

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

**AVALIAÇÃO POR MICRODIÁLISE DA PENETRAÇÃO PULMONAR DA
TOBRAMICINA EM MODELO DE PNEUMONIA POR MICRORGANISMO
FORMADOR DE BIOFILME**

PRISCILA MARTINI BERNARDI

Porto Alegre, 2016.

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

**AVALIAÇÃO POR MICRODIÁLISE DA PENETRAÇÃO PULMONAR DA
TOBRAMICINA EM MODELO DE PNEUMONIA POR MICRORGANISMO
FORMADOR DE BIOFILME**

Dissertação apresentada por **PRISCILA
MARTINI BERNARDI** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Porto Alegre, 2016.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23 de março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Zavascki
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Bibiana Verlindo de Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Danielle da Silva Trentin
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bernardi, Priscila Martini
AVALIAÇÃO POR MICRODIÁLISE DA PENETRAÇÃO PULMONAR
DA TOBRAMICINA EM MODELO DE PNEUMONIA POR
MICROORGANISMO FORMADOR DE BIOFILME / Priscila
Martini Bernardi. -- 2016.
127 f.

Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Tobramicina. 2. Biofilmes. 3. Pseudomonas
aeruginosa. 4. Microdialise. 5. Farmacocinética. I.
Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares, orient. II.
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 Centro Bioanalítico de Medicamentos, no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais um objetivo.

À Prof^a. Teresa Dalla Costa, pela oportunidade concedida, pela orientação ao longo deste trabalho, pela ética, confiança, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof^a. Bibiana Verlindo de Araújo, pelas discussões científicas e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Lorena, por serem os gigantes nos quais me apoiei para enxergar mais longe.

A minha irmã, Raquel, por ser meu exemplo e meu orgulho e por ser a responsável pelo meu amor a nossa profissão.

Ao meu noivo Humberto, cujo companheirismo, compreensão e amor ao longo destes anos tornaram esta etapa possível e menos árdua.

Ao meu cunhado Ricardo Ferretto pela irmandade e pelo conhecimento proporcionado.

Ao meu anjinho Allana Willers, por iluminar meus passos ao longo deste caminho.

Ao farmacêutico Fabiano Barreto por toda a ajuda, aprendizado e disponibilização do equipamento e tempo, ajudando na concretização deste trabalho e tornando este trabalho possível.

As alunas de iniciação científica Arielle Turcatel e Victória Helfer pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do CBIM: Ana, Andressa, Bruna, Camila, Carol, Daiane, Eduardo, Fernando, Grazi, Izabel, Jaqueline, João, Letícia, Maiara e Ricardo pelo coleguismo que se transformou em amizade, pelo aprendizado, pelos bons momentos que passamos juntos e pela ajuda incansável de cada um de vocês.

As grandes e verdadeiras amigas, unidas pelo amor à farmácia, Esther, Ju, May e Mari, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio, carinho e pela amizade verdadeira ao longo desses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários dessa Instituição.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

A CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos concedida durante todo o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme na penetração pulmonar da tobramicina através da modelagem populacional dos dados de plasma e microdialisado em animais saudios e infectados.

Metodologia: A pneumonia foi desenvolvida através de inoculação de *P. aeruginosa* (cepa PA14) pela via intratraqueal (10^9 UFC/mL) a ratos Wistar. Sete dias após a inoculação os animais infectados ($n = 5$) receberam tobramicina 10 mg/kg i.v. *bolus*. Animais saudáveis ($n = 6$) foram utilizados como controle. As concentrações livres pulmonares foram coletadas por microdiálise (sonda CMA/20). As sondas de microdiálise foram calibradas *in vitro* através de diálise e retrodiálise e *in vivo* utilizando retrodiálise. A ligação da tobramicina às proteínas plasmáticas foi determinada por microdiálise. As concentrações do fármaco nas amostras foram determinadas por cromatografia líquida em *tandem* com espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) utilizando metodologia validada. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por abordagem não-compartimental (Phoenix®) e modelagem populacional (popPK) (Monolix®). **Resultados e Discussão:** A recuperação relativa (RR) das sondas foi independente da concentração de tobramicina e inversamente proporcional ao fluxo de perfusão. A RR determinada *in vivo* foi de 27,64 % \pm 7,70 para animais saudios e 24,47 % \pm 1,66 para animais infectados. A ligação às proteínas plasmáticas foi de 11,3 \pm 1,9%. A infecção com formação de biofilme não alterou a farmacocinética plasmática da tobramicina, entretanto reduziu em cerca de 70% a penetração pulmonar do fármaco. As concentrações plasmáticas e teciduais foram simultaneamente descritas por um modelo farmacocinético populacional de dois compartimentos, tanto em animais saudios como infectados. A infecção, utilizada como covariável categórica, permitiu descrever as alterações no volume do compartimento periférico e na constante de eliminação do compartimento central devido à infecção. **Conclusões:** As concentrações plasmáticas da tobramicina, utilizadas para ajuste posológico, superestimam as concentrações ativas no pulmão infectado. O modelo popPK descrito permite a previsão das concentrações livres pulmonares da tobramicina em pulmão infectado, podendo auxiliar na otimização da terapia de pneumonias com *P. aeruginosa* formadora de biofilme.

Palavras-chave: Farmacocinética, microdiálise, penetração pulmonar, *P. aeruginosa* formadora de biofilme, tobramicina, modelagem popPK.

ABSTRACT

Evaluation of tobramycin lung penetration in a biofilm-forming microorganism pneumonia model using microdialysis

Objective: To evaluate the influence of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* infection on tobramycin lung penetration by population pharmacokinetic modeling of plasma and microdialysate data in healthy and infected rats. **Methodology:** The infection was developed by intratracheal inoculation (10^9 CFU/mL) of *P. aeruginosa* (PA14 strain) to Wistar rats. In order to determine plasma and tissue concentrations, seven days after the inoculation the infected animals ($n = 5$) received tobramycin 10 mg/kg i.v. *bolus* dose via femoral vein. A healthy group ($n = 6$) was used as control. Free lung concentrations were determined in microdialysate samples obtained using CMA/20 probes. Microdialysis probes were calibrated *in vitro* by dialysis and retrodialysis and *in vivo* by retrodialysis. Tobramycin plasma protein binding was determined by microdialysis. Plasma and tissue concentrations were quantified by a developed and validated liquid chromatography in tandem with mass spectrometry (LC-MS/MS) method. Compartmental and non-compartmental analyses were carried out by Monolix™ and Phoenix™ software, respectively. **Results and Discussion:** Microdialysis probes relative recovery was independent of the tobramycin concentration and is inversely proportional to the perfusion flow rate investigated. The *in vivo* probe recovery was $27.64 \% \pm 7.70$ (healthy rats) and $24.47 \% \pm 1.66$ (infected rats). The plasma protein binding was $11.3 \pm 1.9\%$. The biofilm-forming lung infection did not alter tobramycin plasma pharmacokinetics, however, reduced lung penetration in about 70%. The plasma and tissue concentrations-time profiles were simultaneously described by a two compartment popPK model in healthy and infected animals. The infection process, used as categorical covariate allowed describing the changes observed in the volume of the peripheral compartment and in constant rate of elimination from the central compartment. **Conclusions:** Tobramycin plasma concentrations, used for dosing adjustments, overestimate active concentrations in infected lung. The described popPK model allows predicting free tobramycin lung concentrations in infected lung and could be useful to optimize the treatment of pneumonia caused by biofilm-forming *P. aeruginosa* with this drug. **Keywords:** Pharmacokinetics, microdialysis, lung penetration, biofilm-forming *P. aeruginosa*, tobramycin, popPK modeling.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Etapas da formação de biofilmes	36
FIGURA 2. Estrutura química da tobramicina.	45
FIGURA 3. Sonda de microdiálise	50

CAPÍTULO 1 – Application of a LC-MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis

FIGURE 1. Chemical structure of tobramycin and apramycin	57
FIGURE 2. Selectivity and sensibility	65
FIGURE 3. The influences of TOB concentration and flow rate in the <i>in vitro</i> TOB relative recovery.	71
FIGURE 4. Concentration-time profiles	72

CAPÍTULO 2 – Population pharmacokinetic modeling of plasma and tissue concentrations of tobramycin in healthy and *P. aeruginosa* biofilm-forming infected Wistar rats

FIGURE 1. TOB mean total plasma and free lung concentrations-time profiles.....	88
FIGURE 2. Structure of the popPK model.....	92
FIGURE 3. Individual and population fitted plasma and tissue.....	93
FIGURE 4. Goodnes-of-fit plots for the popPK model.....	96
FIGURE 5. Visual predictive check (VPC) plot of the final popPK model.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Application of a LC-MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis

TABLE 1. Parameters optimized for tobramycin and apramycin (IS)	60
TABLE 2. Intra- and inter-assay variation of tobramycin in plasma	67
TABLE 3. Intra and inter-assay variation of tobramycin in microdialysate	68
TABLE 4. Accuracy of tobramycin analyses in rat plasma and microdialysate	68
TABLE 5. Stability of tobramycin in plasma and microdialysate	70
TABLE 6. Tobramycin pharmacokinetic parameters determined after i.v. <i>bolus</i> 10mg/kg dosing to Wistar rats	72

CAPÍTULO 2 – Population pharmacokinetic modeling of plasma and tissue concentrations of tobramycin in healthy and *P. aeruginosa* biofilm-forming infected Wistar rats

TABLE 1. TOB plasma pharmacokinetic parameters determined by NCA	89
TABLE 2. TOB lung pharmacokinetic parameters determined by NCA	90
TABLE 3. Parameters estimates of the final TOB popPK model	94

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Elimination rate constant
AIC	Aikaike's information criteria
ASC	Área sob a curva
C_{dial}	Concentração do dialisado
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CL_{tot}	<i>Clearance total</i>
C_{perf}	Concentração do perfundido
ESI+	<i>Electrospray ionization positive mode</i>
FC	Fibrose cística
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
f_T	<i>Tissue penetration factor</i>
HFBA	<i>Heptafluorobutyric acid</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IS	<i>Intern standard</i>
k_{10}	<i>Elimination rate constant</i>
k_e	Constante de eliminação
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MRM	<i>Multiple reaction monitoring mode</i>
MRT	<i>Mean resident time</i>
NCA	<i>Non-compartmental analysis</i>
QC	<i>Quality control</i>
RE	<i>Relative error</i>
RR_D	Recuperação relativa por diálise
RR_{RD}	Recuperação relativa por retrodiálise
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
$t_{1/2}$	Meia-vida
TOB	Tobramicina
V_2	<i>Volume of peripheral compartment</i>
V_d	Volume de distribuição
VPC	Visual predictive check

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1. Biofilmes bacterianos	35
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.3. Fibrose cística	41
3.4. Aminoglicosídeos	42
3.5. Tobramicina	44
3.5.1. Descrição	44
3.5.2. Uso clínico	45
3.5.3. Aspectos farmacocinéticos	46
3.6. Modelos animais de pneumonia	48
3.7. Microdiálise	49
CAPÍTULO 1 – Application of a LC-MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis	53
CAPÍTULO 2 – Population pharmacokinetic modeling of plasma and tissue concentrations of tobramycin in healthy and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm-forming infected Wistar rats	77
4. DISCUSSÃO GERAL	103
5. CONCLUSÕES	109
6. REFERÊNCIAS	113
7. ANEXO - Parecer do Comitê de Ética	125

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são complexas comunidades microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. Os microrganismos que fazem parte de um biofilme estão envoltas em uma matriz polimérica autoproduzida, composta de substâncias como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, que confere estabilidade estrutural ao biofilme. Uma vez na forma de biofilme, as bactérias apresentam maior resistência à fagocitose, aos mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro e à terapia antimicrobiana (SOTO, 2013).

