitium as well as on epithelial lining fluid (ELF), on dependency of the stage of infection (acute or chronic) and differences between biofilm-forming Gram-negative bacterial species: *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. First, plasma, free lung and free ELF CIP concentrations were evaluated after 20 mg/kg i.v. bolus dosing to healthy Wistar rats, acute (2 d) and chronically (14 d) infected by *P. aeruginosa*. Free lung and ELF concentrations were determined by microdialysis. A population pharmacokinetic model (popPK) was developed to describe CIP lung disposition at different conditions using NONMEM® (version 7.4.3) with FOCE+I. Plasma data were described as a three-compartment model with first order elimination. To include lung data, the model was expanded to four compartments with ELF being described as a fraction of interstitium lung levels, estimated as a distribution factor (fD), since ELF concentrations were not influenced by the infectious process. No significant alterations were observed on CIP plasma and lung concentrations caused by acute infection, allowing to pool these groups with healthy and blank bead groups during modelling development. Interindividual variability was determined on fD , central clearance, intercompartmental clearances of the first peripheral compartment and lung compartment and lung volume. To describe the chronically infected group, which showed an increase in plasma concentrations and a 4-fold reduction on free interstitial lung concentrations, chronic infection was added as covariate on central clearance and on lung clearance. Simulations were performed with the popPK model in order to evaluate the probability of CIP concentration obtained for the 20 mg q8h, equivalent to 400 mg q8h used in humans, to reach therapeutic efficacy, using as a target the PK/PD index area under the free concentration/minimal inhibitory concentration - $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$. The results showed that, in spite of the reduction on interstitial lung concentrations due to chronic infection, they were sufficient to treat pneumonia caused by *P. aeruginosa* with MIC up to 0.125 mg/L (probability of target attainment – PTA>90%), which is the most prevalent MIC for this pathogen, but were insufficient to treat pneumonia caused by less susceptible strains. Free ELF concentrations on chronic lung infections can be insufficient to result in an efficacious treatment. Next, the impact of changing the infecting agent on CIP lung distribution on chronic infection was evaluated. CIP plasma and lung interstitial concentrations were determined on male Wistar rats chronically (14 d) infected by *K. pneumoniae* after CIP 20 mg/kg i.v. bolus dosing.

The result showed that *K. pneumoniae* infection produced the same alteration on CIP plasma concentrations that were observed with *P. aeruginosa* infection. However, CIP free interstitial lung concentrations were smaller than the concentrations observed on healthy or *P. aeruginosa* chronically infected groups. Using the same popPK model developed for *P. aeruginosa*, plasma and lung data from *K. pneumoniae* infection were comparatively evaluated. The only difference between the two bacterial species was determined on CIP lung clearance. Although the more pronounced reduction on CIP free interstitial lung concentrations caused by *K. pneumoniae* chronic infection, the probability of target attainment $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ for 20 mg/kg q8h was >90% to the most prevalent MIC of this bacterial specie (0.03 mg/L). For infections with less susceptible strains, the PTA drops drastically, suggesting the need to investigate other dosing regimens. In summary, it was possible to conclude that chronic infection by both bacteria can cause alterations on CIP plasma and lung concentrations and that ELF concentrations are dependent on interstitial lung concentrations. The dose regimen of 20 mg/kg q8h generates effective interstitial lung concentrations to treat chronic infection caused by the most prevalent MIC for each bacteria, but not to treat less susceptible strains. CIP free ELF concentrations are not effective to promote bacterial eradication of the most prevalent strains for both bacteria.

Keywords: Ciprofloxacin; population pharmacokinetic; microdialysis; lung infection; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - General composition of <i>P. aeruginosa</i> and <i>K. pneumoniae</i> biofilm matrix and its influence on airways infections.....	44
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Parameter estimates of the popPK model and bootstrap results...	72
Tabela 2 - Post-hoc analysis comparing $AUC_{0-\infty}$ from final popPK model and NCA.....	74
Tabela S1 - Ciprofloxacin pharmacokinetic parameters determined in plasma after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	86
Tabela S2 - Ciprofloxacin pharmacokinetic parameters determined in lung interstitium and epithelial lining fluid following 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	87

CAPITULO III

Tabela 1 - Parameter estimates of the popPK model.....	107
Tabela S1 - CIP pharmacokinetic parameters determined in plasma after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	125
Tabela S2 - Ciprofloxacin pharmacokinetic parameters determined in interstitial lung after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	126

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Ciprofloxacin mean concentration-time profiles after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	67
Figura 2 - Schematic representation of the ciprofloxacin structural model encompassing plasma, free interstitial lung, and free ELF concentrations.....	70
Figura 3 - Visual corrected predicted checks (pcVPC) of the final population PK model.....	73
Figura 4 - Probabilities of target attainment (PTA) for ciprofloxacin 20 mg q8h.....	74
Figura 5 – Histograms.....	76
Figura S1 - Lung histopathology photomicrographs.....	89
Figura S2 - Individual and population fitted plasma concentration versus time profiles using the final popPK model.....	90
Figura S3 - Individual and population fitted lung concentration versus time profiles using the final popPK model.....	91
Figura S4 - Individual and population fitted ELF concentration-versus-time profiles using the final popPK model.....	92
Figure S5 - GOF plots for plasma group after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing using a nonlinear mixed-effect modeling approach.....	93
Figura S6 - GOF plots for lung group after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing using a nonlinear mixed-effect modeling approach.....	94
Figure S7 - GOF plots for ELF group after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing using a nonlinear mixed-effect modeling approach.....	95

CAPITULO III

Figura 1 - Visual corrected predicted checks (pcVPC) of the final population PK model.....	108
---	-----

Figura 2 - Probabilities of target attainment (PTA) for ciprofloxacin 20 mg q8h.....	109
Figura S1 - Lung histopathology photomicrographs.....	117
Figura S2 - Schematic representation of the ciprofloxacin structural model encompassing plasma, free interstitial lung, and free ELF concentrations.....	118
Figura S3 - Free ciprofloxacin profiles determined in pulmonary tissue after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	119
Figura S4 - Ciprofloxacin means total plasma profiles after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing.....	120
Figura S5 - GOF plots for plasma group after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing using a nonlinear mixed effect modeling approach.....	121
Figura S6 - GOF plots for lung group after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing using a nonlinear mixed-effect modeling approach.....	122
Figura S7 - Individual and population fitted plasma concentration versus time profiles using the final popPK model.....	123
Figure S8 - Individual and population fitted lung concentration versus time profiles using the final popPK model.....	124

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVOS.....	29
CAPÍTULO I - LITERATURE REVIEW.....	34
CAPÍTULO II – Ciprofloxacina popPK model for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection.....	53
CAPÍTULO III – Ciprofloxacina popPK model for <i>Klebsiella pneumoniae</i> lung infection.....	97
DISCUSSÃO GERAL.....	127
CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS GERAIS.....	137
ANEXOS.....	147