Os mecanismos envolvidos na resistência das bactérias em biofilme aos antimicrobianos e à defesa imune ainda não estão bem estabelecidos. Algumas hipóteses descritas na literatura visam explicar esse fenômeno: a) a matriz dos biofilmes atua como uma barreira tornando a penetração dos antimicrobianos lenta e incompleta; b) o ambiente heterogêneo encontrado no interior do biofilme determina uma resposta bacteriana diferente aos fármacos; c) a presença de células *persisters* que apresentam um fenótipo distinto das demais confere resistência ao biofilme frente ao antibiótico; e d) a troca facilitada de plasmídeos entre as bactérias possibilita a transferência de mecanismos de resistência (LEID, 2009; FUENTE NÚÑEZ et al., 2013).

Bactérias crescendo em biofilmes são responsáveis por 65% das infecções bacterianas que, devido aos fatores de resistência dessas comunidades, são difíceis de erradicar (SOTO, 2013). Estas infecções podem ser associadas a superfícies, quando estão relacionadas a superfícies bióticas ou abióticas do hospedeiro (como dispositivos médicos, cateteres, implantes); ou associadas ao tecido na forma de agregados celulares embebidos em muco, crescendo, por exemplo, associados ao lúmen dos brônquios em pacientes com fibrose cística (BJARNSHOLT et al., 2013).

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva que afeta principalmente a população caucasiana, é caracterizada por secreções anormais das vias respiratórias, infecção endobronquial e obstrução progressiva das vias aéreas devido ao acúmulo de muco denso nos pulmões, levando à redução da expectativa de vida dos indivíduos portadores (MUNDER et al., 2011; MOGAYZEL et al., 2013). A infecção pulmonar crônica é a maior causa de mortalidade e morbidade em pacientes com FC (*Cystic Fibrosis Foundation*, 2008). Indivíduos portadores de FC são altamente susceptíveis a infecções bacterianas no trato respiratório sendo a

Pseudomonas aeruginosa o agente mais importante e frequentemente associado a essas infecções (*Cystic Fibrosis Foundation*, 2010). O estabelecimento da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* é mediado por um processo adaptativo que inclui alterações fisiológicas das células bacterianas, representadas principalmente pela transição da forma planctônica para um modo de crescimento em biofilme. O crescimento da bactéria na forma de biofilme, associado à conhecida resistência intrínseca deste microrganismo aos antimicrobianos, é um dos fatores responsáveis pela persistência da infecção pulmonar crônica nos pacientes com FC, uma vez que proporciona uma maior tolerância aos mecanismos de defesa do hospedeiro (como *clearance* mecânico, anticorpos e fagócitos) e aos antimicrobianos (SMITH et al., 2006; VENTRE et al., 2006; OLIVER et al., 2007; MATHEE et al., 2008; YANG et al., 2011).

Com o aumento do número de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, os antimicrobianos para terapia eficaz das infecções causadas por esta bactéria vêm se tornando cada vez mais limitados. Os aminoglicosídeos têm sido amplamente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas do pulmão, trato urinário e endocardite. Essa classe de antibióticos é especialmente útil para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* (KIRST; MARINELLI, 2014). Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas cujo mecanismo de ação baseia-se na interrupção da síntese de proteínas bacterianas atuando na subunidade 30S do ribossomo procariótico (MANDELL et al., 2010). Dentre os aminoglicosídeos, a tobramicina, administrada por via intravenosa ou na forma de aerossol, é o fármaco mais indicado para o tratamento de pneumonias causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC (CANTON et al., 2005; MOSKOWITZ et al., 2008).

A tobramicina apresenta um amplo espectro de atividade contra os estafilococos, em especial *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, todos os estreptococos, incluindo *Streptococcus pneumoniae*. Também é ativa contra muitos bacilos Gram-negativos aeróbios e facultativos, incluindo Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Esse aminoglicosídeo desempenha um importante papel no tratamento de infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa* em pacientes adultos e pediátricos com FC (REYES, et al., 2014).

O fluido extracelular é o local predominante das infecções teciduais. Desse modo, a concentração livre (farmacologicamente ativa) de antimicrobianos no líquido intersticial determina o efeito antimicrobiano. A fração livre tecidual de fármacos pode ser mensurada através da técnica de microdiálise (MD) (LIU; DERENDORF, 2003). A MD é uma ferramenta específica para amostrar compostos endógenos e exógenos no espaço extracelular permitindo, desse modo, a determinação das concentrações não-ligadas a proteínas desses compostos no tecido sob investigação (ZHOU; GALLO, 2005; CHAURASIA et al, 2007; WEI et al., 2009). A MD também permite comparar a penetração de antimicrobianos em tecidos infectados e sadios, possibilitando investigar se o processo inflamatório associado à infecção bem como características do microrganismo como formação de biofilmes altera a distribuição tecidual do fármaco.

Não há na literatura, até o momento, relatos de investigação da penetração pulmonar de antimicrobianos determinada por MD em modelo de infecção por bactéria formadora de biofilme. Em função das características de resistência intrínseca dos biofilmes, especialmente a conhecida dificuldade de penetração do fármaco, há necessidade de se conhecer as concentrações dos antimicrobianos nos tecidos infectados por microrganismo produtores de biofilme, como forma de garantir posologias adequadas para erradicação desses processos infecciosos.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar a influência do biofilme de *P. aeruginosa* na penetração pulmonar de antimicrobianos, através da técnica de microdiálise. Para o desenvolvimento desse projeto foi escolhido como fármaco modelo a tobramicina devido a sua importância no tratamento de pneumonias por *P. aeruginosa* em pacientes com FC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do biofilme na penetração pulmonar da tobramicina em ratos com pneumonia por *P. aeruginosa* formadora de biofilme.

2.2. Objetivos específicos

- Adaptar e validar método analítico através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas para quantificação da tobramicina em microdialisado pulmonar e plasma de ratos;
- Validar modelo animal de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* formadora de biofilme;
- Determinar, através de microdiálise, as concentrações livres pulmonares, e as concentrações plasmáticas totais da tobramicina em ratos Wistar sadios e infectados com *P. aeruginosa* formadora de biofilme;
- Avaliar a influência do biofilme na penetração tecidual da tobramicina através da modelagem populacional dos dados de plasma e microdialisado em animais sadios e infectados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biofilmes Bacterianos

Biofilmes são agregados bacterianos que crescem aderidos a superfícies orgânicas ou inorgânicas e representam um modo de crescimento que permite a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis. As bactérias presentes em um biofilme estão envoltas em uma matriz polimérica extracelular autoproduzida que contém ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e polissacarídeos. Esta matriz confere estabilidade estrutural à comunidade bacteriana em virtude de sua constituição, disposição e agregação diferenciadas. Uma vez na forma de biofilme, as bactérias apresentam maior resistência à fagocitose, aos mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro e à terapia antimicrobiana (HOIBY et al., 2011; SOTO, 2013).

O processo de formação do biofilme é regulado por mecanismos específicos, dentre os quais o mais importante é o *quorum sensing* (QS). O termo QS refere-se a um grupo de sistemas de regulação através do qual a população bacteriana é capaz de detectar a densidade celular e responder adaptativamente a mudanças nesta densidade. Isto é obtido através da interação das moléculas sinalizadoras com receptores específicos permitindo um comportamento coordenado e comunicação entre as bactérias do biofilme (O'TOOLE et al., 2000; LI; TIAN, 2012; BHARDWAJ et al., 2013; SCHUSTER et al., 2013).

A formação de biofilme é observada na maior parte das bactérias encontradas em ambientes naturais, clínicos e industriais e é caracterizada pelo desenvolvimento de uma complexa estrutura multicelular tridimensional com formato característico de cogumelo. O primeiro estágio do ciclo de um biofilme é caracterizado por um ataque a superfície, chamado de fixação ou adesão, seguido da formação da microcolônia (crescimento/proliferação), maturação do biofilme e por fim a disseminação, como pode visto na Figura 1 (WEBB et al., 2003; HOIBY et al., 2010; MÜSKEN et al., 2010).

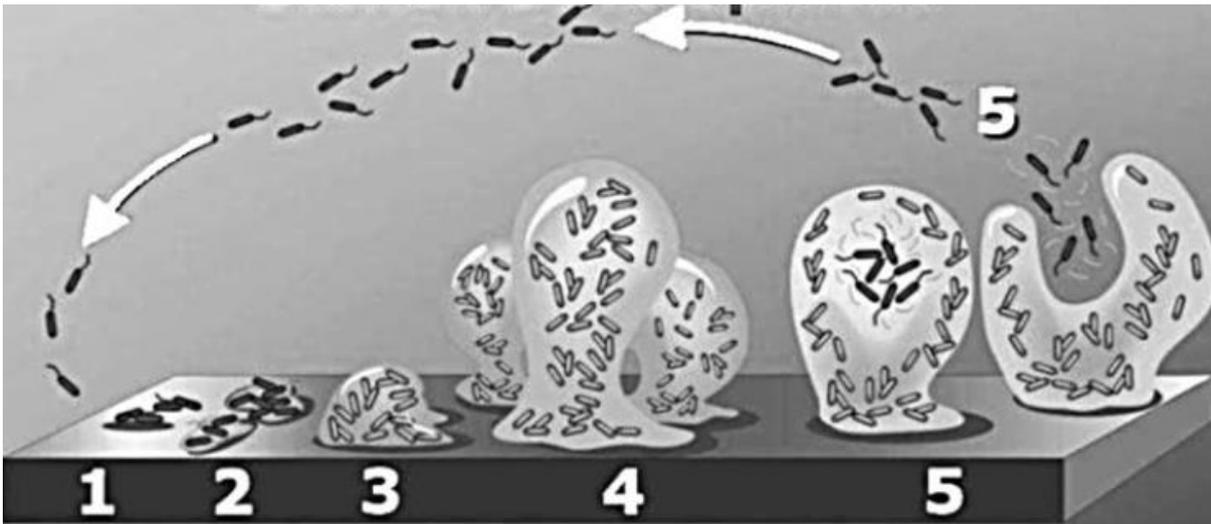


Figura 1. Ciclo de vida de um biofilme bacteriano, compreendendo as fases de 1. adesão inicial reversível, 2. adesão irreversível, 3. proliferação, 4. maturação e 5. dispersão (Adaptado de STOODLEY et al., 2002).

Na etapa de fixação, inicialmente ocorre à adesão das células bacterianas a superfície de forma reversível. Componentes da superfície celular bacteriana, como pili e flagelo, são os responsáveis pela fixação inicial do agregado celular. Quando estes agregados aumentam seu tamanho e sua densidade, componentes extracelulares como proteínas, alginato, lipídios, DNA e polissacarídeos são secretados e, associados ao pili e ao flagelo, formam a matriz extracelular, também chamada de substância polimérica extracelular (SPE). A formação da matriz polimérica torna a fixação irreversível e confere ao biofilme estabilidade estrutural. A composição da matriz extracelular varia de acordo com as espécies bacterianas envolvidas no biofilme (FLEMMING et al., 2007).

Durante a fase de proliferação, as microcolônias ligadas irreversivelmente secretam mais moléculas sinalizadoras com a finalidade de aumentar o biofilme. A matriz formada através da secreção de substância polimérica extracelular é expandida e o biofilme amadurece. Nessa etapa são formados canais de água na matriz, como uma espécie de sistema circulatório que contribui para a homeostase do biofilme e para oxigenação e transporte de nutrientes (SHUNMUGAPERUMAL, 2010; WILKINS et al., 2014). No biofilme maduro, a proporção de matriz e células é de aproximadamente 70-95% e 30-5%, respectivamente (SHUNMUGAPERUMAL,

2010). No final do ciclo de vida do biofilme, uma parte das bactérias retorna ao fenótipo planctônico dispersando-se e torna-se capaz de colonizar outras superfícies e iniciar o processo de formação de um novo biofilme (WILKINS et al., 2014).