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ciprofloxacino (CIP) é uma fluoroquinolona de segunda geração empregada no tratamento de diversos processos infecciosos, como do trato urinário e do sistema respiratório. No tratamento de infecções do sistema respiratório, embora utilizado em menor escala, o ciprofloxacino tem papel importante, atuando como fluoroquinolona antipseudomonas (CIPOLLA; BLANCHARD; GONDA, 2016). Seu transporte através das membranas permite a passagem de substratos de maneira energia-dependente (DEEN *et al.*, 2005). Dentre esses transportadores pulmonares, a glicoproteína-P (P-gp), responsável pelo efluxo de fármacos, está localizada na região apical das células ciliadas e nas regiões apical e lateral de células serosas das glândulas brônquicas, sendo responsável pelo transporte de fármacos no sentido interstício-lúmen (DEEN *et al.*, 2005; BERG *et al.*, 2018). Por outro lado, o influxo de fármacos é realizado por transportadores de cátions orgânicos (OTCs), localizados no epitélio alveolar (ONG *et al.*, 2013). Alterações fisiológicas provocadas por doenças infecciosas ou a resposta inflamatória provocada pela infecção podem acarretar alterações importantes na distribuição tecidual de fármacos, pela inibição ou superexpressão desses transportadores, facilitando ou comprometendo a chegada dos antimicrobianos ao sítio de ação (UEYAMA *et al.*, 2005; BERG *et al.*, 2018).

Quando o epitélio pulmonar é exposto à bactéria, há o desencadeamento da resposta inflamatória mediada pelos macrófagos alveolares, presentes nas vias aéreas, alvéolos, e interstício pulmonar, que liberam citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral TNF- α , interleucinas - IL-1 β , IL-6, IL-8 - e quimiocinas, que possuem diversas funções como controle de crescimento e ativação de células do sistema imune, auxiliando a migração de neutrófilos para o sítio de infecção a fim de combatê-la (KNAPP, 2009; MOLDOVEANU *et al.*, 2009). A resposta inflamatória provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade e infiltração celular. Quando a resolução da infecção não ocorre, o quadro inflamatório até então agudo evolui para crônico, aumentando a destruição tecidual decorrente da tentativa frustrada de eliminar os microrganismos invasores (CHEN *et al.*, 2018).

A reação inflamatória em processos infecciosos pode ser desencadeada de forma indireta através da liberação de endotoxinas presentes na parede

celular de bactérias Gram-negativas, interferindo também no *clearance* mucociliar e facilitando a adesão bacteriana ao tecido pulmonar. Segundo o estudo de Ueyama e colaboradores (2005), as endotoxinas liberadas pelos microrganismos também podem estar envolvidas em alterações na expressão de transportadores de influxo e efluxo, à medida que prejudicariam o transporte de fármacos. Neste estudo os autores realizaram um teste utilizando antipirina, e foi observado que as endotoxinas de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram responsáveis pela diminuição significativa dos níveis hepáticos da P-gp (*P-glicoprotein*), sendo esse decréscimo maior para a enterobactéria, considerando a maior diminuição do *clearance* do fármaco para ela. Quando analisada a influência sobre o Mrp-2 (*Multidrug resistance protein 2*), outro transportador de efluxo, as endotoxinas mostraram-se irrelevantes. O estudo de Ueyama e colaboradores (2005) elucida o comportamento da expressão de transportadores presentes no fígado. Todavia, esses transportadores como, por exemplo, a Pg-P, estão distribuídos em diversos tecidos incluindo o tecido pulmonar. Diante disso, uma infecção localizada no pulmão causaria a liberação de endotoxinas impactando indiretamente na secreção de mediadores inflamatórios (citocinas, interferons) induzindo mudanças fisiológicas, como mudanças na expressão de transportadores, que podem ser importantes quando se fala da entrada de fármacos no sítio de ação (Atamas *et al.*, 2013)

As pneumonias bacterianas são conhecidas como causa frequente de sepse em humanos. Conforme o ambiente em que ocorrem, altera-se a prevalência dos patógenos associados à infecção (KNAPP, 2009): pneumonias adquiridas na comunidade ou em hospitais, em sua maioria envolvem a presença de microrganismos extracelulares como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias (NI *et al.*, 2017). Dentre esses, a *P. aeruginosa* destaca-se por ser um patógeno oportunista, atribuído como causa frequente de pneumonias associadas à ventilação mecânica, sendo também responsável por infecções crônicas em pacientes fibrocísticos (BIELEN *et al.*, 2017). A *Klebsiella pneumoniae* responde por uma proporção das infecções hospitalares, tendo o lipopolissacarídeo componente de sua matriz como um importante fator de virulência (CHEN *et al.*, 2018).

Tanto *P. aeruginosa* quanto *K. pneumoniae* podem apresentar fenótipo formador de biofilmes, que consistem em agregados bacterianos envoltos por

matriz polimérica extracelular cujo objetivo é evitar a resposta imune do hospedeiro. Os biofilmes podem ser considerados 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos em comparação com a sua forma planctônica. Uma vez estabelecido, a matriz do biofilme limita a penetração de antimicrobianos devido a formação de uma estrutura mais rígida e a ação dos antimicrobianos passa a ser limitada em regiões em que há depleção de nutrientes (BALDWIN; HONEYBOURNE; WISE, 1992; DONLAN, 2002; CIOFU *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a distribuição tecidual do CIP tem sido estudada em nosso grupo de pesquisa através de modelos animais com ou sem infecção experimental. Inicialmente, Zimmermann *et al.* (2015) utilizaram o inibidor de P-gp tariquidar para avaliar a contribuição dos transportadores de efluxo na distribuição pulmonar e prostática do CIP. O estudo, realizado através de microdiálise em ratos Wistar saudáveis após dose i.v. *bolus* de 7 mg/kg do fármaco, com e sem a administração concomitante de tariquidar (15 mg/kg), permitiu observar que a inibição da P-gp não resultou em alterações na distribuição pulmonar do CIP quando o fármaco foi administrado por via intravenosa. O fator de penetração tecidual ($fT = ASC_{0-\infty \text{ tecido, livre}} / ASC_{0-\infty \text{ plasma, livre}}$) do CIP foi maior do que a unidade ($fT = 1,2$) na ausência do inibidor de P-gp, indicando que transportadores de influxo atuam preponderantemente na penetração pulmonar desse fármaco. Na presença do inibidor, o fT foi reduzido à metade (0,5), devido ao aumento da exposição central resultante da redução de 45% no *clearance* plasmático do fármaco, sem alteração importante na exposição livre pulmonar. A redução de *clearance* plasmático se deveu à inibição da P-gp nos rins, comprometendo a excreção do CIP, principal mecanismo de eliminação das fluoroquinolonas (NOUAILLE *et al.*, 1998). Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado que CIP é substrato para transportadores de efluxo, esse mecanismo não se mostrou relevante para distribuição pulmonar do fármaco em animais hígidos quando administrado intravenosamente, como ocorre na rotina clínica.