A resistência dos biofilmes a terapia com antimicrobianos é um processo complexo que envolve vários mecanismos associados (PIBALPAKDEE et al., 2012). Células bacterianas que crescem associadas a biofilmes são de 10 a 1000 vezes mais resistentes à terapia antimicrobiana do que as bactérias crescendo na forma planctônica (WILKINS et al., 2014). Segundo Belfield e colaboradores (2015) as concentrações mínimas inibitórias para a erradicação de biofilmes são cerca de 1000 vezes mais elevadas que as concentrações necessárias para os microrganismos planctônicos. Penetração lenta ou incompleta de antibióticos através da matriz polimérica, ambiente heterogêneo encontrado no interior do biofilme, baixa taxa de crescimento das células bacterianas e presença de células *persisters* são fatores que contribuem para a elevada resistência dos agregados celulares frente à terapia antimicrobiana (FUENTE NÚÑEZ et al., 2013).

A penetração lenta ou incompleta dos agentes antimicrobianos através da matriz polimérica contribui para a tolerância dos biofilmes aos antibióticos. Embora a matriz do biofilme não restrinja a difusão dos antibióticos em geral, a matriz atua como uma barreira na penetração de antimicrobianos que se ligam aos componentes da matriz (como alginato e DNA extracelular da matriz de biofilmes de *P. aeruginosa*) ou da membrana bacteriana (HENTZER et al, 2001; WALTER et al., 2003; CHIANG et al., 2013). Alguns antimicrobianos conseguem ultrapassar a matriz rapidamente enquanto outros penetram de maneira lenta e incompleta.

Em 2002, Stone e colaboradores avaliaram a penetração da tetraciclina em biofilmes de *Escherichia coli* uropatogênica. Através de metodologia *in vitro* baseada em fluorescência, pode-se determinar que a tetraciclina penetra rapidamente em biofilmes de *E. coli*. Jefferson e colaboradores (2005) estudaram *in vitro* a penetração da vancomicina em biofilmes de *S. aureus*, através da microscopia confocal de varredura a laser, e determinaram que a vancomicina penetra parcialmente em biofilmes desse microrganismo. A amoxicilina, associada ao ácido clavulânico, difunde-se rapidamente através de biofilmes de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Diferentemente ocorre com trimetoprima/sulfametoxazol que demonstram uma

penetração mais lenta nos mesmos biofilmes (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2007).

Em 2010, Singh e colaboradores elucidaram a influencia da penetração reduzida de antimicrobianos na resistência de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* aos antibióticos. A permeabilidade dos fármacos no biofilme foi determinada através de medidas do diâmetro das zonas de inibição. Os autores concluíram que a penetração de oxacilina, ceftaxima e vancomicina foi significativamente reduzida pelos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto a penetração da amicacina e ciprofloxacino não sofrem alteração frente aos biofilmes.

Tseng e colaboradores (2013) demonstraram, através de um estudo *in vitro*, que a tobramicina tem sua penetração reduzida em biofilmes de *P. aeruginosa*. Isto se deve ao fato da tobramicina, carregada positivamente, interagir com componentes da matriz como o alginato, carregados negativamente, afetando e reduzindo a penetração desse fármaco através do biofilme. Entretanto, estudos *in vivo* avaliando a penetração da tobramicina em biofilmes pulmonares de *P. aeruginosa* ainda não foram descritos na literatura.

Outro mecanismo envolvido na maior resistência dos biofilmes ao tratamento com antimicrobianos é o ambiente heterogêneo encontrado no interior dos biofilmes. Essa heterogeneidade está relacionada a condições de escassez de oxigênio e nutrientes nas camadas mais inferiores. Neste ambiente as células do biofilme passam a uma forma de crescimento lento. Células em crescimento lento são muito menos suscetíveis à terapia com fármacos que atuam na divisão e no metabolismo celular (SOTO, 2013). Essa diminuição da atividade metabólica explicaria a menor efetividade de antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, em condições de anaerobiose (CRAMTON et al., 2001; SHARMA et al., 2014).

A presença de uma subpopulação de células chamadas *persisters*, no interior do biofilme, também contribui para a resistência apresentada pelos biofilmes. Estas células são geneticamente idênticas às outras células da população, entretanto encontram-se em um estado de latência metabólica sobrevivendo à ação antimicrobiana. Essa subpopulação celular apresenta uma taxa de crescimento

extremamente lenta, sendo composta de células não mutantes (LEWIS, 2005; LEWIS, 2007).

A penetração deficiente dos antimicrobianos nessas comunidades, a reduzida taxa de crescimento das bactérias, a alteração do microambiente e a existência de uma subpopulação de células bacterianas tornam o biofilme difícil de tratar e erradicar (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). Dada a sua importância na patogênese, os biofilmes tornarem-se alvo para a terapêutica, na tentativa de se entender os mecanismos relacionados à resistência dos biofilmes aos antimicrobianos visando a otimização de terapias e o desenvolvimentos de novos fármacos (CHIANG et al., 2013; SHARMA et al., 2014).

O desenvolvimento de biofilmes desempenha um papel relevante em muitas infecções bacterianas, causando falhas no tratamento de infecções, tais como as relacionadas à pneumonia em pacientes fibrocísticos, as relacionadas ao uso de dispositivos médicos como próteses e cateteres, às endocardites, às infecções do trato urinário, à otite média e às feridas crônicas. (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um patógeno Gram-negativo oportunista, com formato de bacilo, aeróbico, que devido ao seu amplo genoma apresenta grande variabilidade metabólica e flexibilidade. É encontrada em ambientes como solo e água e frequentemente esta associado à bacteremia em pacientes com queimaduras, infecções em indivíduos com FC, infecções gastrintestinais, otites e infecções do trato urinário em pacientes sondados (IKENO et al., 2007; KOLTER, 2010). Apresenta uma grande capacidade de adaptação e elevado potencial para formar biofilmes causando infecções persistentes em pacientes imunocomprometidos (BJARNSHOLT et al, 2013).

A *P. aeruginosa* possui um grande número de genes reguladores e genes envolvidos no catabolismo de transporte, efluxo de compostos orgânicos e outros. O tamanho e a complexidade do seu genoma refletem na sua capacidade de

adaptação evolutiva que lhe permite prosperar em diversos ambientes e resistir ao efeito de uma ampla gama de antimicrobianos (STOVER et al., 2000; HOIBY et al., 2001). Essa bactéria possui características que contribuem para a sua capacidade de colonização, patogênese e persistência em infecções agudas e crônicas, que incluem a elevada resistência a agentes antimicrobianos, a capacidade de formação de biofilmes, a versatilidade metabólica, diversidade genética e seus fatores de virulência (WHITELEY; GREENBERG, 2001; WAGNER; IGLEWSKI, 2008). A *P. aeruginosa* é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono e nitrogênio e pode crescer em qualquer ambiente aeróbico ou anaeróbico utilizando outros receptores de elétrons. Esta bactéria é intrinsecamente resistente a diversas substâncias em parte devido ao seu sistema de efluxo (WHITELEY; GREENBERG, 2001). Os principais determinantes de virulência de infecções por este patógeno são fatores associados às células bacterianas, como flagelos, pili e lipopolissacarídeos, fatores secretados como elastase, proteases, fosfolipase A, formação de biofilme e *quorum sensing*, tornando as infecções desenvolvidas por este patógeno difícil de erradicar (WHITELEY; GREENBERG, 2001; SADIKOT et al., 2005; KIPNIS et al., 2006).

O sistema QS da *P. aeruginosa* é regulado a partir de dois tipos de moléculas sinalizadoras: N-acil-homoserina lactonas e 4-quinolonas (SINGH et al., 2000; SHARMA et al., 2014). Essas moléculas, quando em elevadas concentrações, indicam que a população bacteriana está aumentada e, assim, ao ligarem-se a receptores específicos, sinalizam a modulação da expressão de genes relacionados ao aumento da densidade celular e a produção de determinados fatores de virulência. O QS é importante no controle da produção de pioverdina e piochelina, envolvidas na formação dos biofilmes, e na prevenção do acúmulo de óxido nítrico, liberado durante respiração anaeróbia, que é tóxico para esse patógeno quando em altas concentrações (CIOFU et al., 2014).

A matriz polimérica extracelular dos biofilmes de *P. aeruginosa* é constituída principalmente de alginato (monômeros de ácido manurônico e ácido glurônico). Este polímero melhora a estrutura tridimensional do biofilme, previne a fagocitose por células do hospedeiro e liga-se a antibióticos catiônicos como aminoglicosídeos (BJARNSHOLT et al., 2008; CATALDI et al., 2014). A regulação da hidrólise do alginato mediante atividade enzimática do biofilme ocorre através de ativação genética, podendo causar a liberação das células da superfície do biofilme,

contribuindo para a sua dispersão (DONLAN, 2002). O segundo maior componente dos biofilmes de *P. aeruginosa* é o DNA extracelular, que atua na estabilização da matriz do biofilme, é liberado através dos mecanismos de sinalização célula-célula e também através de estruturas como pili e flagelo (SHARMA et al., 2014). A matriz dos biofilmes de *P. aeruginosa* também contém os polissacarídeos Pel e Psl. O polissacarídeo Psl é composto de manose, glicose e ramnose e facilita a interação entre as células bacterianas e entre as células e a superfície durante a formação do biofilme (MA et al., 2009). Pel é um polissacarídeo composto principalmente de glicose e desempenha importante função na ligação entre os componentes da matriz do biofilme (COULON et al., 2010).

3.3. Fibrose Cística

A fibrose cística é a infecção com formação de biofilmes mais clássica sendo que o principal patógeno formador de biofilme associado à FC é a *P. aeruginosa* (BJARNSHOLT et al., 2009). Nestes pacientes, a *P. aeruginosa* forma biofilmes resistentes e graves infecções (RYBTKE et al., 2011).

A FC, também conhecida como mucoviscidose, afeta um em cada 2000 recém-nascidos e cerca de 70 mil pessoas em todo o mundo (BELL et al., 2015). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a proporção de indivíduos acometidos pela doença é em torno de 1:7000 habitantes.

A FC é uma desordem genética, autossômica recessiva causada pela presença de uma mutação no cromossomo que transcreve a proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*). Essa proteína, reguladora de condutância transmembranar, se encontra na superfície epitelial das células da mucosa e é responsável pelo transporte de íons cloro. A atividade desta proteína é modulada por mecanismo de fosforilação do domínio regulatório, seguido de hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) que permite a abertura e o fechamento do canal, permitindo a passagem de íons cloro do espaço intracelular para o espaço extracelular. Com a mutação dessa proteína, o transporte de cloro passa a ser defeituoso, causando um acúmulo desses íons no espaço intracelular. Como consequência, ocorre a formação de um muco viscoso e denso no espaço

extracelular, que o sistema mucociliar não consegue eliminar. Com o *clearance* mucociliar deficiente, microrganismos inalados não são eliminados das vias aéreas e o acúmulo de muco torna o ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias (BOUCHER, 2004; HOEGGER et al., 2014). Essa deficiência do mecanismo de defesa das vias respiratórias leva ao recrutamento inicial de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e anticorpos (HOIBY et al., 2001; ARMSTRONG et al., 2005).

A FC afeta diversos órgãos como os das vias aéreas, pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e glândulas sudoríparas. Os sinais da FC pulmonar são muco denso e viscoso acumulado na via respiratória e infecção pulmonar, que desencadeia doença brônquica crônica e bronquiectasias (HOEGGER et al., 2014).

Desde a infância pacientes com FC sofrem com recorrentes infecções do trato respiratório, caracterizadas por inflamação com agregados de PMN. Apesar da intensa terapia com substâncias antimicrobianas, as infecções causadas por *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Achromobacter xylosoxidans* persistem e levam à insuficiência respiratória, transplante de pulmão ou morte do paciente (HOIBY; PRESSLER, 2006).

A *P. aeruginosa* é o agente mais importante e frequente na FC. Este patógeno acomete mais de 80% dos pacientes fibrocísticos sendo a principal causa de morbidade e mortalidade desses pacientes em decorrência de um ciclo de inflamação e infecção que leva a perda da função pulmonar, desencadeando insuficiência respiratória e morte (HEIJERMAN, 2005; *Cystic Fibrosis Foundation*, 2008; TRÉ-HARDY et al., 2009; *Cystic Fibrosis Foundation*, 2010). Além disto, é o patógeno Gram-negativo resistentes a múltiplos fármacos (MDR) que mais causa pneumonia em pacientes hospitalizados (GOOSSENS, 2003).

Na FC, as vias aéreas infectadas são dominadas por *P. aeruginosa* crescendo de forma densa. Os agregados bacterianos estão envoltos por um grande número de neutrófilos (BJARNSHOLT et al., 2008). Também estão presentes algumas bactérias planctônicas que são rapidamente fagocitadas pelos neutrófilos (BJARNSHOLT et al., 2009; KOLPEN et al., 2010). Esse microrganismo tem a capacidade de se adaptar a zona respiratória e de resistir aos mecanismos de

defesa inata e adaptativa do hospedeiro, através da formação de biofilmes, sobrevivendo assim por longos períodos. A formação de biofilmes é o maior mecanismo de defesa dessa bactéria nas condições da infecção pulmonar da FC e o mecanismo de defesa que apresenta maior importância clinicamente (HOIBY et al., 2010).

Os fenótipos mucóide e não-mucóide da *P. aeruginosa* apresentam diferenças na capacidade de formação de biofilme e na susceptibilidade aos antimicrobianos. Ambos os fenótipos são encontrados no pulmão de pacientes com FC. Cepas mucóides são caracterizadas pela elevada formação de biofilme e o componente principal da matriz polimérica desses é o alginato, diferente das cepas não-mucóides, que apresentam uma menor formação de biofilme, sendo que a matriz polimérica desses apresenta menor quantidade de alginato. O fenótipo não-mucóide é o fenótipo ambiental predominante, estando envolvido na colonização inicial de pacientes com FC. As cepas PA14 e PAO1 são as principais cepas não-mucóides de *P. aeruginosa* e apresentam uma elevada virulência em comparação às cepas mucóides. Em condições aeróbicas, ocorre a conversão do fenótipo não mucóide para o fenótipo mucóide. Este processo é caracterizado por um aumento na produção do polissacarídeo alginato levando a formação de colônias mucóides e o estabelecimento da infecção pulmonar no trato respiratório (WOZNIAK et al., 2003; BRAGONZI et al., 2005).

A terapia utilizada para tratar pneumonia causada por *P. aeruginosa* é um dos maiores desafios da terapêutica (DRUSANO et al., 2011). Fluorquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos são as três principais classes de antimicrobianos usadas no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (ELKHATIB et al., 2008).

3.4. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos têm sido utilizados no tratamento de infecções bacterianas crônicas do pulmão e trato urinário. Essa classe de antimicrobianos é especialmente útil e potente para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* (KIRST & MARINELLI, 2014). O

mecanismo de ação desses fármacos bactericidas baseia-se na interrupção da síntese de proteínas bacterianas atuando na subunidade 30S do ribossomo procariótico. Para chegar ao local de ação os aminoglicosídeos ligam-se à parede celular bacteriana, sendo transportados ativamente para o citosol (MANDELL et al., 2010).

Os aminoglicosídeos podem ser utilizados como monoterapia ou associados a outras classes de fármacos. Devido ao baixo custo e à baixa resistência desencadeada, são utilizados em monoterapia para tratamento de infecções causadas por patógenos Gram-negativos que são resistentes a fármacos menos tóxicos (FREUNDLICH et al., 2007; TORFOSS et al.; 2007; STABELL et al., 2008). Devido ao sinergismo, podem ser utilizados em combinação com β -lactâmicos em pacientes com sepse desencadeada por microrganismos Gram-negativos. Os aminoglicosídeos também podem ser utilizados associados a outras classes de antimicrobianos para o tratamento de infecções Gram-positivas, como em caso de endocardite bacteriana.

A significativa toxicidade clínica dos aminoglicosídeos inclui ototoxicidade, nefrotoxicidade e, em alguns casos, toxicidade neuromuscular (TURNIDGE, 2003; BURTON et al., 2006). Com o aumento do número de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, tem-se observado o ressurgimento do uso dos aminoglicosídeos, apesar da toxicidade apresentada (DÖRING et al., 2012).

Os três aminoglicosídeos parenterais mais comumente utilizados são: gentamicina, tobramicina e amicacina. Os aminoglicosídeos são administrados através de via inalatória por nebulização (tobramicina), intraperitoneal e intraventricular (gentamicina).

3.5. Tobramicina

3.5.1. Descrição

Tobramicina (Figura 2) é um aminoglicosídeo produzido pelo microrganismo *Streptomyces tenebrarius* conhecido pelo nome químico de 4S,5S,6R(-4-amino-2-[[[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[[[(2R,3R,5S,6R)-3-amino-6-(aminomethyl)-5-

hidroxioxan-2-il]oxi}-2hidroxiciclohexil]-6- (hidroximetil)oxano-3,5-diol. Sua forma molecular é $C_{18}H_{37}N_5O_9$ e sua massa molecular é 467,51 g/mol. Apresenta o registro no *Chemical Abstracts* (CAS) sob o número 32986-56-4 (DRUG BANK, 2016).

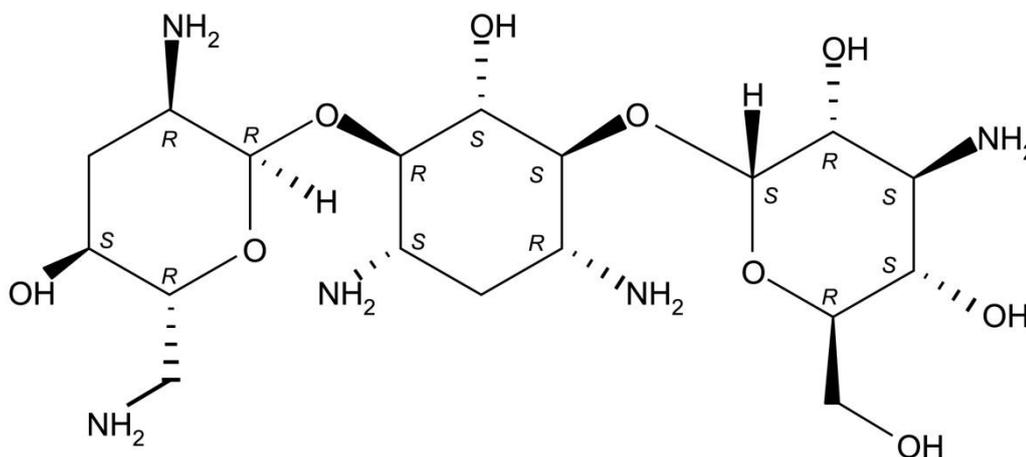


Figura 2. Estrutura química da tobramicina.

3.5.2. Uso Clínico

A tobramicina apresenta um amplo espectro de atividade contra os estafilococos, em especial *S. aureus* e *S. epidermidis*, todos os estreptococos, incluindo *S. pneumoniae*. Também é ativa contra muitos bacilos Gram-negativos aeróbios e facultativos, incluindo Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (CANTON et al., 2005; MOSKOWITZ et al., 2008).

Similarmente a todos os aminoglicosídeos, a tobramicina necessita de um ambiente aeróbico para exercer seu efeito, sendo ineficaz contra patógenos anaeróbicos. A tobramicina pode ser utilizada para o tratamento de infecções em diversos locais do organismo, incluindo infecções do trato urinário devido a sua elevada concentração urinária. Entretanto, o uso da tobramicina no tratamento de infecções do sistema nervoso central não é recomendado em virtude de sua limitada penetração nesse local. Em infecções com susceptibilidade relatada e dificuldade de erradicação, a tobramicina pode ser utilizada como parte de uma associação

medicamentosa em decorrência de sua rápida ação bactericida (REYES et al., 2014).

A tobramicina, administrada por via intravenosa ou na forma de aerossol, é o aminoglicosídeo mais indicado para tratamento de infecções pulmonares crônicas causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC (MOSKOWITZ et al., 2008; FLUME et al., 2009). A administração intravenosa da tobramicina é indicada para o manejo de exacerbações pulmonares aguda da FC, para controlar infecções crônicas e para erradicar *P. aeruginosa* após aquisição recente (FLUME et al., 2009).

Em estudo realizado por Anderson e colaboradores (2013), avaliou-se a efetividade da tobramicina para romper biofilmes de *P. aeruginosa* pré-formado e inibir a formação dos mesmos. O crescimento do biofilme foi realizado em cultura de células do trato respiratório de pacientes com FC, sendo o biofilme exposto ao fármaco por 16 h. Observou-se uma redução nas unidades formadoras de colônias por mL de *P. aeruginosa* de 4×10^8 , quando o mesmo foi tratado com tobramicina na concentração 256 mg/L. Em relação a inibição da formação de biofilmes, 16 h após a inoculação de biofilme com tobramicina, observou-se completa inibição do crescimento dos biofilmes com tobramicina na concentração 64 mg/L.

3.5.3. Aspectos Farmacocinéticos

A tobramicina é um fármaco pouco absorvido pelo trato gastrointestinal e rapidamente absorvido após administração intramuscular. Após a administração parenteral, não sofre processo de metabolização e é eliminada de forma inalterada através da urina. A meia-vida sérica em indivíduos saudáveis é de aproximadamente 2 horas e sua ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10% (DRUG BANK, 2016).

Em 2010, De Leo e colaboradores avaliaram a influência do estado alimentado e jejum na farmacocinética da tobramicina administrada na dose de 10 mg/kg pela via oral a camundongos. Os dados obtidos foram comparados com a farmacocinética da tobramicina após administração i.v. No estado alimentado a

concentração máxima alcançada foi de $0,33 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ em 15 minutos. A meia-vida determinada foi de 41,61 min e a ASC_{0-3h} foi de $16,43 \pm 1,26 \mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$. No estado de jejum, a concentração máxima alcançada foi de $7,8 \pm 0,95 \mu\text{g/mL}$ no tempo de 15 min, a meia-vida foi de 21,97 min e a ASC_{0-3h} foi de $423,68 \pm 24,23 \mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$. Os resultados demonstram uma maior absorção do fármaco no estado de jejum em comparação a absorção no estado alimentado.

Cavalli e colaboradores (2000) avaliaram a absorção da tobramicina em nanoesferas lipídicas sólidas (NLS) administradas a ratos pela via duodenal. Os resultados foram comparados com os obtidos através da administração das NLS de tobramicina através da via i.v. Uma solução controle de tobramicina foi utilizada pela mesma via. Os resultados demonstram que a tobramicina em solução não é absorvida pela via intestinal, enquanto a tobramicina na forma de NLS apresentou elevada absorção. A tobramicina na forma de NLS administrada pela via i.v. apresentou um elevado tempo de circulação em comparação à tobramicina em solução administrada pela mesma via.