Nos experimentos visando avaliar a penetração de antimicrobianos em situação de infecção, conduzidos pelo grupo de pesquisa, tem-se trabalhado com bactérias formadoras de biofilme. Nos pulmões, os biofilmes podem estar impregnados ao muco presente na traqueia, brônquios e bronquíolos, enquanto

a forma planctônica da bactéria, cuja susceptibilidade à resposta imune é maior, pode estar localizada na região dos alvéolos (WANG *et al.*, 2014).

A penetração pulmonar do CIP foi investigada em modelo de infecção pulmonar crônica (14 dias) por *P. aeruginosa* formadora de biofilme em comparação com a penetração em ratos Wistar hípidos. Após dose i.v. *bolus* de 20 mg/kg, Torres e colaboradores (2017) mostraram que na infecção crônica houve aumento significativo da exposição plasmática ($ASC_{0-\infty}$ de $13,30 \pm 3,50$ para $27,30 \pm 12,10 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ao fármaco, devido a redução do *clearance* de $1,59 \pm 0,40 \text{ L}/\text{h}/\text{kg}$ para $0,89 \pm 0,44 \text{ L}/\text{h}/\text{kg}$, causada por alterações na eliminação renal devidas ao processo infeccioso. Quando observadas as concentrações livres intersticiais pulmonares, determinadas por microdiálise, verificou-se uma redução de quatro vezes no *fT* do grupo infectado (0,44) quando comparado ao grupo sadio (1,69). Nesse trabalho, o modelo farmacocinético populacional (popPK) proposto indicou que, para explicar a redução da exposição intersticial devido à infecção crônica, era necessário dividir o compartimento pulmonar em duas partes, sendo uma o compartimento compreendido pelas células e o espaço intersticial, onde as amostras de microdiálise foram coletadas, e a outra o compartimento fluido, compreendido pelo fluido de revestimento epitelial pulmonar – ELF e muco. Com a adição de um *clearance* a partir do compartimento pulmonar fluido no grupo infectado, o modelo popPK descreveu adequadamente os dados de animais sadios e infectados. As hipóteses levantadas para explicar a redução das concentrações livres intersticiais na infecção foram o aumento da distribuição do fármaco para o ELF, na forma livre ou ligada às proteínas, e/ou a penetração celular do mesmo, uma vez que fluoroquinolonas tem penetração celular relatada (SCHÜLER *et al.*, 1997).

Visando aumentar o entendimento do processo de distribuição pulmonar do CIP durante a infecção crônica, bem como investigar se os diferentes estágios da infecção (agudo e crônico) impactariam de modo diferente na distribuição deste fármaco, Lock (2018) avaliou por microdiálise as concentrações livres pulmonares do CIP em animais infectados agudamente e as concentrações livres no ELF em animais sadios e infectados agudamente (7 dias) por *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se que, para as concentrações livres intersticiais pulmonares, existe uma tendência de redução da exposição ao CIP conforme a evolução da infecção, embora não estatisticamente significativa na

comparação dos grupos hígido e infecção aguda ou infecção crônica e infecção aguda. A penetração pulmonar no grupo infecção aguda mostrou-se intermediária ($ASC_{0-\infty} = 12,1 \pm 5,3 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) quando comparada às áreas sob a curva considerando o grupo sadio ($ASC_{0-\infty} = 15,8 \pm 6,6 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) e com infecção crônica ($ASC_{0-\infty} = 8,4 \pm 1,8 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Além disso, considerando a passagem do fármaco dos capilares sanguíneos para o interstício, o fT para o grupo sadio foi maior que 1 ($fT = 1,69$), dando indícios da presença de transportadores de influxo. Nos animais infectados cronicamente o fT foi menor que 1 ($fT = 0,44$), o que sugere a influência da infecção/inflamação no processo de efluxo, e nos animais com infecção aguda, o fT foi intermediário ($fT = 1,02$). Considerando a passagem do fármaco do interstício pulmonar para o PELF, fez-se a razão entre as concentrações brônquicas e pulmonares no estudo de Lock (2018). Para os animais sadios ($fT = 0,46$), agudos ($fT = 0,46$) e crônico ($fT = 0,64$) observou-se que as concentrações no PELF são inferiores às concentrações pulmonares e não são muito afetadas pela infecção. Isso indica que nas infecções crônicas o CIP estaria localizado em outro compartimento pulmonar, como o interior das células, ou mais ligado às proteínas. Um modelo popPK para o CIP, levando em consideração os diferentes estágios da infecção pulmonar, deverá possibilitar o melhor entendimento das alterações da penetração pulmonar em função da infecção, permitindo realizar previsões da eficácia de diferentes posologias para o tratamento de pneumonia com essa bactéria.

Considerando que as endotoxinas liberadas por diferentes bactérias podem impactar de modo distinto os transportadores de membrana, a investigação da penetração pulmonar do CIP em modelo de infecção por *K. pneumoniae* formadora de biofilme se torna relevante. Neste cenário, este projeto pretende aprofundar a investigação da influência da infecção por diferentes espécies bacterianas na distribuição pulmonar do CIP e propor modelos farmacocinéticos populacionais capazes de descrever as alterações farmacocinéticas observadas.

OBJETIVOS



Objetivo geral

Objetivo geral do projeto foi investigar as possíveis alterações na penetração pulmonar do CIP na dependência do grau de infecção e diferentes espécies bacterianas.

Objetivos específicos

- Revisar a literatura pontuando as principais diferenças entre biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e sua relação com estudos de farmacocinética;
- Desenvolver modelo popPK para CIP com dados de plasma, pulmão e PELF de animais hígidos, *bead* branco e infectados aguda e cronicamente por *P. aeruginosa* formadora de biofilme, obtidos em estudos anteriores do grupo;
- Implementar modelos de infecção pulmonar crônica por *Klebsiella pneumoniae* formadora de biofilme em ratos Wistar;
- Determinar as concentrações plasmáticas e as concentrações livres pulmonares do CIP, por microdiálise, em animais cronicamente infectados por *K. pneumoniae* após dose de 20 mg/kg i.v. *bolus*;
- Desenvolver modelo popPK para o CIP em animais infectados por *K. pneumoniae*;
- Comparar os modelos desenvolvidos para infecções crônicas causadas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* verificando se existem diferentes alterações na distribuição do CIP em infecções por diferentes bactérias Gram-negativas.

Os resultados dessa tese serão apresentados na forma de capítulos, contendo:

1. Revisão de literatura sobre o tema, que posteriormente será formatado para publicação;
2. Modelagem popPK do CIP com os resultados do estudo com *P. aeruginosa*;
3. Modelagem popPK do CIP com os resultados do estudo com *K. pneumoniae* e comparação com o modelo de *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO I – LITERATURE REVIEW

O presente capítulo, cujo conteúdo compreende das páginas 35 a 51 foi suprimido uma vez que está em finalização com a finalidade de ser submetido. Trata-se de uma revisão da literatura que busca trazer informações quanto as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* nas infecções pulmonares, com enfoque nas suas diferenças de estrutura, patogenicidade e tratamento.