A posologia da tobramicina para adultos com a função renal normal é de 3 a 5 mg/kg/dia, dividida em três doses diárias, durante sete ou dez dias. No caso de endocardite, a dose indicada para adultos é de 1 mg/kg a cada oito horas, administrada pela via intravenosa. Para o tratamento de fibrose cística em adultos, o esquema posológico indicado é 2,5 mg/kg a cada seis horas.

Em pacientes com a função renal normal, o volume de distribuição da tobramicina é de 0,25 L/Kg (0,1 – 0,5 L/kg). Em pacientes fibrocísticos, o volume de distribuição da tobramicina é de aproximadamente 0,35 L/kg devido ao aumento de líquido extracelular em decorrência do processo infeccioso.

A tobramicina é eliminada quase totalmente na forma inalterada pela urina, sendo a velocidade de eliminação constante similar ao *clearance* da creatinina. A equação utilizada para estimar a taxa de eliminação dos aminoglicosídeos em relação ao *clearance* da creatinina é (BAUER, 2008):

$$K_e \text{ (h}^{-1}\text{)} = 0,00293 \cdot (\text{CrCl}) + 0,014 \quad \text{Eq. 1}$$

onde K_e (h^{-1}) é a constante de velocidade de eliminação renal e CrCl (mL/min) é o *clearance* da creatinina.

O uso de concentrações plasmáticas totais de antimicrobianos e sua comparação à Concentração Inibitória Mínima (CIM) do microrganismo de interesse visando à previsão de desfechos clínicos das infecções é questionável, considerando-se que as concentrações plasmáticas nem sempre correspondem aos seus níveis teciduais. Desta forma, torna-se necessário o uso de técnicas que permitam determinar as concentrações livres do fármaco diretamente no tecido infectado. Para isto, faz-se uso da técnica de microdiálise.

O estudo de penetração tecidual em tecido infectado de humanos é restrito. Desse modo, modelos de infecção experimental em animais têm sido utilizados com sucesso também em estudos de microdiálise (ARAUJO et al., 2008; ARAUJO et al., 2011; AZEREDO et al., 2012).

3.6. Modelos Animais de Pneumonia

Modelos animais de infecção são ferramentas muito úteis uma vez que eles proporcionam informações sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo infeccioso, em um ambiente controlado, permitindo assim uma análise precisa da interação causa-efeito entre hospedeiro e patógeno (SANDE; ZAK, 1999; ANDES, 2003). Além disso, após a validação, esses modelos podem ser aplicados para a investigação farmacocinética, permitindo comparações entre a distribuição tecidual do fármaco em tecidos infectados e em animais saudáveis (MARCHAND et al., 2005; DAHYOT et al., 2006).

Yan e colaboradores (2008) desenvolveram um modelo animal de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* (cepa PAO579) utilizando *beads* de alginato inoculados em ratos Wistar a fim de avaliar o efeito patogênico do biofilme. Os resultados demonstram que a infecção com formação de biofilme é mais resistente à terapia antimicrobiana e as defesas do hospedeiro comparada à infecção com bactéria planctônica.

Em 2005, Hoffmann e colaboradores desenvolveram um modelo de infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* sem a incorporação da bactéria em *beads* de alginato. Neste modelo, a cepa NH57388A, super produtora de alginato, foi administrada intratraquealmente na forma de suspensão, através de traqueostomia, a camundongos e foi possível o estabelecimento da infecção.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* formadora de biofilme (cepa mucoide ATCC 27853) utilizando *beads* de alginato. Essas estruturas impedem o *clearance* mecânico da bactéria tornando possível o estabelecimento da infecção. A *P. aeruginosa* incorporada aos *beads* de alginato foi administrada em ratos Wistar anestesiados através da via intratraqueal. Com esse modelo foi possível estabelecer a infecção pulmonar crônica com formação de biofilme por até 14 dias (BERNARDI et al., 2014), sendo o modelo utilizado para avaliar a influência da infecção pulmonar com formação de biofilme na penetração da fluorquinolona ciprofloxacino.

Entretanto, devido ao fato da tobramicina interagir ionicamente com o alginato presente nos *beads*, levando a redução da penetração nos biofilmes, faz-se necessário o desenvolvimento de um novo modelo de infecção sem a incorporação da bactéria em estruturas de alginato.

3.7. Microdiálise

A MD é uma ferramenta específica para amostrar compostos endógenos e exógenos no espaço extracelular, permitindo a determinação das concentrações livres do analito no líquido intersticial do tecido sob investigação (DHANINI et al., 2010). Essa técnica consiste na introdução de uma sonda (Figura 3) no tecido estudado, sendo esta continuamente irrigada com líquido de perfusão isosmótico. Na porção terminal desta sonda, que fica em contato direto com o tecido, há uma membrana semipermeável que funciona como um filtro, impedindo a passagem de moléculas maiores que seu *cut off* 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 sonda é chamado de dialisado e está pronto para ser utilizado para quantificação do composto de interesse, sem necessidade de processamento prévio da amostra (BRUNNER et al., 2005; CHAURASIA et al., 2007).

Como a irrigação da sonda com o líquido de perfusão é contínua, a membrana semipermeável é mantida constantemente em condição *sink*. Desta maneira, o equilíbrio de difusão nunca é alcançado, e as concentrações determinadas no dialisado sempre serão menores do que os valores reais do analito no líquido intersticial, levando à necessidade de determinar-se a recuperação relativa (RR) da sonda, que expressa à razão entre a concentração medida e a concentração real no tecido investigado (PLOCK; KLOFT, 2005).

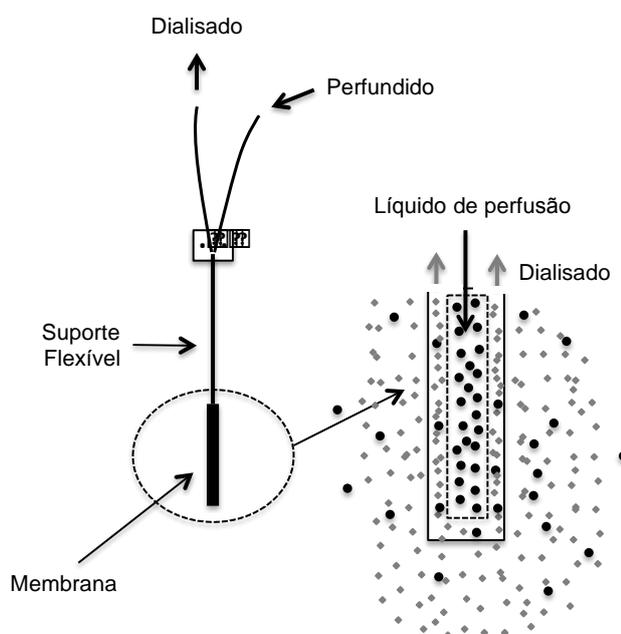


Figura 3. Sonda de microdialíse de formato concêntrico. O detalhe da membrana mostra a difusão do líquido de perfusão (círculos) e do analito (losangos) entre o meio extracelular e a sonda (Adaptado de CHAURASIA et al., 2007).

A MD é uma técnica bem estabelecida e amplamente utilizada para determinação de perfis de concentrações livres teciduais de diversos agentes antimicrobianos, incluindo quinolonas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, fosfomicina, rifampicina e ácido fusídico em diversos tecidos e órgãos, tais como cérebro, pulmão, coração, bile, osso, olhos e sangue em animais de laboratório e em voluntários humanos e pacientes (JOUKHADAR et al., 2001). Nosso grupo de pesquisa vem utilizando essa técnica para avaliar a penetração de

antimicrobianos e antifúngicos em diferentes órgãos/tecidos: a penetração muscular do norfloxacino (FREDDO et al., 2002); a penetração pulmonar e muscular do gatifloxacino (TASSO et al., 2008); a penetração pulmonar e prostática do levofloxacino (HURTADO et al., 2014a; ZIMMERMANN et al., 2015) e a penetração prostática do moxifloxacino (HURTADO et al., 2014b).

Essa técnica, além de ser utilizada para determinação de concentrações livres teciduais de fármacos, também permite comparar a penetração de antimicrobianos em tecidos infectados e sadios, possibilitando investigar a influência do processo inflamatório, que ocorre no local da infecção, na distribuição tecidual do fármaco (DHANANI et al, 2010). O processo infeccioso pode reduzir, aumentar ou não acusar alteração nas concentrações livres teciduais de antimicrobianos e antifúngicos.

Em 2011, mostramos, utilizando microdiálise, que as concentrações livres de piperacilina (60, 120 e 240 mg/kg i.v. *bolus*) determinadas por microdiálise em miosite experimental por *E. coli* na coxa de ratos Wistar (*tight infection model*) foram 30% menores do que as concentrações determinadas em tecido equivalente sadio (ARAUJO et al., 2011). Em 2012 demonstramos que a infecção renal por *Candida albicans* não afeta as concentrações livres teciduais do antifúngico fluconazol (10 mg/kg, i.v. *bolus* e 50 mg/kg p.o.) (AZEREDO et al., 2012). O mesmo já havíamos demonstrado para o antifúngico voriconazol (ARAUJO et al., 2008), ambos utilizados para o tratamento de candidíase sistêmica.

Gonzalez e colaboradores (2013) utilizaram a técnica de microdiálise para avaliar as concentrações livres de azitromicina no tecido muscular de ratos infectados com *S. aureus*. Foi observado um aumento da exposição da azitromicina no tecido infectado em comparação com o tecido sadio, uma vez que a azitromicina atua nos macrófagos, que aumentam após a inoculação tecidual.

Os resultados obtidos por Gonzalez e colaboradores (2013) e Araújo e colaboradores (2011) demonstram o impacto da infecção nas concentrações livres (ativas) dos fármacos na biofase. Ao mesmo tempo, fica evidente que não há como prever a alteração das concentrações livres intersticiais de fármacos devido à infecção, sendo necessária a investigação experimental de cada fármaco no tecido infectado de interesse.

Na literatura, há somente um relato de utilização da microdiálise para avaliar concentrações livres pulmonares da tobramicina. O estudo foi conduzido por Eisenberg e colaboradores (1993) e avaliou a farmacocinética dos aminoglicosídeos

gentamicina e tobramicina no fluido epitelial pulmonar de ratos sadios após administração de 20 mg/kg i.v. *bolus* de cada fármaco. Através da microdiálise foi possível a determinação do fator de penetração médio dos aminoglicosídeos no fluido pulmonar ($ASC_{livre,pulmão}/ASC_{total,plasma}$), sendo que a tobramicina apresentou um fator de penetração de $0,56 \pm 0,09$ e a gentamicina de $0,36 \pm 0,06$.

CAPÍTULO 1

**Application of a LC-MS/MS method for evaluating
lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis**

Application of a LC-MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis

Bernardi, P.M.^{a,b}; Barreto, F.^c; Dalla Costa, T.^{a,b}

^aPharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bBioanalytical Drugs Centre, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

O texto completo do Capítulo 1, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 56 – 76 foi suprimido por tratar-se de um manuscrito a ser submetido para publicação em um periódico científico. O resumo do Capítulo 1 é apresentado na página seguinte.