CAPÍTULO 2 – POPPK MODEL FOR *P. aeruginosa* INFECTION

Artigo aceito para publicação na *European Journal of Pharmaceutical Sciences*
sob doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106546>

**POPULATION PHARMACOKINETIC MODELING OF THE INFLUENCE OF
CHRONIC AND ACUTE BIOFILM-FORMING *Pseudomonas aeruginosa*
LUNG INFECTION ON CIPROFLOXACIN FREE PULMONARY AND
EPITHELIAL LINING FLUID CONCENTRATIONS**

LOCK, GRAZIELA DE ARAUJO; HELFER, VICTÓRIA ETGES; DIAS, BRUNA
BERNAR; TORRES, BRUNA GAELZER SILVA; DE ARAÚJO, BIBIANA
VERLINDO; DALLA COSTA, T.

Pharmacokinetics and PK/PD Modeling Laboratory, Pharmaceutical Sciences
Graduate Program, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Pharmaceutical Sciences Graduate Program

Faculty of Pharmacy

Federal University of Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90.610-000

Email: dalla.costa@ufrgs.br

Keywords: Ciprofloxacin, *Pseudomonas aeruginosa*, lung infection, epithelial
lining fluid, microdialysis, population pharmacokinetic model

O presente capítulo, cujo conteúdo compreende das páginas 56 a 95 foi suprimido, uma vez que se trata de um artigo aceite para publicação na revista *European Journal of Pharmaceutical Sciences* sob doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106546>. O artigo trata da avaliação das concentrações do ciprofloxacino no plasma, interstício pulmonar e no fluido de revestimento epitelial pulmonar em ratos Wistar infectados aguda e cronicamente por *P. aeruginosa*. Foi realizada modelagem farmacocinética populacional para buscando avaliar o impacto dos diferentes estágios de infecção nas concentrações do fármaco e identificar a presença de possíveis covariáveis que possam explicar as diferenças nas concentrações encontradas.

**CAPÍTULO 3 – POPPK MODEL FOR *K. pneumoniae*
INFECTION**

Short communication to be submitted at *International Journal of Antimicrobial Agents*

**IMPACT OF *Pseudomonas aeruginosa* AND *Klebsiella pneumoniae* ON
CIPROFLOXACIN LUNG PENETRATION: DOES THE INFECTING
BACTERIA PLAY A ROLE?**

LOCK, G. A.^a; HELFER, V.E.^a; DIAS, B.B.^a; BARRETO, F.^b; ARAÚJO, B.V.^a;
DALLA COSTA, T^{a,*}.

^aPharmacokinetics and PK/PD Modeling Lab, Pharmaceutical Sciences
Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bFederal Laboratory of Animal and Plant Health and Inspection – LFDA/RS,
Porto Alegre/BR

Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Pharmaceutical Sciences Graduate Program

Faculty of Pharmacy

Federal University of Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90.610-000

Email: dalla.costa@ufrgs.br

Keywords: Ciprofloxacin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*,
lung infection, microdialysis, population pharmacokinetic model

O presente capítulo, cujo conteúdo compreende as páginas 100 a 126 foi suprimido uma vez que pretende-se realizar a sua submissão. Trata-se de um estudo que avaliou as concentrações plasmáticas e intersticiais pulmonares do ciprofloxacino em ratos Wistar machos infectados cronicamente por *K. pneumoniae*. O trabalho dá sequência ao artigo apresentado no capítulo II, e utiliza o modelo farmacocinético populacional desenvolvido para *P. aeruginosa* para avaliar possíveis covariáveis que ajudem a descrever as diferentes concentrações observadas diante das infecções crônicas por esses dois patógenos Gram-negativos.

DISCUSSÃO GERAL

A forma usual de monitoramento terapêutico na prática clínica envolve avaliação das concentrações plasmáticas, assumindo que essas seriam capazes de prever as concentrações que atingem o sítio alvo. Em se tratando do uso de antimicrobianos, o objetivo é combater a infecção no local em que ela se apresenta, contudo, diferenças entre espécies bacterianas, presença ou não de biofilmes e estágio da infecção podem influenciar as concentrações que efetivamente estarão disponíveis no sítio alvo para atuar na erradicação do patógeno e cura da doença.

Diante deste contexto, o objetivo desta tese foi investigar as possíveis alterações na penetração pulmonar do CIP na dependência do estágio de infecção e diferentes espécies bacterianas. Para isso, inicialmente utilizamos de dados disponíveis das concentrações de plasma, pulmão e ELF em animais saudáveis, aguda e cronicamente infectados por *P. aeruginosa* oriundos de experimentos desenvolvidos em nosso laboratório para a construção de modelo popPK que englobasse todas as informações.

Os experimentos de microdiálise conduzidos em ratos Wistar saudáveis, aguda (2 dias) e cronicamente infectados com *P. aeruginosa* permitiram determinar que a infecção aguda não produziu alterações significativas nos níveis plasmáticos e pulmonares do CIP. No entanto, a pneumonia crônica (14 dias) conduziu a um aumento na exposição plasmática e uma redução na exposição livre intersticial do fármaco em comparação com os grupos sadio e agudamente infectado. As concentrações livres no ELF, em todos os grupos, foram dependentes das concentrações livres no interstício pulmonar, não sendo afetadas pelos diferentes estágios da infecção.

Na presente tese, propusemos modificações no modelo popPK construído por Torres *et al.* (2017) empregando dados de concentração de CIP em plasma e interstício pulmonar de animais saudáveis e cronicamente infectados (14 dias) com *P. aeruginosa* formadora de biofilme. O modelo popPK proposto descreve o plasma com três compartimentos com eliminação de primeira ordem, tendo um compartimento central único, diferente do modelo particionado o compartimento central em arterial e venoso, proposto anteriormente. As concentrações livres

intersticiais pulmonares foram incorporadas no modelo como um quarto compartimento e as concentrações livres no ELF foram descritas como uma fração das concentrações que chegam ao interstício pulmonar, sendo estimadas como um fator de distribuição. A infecção crônica se manteve como covariável para diferenciar o *clearance* do grupo com infecção crônica. Foi necessária a adição de um *clearance* pulmonar para melhor descrever as menores concentrações livres intersticiais observadas nos animais com infecção crônica, indicando que o fármaco pode estar sendo deslocado em maior quantidade para o interior de macrófagos alveolares e outras células envolvidas na resposta inflamatória nessa condição. Os resultados indicam que a redução das concentrações intersticiais pulmonares observadas na infecção crônica se deve provavelmente ao aumento das concentrações do fármaco no interior das células e não ao extravasamento para o ELF, como previamente hipotetizado (Torres et al., 2017).