Abstract

A bioanalytical LC-MS/MS method was developed and validated to determine tobramycin in plasma and lung microdialysate samples. Tobramycin was separated using a C₁₈ column and a mobile phase consisting of water and acetonitrile, both with 10 mM of heptafluorobutyric acid, eluted as gradient. Apramycin was used as internal standard (IS) for plasma samples. Drugs were monitored using electrospray ionization operating on positive mode (ESI+) monitoring the transitions 468.2 > 163.3 *m/z* for tobramycin and 540.3 > 217.2 *m/z* for IS. The method showed linearity in the concentration range of 0.1 – 50 µg·mL⁻¹ for microdialysate and 0.5 – 100 µg·mL⁻¹ for plasma with coefficients of determination ≥ 0.991. The inter- and intra-day precision, the accuracy and the stability of the drug in different conditions were in accordance with the limits established by US Food and Drug Administration guideline. The concentrations of tobramycin in plasma and lung microdialysate, determined using CMA/20 probes and a Ringer solution at a flow rate of 1 µL·min⁻¹, were evaluated in healthy Wistar rats after a 10 mg·kg⁻¹ i.v. *bolus* dose. Samples were harvested up to 12 h post-dose. Before animal's experiments, probe recovery was determined by dialysis and retrodialysis *in vitro* and by retrodialysis *in vivo*. Probes recovery was independent of drug concentration and method of determination. *In vivo* recovery was 27.74 ± 7.70 %. Pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental analysis using the software Phoenix®. The estimated area under the curve (AUC_{0-∞}) was 128 ± 19 µg·h·mL⁻¹ and 105 ± 12 µg·h·mL⁻¹ for plasma and lung, respectively. Tobramycin plasma clearance was 0.07 ± 0.01 L/h/kg and the volume of distribution was 0.49 ± 0.09 L/kg. Half-life in plasma was 4.4 ± 0.7 h and in lung, 4.2 ± 0.56 h. The free tissue/free plasma AUC_{0-∞} ratio was 0.94. This is the first study showing a validated method to quantify tobramycin in microdialysate samples and to evaluate the lung interstitial concentration of the drug.

Keywords: tobramycin, bioanalytical method validation, LC-MS/MS, tissue penetration, microdialysis, pre-clinical pharmacokinetics.

CAPÍTULO 2

Population pharmacokinetic modeling of plasma and tissue concentrations of tobramycin in healthy and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-forming infected Wistar rats

Population pharmacokinetic modeling of plasma and tissue concentration of tobramycin in healthy and *P. aeruginosa* biofilm-forming infected Wistar rats

Bernardi, P.M.^{a,b}; Torres, B.G.S.^{a,b}; Araújo, B.V.^{a,b}; Barreto, F.^c; Dalla Costa, T.^{a,b}

^aPharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bBioanalytical Drugs Centre, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

O texto completo do Capítulo 2, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 80 – 101 foi suprimido por tratar-se de um manuscrito a ser submetido para publicação em um periódico científico. O resumo do Capítulo 2 é apresentado na página seguinte.

Abstract

Objective: The present work aimed to evaluate the influence of *P. aeruginosa* biofilm infection on lung penetration of tobramycin (TOB) by microdialysis and to establish a population pharmacokinetic model (popPK) to describe free lung and total plasma concentrations simultaneously in healthy and infected rats.

Methods: To establish the *P. aeruginosa* (PA14) biofilm-forming pulmonary infection, anesthetized male Wistar rats (n=5) were intratracheally inoculated (10^9 CFU/mL). Seven days after inoculation, the animals received TOB $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. bolus dose. Blood and lung microdialysate (CMA 20 probes) samples were collected up to 12 h after dosing. Plasma and microdialysate samples were analyzed by LC-MS/MS validated method. Non-compartmental (NCA) analysis was carried out using the software Phoenix® and the population pharmacokinetic modeling was evaluated using the software Monolix® v.4.3.3.

Results: TOB plasma pharmacokinetics was not altered by infection, however, drug lung penetration factor was reduced from 0.94 in healthy to 0.25 in biofilm-forming infected animals. A two compartment popPK model described simultaneously plasma and free drug lung concentrations in healthy and pneumonic rats. The infection process used as categorical covariate showed to influence V_2 and k_{10} . The results indicate that free plasma levels are not a good surrogate because they overestimate free lung concentrations in pneumonic animals.

Conclusion: The infection with biofilm-forming *P. aeruginosa* reduces significantly the pulmonary penetration of TOB. The developed popPK model allows to predict TOB free concentration in infected lungs using total plasma data.

Keywords: Tobramycin, biofilm-forming *P. aeruginosa*, pneumonia animal model, microdialysis, popPK modeling.

4. DISCUSSÃO GERAL

Bactérias apresentam além da possível resistência intrínseca aos antimicrobianos, mecanismos de defesa frente à resposta imune do hospedeiro e a ação de antimicrobianos devido a formação de biofilmes. Esses mecanismos de defesa, associados ao crescimento da bactéria na forma de biofilme, contribuem no desenvolvimento de infecções crônicas e difíceis de tratar. Os biofilmes são responsáveis por 65% das infecções bacterianas, sendo a infecção pulmonar em pacientes com FC a mais prevalente (SOTO, 2013). A FC é caracterizada pelo acúmulo de um muco denso no pulmão dos pacientes favorecendo o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de pneumonia. O agente mais importante e frequente associado à pneumonia em pacientes fibrocísticos é a *P. aeruginosa* (Cystic Fibrosis Foundation, 2010). Uma vez estabelecidos os biofilmes de *P. aeruginosa*, os regimes terapêuticos usuais com antibióticos são incapazes de erradicar esta bactéria das vias aéreas de pacientes fibrocísticos (MOREAU-MARQUIS et al., 2008).

Diante dessa situação, para definir-se posologias mais eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias formadoras de biofilmes, o conhecimento da concentração livre (farmacologicamente ativa) de antimicrobianos no tecido infectado se torna ainda mais relevante.

Esse trabalho objetivou avaliar a influência do biofilme na penetração pulmonar da tobramicina em modelo de pneumonia por *P. aeruginosa* formadora de biofilme através da microdiálise.

Para atingir esse objetivo geral, inicialmente foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para quantificação da tobramicina em amostras de plasma e microdialisado utilizando a apramicina como padrão interno. A quantificação foi realizada através de cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM). A metodologia foi validada de acordo com as diretrizes do FDA, mostrando-se linear, precisa, exata, específica e sensível para quantificação da tobramicina nas amostras avaliadas. O método foi capaz de caracterizar os perfis plasmáticos e teciduais e não foi observada a presença de componentes endógenos e/ou metabólitos que pudessem prejudicar a quantificação do fármaco. A estabilidade da tobramicina em plasma e microdialisado também foi avaliada a fim de garantir a integridade do fármaco nas condições experimentais empregadas.

Para avaliar a influência do biofilme na penetração pulmonar da tobramicina, foi necessário o desenvolvimento de um modelo animal de infecção pulmonar com formação de biofilme em ratos Wistar. Para tanto utilizou-se a cepa não-mucoide de *P. aeruginosa* PA14 que foi administrada nos animais através da via intratraqueal. Essa cepa apresenta elevada virulência, favorecendo o estabelecimento da infecção pulmonar por até sete dias pós-inoculação.

Para a realização dos estudos de microdiálise foi necessário determinar a calibração das sondas em diferentes condições, *in vitro* e *in vivo*. Para a calibração *in vitro* foram empregadas as técnicas de diálise e retrodiálise. As recuperações relativas obtidas através das duas técnicas não apresentaram diferenças estatísticas significativas nas condições testadas. Os resultados demonstraram que a tobramicina não se liga à tubulação do sistema de microdiálise, sendo a recuperação relativa independente da concentração do fármaco. Os estudos *in vitro* permitiram determinar o fluxo de perfusão e o intervalo de coletas mais adequados para os estudos de microdiálise *in vivo*. A calibração *in vivo* foi realizada por retrodiálise, sendo semelhante para animais sadios ($27,7 \pm 7,7\%$) e infectados ($24,5 \pm 1,7\%$), indicando que a infecção não interfere no processo de difusão da tobramicina através da membrana semi-permeável da sonda de microdiálise. Essas recuperações médias foram utilizadas para calcular as reais concentrações teciduais da tobramicina nos experimentos de farmacocinética.

A ligação às proteínas plasmáticas da tobramicina também foi avaliada *in vitro* utilizando a técnica de microdiálise. Ligações médias às proteínas de $11,3 \pm 1,9\%$ e $10,9 \pm 2,4\%$ foram observadas no plasma de animais sadios e infectados, respectivamente. A ligação à proteína se mostrou independente da concentração da tobramicina e da presença do processo infeccioso, sendo utilizada para prever as concentrações plasmáticas livres do fármaco baseadas nas concentrações totais determinadas.

A avaliação da farmacocinética plasmática e pulmonar foi realizada em animais sadios e infectados após dose única i.v. *bolus* de 10 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por abordagem não-compartimental, utilizando o software Phoenix®, e modelagem populacional, utilizando o software Monolix®.

Através da microdiálise foi possível quantificar as concentrações livres teciduais da tobramicina no fluido intersticial pulmonar e determinar o fator de penetração pulmonar do fármaco. O fator de penetração determinado (0,94) permite indicar que a distribuição pulmonar da tobramicina ocorre através de difusão, não havendo transportadores de influxo e efluxo envolvidos nesse processo. Eisenberg et al. (1993) avaliaram a penetração da tobramicina no fluido epitelial pulmonar de ratos. O fator de penetração determinado neste estudo foi de 0,56, indicando que a penetração da tobramicina varia de acordo com a região pulmonar.

A análise não-compartimental dos dados de plasma mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros farmacocinéticos determinados para os animais sadios e infectados, indicando que a infecção pulmonar com formação de biofilme induzida intratraquealmente não altera a farmacocinética plasmática da tobramicina. Por outro lado, a exposição pulmonar ao fármaco foi reduzida em cerca de 70% nos animais com pneumonia por *P. aeruginosa* formadora de biofilme (ASC_{0-inf} de $105 \pm 12 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ em animais sadios e $32 \pm 17 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ em animais infectados), reduzindo o fator de penetração tecidual ($fT = ASC_{0-\infty, \text{pulmão}} / ASC_{0-\infty, \text{plasma}}$) de 0,94 para 0,25 devido a infecção. Essa reduzida penetração da tobramicina em biofilmes de *P. aeruginosa* pode ser parcialmente explicada pela ligação da tobramicina, positivamente carregada, aos componentes da matriz carregados negativamente, formando um complexo inativo (TSENG et al., 2013), que provavelmente não é coletado pela sonda de microdiálise. Contribuem também para essa reduzida penetração as alterações na fisiologia pulmonar causadas pela infecção e processo inflamatório local decorrente da mesma.

Foi utilizado um modelo populacional de dois compartimentos (popPK) para descrever os dados plasmáticos e teciduais da tobramicina em animais sadios e infectados. A escolha do modelo foi baseada em critérios estatísticos, correlação entre dados previstos e observados e ajuste dos perfis aos dados experimentais (VPCs). Os valores dos parâmetros farmacocinéticos (CL_{tot} , $ASC_{0-\infty}$ e Vd_{ss}) obtidos através da modelagem farmacocinética populacional foram semelhantes aos obtidos através da abordagem não-compartimental, demonstrando que o modelo utilizado foi adequado para descrever os dados experimentais.

O modelo desenvolvido permitiu caracterizar a distribuição da tobramicina no plasma e no pulmão de animais sadios e infectados. Os resultados da modelagem demonstram que a volume do compartimento periférico (V_2) e a constante de eliminação do compartimento central (k_{10}) são alterados pelo processo infeccioso. Através da inclusão da infecção como uma variável categórica no modelo, as concentrações teciduais livres da tobramicina no tecido infectado puderam ser corretamente previstas pelo modelo, uma vez que a concentrações livres plasmáticas superestimam as concentrações livres pulmonares observadas na pneumonia com bactéria formadora de biofilme.