Os parâmetros estimados pelo modelo popPK desenvolvido foram utilizados para simular concentrações livres plasmáticas, pulmonares e no ELF obtidas para a dose de 20 mg/kg q8h administrada para o tratamento de infecção crônica por *P. aeruginosa*, equivalente à dose de 400 mg/kg q8h recomendada para humanos. A probabilidade dessas concentrações atingirem o alvo terapêutico $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ foram determinadas. Os PTAs mostraram que, para ambos os estágios da infecção, usando concentrações livres plasmáticas de CIP como substituto das concentrações no sítio da infecção, o regime de dose prevê tratamento adequado para mais de 90% das infecções com MICs de até 0,25 mg/mL, que incluem o MIC mais prevalente da *P. aeruginosa* (0,125 mg/L). Se as concentrações livres intersticiais pulmonares de CIP observadas no grupo crônico forem usadas para acessar a eficácia do tratamento, um PTA $\geq 90\%$ foi obtido apenas para MICs de até 0,125 mg/L. Para bactérias com MICs mais altas, o tratamento seria menos eficaz. As concentrações de CIP livres no ELF foram suficientes para atingir PTA $\geq 90\%$ apenas para MICs muito baixas ($< 0,06$ mg/L), abaixo da CIM de *P. aeruginosa* mais prevalente. Esses resultados reforçam a noção de que as concentrações livres plasmáticas não são boas substitutas para o monitoramento do CIP no tratamento de pneumonias crônicas uma vez que não refletem as concentrações no interstício pulmonar e no ELF na

situação de infecções crônicas por *P. aeruginosa*. Os resultados também indicam que, se o objetivo do tratamento for a erradicação bacteriana no ELF, posologias alternativas devem ser investigadas. Em se tratando de infecção aguda em que o início da colonização se dá na interface das células pulmonares com o ar, a utilização da via intratraqueal pode ser uma escolha interessante para que o fármaco chegue em concentrações suficientes para erradicar a bactéria no início da colonização e infecção.

Na segunda etapa da tese buscou-se investigar se a infecção crônica por diferentes espécies bacterianas poderia impactar na penetração pulmonar do CIP de modo distinto. Com esse objetivo, investigamos a influência da *K. pneumoniae*, por ser tratar de outra bactéria Gram-negativa formadora de biofilme importante em casos de pneumonia adquirida na comunidade.

Inicialmente foi realizada a validação do modelo de infecção crônica (14 dias) por *K. pneumoniae* impregnada em *beads* de alginato utilizada para *P. aeruginosa*, sendo mantidas a mesma estratégia de inoculação pela via intratraqueal e a mesma concentração do inóculo (10^8 UFC/mL). Os experimentos de avaliação da farmacocinética plasmática e intersticial pulmonar, por microdiálise, foram conduzidos em ratos Wistar saudáveis e infectados. Verificou-se que as concentrações plasmáticas do CIP na infecção por *K. pneumoniae* se assemelham às concentrações observadas na pneumonia por *P. aeruginosa*, ambas diferentes das concentrações encontradas nos animais saudáveis. A exposição pulmonar também foi alterada nessa bactéria, entretanto a redução das concentrações foi mais pronunciada para *K. pneumoniae* chegando a ser 7 vezes menor que nos animais saudáveis e 1,7 vezes menor quando comparada à infecção crônica por *P. aeruginosa*.

Utilizando o modelo popPK desenvolvido, modelou-se os dados dos grupos saudáveis e infectados cronicamente por ambas bactérias. Não foram necessárias alterações no modelo estrutural, na variabilidade interindividual e no modelo de erro residual. As concentrações plasmáticas de CIP nas duas infecções crônicas foram modeladas utilizando um único *clearance* para caracterizar a infecção crônica, mantendo-se fixado o valor do fator de distribuição para ELF em 37.6%, uma vez que para a infecção por *K.*

pneumoniae não foram determinadas as concentrações livres de CIP no ELF. Para diferenciar os perfis pulmonares das duas bactérias, a adição de um *clearance* pulmonar específico para cada espécie bacteriana foi suficiente para promover redução significativa na OFV e adequação gráfica. O *clearance* pulmonar da *K. pneumoniae* foi 2.26 vezes maior ($CL_{Lung} = 0.414$ L/h/kg) do que o *clearance* pulmonar da *P. aeruginosa* ($CL_{Lung} = 0.183$ L/h/kg), indicando que na infecção por *K. pneumoniae* o deslocamento do fármaco para as células é mais pronunciado.

A avaliação da probabilidade de atingir o alvo PK/PD $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ foi conduzida considerando a prevalência de MICs para ambas as bactérias e as concentrações livres plasmáticas e teciduais simuladas para a posologia 20 mg/kg q8h. Para *K. pneumoniae*, foi possível verificar que as concentrações plasmáticas livres de CIP são eficazes (PTA $\geq 90\%$) para MICs até 0.25 mg/L, incluindo o MIC mais prevalente (0.03 mg/L). Todavia, o mesmo não é evidenciado para as concentrações pulmonares, que são eficazes para MICs até 0.06 mg/L. Embora atinja a MIC mais prevalente para essa enterobactéria, as concentrações plasmáticas superestimam o efeito do fármaco, como demonstrado também para *P. aeruginosa*.

Por fim, esse estudo permitiu caracterizar as concentrações do CIP tanto no interstício pulmonar quando no ELF na condição de pneumonia, possibilitando estabelecer a relação quantitativa entre as mesmas e a influência dos diferentes estágios da infecção por diferentes bactérias. Os resultados confirmam que as concentrações livres plasmáticas do fármaco não são indicativas das concentrações nessas duas biofases e que diferentes espécies bacterianas alteram de modo distinto a penetração pulmonar do CIP. O impacto das alterações farmacocinéticas observadas para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* na eficácia do tratamento corrente com CIP deve ser relevante quando a cepa infectante é menos suscetível a esse antimicrobiano.

CONCLUSÕES



Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- As infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* formadores de biofilme reduzem de modo distinto as concentrações livres do CIP no interstício pulmonar em comparação com as concentrações observadas no pulmão sadio;
- As concentrações livres do CIP no ELF representam uma fração das concentrações livres intersticiais pulmonares do fármaco, independente da presença ou estágio da infecção por *P. aeruginosa*.
- O modelo popPK proposto foi capaz de descrever adequadamente a relação entre as concentrações do CIP no plasma, interstício pulmonar e líquido de revestimento alveolar em animais sadios e com pneumonia aguda e crônica por *P. aeruginosa* formadora de biofilme, após administração intravenosa do fármaco, podendo ser utilizado para investigar diferentes posologias;
- O modelo popPK foi capaz de descrever adequadamente as concentrações do ciprofloxacino no plasma e interstício pulmonar de animais sadios e com pneumonia crônica por *K. pneumoniae* formadora de biofilme, após administração intravenosa do fármaco;
- As concentrações livres de CIP obtidas no interstício pulmonar em infecções crônicas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* são suficientes para obter $PTA \geq 90\%$ tendo como alvo terapêutico o índice PK/PD $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$ considerando a MIC para a cepa mais prevalente de cada bactéria;
- As concentrações livres de CIP no ELF obtidas na infecção crônica por *P. aeruginosa* não são suficientes para produzir $PTA \geq 90\%$ tendo como alvo terapêutico o índice PK/PD $fAUC_{0-24}/MIC \geq 90$.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABDULLA A, ROGOUTI O, HUNFELD NGM, ENDEMAN H, DIJKSTRA A, VAN GELDER T, MULLER AE, DE WINTER BCM, KOCH BCP. Population pharmacokinetics and target attainment of ciprofloxacin in critically ill patients. *Eur J Clin Pharmacol*, n.76, v.7, p.957-967, 2020.

ATAMAS S.P., CHAPOVAL, S.P., KEEGAN, A.D. Cytokines in chronic respiratory diseases. *F1000 Biology Reports*, v.5, n.3, Epub 2013.

ASHURST, J.V., DAWSON, A. *Klebsiella Pneumoniae*. [Updated 2021 Feb 5]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

AL-MOGHIRAKHAIRI AL-QAYSI, MUSHTAK T. S. AL-OUQAILI, SAFAA ABED LATEF AL-MEANI. Effect of pyocyanin as secondary metabolite on pseudomonal biofilm and in increasing the resistance degree to antipseudomonal agents. *Drug Invention Today*, v.14, n.6, 2020.

BALDWIN, D. R.; HONEYBOURNE, D.; WISE, R. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: Methodological considerations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 6, p. 1171–1175, 1992.

BASSETTI M, VENA A, CROXATTO A, RIGHI E, GUERY B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*, v.7, 2018.

BERG, T.; HEGELUND-MYRBÄCK, T.; ÖCKINGER, J.; *et al.* Expression of MATE-1, P-gp, OCTN1 and OCTN2 , in epithelial and immune cells in the lung of COPD and healthy individuals. *Respiratory Research*, p. 1–13, 2018.

BIELLEN, K.; JONGERS, B. S.; MALHOTRA-KUMAR, S.; *et al.* Animal models of hospital-acquired pneumonia: current practices and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*. v. 5, n. 6, p. 1–13, 2017.

BJARNSHOLT T, ALHEDE M, ALHEDE M, EICKHARDT-SØRENSEN SR, MOSER C, KÜHL M, JENSEN PØ, HØIBY N. The in vivo biofilm. *Trends Microbiology*, v.9, p.466-474, 2013.

CADAVID E, ROBLEDO SM, QUIÑONES W, ECHEVERRI F. Induction of Biofilm Formation Sensing modulation. *Antibiotics*, v.7, n.4, p.103, 2018.

CHATTERJEE M, ANJU CP, BISWAS L, ANIL KUMAR V, GOPI MOHAN C, BISWAS R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol.*,v. 306, n.1, p. 48-58, 2016.

CHEN, Z.; CHEN, X.; CHENG, H.; *et al.* A novel CXCL8-IP10 hybrid protein is effective in blocking pulmonary pathology in a mouse model of *Klebsiella pneumoniae* infection. *International Immunopharmacology*, v. 62, p. 40–45, 2018.

CHRISTOPHERSEN L, SCHWARTZ FA, LERCHE CJ, SVANEKJÆR T, KRAGH KN, LAULUND AS, THOMSEN K, HENNEBERG KÅ, SAMS T, HØIBY N, MOSER C. In vivo demonstration of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms as independent pharmacological microcompartments. *J Cyst Fibros.*, v.19, n.6, p. 996-1003, 2020.

CHUNG PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.*, v.363, n.20, p.219, 2016.

CIGANA C, LORÈ NI, RIVA C, DE FINO I, SPAGNUOLO L, SIPIONE B, ROSSI G, NONIS A, CABRINI G, BRAGONZI A. Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections. *Sci Rep.*, v.6, p.21465, 2016.

CIOFU O, TOLKER-NIELSEN T, JENSEN PØ, WANG H, HØIBY N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev.*, n.85, p.7.23, 2015.

CIOFU O, TOLKER-NIELSEN T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol.*, v.10, p.913, 2019.

CIPOLLA, D.; BLANCHARD, J.; GONDA, I. Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections. *Pharmaceutics*, v. 8, p. 6, 2016.

CLEGG S, MURPHY CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.*, v.4, n.1, 2016.

DE CARVALHO CCCR. Biofilms: Microbial Strategies for Surviving UV Exposure. *Adv Exp Med Biol.*, v.996, p.233-239. 2017.

DEPKE T, THÖMING JG, KORDES A, HÄUSSLER S, BRÖNSTRUP M. Untargeted LC-MS Metabolomics Differentiates Between Virulent and Avirulent Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules*, v.10, n.7,p.1041, 2020.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

ELKHATIB W, NOREDDIN A. Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm using in vitro experimental model. *Microb Drug Resist.*, v.20.n.6, p.575-82, 2014.

ERNST J, KLINGER-STROBEL M, ARNOLD K, THAMM J, HARTUNG A, PLETZ MW, MAKAREWICZ O, FISCHER D. Polyester-based particles to overcome the obstacles of mucus and biofilms in the lung for tobramycin application under static and dynamic fluidic conditions. *Eur J Pharm Biopharm.*, v.131, p.120-129, 2018.

FDA. *Population. Pharmacokinetics. Guidance for Industry*. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Clinical Pharmacology, 2022.

FLEMMING HC, WINGENDER J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.*, v.8, n.9, p. 623-33. 2010.

GAI X, SHEN N, HE B, ZHOU Q, BO S, LI X, ZHAI S, YIN A, LU W. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in Chinese elderly patients with lower respiratory tract infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Chinese)*, v.26, n.95, 2015.

GAI, XIAO-YAN; BO, SHI-NING; SHEN, NING; ZHOU, QING-TAO; YIN, AN-YUE; LU, WEI. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of ciprofloxacin in elderly Chinese patients with lower respiratory tract infections caused by Gram-negative bacteria. *Chinese Medical Journal*,v.132, n.6, p. 638-646, 2019.

GREENE, C.M., MCELVANEY, N.G. Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol.*, v.158,n.4, p.1048-1058, 2009.

GUO, T., ABDULLA, A., KOCH, B.C.P., VAN HASSELT, J.G.C., ENDEMAN, H., SCHOUTEN, J.A., ELBERS, P.W.G., BRÜGGEMANN, R.J.M., VAN HEST, R.M. Pooled Population Pharmacokinetic Analysis for Exploring Ciprofloxacin Pharmacokinetic Variability in Intensive Care Patients. *Clinical Pharmacokinetics*, v.61, n.6, p869-879, 2022.

GUPTA, A., CHEEPURUPALLI, L., VIGNESWARAN, S., SINGH RATHORE, S., SUMA MOHAN, S., RAMAKRISHNAN, J. *In vitro* and *in silico* investigation of caprylic acid effect on multi drug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* biofilm. J Biomol Struct Dyn., v.38, n.2,p.616-624, 2020.

HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P., KATHJU, S., HØIBY, N., MOSER, C., COSTERTON, J.W., MOTER, A., BJARNSHOLT, T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. FEMS Immunol Med Microbiol., v.65,n.2,p.127-45, 2012.

JOHANSEN, H.K., ESPERSEN, F., PEDERSEN, S.S., HOUGEN, H.P., RYGAARD, J., HØIBY, N. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in normal and athymic rats. APMIS, v.101,n.3,p.207-25, 1993.

JURADO-MARTÍN I, SAINZ-MEJÍAS M, MCCLEAN S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci., v.22,n.6,p.3128, 2021.

KART D, REÇBER T, NEMUTLU E, SAGIROGLU M. Sub-Inhibitory Concentrations of Ciprofloxacin Alone and Combinations with Plant-Derived Compounds against *P. aeruginosa* Biofilms and Their Effects on the Metabolomic Profile of *P. aeruginosa* Biofilms. Antibiotics (Basel),v.10,n.4,p.414, 2021.

KNAPP, S. Asthma and respiratory diseases LPS and bacterial lung inflammation models. Drug Discovery Today: Disease Models, v. 6, n. 4, p. 113–118, 2009.

KRADIN, R.L. Pulmonary Infection. Understanding Pulmonary Pathology., p.157-242, 2017.

KUMAR, M., RAO, M., MATHUR, T., BARMAN, T.K., JOSHI, V., CHAIRA, T., SINGHAL, S., PANDYA, M., AL KHODOR, S., UPADHYAY, D.J., MASUDA, N. Azithromycin Exhibits Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Rat Lung Infection Model. Front Microbiol.,v.12, 2021.

LANDERSDORFER CB, WANG J, WIRTH V, CHEN K, KAYE KS, TSUJI BT, LI J, NATION RL. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of systemically administered polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae* in mouse thigh and lung infection models. J Antimicrob Chemother., v.1, n.73, p.462-468, 2018

LAVENDER, H.F., JAGNOW, J.R., CLEGG, S. Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun., v.,72,p.8,p.4888-90, 2004.

LOCK, G.A. Avaliação por microdiálise das concentrações livres pulmonares intersticiais e brônquicas de ciprofloxacino em ratos Wistar saudáveis e infectados com diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biofilme. Dissertação para obtenção do grau de mestre. UFRGS, Porto Alegre, 2018.

LOO CY, LEE WH, LAURETANI G, SCALIA S, CIPOLLA D, TRAINI D, YOUNG P, ONG HX. Sweetening Inhaled Antibiotic Treatment for Eradication of Chronic Respiratory Biofilm Infection. Pharm Res., v.35,n.3,p.50,2018.

MACIÀ MD, ROJO-MOLINERO E, OLIVER A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. Clin Microbiol Infect., v.20,n.10,p.981-90. 2014.

MOLDOVEANU, B.; JANI, P.; WALKER, J.; *et al.*, Inflammatory mechanisms in the lung. Journal of Inflammation Research, v. 2, p. 1–12, 2009.

MOULD, D.R. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-based drug development. CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology, v.1 2012.

MOULD, D.R., UPTON, R.N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol., v.2, n.4,p.e38, 2013.

NI, W.; YANG, D., M.E.I., H. *et al.*, Penetration of ciprofloxacin and amikacin into the alveolar epithelial lining fluid of rats with pulmonary fibrosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 61, n.4, p. e01936-16, 2017.

NOUAILLE-DEGORCE, B., VEAU, C., DAUTREY S, TOD M, LAOUARI D, CARBON C, FARINOTTI R. Influence of renal failure on ciprofloxacin pharmacokinetics in rats. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 42, n. 2, p. 289092, 1998.

OLIVARES, E., BADEL-BERCHOUX, S., PROVOT, C., PRÉVOST, G., BERNARDI, T., JEHL, F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. Front Microbiol., n. 10, p.2894, 2020.

ONG, H. X.; TRAINI, D.; BEBAWY, M.; YOUNG, P. M. Ciprofloxacin is actively transported across bronchial lung epithelial cells using a calu-3 air interface cell model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 6, p. 2535–2540, 2013.

OPOKU-TEMENG, C., KOBAYASHI, S.D., DE LEO, F.R. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput Struct Biotechnol J*, n.17, p.1360-1366, 2019.

OWLIA, P., NOSRATI, R., ALAGHEHBANDAN, R., LARI, A.R. Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *GMS Hyg Infect Control.*, v.9, n.2,2014.

PAYEN, S., SERREAU, R., MUNCK, A., AUJARD, Y., AIGRAIN, Y., BRESSOLE, F., JACQZ-ALGRAIN, E. Population Pharmacokinetics in Pediatric and Adolescent Patients with Acute Infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, n.10, 2003.

POWERS, K.A., DHAMOON, A.S. Physiology, Pulmonary Ventilation and Perfusion. 2021 Aug 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

RIQUELME, S.A., AHN D, PRINCE A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung. *J Innate Immun.*, v.10(5-6), p.442-454, 2018.

RODVOLD, K.A., HOPE, W.W., BOYD, S.E. Considerations for effect site pharmacokinetics to estimate drug exposure: concentrations of antibiotics in the lung. *Curr Opin Pharmacol.*, v.36, p.114-123, 2017.

SEIFI K, KAZEMIAN H, HEIDARI H, REZAGHOLIZADEH F, SAAE Y, SHIRVANI F, HOURI H. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol.*, v.9(1),p.e30682, 2016.

SCHÜLER, P., ZEMPER, K., BORNER, K., KOEPPE, P., SCHABERG, T., LODE, H. Penetration of sparfloxacin and ciprofloxacin into alveolar macrophages, epithelial lining fluid, and polymorphonuclear leucocytes. *European Respiratory Journal* v. 10, n. 5, p. 1130-6, 1997.

SCHULTZ AN, HØIBY N, NIELSEN XC, PRESSLER T, DALHOFF K, DUNO M, BUCHARD A, JOHANSEN HK, WANG H, DALBØGE CS. Individual pharmacokinetic variation leads to underdosing of ciprofloxacin in some cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*, v.52(3),p.319-323, 2017.

SHERATON, M.V., YAM, J.K.H., TAN, C.H., OH, H.S., MANCINI, E., YANG, L., RICE, S.A., SLOOT, P.M.A. Mesoscopic Energy Minimization Drives *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Morphologies and Consequent Stratification of Antibiotic Activity Based on Cell Metabolism. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, v. 62(5),p.e02544-17, 2018.

SIEVERT, D., RICKS, P., EDWARDS, J., SCHNEIDER, A., PATEL, J., SRINIVASAN, A., FRIDKIN, S. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v.34 (1), p.1-14,2009-2010

SINGLA, S., HARJAI, K., CHHIBBER, S. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. v.66(2), n.61-6, 2013.

SOU, T., KUKAVICA-IBRULJ, I., SOUKARIEH, F., HALLIDAY, N., LEVESQUE, R.C., WILLIAMS, P., STOCKS, M., CÁMARA, M., FRIBERG, L.E., BERGSTRÖM, C.A.S. Model-Based Drug Development in Pulmonary Delivery: Pharmacokinetic Analysis of Novel Drug Candidates for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *J Pharm Sci.*,v.108,n.1, p.630-640, 2019.

STEWART, P.S., CAMPER, A.K., HANDRAN, S.D., HUANG, C., WARNECKE, M. Spatial Distribution and Coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Microb Ecol.*, v.33(1),p.2-10, 1997.

THI, M.T.T., WIBOWO, D., REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.*, n.21, v. 8671, 2020.

TORRES, B. G. S.; HELFER, V. E.; BERNARDES, P. M.; *et al.* Population Pharmacokinetic Modeling as a Tool To Characterize the Decrease Ciprofloxacin Free Interstitial Levels Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Wistar Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 7, p. 1–14, 2017.

UEYAMA, J.; NADAI, M.; KANAZAWA, H.; *et al.* Endotoxin from various gram-negative bacteria has differential effects on function of hepatic cytochrome P 450 and drug transporters. *European Journal of Pharmacology*, v. 510, p. 127–134, 2005.

VAN DER DEEN, M., DE VRIES, E.G., TIMENS, W., SCHEPER, R.J., TIMMER-BOSSCHA, H., POSTMA, D.S. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res.* v.8, p.6, 2005.

WATTERS, C., FLEMING, D., BISHOP, D., RUMBAUGH, KP. Host Responses to Biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, v.142, p. 142:193-239, 2016.

World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistantbacteria/en/> (accessed on 02 December 2021).

WOOD, T.K., KNABEL, S.J., KWAN, B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*, v.79, n.23, p.7116-21, 2013.

WU, M., & LI, X. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, p. 1547–1564, 2015.

WANG, Y., WATTS, A. B., PETERS, J. I., WILLIAMS, R. O. The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines — A review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 461, n. 1-2, p. 112–128, 2014.

ZIMMERMANN, E. S., TORRES, B. G. S., DALLA COSTA, T. Validation of a sensitive HPLC / fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats. *Biomedical Chromatography*, v. 30, p. 330–336, 2015.

ANEXOS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36515

Título: Modelagem farmacocinética populacional do ciprofloxacino na inflamação e na infecção por bactérias Gram-negativas

Vigência: 14/01/2019 à 31/08/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 14/01/2019
Graziela de Araújo Lock - Aluno de Doutorado desde 14/01/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/02/2019 - Plenarinho - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 270 ratos Wistar, machos, pesando entre 250-300 g, oriundos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 21 de Fevereiro de 2019

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

Porto Alegre, novembro de 2019.

Resultado de Exame de Necropsia

N-1655-19

<u>Espécie:</u> rato	<u>Requisitante:</u> Graziela de Araújo Lock
<u>Sexo:</u> macho	<u>Endereço:</u> Av. Ipiranga, 2752 – Azenha
<u>Raça:</u> Wistar	<u>Instituição:</u> Faculdade de Farmácia - UFRGS
<u>Idade:</u> aproximadamente 60 dias	<u>Telefone:</u> 996297793
<u>Nome:</u> R28	<u>E-mail:</u> graziela_lock@yahoo.com.br
<u>Proprietário:</u> NI	<u>Plantonistas:</u> Andréia/ Rafael/ Ronaldo
<u>Endereço:</u> NI	<u>Data da morte:</u> 31/10/2019
<u>Telefone:</u> NI	<u>Data da entrega:</u> 31/10/2019
	<u>Data da necropsia:</u> 31/10/2019
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (conforme requisitante): dois animais com dois dias de infecção por *K. pneumoniae* e dois animais com infecção de 14 dias por *K. pneumoniae*. Suspeita clínica: pneumonia aguda e crônica.

Exame macroscópico: cadáver de um rato, em bom estado corporal, com mucosas normocoradas. **Estômago:** repleto de conteúdo alimentar. **Pulmão:** áreas multifocais vermelho-escuras e firmes entremeadas com focos brancos. Demais órgãos sem alterações.

Exame microscópico: **Pulmão:** hemorragia multifocal moderada associado a congestão multifocal acentuada além de áreas de atelectasia e enfisema. Nota-se ainda hiperplasia de BAL. **Fígado:** Tumefação hepatocelular difusa moderada além congestão difusa moderada. **Rim:** áreas multifocais moderadas de congestão. **Coração, timo, encéfalo, testículos, tecido adiposo, estômago, intestino delgado, intestino grosso:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Hemorragia e congestão pulmonar acentuadas

O original assinado pode ser retirado no setor de patologia veterinária da UFRGS.

Professor David Driemeier
CRMV-RS 5756
Setor de Patologia Veterinária

Porto Alegre, novembro de 2019.

Resultado de Exame de Necropsia

N-1656-19

<u>Espécie:</u> rato	<u>Requisitante:</u> Graziela de Araújo Lock
<u>Sexo:</u> macho	<u>Endereço:</u> Av. Ipiranga, 2752 – Azenha
<u>Raça:</u> Wistar	<u>Instituição:</u> Faculdade de Farmácia - UFRGS
<u>Idade:</u> aproximadamente 60 dias	<u>Telefone:</u> 996297793
<u>Nome:</u> R29	<u>E-mail:</u> graziela_lock@yahoo.com.br
<u>Proprietário:</u> NI	<u>Plantonistas:</u> Andréia/ Rafael/ Ronaldo
<u>Endereço:</u> NI	<u>Data da morte:</u> 31/10/2019
<u>Telefone:</u> NI	<u>Data da entrega:</u> 31/10/2019
	<u>Data da necropsia:</u> 31/10/2019
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (conforme requisitante): dois animais com dois dias de infecção por *K. pneumoniae* e dois animais com infecção de 14 dias por *K. pneumoniae*. Suspeita clínica: pneumonia aguda e crônica.

Exame macroscópico: cadáver de um rato, em bom estado corporal, com mucosas normocoradas. Estômago: repleto de conteúdo alimentar. Pulmão: áreas multifocais vermelho-escuras e firmes entremeadas com focos brancos. Demais órgãos sem alterações.

Exame microscópico: Pulmão: Em meio ao parênquima observam-se áreas multifocais nodulares compostas por infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e ocasionais células gigantes multinucleadas e em menor número, eosinófilos e neutrófilos. Fígado: Tumefação hepatocelular difusa moderada além congestão difusa moderada. Encéfalo e Rim: áreas multifocais moderadas de congestão. Coração, músculo esquelético, timo, baço, testículos, tecido adiposo, estômago, Intestino delgado, Intestino grosso: sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: pneumonia granulomatosa

O original assinado pode ser retirado no setor de patologia veterinária da UFRGS.

Professor David Driemeler
CRMV-RS 5756
Setor de Patologia Veterinária