Os resultados dessa dissertação descrevem pela primeira vez a influência da infecção com *P. aeruginosa* formadora de biofilme na penetração pulmonar da tobramicina utilizando a microdiálise, os achados apontam a necessidade de rever a posologia para o tratamento eficaz deste tipo de infecção, uma vez que esta baseada nas concentrações plasmáticas totais do fármaco, superestimando as concentrações farmacologicamente ativas na biofase.

5. CONCLUSÕES

- Uma metodologia analítica por CLAE-EM/EM foi desenvolvida e validada e conseguiu caracterizar adequadamente os perfis plasmáticos e teciduais pulmonares da tobramicina. Os parâmetros validados estão dentro dos limites estabelecidos pelo FDA.
- O modelo de infecção desenvolvido com a cepa de *P. aeruginosa* não-mucoide PA14 foi capaz de manter os ratos Wistar infectados por até sete dias após a inoculação, permitindo a realização dos experimentos de farmacocinética.
- A pneumonia por *P. aeruginosa* formadora de biofilme, cepa PA14, não alterou a ligação da tobramicina às proteínas plasmáticas de ratos Wistar em comparação à ligação observada no plasma de animais saudáveis.
- Os perfis plasmáticos obtidos após a administração de 10 mg/kg de tobramicina em animais saudáveis e infectados foram semelhantes, demonstrando que a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* formadora de biofilme (cepa PA14) não altera a disposição plasmática do fármaco.
- A exposição pulmonar à tobramicina foi reduzida em cerca de 70% devido à pneumonia por *P. aeruginosa* formadora de biofilme não-mucoide (cepa PA14) em comparação com os animais saudáveis.
- O modelo popPK de dois compartimentos se mostrou adequado para descrever simultaneamente o perfil plasmático e tecidual da tobramicina após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos saudáveis e infectados.
- O modelo popPK possibilitou descrever a influência da infecção na distribuição pulmonar da tobramicina e foi capaz de prever corretamente as concentrações teciduais livres nos animais infectados.
- O conjunto de dados obtidos neste estudo permite concluir que a infecção pulmonar com formação de biofilmes não altera a farmacocinética plasmática da tobramicina, entretanto, reduz significativamente a penetração pulmonar do fármaco, a taxa de eliminação da tobramicina a partir do compartimento central e o volume do compartimento periférico,

demonstrando a necessidade de rever a posologia indicada para o tratamento eficaz deste tipo de infecção, que é atualmente baseada nas concentrações plasmáticas totais do fármaco.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

ANDERSON, G.G.; KENNEY, T.F.; MACLEO, D.L.; HENIG, N.R.; O'TOOLE, G.A. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomycin/tobramycin antibiotic combination. **Pathog Dis**, v. 67, p. 39–45, 2013.

ANDES, D. *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1179-1186, 2003.

ARAUJO, B.V.; DINIZ, A.; PALMA, E.C.; BUFFE, C.; DALLA COSTA, T. PK-PD modeling of b-lactam antibiotics: *In vitro* or *in vivo* models? **J Antibiot**, v. 64, p. 439-446, 2011.

ARAUJO, B.V.; SILVA, C.F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine the free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **J Pharm Biomed Anal**, v. 47, p. 876–881, 2008.

ARMSTRONG, D.S.; HOOK, S.M.; JAMSEN, K.M.; NIXON, G.M.; CARZINO, R.; CARLIN, J.B.; ROBERTSON, C.F.; GRIMWOOD, K. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. **Pediatr Pulmonol**, v. 40, p. 500–510, 2005.

AZEREDO, F.J.; DE ARAUJO, B.V.; HAAS, S.E.; TORRES, B.; PIGATOO, M.; DE ANDRADE, C.; DALLA COSTA, T. Comparison of fluconazole renal penetration levels in healthy and *Candida albicans*-infected Wistar rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 5852-5857, 2012.

BAUER, L.A. **Applied Clinical Pharmacokinetics**. 2nd edition. Chapter 4: The aminoglycoside antibiotics. p. 97 – 298, 2008.

BELFIELD, K.; BAYSTON, R.; BIRCHALL, J.P.; DANIEL, M. Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review. **Int J Pediat Otorhinolaryngol**, v. 79, n. 3, p. 296–300, 2015.

BELL, S.C.; DE, B.K.; AMARAL, M.D. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. **Pharmacol Ther**, v. 145, p. 19-35, 2015.

BHARDWAJ, A.K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, p. 68-83, 2013.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed? **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 791–808, 2013.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P.O.; FIANDACA, M.J.; PEDERSEN, J.; HANSEN, C.T.; ANDERSEN, C.B.; PRESSLER, T.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.

BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP-MOLLER, K.; JENSEN, P.O.; MADSEN, K.G.; PHIPPS, R.; KROGFELT, K.; HOIBY, N.; DR. MED, GIVSKOV, M.; DR. TECHN.

Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 1, p. 2–10, 2008.

BERNARDI, P.M.; TORRES, B.G.S.; MACEDO, A.; DALLA COSTA, T. Evaluation of a chronic lung infection model in Wistar rats after intranasal and intratracheal inoculation. II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, Búzios (BRA), 2014.

BOUCHER, R.C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. **Eur Respir J**, v. 23, p. 146-158, 2004.

BRAGONZI, A.; WORLITZSCH, D.; PIER, G.B.; TIMPERT, P.; ULRICH, M.; HENTZER, M.; ANDERSON, J.B.; GIVSKOV, M.; CONESE, M.; DÖRING, G. Nonmucoïd *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. **J Infect Dis**, v. 192, p. 410-419, 2005.

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

BURTON, M.E.; SHAW, L.M.; SCHENTAG, J.J.; EVANS, W.E. eds. Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Fourth edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.

CANTON, R.; COBOS, N.; DE GRACIA, J.; BAQUERO, F.; HONORATO, J.; GARTNET, S.; ALVAREZ, A.; SALCEDO, A.; OLIVER, A.; GARCÍA-QUETGLAS, E. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p. 690-703, 2005.

CAVALLI, R.; ZARA, G.; CAPUTO, O.; BARGONI, A.; FUNDAR, A.; GASCO, M.R. Transmucosal transporto of tobramycin incorporated in SLN after duodenal administration to rats. Part I – A pharmacokinetic study. **Pharmacol Res**, v. 42, p. 541-545, 2000.

CATALDI, M.; SBLENDORIO, V.; LEO, A.; PIAZZA, O. Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? **Pulm Pharmacol Ther**, v. 28, n. 2, p. 98–108, 2014.

CHAURASIA, C. S.; MULLER, M.; BASHAW, D.E.; et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. **Pharmaceut Res**, v. 24, n. 5, p. 1014-1025, 2007.

CHIANG, W.C.; NILSSON, M.; JENSEN, P.O.; HOIBY, N.; NIELSEN, T.E.; GIVSKOV, M.; TOLKER – NIELSEN, T. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, p. 2352-2361, 2013.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T.; JENSEN, P.O.; WANG, H.; HOIBY, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 85, p. 7-23, 2014.

COULON, H.; VINOGRADOV, E.; FILLOUX, A.; SADOVSKAY, I. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Plos One**, v. 5, n. 12, 2010.

CRAMTON, S. E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4079–4085, 2001.

Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: 2007 annual data report; 2008.

Cystic Fibrosis Foundation. US Cystic Fibrosis Foundation Annual Registry Report 2009. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2010.

DAHYOT, C., MARCHAND, S.; PESSINI, G. L.; PARIAT, C.; DEBAENE, B.; COUET, W.; MIMOZ, O. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of *Acinetobacter baumannii* infected rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 6, p. 2265-2267, 2006.

DE LEO, G.; DI TORO, N.; DECORTI, G.; MALUSA, N.; VENTURA, A.; NOT, T. Fasting increases tobramycin oral absorption in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 4, p. 1644–1646, 2010.

DHANANI, J.; ROBERTS, J. A.; CHEWD, M.; LIPMAN, J.; BOOTS, R.J.; PETERSONE, D.L.; FRASER, J.F. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, p. 491-500, 2010.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DÖRING, G.; FLUME, P.; HEIJERMAN, H.; ELBORN, J.S. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. **J Cyst Fibros**, v. 11, p. 461-479, 2012.

DRUGBANK. Tobramycin. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00684>. Acesso em 17/01/2016.

DRUSANO, G.L.; LODISE, T.P.; MELNICK, D.; LIU, W.; OLIVER, A.; MENA, A.; VAN SCOY, B.; LOUIE, A. Meropenem penetration into epithelial lining fluid in mice and men and delineation of exposure targets. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 3406–3412, 2011.

EISENBERG, E. J.; CONZENTINO, P.; EICKHOFF, W. M.; CUNDY, K. C. Cundy. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. **JPM**, v. 29, n. 2, p. 93-98, 1993.

ELKHATIB, W. F.; HAYNES, V. L.; NOREDDIN, A. M. Unexpected induction of resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to fluoroquinolones by diltiazem: A new perspective of microbiological drug—drug interaction. **J Infect Public Health**, v.1, v. 105-112, 2008.

FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **J Bacteriol**, v. 189, p, 7945-7947, 2007.

FLUME, P.A.; MOGAYZEL, P.J.; ROBINSON, K.A.; GOSS, C.H.; ROSENBLATT, R.L.; KUHN, R.J.; MARSHALL, B.C. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, p. 802-808, 2009.

FREDDO, R.J.; DALLA COSTA, T. Determination of norfloxacin free interstitial levels in skeletal muscle by microdialysis. **J Pharm Sci**, v. 91, n. 11, p. 2433 – 2440, 2002.

FREUNDLICH, M.; THOMSEN, R.W.; PEDERSEN, L.; WEST, H.; SCHONHEYDER, H.C. Aminoglycoside treatment and mortality after bacteremia in patients given appropriate empirical therapy. A Danish hospital based cohort study. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, 1115–1123, 2007.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, E.W.R. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Curr Opin Microbiol**, v.16, p. 580-589, 2013.

GONZALEZ, D.; SCHMIDT, S.; DERENDORF, H. Importance of relating efficacy measures to unbound drug concentrations for anti-infective agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n.2, p. 274-288, 2013.

GOOSSENS, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, p. 980-983, 2003.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

HEIJERMAN, H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. **J Cyst Fibros**, v. 4, p.3-5, 2005.

HENTZER, G.M.; TEITZEL, G.J.; BALZER, A.; HEYDORN, S.; MOLIN, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M.R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function, **J. Bacteriol**, v. 183, p. 5395–5401, 2001.

HOEGGER, M.J.; FISCHER, A.J.; MCMENIMEN, J.D.; OSTEDDGAARD, L.S.; TUCKER, A.J.; AWADALLA, M.A.; MONINGER, T.O.; MICHALSKI, A.S.; HOFFMAN, E.A.; ZABNER, J.; STOLTZ, D.A.; WELSH, M.J. Cystic fibrosis. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. **Science**, v. 345, p. 818–822, 2014.

HOFFMANN, N.; RASMUSSEN, T. B.; JENSEN, P.O.; STUB, C.; HENTZER, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O.; GIVSKOV, M.; JOHANSEN, H.K.; HOIBY, N. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infect Immun**, v.73, p. 2504-2514, 2005.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Ag**, v. 35, p. 322–332, 2010.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 1663–1674, 2010.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.J.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms . **Int J Oral Sci**, v. 3, n. 2, p. 55-65, 2011.

HOIBY, N.; JOHANSEN, H.K.; MOSER, C.; SONG, Z.; CIOFU, O.; KHARAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. **Microbes Infect**, v.3, p. 23–35, 2001.

HOIBY, N.; PRESSLER, T. Emerging pathogens in cystic fibrosis, in: A.K.Webb, F. Ratjen (Eds.), **European respiratory monograph in cystic fibrosis**, p. 66–78, 2006.

HURTADO, F.K.; WEBER, B.; DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G.; DALLA COSTA, T. Population pharmacokinetic modeling of the unbound levofloxacin concentrations in rat plasma and prostate tissue measured by microdialysis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 678–686, 2014a.

HURTADO, F.K.; LAUREANO, J.V.; LOCK, G.A.; DERENDORF, H.; DALLA COSTA, T. Enhanced penetration of moxifloxacin into rat prostate tissue evidenced by microdialysis. **Int J Antimicrob Ag**, v. 44, p. 327–333, 2014b.

IKENO, T.; FUKUDA, K.; OGAWA, M.; HONDA, M.; TANABE, T.; TANIGUCHI, H. Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 10, p. 929-938, 2007.

JEFFERSON, K. K.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2467–2473, 2005.

JOUKHADAR, C.; DERENDORF, H.; MULLER, M. Microdialysis: A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 57, p. 211-219, 2001.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med Mal Infect**, v. 36, p. 78-91, 2006.

KIRST, H.A.; MARINELLI, F. Aminoglycoside Antibiotics. **Antimicrobials Book**. Chapter 10, p. 193 – 209, 2014.

KOLPEN, M.; HANSEN, C.R.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; CHRISTENSEN, L.D.; GENNIP, M.; CIOFU, O.; MANDSBERG, L.; KHARAZMI, A.; DORING, G.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N.; JENSEN, P.O. Polymorphonuclear leukocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. **Thorax**, v. 65, p. 57–62, 2010.

KOLTER, R. Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. **Int Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2010.

LEID, J. G. Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses. **Microbe**, v. 4, n. 2, p. 66–70, 2009.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 267–274, 2005.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, p. 48-56, 2007.

LI, Y.H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensor**, v. 12, p. 2519-2538, 2012.

LIU, P.; DERENDORF, H. Antimicrobial tissue concentrations. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, p. 599-613, 2003.

MA, L.; JACKSON, K.D.; LANDRY, R.M.; PARSEK, M.R.; WOZNIAK, D.J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure. **J. Bacteriol**, v. 188, n. 23, p. 8213-8221, 2006.

MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/ Elsevier; 2010.

MARCHAND, S.; DAHYOY, C.; LAMARCHE, I.; MIMOZ, O.; COUET, W. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of noninfected rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2356–2361, 2005.

MATHEE, K., NARASIMHAM, G.; VALDES, C.; QIU, X.; MATEWISH, J.M.; KOEHRSEN, M.; ROKAS, A.; YANDAYA, C.N.; ENGELS, R.; ZENG, E.; OLAVARIETTA, R.; DOUD, M.; SMITH, R.S.; MONTGOMERY, P.; WHITE, J.R.; GODFREY, P.A.; KODIRA, C.; BIRREN, B.; GALAGAN, J.E.; LORU, S. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 105, p. 3100–3105, 2008.

MOGAYZEL, P.J.; NAURECKAS, E.T.; ROBINSON, K.A.; MUELLER, G.; HADJILIADIS, D.; HOAG, J.B.; LUBSCH, L.; HAZLE, L.; SABADOSA, K.; MARSHALL, B. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines - Chronic Medications for Maintenance of Lung Health. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 187, n. 7, p. 680–689, 2013.

MOREAU-MARQUIS, S.; STANTON, B. A.; O'TOLLE, G.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pul Pharmacol Ther**, v. 21, p. 595-599, 2008.

MOSKOWITZ, S.M.; SILVA, J.S.; MAYER-HAMBLETT, N.; PASTA, D.J.; MINK, D.R.; MABIE, J.A.; KONSTAN, M.W.; WAGENER, J.S. Shifting patterns of inhaled antibiotic use in cystic fibrosis. **Pediatr Pulm**, v. 43, p. 874–881, 2008.

MUNDER, A.; WOLBELING, F.; KERBER-MOMOT, T.; WEDEKIND, D.; BAUMANN, U.; GULBINS, E.; TUMMLER, B. Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. **Resp Res**, v. 12, p. 148-162, 2011.

MÜSKEN, M.; DI FIORE, S.; DOTSCHE, A.; FISCHER, R.; HAUSSLER, S. Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. **Microbiol**, v. 156, p. 431-441, 2010.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OLIVER, A.; MENA, A.; MACIA, M.D. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity: from acute to chronic infections, *In* F. BAQUERO et al. (ed.), Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens. **American Society for Microbiology**, p. 433-434, 2007.

PIBALPAKDEE, P.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TAWEECHASUPAPONG, S.; NIUMSUP, P.R. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 4, p. 356-359, 2012.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **Eur J Pharm Sci**, v. 25, p. 1-24, 2005.

REYES, M.P. ZHAO, J.J.; BUENSALIDO, J.A.L. Current Perspectives: Therapeutic Uses of Tobramycin. **J Pharmacovigilance**, v. 2, p. 1-5, 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; BALLESTA, S.; PASCUAL, A. Activity and penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Int J Antimicrob Ag**, v. 30, p. 366-368, 2007.

RYBTKE, M.T.; JENSEN, P.O.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 141-157, 2011.

SADIKOT, R.T.; BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W.; PRINCE, A.S. Pathogen-host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, p. 1209-1223, 2005.

SANDE, M.; ZAK, O. Handbook of Animal Models of Infection: Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy. **Academic Press**, USA, p. 113, 1999.

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, p. 1-7, 2014.

SHUNMUGAPERUMAL, T. Biofilm eradication and prevention: A pharmaceutical approach to medical device infections, 2010.

SHUSTER, M.; SEXTON, D.J.; DIGGLE, S.P.; GREENBERG, E.P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. **Annu Rev Microbiol**, v. 67, p. 43-63, 2013.

SINGH, P. K.; SCHAEFER, A.L.; PARSEK, M.R.; MONINGER, T.O.; WELSH, M.J.; GREENBERG, E.P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, p. 762–764, 2000.

SINGH, R.; RAY, P.; DAS, A.; SHARM, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 1955–1958, 2010.

SMITH, E. E.; BUCKLEY, D.G.; WU, Z.; SAENPHIMMACHALK, C.; HOFFMAN, L.R.; D'ARGENIO, D.A.; MILLER, S.; RAMSEY, B.M.; SPEERT, D.P.; MOSKOWITZ, S.M.; BURNS, J.L.; KAUL, R.; OLSON, M.V. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 8487-8492, 2006

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

STABELL, N.; NORDAL, E.; STENSVOLD, E.; GAMMELSRUD, K.W.; LUND, B.; TAXT, A.; BUHRING, F.; GREVE-ISDAHL, M.; FORNEBO, H.P.; SIMONSEN, G.S.; KLINGENBERG, C. Febrile neutropenia in children with cancer: a retrospective Norwegian multicentre study of clinical and microbiological outcome. **Scand J Infect Dis**, v. 40, 301-307, 2008.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STONE, G.; WOOD, P.; DIXON, L.; KEYHAN, M.; MATIN, A. Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2458–2461, 2002.

STOVER, C. K. ; PHAM, X.Q. ; ERWIN, A.L. ; et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959–964, 2000.

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

TORFOSS, D.; HOIBY, E.A.; TANGEN, J.M.; HOLTE, H.; BO, K.; MEYER, P.; GROTTUM, K.; WEYDE, K.; LAURITZSEN, G.F.; SANDSTAD, B.; JACOBSEN, A.B.; OLSEN, H.; KVALOY, S. Tobramycin once versus three times daily, given with penicillin G, to febrile neutropenic cancer patients in Norway: a prospective, randomized, multicentre trial. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 711–717, 2007.

TRÉ-HARDY, M.; TRAORE, H.; EL MANSSOURI, N.; VANDERBIST, F.; VANEECHOUTTE, M.; DEVLEESCHOUWER, M.J. Evaluation of long-term co-administration of tobramycin and clarithromycin in a mature biofilm model of cystic

fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicro Agents**, v.34, p. 370-374, 2009.

TSENG, B.S.; ZHANG, W.; HARRISON, J.J.; QUACH, T.P.; SONG, J.L.; PENTERMAN, J.; SINGH, P.K.; CHOPP, D.L.; PACKMAN, A.I.; PARSEK, M.R. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. **Environ Microbiol**, v. 15, n.10, p. 2865-2878, 2013.

TURNIDGE, J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, p.503–528, 2003.

VENTRE, I.; GOODMAN, A.L.; VALLET-GELY, I.; VASSEUR, P.; SOSCIA, C.; MOLIN, S.; BLEVES, S.; LAZDUNSKI, A.; LORY, S.; FILLOUX, A. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 103, p. 171–176, 2006.

WAGNER, V.E.; IGLEWSKI, B.H. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 35, p.124-134, 2008.

WALTER, M.C.; ROE, F.; BUGNICOURT, M.J.; FRANKLIN, J.; STEWART, P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin, **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 317-323, 2003.

WEBB, J. S.; THOMPSON, L. S.; JAMES, S.; CHARLTON, T.; TOLKER-NIELSEN, B.; KOCH, M.; GIVSKOV M.; KJELLBERG, S. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **J Bacteriol**, v. 185, p. 4585–4592, 2003.

WEI, Y. H.; XU, L. Z.; LIU, L.; SHEN, Q.; LI, F. Z. Microdialysis: A technique for pharmacokinetic-pharmacodynamic studies of oncological drugs. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 10, p. 631-640, 2009.

WHITELEY, M.; GREENBERG, E.P. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. **J Bacteriol**, v. 183, n. 19, p. 5529–5534, 2001.

WILKINS, M.; HALL-STOODLEY, L.; ALLAN, R.N.; FAUST, S.N. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. **J Infection**, v. 69, p. 47-52, 2014.

WOZNIAK, D.J.; WYCKOFF, T.J.O.; STARKEY, M.; KEYSER, R.; AZADIS, P.; O'TOOLE, G.A.; PARSEK, M.R. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PNAS**, v. 100, n. 13, p. 7907-7912, 2003.

YAN, P.; CHEN, Y.; SONG, Z.; WU, H.; KONG, J.; QIN, X. Pathogenic effects of biofilm with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in rats. **J Nan Med Univ**, v. 22, n. 1, p. 34-38, 2008.

YANG L., JELSBK, L.; MARVIG, R.L.; DAMKIAER, S.; WORKMAN, C.T.; RAU, M.H.; HANSE, S.K.; FOLKESSON, A.; JOHANSEN, H.K.; CIOFU, O.; HOIBY, N.; SOMMER, M.O.A.; MOLIN, S. Evolutionary dynamics of *Pseudomonas aeruginosa*

bacteria in a human host environment. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 7481-7486, 2011.

ZHOU, Q.; GALLO, J. M. *In vivo* microdialysis for PK and PD studies of anticancer drugs. **AAPS J**, v. 7, p. 659-667, 2005.

ZIMMERMANN, E.S.; LAUREANO, J.V.; SANTOS, C.N.; SCHIMIDT, S.; LAGISHETTY, C.V.; DE CASTRO, W.V.; DALLA COSTA, T. A simultaneous semi mechanistic population analysis of levofloxacin in plasma, lung and prostrate to describe the influence of efflux transporters on drug distribution following intravenous and intratracheal administration. **Antimicrob Agents Chemother**, doi:10.1128/AAC.02317-15, 2015.



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: 27847

Título: AVALIAÇÃO POR MICRODIALISE DA PENETRAÇÃO PULMONAR DA TOBRAMICINA EM MODELO DE PNEUMONIA POR MICRORGANISMO FORMADOR DE BIOFILME

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 18/08/2014
Priscila Martini Bernardi - Aluno de Mestrado desde 18/08/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 08/12/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 75 Ratos Wistar machos (250-300 g), 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, 17 de Dezembro de 2014.

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética