

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

Influência da pneumonia experimental aguda e crônica por *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações livres de tobramicina no fluido de revestimento epitelial pulmonar

Bruna Bernar Dias

Porto Alegre, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
por **Bruna Bernar Dias** para obtenção do
diploma de Farmacêutica

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Coorientadora: Victória Etges Helfer

Porto Alegre, 2019.

Este Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Modelagem PK/PD da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade, e por ser uma instituição da qual tenho orgulho de representar, em breve, como profissional.

Aos órgãos de fomento e auxílio à pesquisa, que dispuseram de financiamento, possibilitando o desenvolvimento deste projeto: FAPERGS pela bolsa de pesquisa, CNPq e Capes.

À minha orientadora, Profa. Teresa Dalla Costa, por ser um exemplo de profissional, que sempre me levou a pensar além do comum. Sou grata pela oportunidade de ter aprendido tantas coisas, além da farmacocinética.

À Victória Etges Helfer, por ter sido mais que uma coorientadora, que estava sempre presente, planejando experimentos, dividindo as alegrias e as frustrações, e sempre tentando achar uma resposta para as perguntas que surgiam no meio do caminho.

À Profa. Bibiana Verlindo de Araújo, pelas brilhantes discussões em grupo, que sempre trouxeram inspirações.

À Profa. Karina Paese, pela sempre disponibilidade em ajudar nas análises no Master, e pelo carinho de sempre.

Ao Prof. Alexandre Macedo, pela doação das cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.

À Priscilla Bernardi Garzella pelo incentivo e ensinamentos no início do projeto, e à Daiane de Lima pela contribuição no projeto.

Ao Dr. Fabiano Barreto pela solicitude em realizar as análises das amostras, e por toda ajuda neste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacocinética e Modelagem PK/PD da Faculdade de Farmácia, por ser o lugar que me fez amar a farmacocinética, e me acolheu por tantas noites de experimento.

Aos amigos que a farmacocinética me deu: Carol Backes, por sempre ter um doce para meus dias ruins; Fernando Carreño, pelas caronas, cafés todo dia de manhã (que fazem muita falta), pelos conselhos e irritações que só arianos entendem e os "shallows now"; Graziela Lock, pela amizade que construímos, por sempre estar disposta a qualquer coisa, com um sorriso no rosto, e por ter me dado a guarda de um peludinho lindo; Izabel Alves, pelas risadas e pelo exemplo de que

tudo é possível quando se quer; Keli Staudt, pelos mates na orla que tomamos só uma vez, pelas jantas e por ter me dado uma afilhada fofíssima; Larissa Lachi, pelas visitas, rolês e discussões analíticas; Laura Olivo, por sempre dizer que vai ficar tudo bem e por ser a PD do meu PK; Schaiane Ferri pelo brilho; Victória Etges Hefer, por ser a melhor Co do mundo.

À Ana Lúcia, que sempre tinha um café e uma palavra de incentivo para dar quando precisávamos.

À Camila Muneretto, e à Caroline Pavin, as melhores amigas que essa faculdade poderia ter me dado, que tornaram meus dias ao longo da graduação mais fáceis.

Ao Diretório Acadêmico da Faculdade de Farmácia, por ter me ensinado a lutar pelos direitos dos estudantes e por me mostrar que sempre podemos ser melhores do que somos.

Aos meus filhos de quatro patas, Jon Snow e Oliver, que me trazem um amor incondicional.

Ao Rafael Martins, por toda ajuda durante este período de escrita e por todo amor que temos um pelo outro.

Ao Ricardo Fortes e ao Matheus, por serem como meus irmãos, que sempre estão presentes para comemorar minhas conquistas.

À minha irmã Paula Bernar Dias, por ter sido sempre meu exemplo de luta e dedicação. Que me ajudou desde a pegar ônibus em Porto Alegre até a escolher as cores dos gráficos do TCC.

À minha vó Lourena Claro, por ser a minha âncora, e por nunca ter medido esforços para nos ajudar no que possível.

À minha mãe, Luciana Bernar Dias, por ser meu porto seguro e nunca ter me deixado desistir, que sempre me apoiou incondicionalmente e fez tudo para que eu pudesse estar concluindo uma graduação hoje.

À todos aqueles que acreditam na ciência brasileira.

“Happiness can be found even in the darkest times if one only remembers to turn on the light.”

J.K. Rowling

RESUMO

Introdução: Infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biofilmes são resistentes ao tratamento devido à dificuldade de penetração dos antimicrobianos. Previamente demonstramos que a infecção aguda e crônica reduz a penetração pulmonar do aminoglicosídeo tobramicina (TOB) em cerca de 70%, indicando que a presença de infecção/inflamação, e não a cronicidade desta, leva à diminuição da exposição tecidual ao fármaco. Como as infecções pulmonares iniciam pela contaminação do fluido de revestimento epitelial pulmonar (PELF), é importante conhecer as concentrações brônquicas livres de antimicrobianos nesse local para a escolha de posologias que garantam a erradicação microbiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a penetração brônquica da TOB em modelo experimental de infecção aguda e crônica por *P. aeruginosa* utilizando a técnica de microdiálise. **Metodologia:** Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA/UFRGS (#32345). Para o desenvolvimento da infecção aguda, ratos Wistar machos (45 d) anestesiados (cetamina/xilazina, 100:10 mg/kg, i.p.), foram inoculados pela via i.t. com 10^9 UFC/mL da cepa não-mucoide PA14 (n = 6). Para produzir a infecção crônica, 10^7 UFC/mL de *P. aeruginosa* mucoide ATCC 27853 foi imobilizada em *beads* de alginato, que foram inoculados da mesma forma em animais de mesma idade (n = 3). Sete e quatorze dias após a inoculação, respectivamente, os animais foram anestesiados (uretano, 1,25 mg/kg, i.p.) e receberam TOB 10 mg/kg via i.v. *bolus*. Animais hígidos de mesma idade foram utilizados como controle (n = 7), assim como animais inoculados com *bead* branco de alginato, sem a bactéria (n = 4). As concentrações livres brônquicas de TOB foram coletadas por microdiálise, utilizando a sonda CMA 20[®] (2 mm, *custom made*), a cada 30 min por 12 h pós-dose e quantificadas por CLAE-EM/EM utilizando método validado. Para a comparação com os grupos contendo *beads* de alginato, foi desenvolvido um *bead* de agarose, que apresentou tamanho e dispersão adequados. Os *beads* brancos de agarose foram inoculados a animais hígidos e a farmacocinética pulmonar da TOB foi determinada por microdiálise utilizando a sonda CMA 20[®] (4 mm). Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por abordagem não-compartimental (Phoenix[®]) e a comparação estatística feita por ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguida de Teste de Bonferroni. **Resultados:** Os resultados demonstraram que não há alteração na meia-vida de eliminação da TOB no PELF

(aprox. 4,5 h) em animais hígidos, com infecção aguda e crônica e inoculados com *beads* brancos, sendo que essa se mostrou semelhante à meia-vida pulmonar obtida anteriormente nas mesmas condições. A infecção aguda reduziu a exposição da TOB no PELF em torno de 70% em relação aos animais hígidos. A infecção crônica alterou o equilíbrio pulmão/PELF da TOB pela redução da exposição plasmática devido ao aumento do *clearance* total. O grupo inoculado com *bead* branco de agarose não apresentou a mesma redução da exposição pulmonar observada no grupo inoculado com *bead* branco de alginato. **Conclusões:** Infecções agudas reduzem a exposição brônquica à TOB, semelhante ao observado para a exposição pulmonar. A infecção crônica alterou a farmacocinética da TOB, reduzindo as concentrações plasmáticas e pulmonares e aumentando a penetração brônquica devido à lesão tecidual e ao aumento da permeabilidade vascular. Os resultados indicaram que as alterações encontradas no grupo de infecção crônica foram principalmente devidas aos efeitos da infecção/inflamação, associados à presença do alginato, componente do biofilme mucoide da *P. aeruginosa* e dos *beads* de alginato utilizados para inoculação.

Palavras-chave: PELF, microdiálise brônquica, concentração livre de tobramicina, *Pseudomonas aeruginosa*, infecção pulmonar aguda, infecção pulmonar crônica.

ABSTRACT

The role of acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in tobramycin free concentrations in pulmonary epithelial lining fluid

Introduction: Pulmonary infections caused by biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* are resistant to treatment due to the difficulty of antimicrobial penetration. It has been previously demonstrated by our group that acute and chronic infection reduces tobramycin (TOB) lung penetration in about 70% due to the presence of infection/inflammation rather than the infection chronicity. Because lung infections initiated by contamination of the pulmonary epithelial lining fluid (PELF), it is important to determine antimicrobials free concentration at this biophase to better determine doses to ensure microbial eradication. The aim of this study was to evaluate the bronchial penetration of TOB in experimental model of acute and chronic *P. aeruginosa* lung infection, using microdialysis. **Methodology:** Studies approved by CEUA/UFRGS (# 32345, appendix). For the development of acute infection, Wistar rats (45 d) were anesthetized (ketamine/xylazine, 100:10 mg/kg, i.p.) and inoculated i.t. with 10^9 CFU/mL of *P. aeruginosa* non-mucoid PA14 strain (n = 6). To produce chronic infection, 10^7 CFU/mL *P. aeruginosa* mucoid ATCC 27853 strain was immobilized in alginate beads, which were inoculated in the same way in animals of the same age (n = 3). Seven and four days after inoculation, respectively, the animals were anesthetized (urethane, 1.25 mg/kg, i.p.) and received TOB 10 mg/kg i.v. *bolus*. Healthy animals of the same age were used as a control group (n = 7). Another groups was inoculated with blank alginate beads, without bacteria (n = 4). Free TOB bronchial concentrations were harvested by microdialysis using a custom made 2 mm CMA 20[®] probe every 30 min up to 12 h post-dose and the drug quantified by a validated HPLC-MS/MS method. To determine the influence of the alginate beads on TOB pharmacokinetics, an agarose bead was developed, which exhibited proper size and dispersion. The blank agarose beads were inoculated in the animals and TOB pharmacokinetics was determined in animal's lung interstitial fluid. Free lung TOB's concentrations were determined using a 4 mm CMA 20[®] probe. Pharmacokinetic parameters were determined by non-compartmental approach (Phoenix[®]) and a statistical comparison performed by ANOVA ($\alpha = 0.05$) followed by Bonferroni test. **Results:** There was no change in TOB half-life (about.

4.5 h) in PELF in acute and chronic infected animals and in those inoculated with alginate and agarose blank beads. The half-lives determined were similar to those reported previously in lung interstitial fluid in the same experimental conditions. Acute infection reduces PELF exposure to TOB by 70% compared to healthy animals. Chronic infection altered the lung/P ELF balance by reducing plasma exposure due to increased clearance. The group inoculated with blank agarose beads did not show the same reduction in lung exposure observed in the group inoculated with blank alginate beads. **Conclusions:** Acute infections reduce bronchial exposure to TOB, similar to that observed for pulmonary exposure. Chronic infection altered the pharmacokinetics of TOB, reducing plasma and pulmonary concentrations and increasing bronchial penetration due to tissue damage and increased vascular permeability. The results indicated that the changes found in chronically infection group were mainly due to the effects of infection/inflammation associated with the presence of alginate, which is a component of the mucoid biofilm, and also of the beads used for *P. aeruginosa* inoculation.

Keywords: PELF, bronchial microdialysis, free tobramycin concentrations, *Pseudomonas aeruginosa*, acute lung infection, chronic lung infection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Concentrações livres farmacologicamente ativas	15
3.2 Fatores que interferem na distribuição tecidual de antimicrobianos	19
3.3 Modelos animais de infecção pulmonar	20
3.4 Agentes causadores de infecções pulmonares.....	22
3.5 Tobramicina no tratamento de infecções pulmonares.....	23
4 METODOLOGIA	26
4.1 Padrões, reagentes, solventes e meios de cultura.....	26
4.2 Cepas bacterianas.....	26
4.3 Preparação do inóculo de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	27
4.4 Preparação dos beads de alginato contendo <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853.....	27
4.5 Preparação dos <i>beads</i> de agarose	28
4.6 Inoculação dos animais	28
4.7 Experimentos de microdiálise brônquica e pulmonar	29
4.8 Calibração <i>in vivo</i> das sondas de microdiálise.....	30
4.9 Quantificação da TOB nas amostras de microdialisado	31
4.10 Análise farmacocinética não-compartimental e análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Calibração das sondas	32
5.2 Farmacocinética brônquica da TOB.....	33
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS	44
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	52
ANEXO.....	53

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo encontrado em abundância no ambiente que causa infecções oportunistas nos seres humanos. Os mais acometidos são pacientes imunocomprometidos, queimados, em ventilação mecânica e portadores de fibrose cística (FC), causando principalmente infecções pulmonares. É uma bactéria associada à resistência aos antimicrobianos, principalmente pela sua capacidade de formação de biofilmes (LUND-PALAU et al., 2016).

Os biofilmes são agregados de microrganismos envolvidos por uma matriz polimérica autoproduzida, constituída de polissacarídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas que conferem resistência à penetração de antimicrobianos, podendo aumentar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de antibióticos de cem a mil vezes (WOZNIAK et al., 2003; HOIBY et al., 2011).

Os biofilmes de *P. aeruginosa* podem se apresentar em fenótipo não-mucoide ou mucoide. O fenótipo não-mucoide é composto por polissacarídeos – lipopolissacarídeo (LPS), Pel (rico em glicose) e Psl (pentassacarídeo contendo D-manose, D-glicose e L-ramnose) e está envolvido em infecções pulmonares e em colonização inicial de pacientes com FC. O fenótipo mucoide ocorre por mutações em genes reguladores que controlam a expressão do *operon* de produção do polissacarídeo alginato, por isso sua matriz extracelular é majoritariamente composta por alginato (WOZNIAK et al., 2003; FLEMMING & WINGENDER, 2010; LUND-PALAU et al., 2016).

Os biofilmes mucoides são encontrados em infecções crônicas de pacientes fibrocísticos que foram colonizados por cepas não-mucoides que sofreram mutações ou já foram contaminadas diretamente por estas cepas mucoides. Os achados dessa bactéria no pulmão de pacientes fibrocísticos estão relacionados à progressão acelerada da doença, pela dificuldade de tratamento dessas infecções nestes pacientes (LUND-PALAU et al., 2016).

Para o tratamento de infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes com FC um dos antimicrobianos utilizados é a tobramicina (TOB). A distribuição

tecidual da TOB vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores, utilizando modelos animais de infecção aguda (cepa não-mucoide) e crônica (cepa mucoide) por *P. aeruginosa* para avaliar a penetração pulmonar do fármaco em comparação com a penetração observada em animais hígidos. Nesses trabalhos encontramos concentrações plasmáticas de TOB 70% menores nos animais infectados cronicamente em função do aumento do *clearance* nesse grupo. O tecido pulmonar tanto dos animais com infecção aguda quanto crônica apresentaram uma reduzida exposição às concentrações livres de TOB, o que pode levar a falha terapêutica nesses casos (BERNARDI, 2016; LIMA, 2017).

As concentrações livres da TOB foram avaliadas no tecido pulmonar. Sabe-se, no entanto, que as infecções pulmonares se desenvolvem inicialmente pela contaminação dos brônquios, sendo o início do processo infeccioso dado pela contaminação do fluido de revestimento epitelial pulmonar (PELF), localizado no espaço brônquico. Considerando que as concentrações livres de antimicrobianos são determinantes para o sucesso do tratamento, o alcance de concentrações livres dos antimicrobianos no PELF é importante para garantir o sucesso dos tratamentos de pneumonias (THEURETZBACHER, 2007)

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a penetração brônquica da TOB administrada pela via intravenosa em modelo experimental de infecção aguda e crônica por *P. aeruginosa* utilizando a técnica de microdiálise e comparar os resultados com os obtidos no plasma e no líquido intersticial pulmonar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Concentrações livres farmacologicamente ativas

As concentrações livres, não ligadas às proteínas, estão disponíveis para interagir com receptores e, portanto, gerar o efeito biológico do fármaco. Em infecções teciduais são necessárias concentrações adequadas de fármaco no local de ação para o sucesso do tratamento antimicrobiano (BERGOGNE-BEREZIN, 1981). O alvo dos antimicrobianos deve ser o fluido intersticial, local onde geralmente ocorrem as infecções bacterianas. As concentrações livres intersticiais não podem ser previstas pelas concentrações plasmáticas, pois em muitas situações não ocorre um equilíbrio entre o plasma e os diferentes tecidos devido a presença de transportadores de influxo e/ou efluxo que alteram a distribuição causada apenas por processo de difusão (JOUKHADAR et al., 2001).

Para as infecções pulmonares, as concentrações livres de antimicrobianos no PELF são tão relevantes quanto as concentrações livres intersticiais para prever a eficácia clínica e microbiológica, pois inicialmente a contaminação dos pacientes se dá pela via respiratória. Além disso, o PELF também deve ser considerado para determinação de concentrações do fármaco visando à otimização de doses, pois concentrações inadequadas de antimicrobianos no sítio de ação podem levar, além da falha terapêutica, ao desenvolvimento de resistência microbiana (DHANANI et al., 2010).

A técnica de microdiálise tem sido utilizada para mensurar concentrações livres de fármacos no fluido intersticial, contribuindo para o entendimento da distribuição destes nos tecidos e possibilitando a relação das concentrações teciduais aos seus efeitos farmacológicos (HAMMARLUND-UDENAES, 2017). A técnica baseia-se na inserção de uma sonda que contém uma membrana semipermeável na sua extremidade em uma região específica de tecido ou espaço fluido a ser analisado (Figura 1).

A sonda é constantemente perfundida por uma solução fisiológica isosmolar ao tecido, a um fluxo constante (usualmente entre 0,3 e 2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$), e pelo princípio de diálise ocorrem trocas entre o meio extracelular e o fluido no interior da sonda,

possibilitando a coleta de moléculas presentes no tecido que se difundem para dentro da sonda. Como o fluxo é constante, não ocorre equilíbrio entre as concentrações extracelulares e as concentrações no microdialisado, coletadas pela sonda, ocorrendo uma condição *sink*. Portanto, para a correta mensuração das concentrações coletadas, é necessária a determinação da recuperação das sondas, utilizando um método de calibração (JOUKHADAR et al., 2001; CHAURASIA et al., 2007).

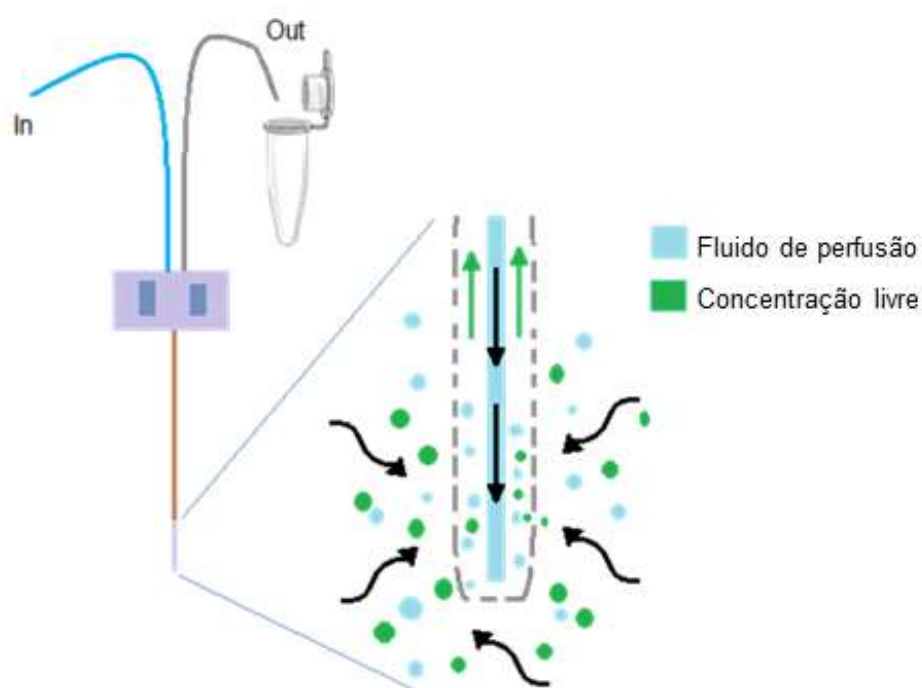


Figura 1. Representação esquemática da sonda de microdialise. O detalhe mostra as trocas que ocorrem na membrana semipermeável, onde, em azul tem-se o fluido de perfusão e em verde a concentração livre do fármaco que pode ser coletada pela sonda. As flechas pretas e verdes no interior da sonda mostram o sentido do fluxo do fluido de perfusão no interior da sonda.

A recuperação relativa deve ser determinada *in vitro* e *in vivo*, pois há diferenças entre a difusão das moléculas em solução e no tecido, onde a presença das células aumenta o caminho a ser percorrido pelo fármaco até chegar à membrana, devido à tortuosidade do tecido (DE LANGE et al., 2000; HAMMARLUND-UDENAES, 2017).

A calibração das sondas é um ponto crítico da utilização da técnica de microdialise, pois muitos fatores alteram a recuperação, incluindo taxa de fluxo do

fluido de perfusão, temperatura do local onde a sonda está inserida, composição da sonda (material, porosidade comprimento e diâmetro da membrana) e natureza do tecido dialisado em função do volume de líquido intersticial e tortuosidade. Fatores que interfiram na difusão da molécula pela membrana e as propriedades físico-químicas do fármaco como a permeabilidade, tamanho e lipofilia também podem interferir na recuperação das sondas (DE LANGE et al., 2000; CHAURASIA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008, AZEREDO et al., 2014).

Os métodos mais comumente empregados para determinação da recuperação das sondas de microdiálise são o método da “perda = ganho” e o da retrodiálise por fármaco, ou uma combinação dos dois métodos. Entende-se por “ganho” a fração recuperada por diálise quando o fármaco se encontra em solução no líquido que banha a sonda e o líquido de perfusão é isento de fármaco. Por outro lado, “perda” corresponde à fração dialisada para o meio quando o líquido de perfusão é uma solução do fármaco e o meio externo é isento do mesmo. No caso da perda denomina-se o processo de retrodiálise.

Em princípio, diálise e retrodiálise através da sonda devem ser iguais. Costuma-se realizar experimentos *in vitro* para confirmar essa hipótese. Quando a igualdade é verdadeira, os experimentos *in vivo* para determinar a recuperação relativa podem ser conduzidos por retrodiálise pelo fármaco antes da administração do mesmo ao indivíduo, utilizando-se o valor individual para calcular as concentrações livre teciduais reais (JOUKHADAR et al., 2001; ARAÚJO et al., 2008; HAMMARLUND-UDENAES, 2017). Quando perda e ganho *in vitro* não são semelhantes, devido à ligação do fármaco à tubulação de entrada do líquido de perfusão na sonda, há necessidade de utilizarem-se métodos alternativos para determinação da recuperação *in vivo* da sonda, como fluxo líquido zero (WANG et al., 1993) ou realizar experimentos para corrigir matematicamente os valores da recuperação *in vivo* (ARAÚJO et al., 2008).

A técnica de microdiálise vem sendo empregada pelo nosso grupo de pesquisa para a avaliação de concentrações livres de diferentes fármacos em diversos tecidos, como no cérebro, músculo, rim, próstata, fígado, pulmão e em tumores de ratos (ALVES et al., 2017; ARAÚJO et al., 2013; CARREÑO et al., 2016; PIGATTO

et al., 2015; TASSO et al., 2008), além do tecido subcutâneo de pacientes em cirurgia bariátrica (PALMA et al., 2018).

O estudo de Freddo e Dalla Costa (2002) investigou a farmacocinética do norfloxacino utilizando a microdiálise. Foi demonstrado que as concentrações livres do fármaco no músculo de animais que receberam uma dose i.v. *bolus* de 5 ou 10 mg/kg eram menores do que as concentrações plasmáticas livres, sendo necessário um fator de correção de $0,25 \pm 0,08$ para igualá-las. Tasso e colaboradores (2008) mostraram concentrações livres plasmáticas, pulmonares e musculares semelhantes para o gatifloxacino após dose de 6 mg/kg i.v. *bolus* a ratos Wistar. O fator de penetração calculado foi de 1,02 e 1,08 para o músculo e o pulmão, respectivamente, em relação ao plasma. Zimmermann e colaboradores (2019) utilizaram a microdiálise para obter as concentrações pulmonares e prostáticas livres do ciprofloxacino após dose i.v. *bolus* de 7 mg/kg, determinando que as concentrações teciduais livres foram maiores do que as concentrações plasmáticas livres, com um fator de penetração tecidual de 1,2 e 1,5 para pulmão e próstata, respectivamente. Esses estudos mostram que as concentrações livres teciduais podem ser maiores, semelhantes ou menores que as concentrações livres plasmáticas, na dependência da ação de transportadores de influxo e efluxo, principalmente. Desse modo, a penetração de cada fármaco deve ser investigada experimentalmente na biofase de interesse.

Dos estudos para avaliação da penetração tecidual de antimicrobianos podemos depreender que as concentrações plasmáticas nem sempre podem ser utilizadas para prever as concentrações livres teciduais.

Apesar de a microdiálise ser bastante difundida para avaliação da penetração de fármacos em diferentes tecidos de animais e humanos, são raros os estudos que utilizaram a microdiálise para a avaliação de fármacos no PELF em animais de pequeno porte. Eisenberg e colaboradores (1993) estabeleceram a técnica de microdiálise brônquica para mensurar a concentração de aminoglicosídeos no PELF, como uma alternativa ao lavado broncoalveolar (BAL). Gentamicina e TOB na dose de 20 mg/kg i.v. *bolus* foram administradas em ratos Wistar e amostras de plasma e de microdialisado foram coletadas. Foi encontrado uma média de penetração da TOB e da gentamicina no PELF, expressa pela razão da AUC_{PELF} pela AUC_{PLASMA} de

0,36 ± 0,06 e de 0,56 ± 0,09, respectivamente, indicando que as concentrações dos fármacos no PELF são menores do que as encontradas no plasma (EISENBERG et al., 1993).

3.2 Fatores que interferem na distribuição tecidual de antimicrobianos

As alterações teciduais causadas pelo processo infeccioso podem reduzir, aumentar ou não alterar as concentrações livres teciduais de antimicrobianos em comparação com as concentrações observadas em tecidos não infectados. O aumento das concentrações para além da faixa terapêutica pode levar à toxicidade dos fármacos, e a redução pode causar falha terapêutica, levando à reincidência da infecção, podendo causar resistência bacteriana (DHANANI et al., 2010).

Estudos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa utilizando a técnica de microdiálise vêm demonstrando as alterações de concentrações teciduais que podem ocorrer devido à presença de infecções. Em 2011, Araújo e colaboradores demonstraram, utilizando modelo de infecção da coxa de ratos Wistar por *Escherichia coli*, que as concentrações livres musculares de piperacilina foram 30% menores do que as concentrações observadas em animais hígidos. Em 2017, Torres e colaboradores observaram que a exposição plasmática ao ciprofloxacino após dose i.v. *bolus* de 20 mg/kg dobrou em ratos Wistar com pneumonia crônica por *P. aeruginosa* (14 dias) em comparação com a exposição observada em animais hígidos, enquanto a exposição pulmonar foi reduzida quatro vezes.

Para os antifúngicos, Azeredo e colaboradores (2012) demonstraram que não há diferença na penetração renal do fluconazol após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar infectados com *Candida albicans*, comparados com os animais não-infectados, ficando o fator de penetração tecidual em torno de 0,88 em ambos os grupos. Resultados semelhantes haviam sido observados por Araújo e colaboradores (2009) para o voriconazol, em que a infecção por diferentes espécies de *Candida* não alterou a penetração renal do fármaco após doses de 40 e 60 mg/kg pela via oral. Alves e colaboradores (2017) determinaram as concentrações livres de voriconazol 5 mg/kg i.v. *bolus* em cérebro de ratos Wistar infectados por *Cryptococcus neoformans*. A infecção causou aumento da exposição cerebral do

fármaco, com fator de penetração 1,86 nos animais infectados e 0,85 nos não-infectados.

Bernardi (2016) avaliou a penetração pulmonar da TOB em ratos hígidos por microdiálise. O fator de penetração pulmonar encontrado foi de 0,94, indicando que difusão é o processo que governa a penetração pulmonar da TOB. Em uma infecção aguda por *P. aeruginosa* PA14, as concentrações da TOB no plasma não sofreram alterações, mas a penetração pulmonar do fármaco reduziu em torno de 70% (BERNARDI, 2016). Lima (2017) estudou a penetração pulmonar da TOB em ratos em uma infecção crônica por *P. aeruginosa* ATCC27853 impregnada em beads de alginato. Nessa situação, tanto a farmacocinética plasmática quanto a farmacocinética tecidual sofreram alterações, com redução de mais de 70% nas concentrações plasmáticas e no tecido pulmonar. Não há estudos relatando a penetração da TOB no PELF de animais ou humanos.

Crandon e colaboradores (2009) avaliaram a exposição da tigeciclina (50 e 25 mg/kg, s.c.) no PELF de ratos neutropênicos infectados com *Acinetobacter baumannii*. Os autores demonstraram que o fármaco possui uma alta penetração no PELF, com um fator de penetração (f_T) de $8,07 \pm 0,17$ e $6,17 \pm 0,40$ nas doses de 50 e 25 mg/kg, respectivamente, obtido pela relação de $ASC_{\text{livre, tecido}}/ASC_{\text{livre, plasma}}$. Nos animais infectados o fármaco atingiu valores de f_T de $23,3 \pm 5,69$ e $12,92 \pm 1,05$, nas mesmas doses, indicando que a infecção aumenta a penetração do fármaco nessa biofase.

Estes estudos demonstram que as infecções podem alterar a distribuição tecidual de antimicrobianos, podendo causar redução ou aumento da exposição aos fármacos. A baixa penetração dos antimicrobianos no local de infecção, causando uma exposição insuficiente, pode ser um motivo de falha terapêutica enquanto o aumento da exposição pode levar à toxicidade (DHANANI et al., 2010).

3.3 Modelos animais de infecção pulmonar

Os estudos farmacocinéticos *in vivo* utilizam modelos animais de infecção para a investigação das diferenças na distribuição tecidual dos fármacos em comparação com a distribuição em animais hígidos. A partir desses modelos é possível identificar

como o processo infeccioso pode influenciar a disposição do fármaco e quais os parâmetros farmacocinéticos alterados devido à presença local de bactérias e processo inflamatório associado. Os estudos de penetração tecidual de fármacos em humanos infectados são escassos, por isso os modelos animais são importantes e estão sendo utilizados para as investigações farmacocinéticas nessa condição (ARAÚJO et al., 2011; ZHAO et al., 2016).

Diversos modelos animais de infecção pulmonar são empregados na literatura (STARKE et al., 1987; MORISSETTE et al., 1995; McMORRAN et al., 2001; HEECKEREN & SHLUCHTER, 2002; HENGZHUANG et al., 2012). O desenvolvimento de infecções agudas pode ser realizado pela instilação intratraqueal ou intranasal de um inóculo bacteriano conhecido no animal. Goodman e colaboradores (2004) utilizaram a via intranasal para inoculação de 1×10^7 UFC/mL de *P. aeruginosa* PAK para o desenvolvimento de infecção aguda de 16 h em camundongos. Caron e colaboradores (2014) desenvolveram um modelo de infecção pulmonar de 10 dias por *P. aeruginosa* em camundongos utilizando a instilação intratraqueal de 1×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA01 em fase exponencial, resuspensa em solução salina 0,9% estéril. Para desenvolvimento de infecções crônicas geralmente são empregados modelos em que a bactéria é imobilizada em forma de *beads*, com a intenção de fixar a célula bacteriana e garantir a persistência da infecção. Cash e colaboradores (1979) propuseram um modelo utilizando a impregnação de cepas mucoides de *P. aeruginosa* em *beads* de agarose enquanto Johansen & Hoiby (1999) propuseram a impregnação de *beads* de alginato com a mesma bactéria, ambos visando estabelecer infecção pulmonar.

Yan e colaboradores (2007) estabeleceram um modelo de infecção crônica por *P. aeruginosa* utilizando *beads* de alginato e avaliaram as características patológicas e bacteriológicas da mesma. O alginato é produzido por *P. aeruginosa* na forma de biofilmes e é responsável pela adesão ao epitélio pulmonar. Nesse modelo, o alginato utilizado para incorporar a bactéria se assemelha ao alginato produzido nos biofilmes, assemelhando-se a infecções causadas por biofilmes em pacientes fibrocísticos (YAN et al., 2008).

Modelos similares vêm sendo empregados utilizando o tamanho e distribuição padrão das partículas dos *beads* a fim de obter uma infecção mais homogênea e

capaz de melhor representar um modelo de infecção semelhante a uma infecção pulmonar crônica encontrada em um paciente com fibrose cística (GROWCOTT et al., 2011)

As diferenças nos modelos de infecção agudas e crônicas estão nas características das bactérias utilizadas para o desenvolvimento do modelo e no tempo decorrido dessas infecções. As cepas normalmente utilizadas para as infecções agudas expressam muitas cadeias de lipopolissacarídeo (LPS) e não produzem tanta quantidade do exopolissacarídeo alginato. Já as cepas utilizadas para o desenvolvimento da infecção crônica possuem uma modificação no LPS, não expressando em tanta quantidade, mas apresentam fenótipo mucóide, devido a superprodução do polissacarídeo alginato (GOODMAN et al., 2004).

3.4 Agentes causadores de infecções pulmonares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), infecções do trato respiratório inferior estão entre as 10 maiores causas de morte no mundo, sendo responsáveis por 3 milhões de morte em 2016, sendo mais prevalentes e severas em regiões mais pobres (WHO, 2018). Entre os fatores que podem estar relacionados a alta incidência de infecções pulmonares pode-se citar o aumento do tempo de vida a população, a emergência de novos patógenos causadores de infecções e a resistência aos antimicrobianos (MIZGERD, 2006).

Os principais patógenos bacterianos causadores de infecções pulmonares são os cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, destacando-se *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (NOGUEIRA et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa é um agente importante nas infecções pulmonares por se tratar de uma bactéria oportunista que pode se proliferar tanto na forma planctônica quanto em forma de biofilme (RIQUELME et al., 2015). Os principais alvos dessa bactéria são pacientes em estado crítico, imunocomprometidos, queimados, pacientes em ventilação mecânica e com FC (LUND-PALAU et al., 2016).

As infecções crônicas recorrentes por *P. aeruginosa* representam a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com FC. Durante a infância, os pacientes com FC são colonizados por *P. aeruginosa* e por *S. aureus*. Na vida adulta alguns fatores favorecem o predomínio de *P. aeruginosa*, como a viscosidade do muco, a excessiva produção de espécies reativas de oxigênio, a redução da acidez das vias aéreas e a autofagia prejudicada (LUND-PALAU et al., 2016; RIQUELME et al., 2018).

3.5 Tobramicina no tratamento de infecções pulmonares

Na prática clínica, os antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas são penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Os principais aminoglicosídeos utilizados são a gentamicina, TOB, amicacina e netilmicina, empregados como monoterapia ou em combinação a outros antimicrobianos, como um β -lactâmico (CRAIG, 2011; GURJAR, 2015).

A TOB é um aminoglicosídeo obtido de culturas do microrganismo *Streptomyces tenebrarius*. Possui peso molecular médio de 467,5 e fórmula química $C_{18}H_{37}N_5O_9$. É uma molécula hidrofílica, altamente solúvel em água, com $\log P = -3$. Possui pKa ácido de 12,54 e pKa básico de 9,83 (DRUGBANK, 2019).

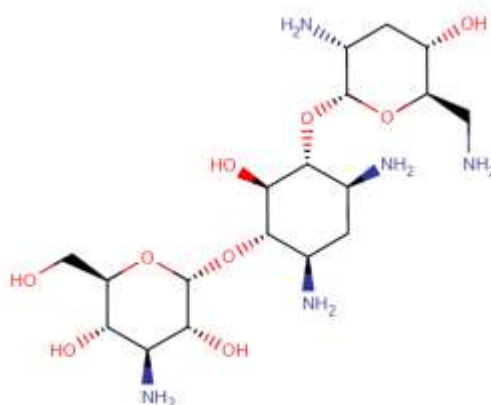


Figura 2. Estrutura química da tobramicina: (4S,5S,6R(-4-amino-2-[[[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[[[(2R,3R,5S,6R)-3-amino-6-(aminomethyl)-5-hidroxi-oxan-2-il]oxi]-2-hidroxiciclohexil]-6-(hidroximetil)oxano-3,5-diol).

Seu mecanismo de ação se deve à ligação permanente à subunidade 30S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas bacterianas e apresentando efeito pós-antibiótico (BARMADA et al., 1993; CRAIG, 2011).

Seu espectro de ação clinicamente relevante frente a bactérias Gram-positivas é restrito apenas à *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Porém, exerce um grande efeito contra bacilos Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos, como *Escherichia Coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Como todos os aminoglicosídeos, requer um ambiente aeróbio para exercer o seu efeito, não sendo efetiva contra patógenos anaeróbios (REYES et al., 2014).

A TOB é pouco absorvida quando administrada por via oral, por isso sua forma de administração mais utilizada é intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) ou em dispositivos inalatórios. A meia-vida da TOB no plasma em pacientes com função renal normal é aproximadamente 2 h, quando administrada por via i.v. ou i.m., e seu volume de distribuição, nessas mesmas condições, é aproximadamente 30% do volume corporal. Sua excreção é majoritariamente renal, por filtração glomerular, e não sofre metabolização. Seus efeitos tóxicos incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade neuromuscular e reações de hipersensibilidade (ISRAEL et al., 1976; NEU, 1976; REYES et al., 2014).

A TOB é utilizada no tratamento de infecções do trato urinário, por apresentar uma alta concentração neste local, e em infecções do trato respiratório, infecções de pele, tecidos moles e osteomielites. Apesar de relatos de uso em meningites, o seu uso não é recomendado, pois há uma baixa penetração cerebral. Em pacientes críticos ou infectados por organismos multirresistentes, a sua principal forma de uso é em associação a um β -lactâmico, para obtenção de um amplo espectro de ação (NEU, 1976; REYES et al., 2014).

O uso da TOB por via i.v. associado a penicilinas, cefalosporinas ou carbapenêmicos é o tratamento recomendado para infecções pulmonares agudas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Em caso de colonização crônica pelo mesmo patógeno, deve-se manter o uso dos antimicrobianos, mas por via inalatória (CANTÓN et al., 2005) A dose recomendada para o tratamento das exacerbações agudas é 10 mg/kg/dia, em dose única, visando pico de concentração plasmática

($C_{m\acute{a}x}$) de 20 a 40 mg/L e vale ($C_{m\acute{i}n}$) menores do que 1 mg/L, com uma área sob a curva (ASC) de 20 a 120 mg·h/L (REYES et al., 2014).

Neste trabalho será utilizada a técnica de microdiálise par avaliar a influência da infecção aguda e crônica por *P. aeruginosa* nas concentrações brônquica (PELF) livres da TOB após administração intravenosa do fármaco, uma vez que esse é o local onde se dá a contaminação inicial das vias aéreas. Essa avaliação é importante para garantir que no local de ação o fármaco atinja concentrações livres adequadas para o sucesso terapêutico.

4 METODOLOGIA

4.1 Padrões, reagentes, solventes e meios de cultura

A TOB foi adquirida da Ontario Chemicals (Canadá). A apramicina, utilizada como padrão interno, foi adquirida do Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha). Acetonitrila grau HPLC foi adquirida da JT Baker (USA). Ácido heptafluorbutírico (HFBA), carbamato de etila, hidróxido de sódio p.a., alginato de sódio extraído de algas marrons, cloreto de cálcio p.a. e cloreto de potássio p.a. foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Brasil). Cloreto de Sódio foi adquirido da LS Chemicals (Índia). Tris (hidroximetilaminometano) p.a. foi adquirida da Neon (Brasil). Ácido Clorídrico p.a. e fosfato dissódico e fosfato de sódio monobásico foram adquiridos da empresa Dinâmica (Brasil). Ágar e caldo Müller-Hinton foram adquiridos de Kasvi (Itália), e ágar triptona de soja (TSA) foi adquirido de Oxoid (Inglaterra). Cetamina e xilazina foram adquiridas de Sespo Indústria e Comércio Ltda (Brasil). Óleo mineral foi adquirido de Lifar Ltda (Brasil). Água para HPLC foi obtida com sistema Millipore's Milli-Q. A solução de Ringer foi preparada utilizando 8,59 g de NaCl, 0,19 g de CaCl₂ e 0,3 g de KCl, em 1 L de água Milli-Q, ajustando o pH para 7,0 com solução de NaOH 1 M. O tampão fosfato de sódio (PBS) foi preparado 10 X concentrado, utilizando 82 g de NaCl, 10,5 g de Na₂HPO₄ e 3,55 g de NaH₂PO₄ + H₂O em 1 L de água Milli-Q. No momento da utilização, o tampão PBS foi diluído com água Milli-Q.

4.2 Cepas bacterianas

Para o desenvolvimento da infecção aguda foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, produtora de biofilme não-mucoide, e para a infecção crônica foi utilizada a cepa ATCC 27853 imobilizada em *beads* de alginato. As duas cepas foram recebidas por doação do Prof. Alexandre José Macedo (Faculdade de Farmácia, UFRGS).

4.3 Preparação do inóculo de *P. aeruginosa* PA14

Para produzir a infecção aguda foi preparado um inóculo de *P. aeruginosa* PA14. Dois dias antes da inoculação dos animais, 30 µL da bactéria congelada em *skim milk* foram transferidos para 30 mL de caldo Müller-Hinton e incubados a 37 ± 1 °C de 18 a 24 h. No dia seguinte, realizou-se uma semeadura do caldo em tubo inclinado contendo ágar Müller-Hinton e incubou-se novamente a $37^{\circ} \pm 1$ °C de 18 a 24 h. No dia da inoculação, uma suspensão bacteriana das colônias de bactérias presentes no tubo inclinado contendo 10^7 UFC/mL em solução salina estéril 0,9% (m/v) foi preparada através da leitura de $0,80 \pm 0,02$ de absorvância em espectrofotômetro a 600 nm.

4.4 Preparação dos beads de alginato contendo *P. aeruginosa* ATCC® 27853

Para o desenvolvimento da infecção crônica nos animais, células de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram imobilizadas em *beads* de alginato. Os *beads* foram preparados contendo bactéria ou solução salina estéril (*bead* branco). Inicialmente, foi preparado um inóculo bacteriano contendo 10^9 UFC/mL. Dois dias antes da inoculação dos animais, 30 µL da bactéria congelada em *skim milk* foram transferidos para 30 mL de caldo Müller-Hinton e incubados a 37 ± 1 °C de 18 a 24 h. No dia seguinte, realizou-se uma semeadura do caldo em tubo inclinado contendo ágar Müller-Hinton e incubou-se novamente a $37^{\circ} \pm 1$ °C de 18 a 24 h. No dia da produção dos *beads*, uma suspensão bacteriana das colônias de bactérias presentes no tubo inclinado contendo 10^9 UFC·mL⁻¹ em solução salina estéril 0,9% (m/v) foi preparada através da leitura de absorvância de $0,90 \pm 0,02$ em espectrofotômetro a 600 nm. Misturou-se 1 mL do inóculo com 9 mL de solução de alginato estéril (11 mg/mL) e com o auxílio de bomba de ar comprimido esta mistura foi aspergida sobre uma solução contendo tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0) e CaCl₂ 0,1 M, sob vigorosa agitação. Após 1 h de estabilização, a solução foi coletada com auxílio de micropipeta automática e centrifugada duas vezes a 1000 g por 10 min, realizando uma lavagem com solução salina 0,9% (m/v) estéril entre as

centrifugações. A suspensão de *beads* contendo *P. aeruginosa* foi diluída e plaqueada em ágar Müller-Hinton para a determinação da UFC/mL após 18-24 h de incubação a $37^{\circ} \pm 1$ °C.

4.5 Preparação dos *beads* de agarose

Para avaliar a influência do alginato utilizado no preparo dos *beads* impregnados com bactéria na distribuição tecidual da tobramicina, realizou-se um grupo experimental com *beads* de agarose sem bactéria. O preparo dos *beads* foi realizado utilizando ágar triptona de soja (TSA), segundo descrito por McMORRAN e colaboradores (2001), com modificações. Um volume de 0,8 mL de solução salina 0,9% (m/v) estéril e 1,2 mL de TSA foram aquecidos a 52 ± 1 °C e essa mistura foi gotejada em 50 mL de óleo mineral, também aquecido a mesma temperatura, sob vigorosa agitação. Após 1 h de estabilização, o sistema foi resfriado com gelo até atingir a temperatura de 25 ± 1 °C. A solução contendo os *beads* foi transferida com auxílio de micropipeta automática para um tubo de centrifuga, ao qual foi adicionado o mesmo volume de solução tampão fosfato, e homogeneizado suavemente. Após separação de fases, com o auxílio de uma pipeta de vidro estéril, a fração do óleo mineral foi retirada e o tubo foi centrifugado duas vezes a 1000 g por 20 min realizando uma lavagem com solução salina 0,9% (m/v) estéril entre as centrifugações.

Os *beads* foram analisados para determinação do tamanho e dispersão populacional utilizando-se difrator de luz à laser Mastersizer (Malvern Panalytical, Reino Unido).

4.6 Inoculação dos animais

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS #32345). Foram utilizados ratos Wistar machos de 45 dias (250 - 300 g) fornecidos pelo Centro e Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS). Os animais foram mantidos com ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (65%)

controlada e receberam ração para roedores Nuvital® e água *ad libitum* até o momento dos experimentos.

O desenvolvimento da infecção foi realizado por instilação intratraqueal. Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg i.p., respectivamente) e imobilizados em posição supina com angulação aproximada de 45°. Com o auxílio de lanterna, a traqueia foi localizada e uma cânula guia posicionada para a realização da instilação intratraqueal dos diferentes inóculos. Para desenvolver a infecção aguda, foram inoculados 100 µL de suspensão contendo 10⁷ UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14; para a infecção crônica, 50 µL da suspensão de *beads* contendo a bactéria; e, para os grupos controles do *bead*, 50 µL da suspensão contendo *bead* de alginato ou *bead* de agarose. Sete dias após a inoculação da infecção aguda e quatorze dias após a crônica, os animais foram submetidos aos experimentos de microdiálise.

A confirmação da infecção foi realizada por identificação das colônias 24 h após plaqueamento dos pulmões retirados cirurgicamente dos animais eutanasiados ao encerramento do experimento de microdiálise.

4.7 Experimentos de microdiálise brônquica e pulmonar

Para medir as concentrações livres no fluido de revestimento epitelial pulmonar nos grupos hígidos, infectados PA14, infectados ATCC 27853 e *bead* branco, foi realizada a microdiálise brônquica (n = 3 a 7/grupo). Para a determinação das concentrações livres pulmonares no grupo *bead* agarose, foi realizada a microdiálise pulmonar (n = 4).

Após o estabelecimento da infecção, respeitando 7 ou 14 dias pós-inoculação para infecção aguda ou crônica, respectivamente, os animais foram anestesiados com carbamato de etila (1,25 g/kg, i.p.) e posicionados em posição supina, sob uma manta de aquecimento, a fim de manter a sua temperatura corporal controlada.

Para a microdiálise brônquica foi realizada traqueostomia para inserção da sonda CMA 20® (2 mm *custom made probes, cut-off* 20 kDa, CMA Microdialysis AB, Suécia) que foi perfundida com solução de Ringer através de uma seringa de

plástico (Descarpak) conectada em uma bomba de microinfusão PHD 2000 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) a um fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Para a microdiálise pulmonar os animais foram intubados por traqueostomia e colocados em ventilação artificial com o auxílio de um respirador para roedores (Harvard Apparatus, modelo 683) com uma frequência de 62-66 min^{-1} e um volume de ar de 2,5 mL. O pulmão direito foi exposto e a sonda CMA 20[®] (4 mm, *cut-off* 20 kDa, CMA Microdialysis AB, Suécia) foi inserida no lóbulo intermediário através de uma pequena incisão feita com auxílio de uma agulha.

Após 1 h de estabilização das sondas, os animais receberam TOB na dose de 10 mg/kg pela veia femoral, aguardou-se o tempo para preenchimento do volume morto do *outlet* da sonda (19 min para a sonda brônquica e 5 min para a sonda pulmonar), e coletou-se amostras de microdialisado a cada 30 min por 12 h. As amostras foram congeladas em $-80^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para análise posterior.

4.8 Calibração *in vivo* das sondas de microdiálise

Para a correta mensuração das concentrações de fármaco coletadas pela sonda de microdiálise determinou-se a recuperação *in vivo* das sondas através de retrodiálise (ARAÚJO et al., 2008). Após a inserção da sonda no animal anestesiado, a mesma foi perfundida a um fluxo de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ com uma solução de TOB na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução de Ringer. Após estabilização de 1 h, o microdialisado foi coletado a cada 30 min durante duas horas. A concentração de fármaco foi quantificada utilizando metodologia detalhada no item 3.9, na solução perfundida e na solução dialisada, e a recuperação relativa (RR) das sondas foi calculada conforme descrito na Equação 1:

$$RR = \frac{Conc_{perfusado} - Conc_{dialisado}}{Conc_{perfusado}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

4.9 Quantificação da TOB nas amostras de microdialisado

A quantificação da TOB foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS-MS), em método previamente validado por Bernardi e colaboradores (2017) utilizando apramicina como padrão interno (PI). As análises foram realizadas em um sistema LC Agilent 1200 (Agilent, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Sciex, API 5000 (ABSciex, Canadá). Foi utilizada uma coluna C₁₈ (Waters X-Terra[®], 100 mm × 2,1 mm, tamanho de partícula 3,5 µm), com pré-coluna C18 Phenomenex AJO-428. O volume de injeção foi de 4 µL, e a coluna mantida a 40 ± 1 °C. O tempo de corrida cromatográfico foi de 9,5 min, a um fluxo de 300 µL/min, consistindo em gradiente de fase móvel A: água:10 mM de HFBA e fase móvel B: acetonitrila:10 mM de HFBA, iniciando com 5% de B, aumentado para 90% em 4 min, mantendo por 4 min e retornando à condição inicial por 4 min ao final da análise. A TOB e o PI foram monitoradas utilizando ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI+), nas transições de massa m/z 468,2 > 163,3 para a TOB e 540,3 > 217,2 para o PI.

4.10 Análise farmacocinética não-compartmental e análise estatística

A análise farmacocinética não-compartmental (NCA) dos perfis de concentração *versus* tempo foi realizada utilizando o *software* Phoenix[®] v. 64 (Pharsight[®]). Foram determinados os parâmetros farmacocinéticos: constante de velocidade de eliminação (λ), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e área sob a curva (ASC_{0-∞}). O fator de penetração tecidual (f_T) foi calculado pela razão entre as concentrações livres teciduais e as concentrações livres plasmáticas [dados obtidos anteriormente no grupo por Bernardi (2016) e Lima (2018)]. Os parâmetros obtidos através de análise não-compartmental, nos grupos hígidos, infectados PA14, infectados ATCC 27853 e *bead* branco de alginato foram comparados por ANOVA One-Way ($\alpha = 0,05$) seguido de Teste de Bonferroni, realizados no *software* Prism 6.0 (GraphPad[®]).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Calibração das sondas

A recuperação relativa das sondas de microdiálise foi determinada pela técnica de retrodiálise *in vivo*. Nos estudos conduzidos previamente não foram encontradas diferenças na RR das sondas entre os grupos hígidos, de infecção aguda, crônica, e os inoculados com *bead* branco de alginato (BERNARDI, 2016; LIMA, 2017). Por este motivo, a RR das sondas de microdiálise brônquica foi determinada apenas nos animais hígidos. O valor médio encontrado foi de $RR = 26,6 \pm 9,8\%$, próximo à RR da sonda pulmonar ($27,7 \pm 7,7\%$). Os valores de concentração de cada animal foram corrigidos pelo valor da respectiva sonda utilizada no experimento visando minimizar os erros experimentais.

As diferenças da sonda de microdiálise brônquica e da pulmonar, utilizada nos estudos anteriores, foram no comprimento da membrana e no comprimento do *shaft* da sonda uma vez que o material da tubulação e da membrana é o mesmo. Com a redução do comprimento da membrana, de 4 mm na sonda pulmonar para 2 mm na sonda brônquica, era esperado que a RR das sondas brônquicas diminuísse, pois a redução da superfície da membrana diminuiria a área de difusão do fármaco. Porém, esse processo pode ter sido compensado pelo local onde a sonda foi inserida, visto que no PELF a tortuosidade é menor e o volume de líquido maior em comparação com o tecido pulmonar, onde as células conferem maior tortuosidade ao caminho da molécula no líquido intersticial até ser coletada pela sonda (HAMMARLUND-UDENAES, 2017).

Nos grupos de microdiálise pulmonar, inoculados com *bead* de agarose, utilizou-se a sonda de microdiálise tecidual, e como não havia dados de RR neste grupo, também foi realizada a calibração. O valor obtido de RR foi $6,6 \pm 0,3\%$, menor do que o a RR destas sondas nos outros grupos analisados anteriormente ($27,7 \pm 7,7\%$) (BERNARDI, 2016).

5.2 Farmacocinética brônquica da TOB

A Tabela 1 descreve os parâmetros farmacocinéticos brônquicos determinados por NCA a partir dos perfis farmacocinéticos nos diferentes grupos analisados. Visando facilitar a discussão dos resultados a Tabela S1 (Material Suplementar) traz os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e pulmonares obtidos dos experimentos anteriores (BERNARDI, 2016; LIMA, 2017), juntamente com os brônquicos obtidos nesse trabalho.

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos brônquicos (PELF) da TOB determinados por análise não-compartimental após administração i.v. *bolus* da dose de 10 mg/kg a ratos Wistar.

Parâmetros PK	Hígidos (n = 7)	Infecção aguda (n = 6)	Infecção crônica (n = 3)	<i>Bead</i> de alginato (n = 4)
λ (h^{-1})	0,27 ± 0,10	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,02
$t_{1/2}$ (h)	3,0 ± 1,2	5,6 ± 2,3	5,5 ± 1,8	4,27 ± 0,44
ASC _{0-∞} (μg·h/mL)	8,7 ± 5,8	2,8 ± 1,8 ^{a,b}	8,1 ± 7,7	14,41 ± 4,08
$fT_{PELF/PULMÃO}$	0,08	0,09	0,31	0,50

^aEstatisticamente diferente do grupo hígidos ($\alpha = 0,05$); ^bEstatisticamente diferente do grupo *bead* alginato ($\alpha = 0,05$). ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão.

A Figura 3 descreve o perfil farmacocinético plasmático total, pulmonar e brônquico (PELF) livres da TOB nos animais hígidos. A constante de eliminação da TOB determinada no PELF dos animais hígidos foi de $0,27 \pm 0,10 h^{-1}$, semelhante aos valores determinados no plasma $0,15 \pm 0,02 h^{-1}$ e no pulmão $0,16 \pm 0,02 h^{-1}$ (BERNARDI, 2016). Do mesmo modo, a meia-vida da no PELF ($3,0 \pm 1,2 h$) foi semelhante à plasmática ($4,5 \pm 0,7 h$) e pulmonar ($4,2 \pm 0,5 h$) determinados anteriormente (BERNARDI, 2016). Esses resultados indicam que em animais hígidos a TOB é eliminada na mesma velocidade a partir do PELF, tecido pulmonar e

plasma dos animais hígidos. As exposições plasmática ($ASC_{0-\infty}$) e pulmonar à TOB determinadas anteriormente foram de 128 ± 19 e $105 \pm 12 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, respectivamente, (Tabela S1), levando a um fator de penetração pulmonar (f_T) de 0,92. O pulmão possui diversos compartimentos de diferentes permeabilidades que influenciam as concentrações atingidas nos diferentes locais. A TOB é uma molécula altamente hidrofílica que apresenta baixa ligação a proteínas ($f_u = 0,9$), características que favorecem a sua distribuição para o espaço extracelular. Desta forma, as concentrações de fármaco livre no plasma e no líquido intersticial pulmonar tendem a ser semelhantes, considerando que o endotélio capilar é relativamente permeável (BERGOGNE-BEREZIN, 1995; MAZZEI, et al., 1995). O $f_{T_{\text{PULMÃO/PLASMA}}}$ médio determinado de 92% comprova que as concentrações de fármaco livre no plasma são semelhantes às concentrações livres no espaço extracelular do pulmão, indicando que difusão é o processo que governa a distribuição do fármaco do plasma para o tecido pulmonar.

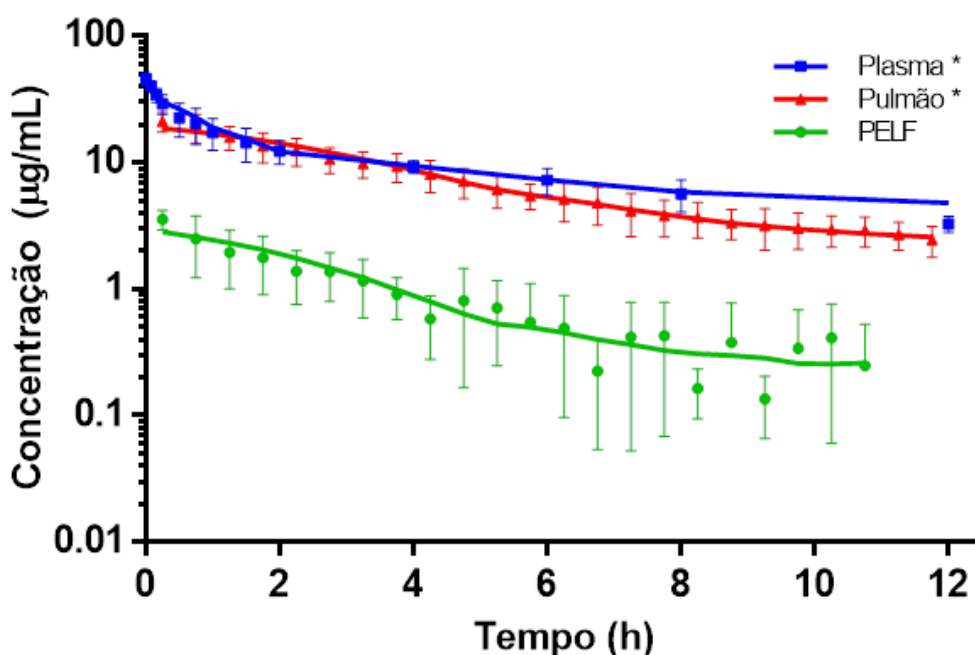


Figura 3. Perfil farmacocinético plasmático total ($n = 6$), pulmonar ($n = 6$) e brônquico (PELF) ($n = 5$) livres da TOB após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar hígidos. Dados expressos como média \pm desvio padrão e linha de tendência. *Dados de BERNARDI, 2016.

No PELF dos animais hígidos a $ASC_{0-\infty}$ da TOB é reduzida a $8,7 \pm 5,8$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, levando a determinação de uma penetração brônquica em relação ao tecido pulmonar de aproximadamente 10% ($fT_{\text{PELF}/\text{PULMÃO}} = 0,08$), o que indica uma reduzida penetração alveolar do fármaco em condições normais. Essa passagem é influenciada pela permeabilidade da membrana alveolar, resultando em uma pobre penetração brônquica (BERGOGNE-BEREZIN, 1995; MAZZEI, et al., 1995).

Eisenberg e colaboradores (1993) determinaram a penetração de aminoglicosídeos no PELF de ratos, utilizando a técnica de microdiálise. Neste estudo, a penetração da TOB na dose de 20 mg/kg, calculada pela razão da $ASC_{0-t, \text{PELF}}$ pela $ASC_{0-t, \text{PLASMA}}$ foi de $0,36 \pm 0,06$ (EISENBERG et al., 1993). Porém, alguns fatores deixam dúvidas sobre a confiabilidade desses resultados. A RR das sondas foi medida *in vitro*, utilizando o lavado broncoalveolar dos animais, com a adição de fármaco a concentração de 10, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pela diálise *in vitro* foi calculada a recuperação e a RR foi de $1,74 \pm 0,08\%$. Esse valor muito baixo de recuperação também pode deixar dúvidas sobre as concentrações medidas no PELF, pois estas estariam muito próximas do limite de quantificação do método (de 0,5-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sendo assim, os nossos dados não podem ser comparados com os de Eisenberg, que é o único estudo de penetração da tobramicina no PELF de ratos hígidos.

A Figura 4 descreve o perfil farmacocinético plasmático total, pulmonar e brônquico livres da TOB nos animais com infecção aguda. O $t_{1/2}$ da TOB determinado no PELF foi de $5,6 \pm 2,3$ h e a constante de velocidade de eliminação foi de $0,15 \pm 0,07$ h^{-1} , semelhantes aos parâmetros determinados nos animais hígidos, indicando que a infecção não alterou a constante de eliminação da TOB no PELF. A exposição da TOB no PELF no grupo de infecção aguda foi reduzida, observando-se uma $ASC_{0-\infty}$ de $2,8 \pm 1,8$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, significativamente diferente e aproximadamente 70% menor do que a observada nos animais hígidos. Essa redução das concentrações livres de TOB no PELF dos animais com infecção aguda já foi observada anteriormente no tecido pulmonar, onde observou uma $ASC_{0-\infty}$ de 32 ± 17 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, 70 % menor do que no tecido dos animais hígidos (Tabela S1).

O $fT_{\text{PELF}/\text{PULMÃO}}$ do grupo com infecção aguda indica a mesma proporção de penetração da TOB do interstício pulmonar para os brônquios, observado no grupo hígido. Desse modo, a redução das concentrações livres intersticiais pulmonares

levou a redução proporcional nas concentrações livres no PELF, mantendo a mesma penetração brônquica observada nos animais hígidos, de aproximadamente 10% ($fT_{PELF/PULMÃO} = 0,09$, Tabela 1).

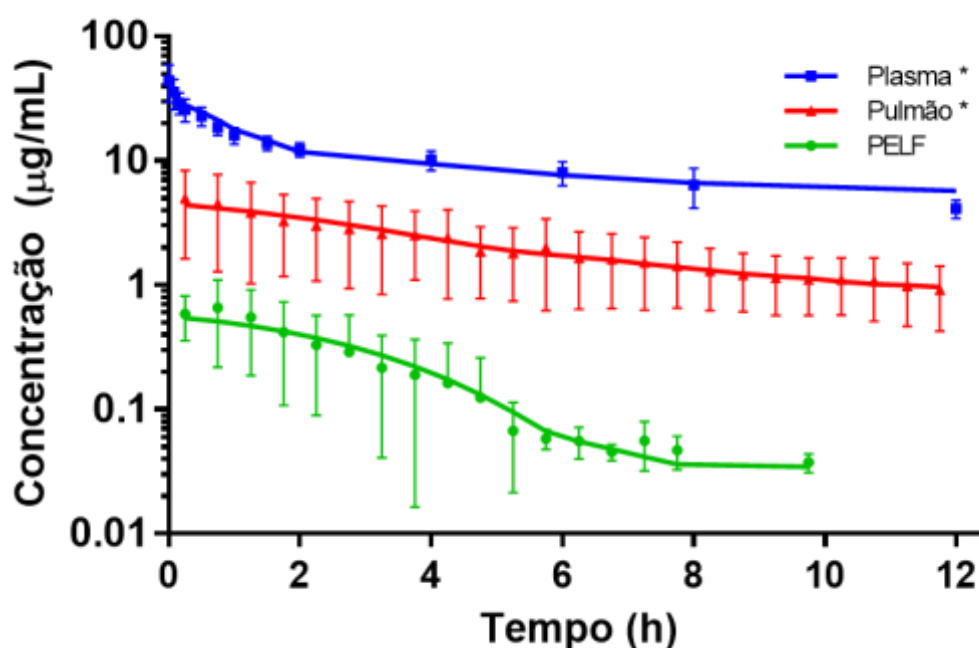


Figura 4. Perfil farmacocinético plasmático total (n = 5), pulmonar (n = 5) e brônquico (PELF) (n = 5) livres da TOB após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar com infecção aguda de 7 dias. Dados expressos como média \pm desvio padrão e linha de tendência. *Dados de BERNARDI, 2016.

A infecção aguda foi desenvolvida utilizando a cepa de *P. aeruginosa* PA14 não-mucoide, capaz de produzir biofilmes espessos e resistentes em uma interface ar-líquido, sem a necessidade de uma superfície para ancoramento. A matriz extracelular de *P. aeruginosa* PA14 é composta majoritariamente de (DNA), seguido de lipopolissacarídeo (LPS), O-antígeno polissacarídeo extracelular (O-PS EC), e uma família de glicerofosforilados cíclicos (COULON et al., 2010).

O DNA é composto de pentose, fosfato e base nitrogenada. Devido aos fosfatos, é uma molécula altamente aniônica. Alguns relatos na literatura indicam que o DNA extracelular presente nos biofilmes pode agir como agente complexante de cátions como antimicrobianos aminoglicosídeos (MARTHA et al., 2006;

BJARNSHOLT et al., 2013). O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas e está relacionado ao ancoramento das bactérias às superfícies abióticas e na formação do biofilme. O O-PS EC é composto por uma unidade de repetição de trissacarídeos, que apresenta características aniônicas, rico em amino-açúcares (COULON et al., 2010). As regiões aniônicas do DNA e do O-OS EC podem interagir com a TOB, que é uma molécula catiônica, capturando-a e impedindo que esta esteja disponível para exercer ação farmacológica, bem como ser coletada pela sonda de microdiálise, levando à diminuição das concentrações livres no interstício pulmonar e no PELF, afetados pela infecção com biofilme (TSENG et al., 2013).

A Figura 5 descreve o perfil farmacocinético plasmático total, pulmonar e brônquico livres da TOB nos animais com infecção crônica. O $t_{1/2}$ e a constante de velocidade de eliminação determinadas no PELF dos animais infectados cronicamente foram de $4,27 \pm 0,44$ h e $0,16 \pm 0,02$ h⁻¹, respectivamente, não diferindo dos parâmetros da TOB no PELF dos animais hígidos, de modo semelhante ao observado para a eliminação pulmonar e plasmática (Tabela S1).

Nos estudos anteriores determinou-se que a infecção crônica reduziu em torno de 70% a exposição plasmática à TOB ($ASC_{0-\infty}$ de 31 ± 25 µg·h/mL) em relação aos animais hígidos (Tabela S1). Em pacientes críticos, com sepse ou trauma, o *clearance* de antimicrobianos eliminados por via renal tende a aumentar. Considerando que a infecção crônica pode causar alterações fisiológicas semelhantes à condição de sepse, a redução da concentração de TOB vista no plasma se deve ao aumento do *clearance* devido à infecção crônica (HOBBS, et al., 2015). Da mesma forma, essa redução também foi vista no interstício pulmonar, onde a exposição foi reduzida em aproximadamente 75% ($ASC_{0-\infty}$ obtida de 26 ± 13 µg·h/mL). Em função da redução proporcional na exposição plasmática e pulmonar, o $f_{T_{PULMÃO/PLASMA}}$ obtido de 0,94, semelhante ao observado nos animais hígidos, apesar das menores concentrações determinadas.

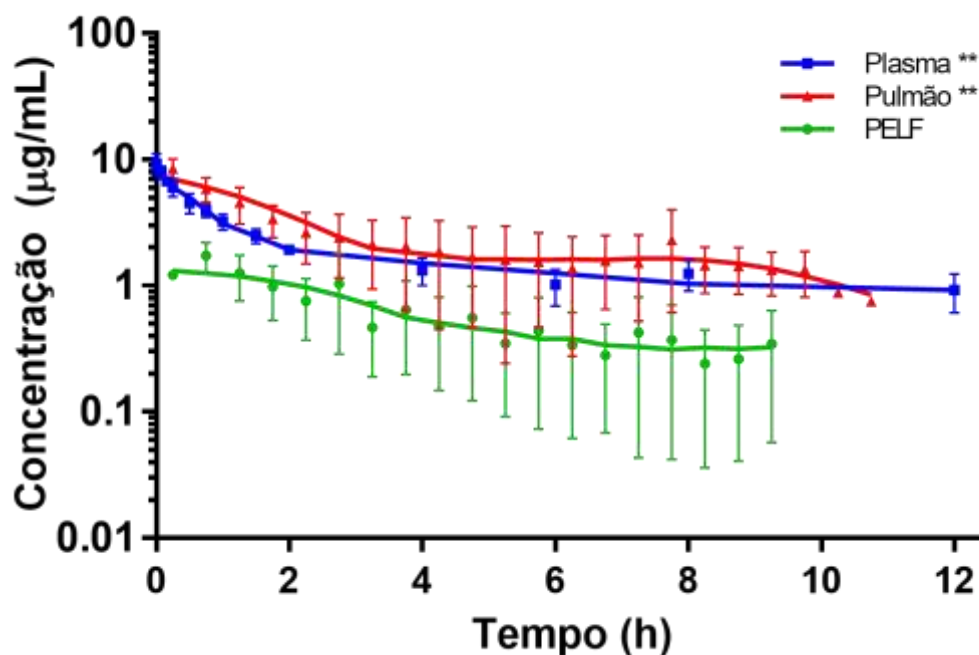


Figura 5. Perfil farmacocinético plasmático total (n = 5), pulmonar (n = 5) e brônquico (PELF) (n = 5) livres da TOB após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar com infecção crônica. Dados expressos como média \pm desvio padrão e linha de tendência. **Dados de LIMA, 2017.

No PELF dos animais infectados cronicamente, no entanto, não foi observada redução da $ASC_{0-\infty}$ quando comparado com os animais hígidos (Tabela 1). Desta forma, o fator de penetração calculado para esse grupo foi superior aos grupos hígidos e infectados agudamente ($fT_{PELF/PULMAO} = 0,31$).

Infecções agudas e crônicas causam alterações teciduais no pulmão, levando à destruição do tecido pulmonar, troca gasosa comprometida e edema pulmonar (WONNENBERG et al., 2014). Além disso, o alginato presente no biofilme de *P. aeruginosa* interfere nas funções dos polimorfonucleares (PMN), como aderência, metabolismo do oxigênio, degranulação e atividade bactericida, protegendo as bactérias da fagocitose, opsonização e causando infiltração neutrofílica que contribui para a lesão tecidual produzida pela infecção (SONG et al., 2003). As lesões teciduais causadas pela presença da infecção crônica e a presença de biofilme mucoide, uma vez que esse grupo foi inoculado com *P. aeruginosa* ATCC 27853, podem ter levado ao aumento da permeabilidade vascular e maior difusão da TOB, causando o aumento da relação de penetração vista no PELF.

A infecção crônica foi desenvolvida pelo modelo utilizado previamente por Torres e colaboradores (2017), utilizando *beads* de alginato impregnados com cepa mucoide de *P. aeruginosa*. Nesse modelo, a presença dos *beads* impede o *clearance* mecânico normalmente realizado pelas vias aéreas dos animais, possibilitando o desenvolvimento de uma infecção mais prolongada. Para avaliar a influência do alginato dos *beads* nos resultados farmacocinéticos do TOB, foi conduzido em paralelo um grupo de animais que receberam *beads* brancos de alginato, sem bactéria. A Figura 6 mostra o perfil farmacocinético plasmático total, pulmonar e brônquico livres do grupo inoculado com *bead* branco de alginato 14 dias após a inoculação. Pode-se observar níveis livres pulmonares similares aos observados nos animais infectados cronicamente. Porém, as concentrações plasmáticas e brônquicas (PELF) são equivalentes às observadas nos animais hígidos que receberam a mesma dose.

Cepas de *P. aeruginosa*, como a utilizada neste estudo e encontradas em infecções crônicas do trato respiratório de pacientes com FC, são compostas de um biofilme mucoide predominantemente composto do polissacarídeo alginato. Nessas cepas, ocorre a superprodução do exopolissacarídeo alginato devido a mutações que causam inativação dos genes que normalmente regulam a sua produção. Com isso, a presença do alginato nos biofilmes de *P. aeruginosa* mucoide confere tanto proteção aos radicais livres como impedem a ação do sistema imunológico, além de estarem associados ao sistema de formação e maturação dos biofilmes (TSENG et al., 2013; LUND-PALAU et al., 2016). Estudos demonstram que o alginato se liga à tobramicina *in vitro*, impedindo a difusão do antimicrobiano e reduzindo suas concentrações disponíveis no meio (NICHOLS et al., 1998; TSENG et al., 2013).

Pode-se hipotetizar que a redução da exposição à TOB vista no tecido pulmonar dos animais inoculados com *beads* de alginato (Tabela 1), em relação aos animais hígidos, seria devido ao sequestro da TOB no alginato dos *beads* brancos presentes nos brônquios. Como não há aumento de permeabilidade nesse grupo, pois não há infecção, a ligação da TOB ao alginato poderia deslocar o equilíbrio das concentrações livres do fármaco em direção ao PELF, diminuindo as concentrações no líquido intersticial pulmonar e mantendo o mesmo nível no PELF.

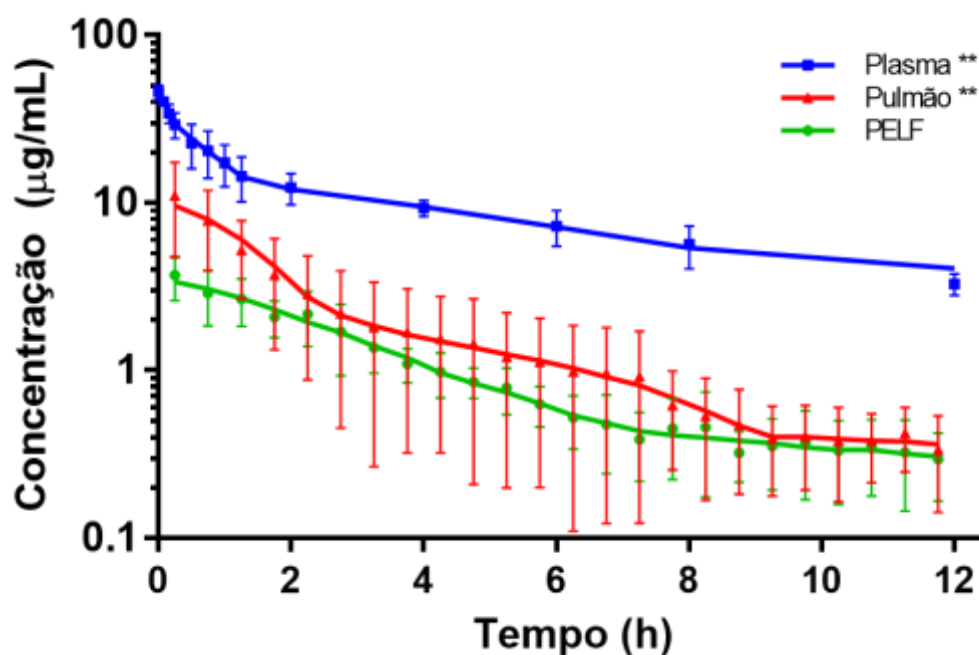


Figura 6. Perfil farmacocinético plasmático (n = 4), pulmonar (n = 6) e brônquico (PELF) (n = 4) livres da TOB após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar inoculados com *beads* de alginato sem bactéria. Dados expressos como média \pm desvio padrão e linha de tendência. **Dados de LIMA, 2017.

Os resultados obtidos trouxeram uma nova questão: qual seria o papel do alginato presente no *bead* nas alterações farmacocinéticas encontradas no grupo crônico? Para tentar elucidar este ponto, foi desenvolvido um *bead* com outra substância, a agarose, um polissacarídeo neutro, que não tem a propriedade de ligação à TOB. Os *beads* de agarose são utilizados em diversos trabalhos para o desenvolvimento de infecção crônica por *P. aeruginosa* (STARKE et al., 1987; MORISSETTE et al., 1995; MCMORRAN et al., 2001, HEECKEREN & SHLUCHTER, 2002).

Foram desenvolvidos *beads* de agarose que apresentaram um tamanho médio de 156 μm e uma população homogênea, dado pelo valor de *span* de 0,93, que indica uma baixa dispersão do tamanho das partículas. A penetração da TOB no grupo de animais inoculados com *beads* de agarose foi determinada apenas no tecido pulmonar. A Figura 7 mostra o perfil farmacocinético pulmonar da TOB no grupo de animais hígidos, de infecção aguda, de infecção crônica, e nos animais

inoculados com *beads* de alginato e de agarose, ambos sem bactéria. A Tabela 2 mostra os parâmetros farmacocinéticos pulmonares determinados por NCA nesses mesmos grupos.

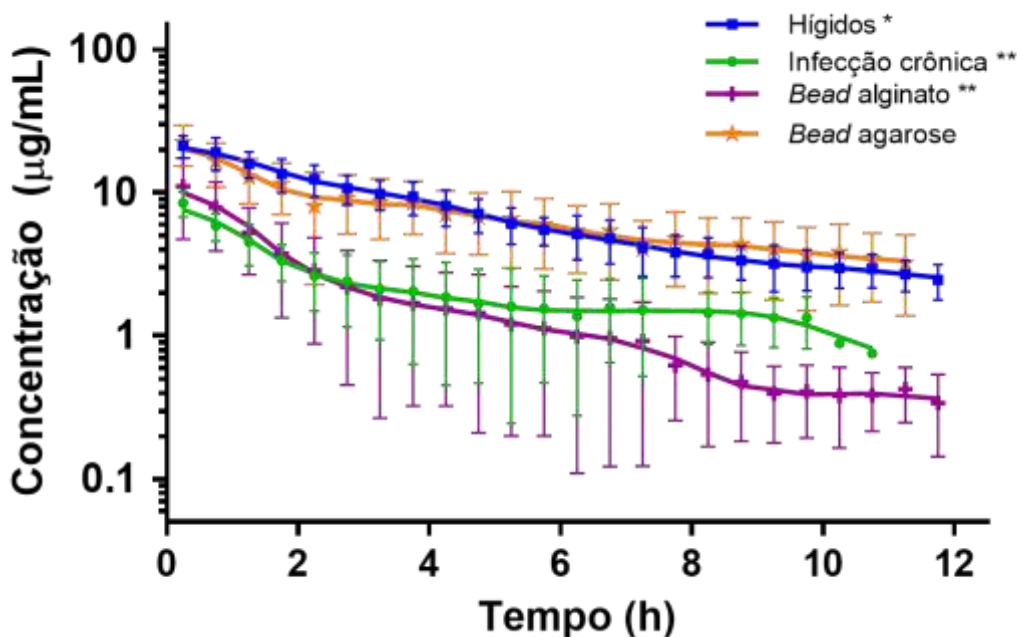


Figura 7. Perfil farmacocinético pulmonar da TOB após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg a ratos Wistar hígidos ($n = 6$), com infecção crônica ($n = 7$), inoculados com *beads* brancos de alginato ($n = 6$) e com *beads* brancos de agarose ($n = 4$). Dados expressos como média \pm desvio padrão e linha de tendência. *Dados de BERNARDI, 2016 e **Dados de LIMA, 2017.

Pode-se observar que os *beads* brancos de agarose não produziram alteração nos níveis pulmonares livres de TOB, uma vez que a $ASC_{0-\infty}$ não apresentou diferença significativa entre esses grupos. O perfil pulmonar livre da TOB nos dois grupos de *beads* brancos também é distinto entre si. Os resultados indicam que somente quando inoculamos uma substância na qual a TOB pode se ligar, como o alginato, ocorre alteração das concentrações pulmonares. Sendo assim, espera-se que as concentrações brônquicas em animais inoculados com *beads* brancos de agarose sejam semelhantes às observadas nos animais hígidos.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos pulmonares da TOB após administração i.v. *bolus* da dose de 10 mg/kg a ratos Wistar determinados por análise não-compartimental.

Parâmetros PK	Hígidos* (n = 6)	<i>Bead</i> branco alginato** (n = 6)	<i>Bead</i> branco agarose (n = 4)
λ (h ⁻¹)	0,16 ± 0,02	0,40 ± 0,57	0,11 ± 0,04
t _{1/2} (h)	4,2 ± 0,5	4,0 ± 2,4	6,9 ± 2,4
ASC _{0-∞} (µg·h/mL)	105 ± 12	26 ± 14 ^{a,c}	99 ± 30
fT	0,92	0,23	-

^a Estatisticamente diferente do grupo hígidos; ^c Estatisticamente diferente do grupo *bead* agarose; ($\alpha = 0.05$). ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão. *Dados de BERNARDI, 2016. **Dados de LIMA, 2017.

Apesar do grupo inoculado com *bead* branco de alginato ter apresentado uma redução das concentrações pulmonares de TOB, o grupo de infecção crônica apresentou alterações semelhantes às observadas no grupo com infecção aguda. Avaliando os resultados em conjunto, as alterações farmacocinéticas encontradas no grupo de infecção crônica são causadas não somente pelo alginato que compõe o biofilme, mas também pela presença da infecção e inflamação decorrente.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados pode-se concluir que foi possível determinar por microdiálise as concentrações livres brônquicas da TOB no PELF de ratos Wistar hígidos e infectados por *P. aeruginosa* aguda e cronicamente, permitindo determinar a influência do processo infeccioso na distribuição tecidual desse fármaco.

Não foi observada alteração na meia-vida de eliminação da TOB do PELF dos animais hígidos, infectados aguda e cronicamente e os inoculados com *beads* de agarose, indicando que a infecção não altera a velocidade de eliminação pulmonar do fármaco.

A infecção aguda reduziu a penetração brônquica da TOB em torno de 70%, semelhante à redução observada no tecido pulmonar. Essa redução da exposição tecidual e brônquica da TOB pode ser explicada pelos efeitos da lesão tecidual causada pela infecção e da ligação da TOB aos componentes da matriz extracelular do biofilme não-mucoide.

A infecção crônica alterou a farmacocinética da TOB, reduzindo as concentrações plasmáticas e pulmonares e aumentando a penetração brônquica devido à lesão tecidual e ao aumento da permeabilidade vascular. Os resultados indicaram que as alterações encontradas no grupo de infecção crônica foram principalmente devidas aos efeitos da infecção/inflamação, associados à presença do alginato, componente do biofilme mucoide e dos *beads* de alginato utilizados para inoculação.

Para complementar os resultados discutidos deste trabalho, pretende-se aumentar o tamanho amostral do grupo PELF de infecção crônica, a fim de aumentar a confiabilidade nos resultados bem como confirmar a recuperação das sondas de microdiálise pulmonar no grupo com agarose. Após, será realizada modelagem farmacocinética populacional dos dados a fim de estabelecer a relação quantitativa da TOB nos compartimentos pulmonares, possibilitando o melhor entendimento do efeito da infecção na distribuição pulmonar do fármaco visando um tratamento antimicrobiano mais efetivo.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, I. A., STAUDT, K., J., SILVA, C., de M., LOCK, G. de A., DALLA COSTA, T., & ARAÚJO, B. V. de,. Influence of experimental cryptococcal meningitis in Wistar rats on voriconazole brain penetration assessed by microdialysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.61(7), p.e00321-17, 2017.

ARAÚJO, B. V., DINIZ, A., PALMA, E. C., BUFFÉ, C. & DALLA COSTA, T. PK-PD modeling of β -lactam antibiotics: in vitro or in vivo models? *The Journal of Antibiotics*. v.64, p. 439-446, 2011.

ARAÚJO, B. V., LAUREANO, J. V., GRÜNSPAN, L. D., DALLA COSTA, T. & TASSO, L. Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. *Journal of Chromatography B*. v.919-920, p.62-66, 2013.

ARAÚJO, B.V., SILVA, C. F., HAAS, S. E., DALLA COSTA, T. Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats. *International Journal of Antimicrobial Agents*. V.33, p.154-159, 2009.

ARAÚJO, B.V., SILVA, C. F., HAAS, S. E., DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.47: p,876-881, 2008.

AZEREDO, F. J., ARAÚJO, B. V. de, HAAS, S. E., TORRES, B., PIGATTO, M., ANDRADE, C. de, & DALLA COSTA, T. Comparison of fluconazole renal penetration levels in healthy and *Candida albicans*-infected Wistar rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.56(11), p.5852-5857, 2012.

AZEREDO, F. J., DALLA COSTA, T. & DERENDORF, H. Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: current status and future directions. *Clinical Pharmacokinetics*. v.53, p.205-212, 2014.

BARMADA, S., KOHLHEPP, S., LEGGETT, J., DWORKIN, R. & GILBERT, D. Correlation of tobramycin-induced inhibition of protein synthesis with postantibiotic effect in *Escherichia coli*. v.37(12), p.2678-2683, 1993.

BERGOGNE-BEREZIN, E. New concepts in the pulmonary disposition of antibiotics. *Pulmonary Pharmacology*. v.8, p. 65-81, 1995.

BERGOGNE-BEREZIN, E. Penetration of antibiotics into the respiratory tree. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.8, p. 171-174, 1981.

BERNARDI, P.M. Avaliação por microdiálise da penetração pulmonar da TOB em modelo de pneumonia por microrganismo formador de biofilme. Dissertação para obtenção do grau de mestre. UFRGS, Porto Alegre, 2016.

BERNARDI, P.M., BARRETO, F., DALLA COSTA, T. Application of a LC-MS/MS method for evaluating lung penetration of tobramycin in rats by microdialysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V.134: p. 340-345, 2017.

BJARNSHOLT, T., CIOFU, O., MOLIN, S., GIVSKOV, M. & HOIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery*. v.12, p. 791-808, 2013.

CANTÓN, R., COBOS, N., GARCIA, J. de, BAQUERO, F., HONORATO, J., GARTNER, S., ALVAREZ, A., SALCEDO, A., OLIVER, A., & GARCIA-QUETGLAS, E. Antimicrobial therapy for pulmonar pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cysti fibrosis patients. *Clinical Microbiology Infection*. v.11. p.690-703, 2005.

CARON, E., DESSEYN, J., SERGENT, L., BARTKE, N., HUSSON, M., DUHAMEL, A. & GOTTRAND, F. Impact of fish oils on the outcomes of a mouse model of acute *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *British Journal of Nutrition*. v.113, p.191-199, 2015.

CARREÑO, F., PAESE, K., SILVA, S. M., GUTERRES, S. & DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic investigation of quetiapine transport across blood-brain barrier mediated by lipid core nanocapsules usin brain microdialysis in rats. *Molecular Pharmaceutics*. v.13, p.1289-1297, 2016.

CASH, H. A., WOODS, D. E., MCCULLOUGH, B., JOHANSON, W. G. & BASS, J. A. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *American Review of Respiratory Disease*. v.119, p.453-459, 1979.

CHAURASIA, C. S., MÜLLER, M., BASHAW, E. D., BENFELDT, E., BOLINDER, J., BULLOCK, R., BUNGAY, P. M., DELANGE, E. C. M., DERENDORF, H., ELMQUIST, W. F., HAMMARLUND-UDENAES, M., JOUKHADAR, C., KELLOGG JR, D. L., LUNTE, C. E., NORDSTROM, C. H., ROLLEMA, H., SAWCHUK, R. J., CHEUNG, B. W. Y., SHAH, V. P., STAHL, L., UNGERSTEDT, U., WELTY, D. F. & YEO, H. AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application, and regulatory perspectives report from the joint AAPS-FDA Workshop, november 4-5, 2005, Nashville, TN. The AAPS Journal. v.9(1). p.E48-E59, 2007.

COULON, C., VINOGRADOV, E. & FILLOUX, A., SADOVSKAYA, I. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrate of biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. PLOS ONE. v.5(12), e14220, 2010.

CRAIG, W. A. Optimizing aminoglycoside use. Critical Care Clinics. v.27: p.107-121, 2011.

CRANDON, J. L., KIM, A. & NICOLAU, D. P. Comparison of tigecycline penetration into the epithelial lining fluid of infected and uninfected musine lungs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.64, p.837-839, 2009.

DE LANGE, E. C. M., DE BOER, A. G. & BREIMER, D. D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. Advanced Drug Delivery Reviews. v.45, p.125-148, 2000.

DHANANI, J., ROBERTS, J. A., CHEW, M., LIPMAN, J., BOOTS, R. J., PATERSON, D. I. & FRASER, J. F. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. International Journal of Antimicrobial Agents. V.36, p.491-500, 2010.

DRUGBANK. Tobramycin. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00684>. Acesso em: 19 de outubro de 2019.

EISENBERG, E. J., CONZENTINO, P., EICKHOFF, W. M. & CUNDY, K. C. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. Journal of Pharmacological Methods. V.29(2), p.93-98, 1993.

FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Natural Reviews Microbiology*. v.8, pg. 623-633, 2010.

FREDDO, R. J. & DALLA COSTA, T. determination of norfloxacin free interstitial levels in skeletal muscle by microdialysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.91(11), p.2433-2440, 2002.

GOODMAN, A. L., KULASEKARA, B., RISTSCH, A., BOYD, D., SMITH, R. S. & LORY, STEPHEN. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*. v., p.745-754, 2004.

GROWCOTT, E. J., COULTHARD, A., AMISON, R., HARDAKER, E. L., SAXENA, V., MALT, L., JONES, P., GREVOT, A., POLL, C., OSBORNE, C. & BANNER, K. Characterization of a refined rat model of respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of ciprofloxacin. *Journal of Cystic Fibrosis*. v.10(3), p.166-174, 2011.

GURJAR, M. Colistin for lung infection: an update. *Journal of Intensive Care*. v.3(1), p.3, 2015.

HAMMARLUND-UDENAES, M. Microdialysis as na importante technique in systems pharmacology – a historical and methodological review. *The AAPS Journal*. v. 19(5), p. 1294–1303, 2017.

HEECKEREN, A. M. & SCHLUCHTER, M. D. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Laboratory Animals*. v.36, p. 291-312, 2002.

HENGZHUANG, W., WU, H., CIOFU, O., SONG, Z. & HOIBY, N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.56(5), p.2683-2690, 2012.

HOBBS, A. L. V., SHEA, K. M., ROBERTS, K. M. & DALEY, M. J. Implications of augmented renal clearance on drug dosing in critical ill patients: a focus on antibiotics. *Pharmacotherapy*. v.35(11), p.1063-1075, 2015.

HOIBY N., CIOFU, O., JOHANSEN, H. K., SONG, Z., MOSER, C., JENSEN, P. O., MOLIN, S., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. & BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*. v.3, p.55-65, 2011.

ISRAEL, K.S., WELLES, J.S., BLACK, H.R. Aspects of the pharmacology and toxicology of tobramycin in animals and humans. *The Journal of Infectious Diseases*. v.134, p.S97-S103, 1976.

JOHANSEN, H. K. & HOIBY, N. Rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Handbook of Animal Models of Infection: Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy*. p. 517-529, 1999.

JOUKHADAR, C., DERENDORF, H. & MÜLLER, M. Microdialysis. A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *European Journal of Clinical Pharmacology*. v.57(3), p.211-219, 2001.

LIMA, D.M.F. Influência de pneumonia crônica experimental por *Pseudomonas aeruginosa* mucóide na disposição plasmática e pulmonar da tobramicina. Trabalho de Conclusão de Curso. UFRGS, 2017.

LUND-PALAU, H., TURNBULL, A. R., BUSH, A., BARDIN, E., CAMERON, L., SOREN, O., WIERRE-GORE, N., ALTON, E. W. F. W., BUNDY, J. G., CONNETT, G., FAUST, S. N., FILLOUX, A., FREEMONT, P., JONES, A., KHOO, V., MORALES, S., MURPHY, R., PABARY, R., SIMBO, A., SCHELENZ, S., TAKATS, Z., WEBB, J., WILLIAMS, H. D., & DAVIES, J. C. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine*. v.10(6), p.685-697, 2016

MARTHA, B., CROISIER, D., DURAND, D., HOCQET, D., PLESIAT, P., PIROTH, L., PORTIER, H. & CHAVANET, P. In-vivo impact of the MexXY efflux system on aminoglycoside efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia treated with tobramycin. *Clinical Microbiology Infection*. v.12, p.426-432, 2006.

MAZZEI, T., NOVELLI, A., DE LALLA, F. de., MINI, E. & PERITI, P. Tissue penetration and pulmonar disposition of tobramycin. *Journal of Chemotherapy*. v.7(4), p.363-370, 1995.

McMORRAN, B.J., PALMER, J.S., LUNN, D.P. OCEANDY, D., COSTELLOE, E.O., THOMAS, G.R., HUME, D.A. & WAINWRIGHT, B.J. G551D CF mice display an abnormal host response and have impaired clearance of *Pseudomonas* lung disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. v. 281: p.L740-L747, 2001

MIZGERD, J. P. Lung Infection – A public health priority. *PLOS Medicine*. v.3(2), e76, 2006.

MORISSETTE, C., SHAMENE, E. & GERVAIS, F. Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infection and Immunity*. v.63(5), p.1718-1724, 1995.

NEU, H. C. Tobramycin: an overview. *The Journal of Infectious Diseases*. v.134, p.S3-S19, 1976.

NICHOLS, W. W., DORRINGTON, S. M., SLACK, M.P. E. & WALMSLEY, H. L. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Microbial Agents and Chemotherapy*. v.32(4), p. 518-523, 1988.

NOGUEIRA, P. S. F., MOURA, E. R. F., COSTA, M. M. F., MONTEIRO, W. M. S. & BRONDI, L.. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. *Revista de Enfermagem*. v.17(1), p.96-101, 2009.

PALMA, E. C., LAUREANO, J. V., ARAUJO, B. V., MEINHARDT, N. G. & DALLA COSTA, T. Fast and sensitive HPLC/UV method for cefazolin quantification in plasma and subcutaneous tissue microdialysate of humans and rodents applied to pharmacokinetic studies in obese individuals. *Biomedical Chromatography*. v.32, p. e4254, 2018.

PIGATTO, M. C., MOSSMANN, D. L. & DALLA COSTA, T. HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. v.29, p.529-536, 2015.

REYES, M. P., ZHAO, J. J., & BUENSALIDO, J. A. L. Current perspectives: therapeutic uses of tobramycin. *Journal of Pharmacovigilance*. v.2(2), p. 2329-6887, 2014.

RIQUELME, S. A., AHN, D. & PRINCE, A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* adaptation to innate immune clearance mechanisms in the lung. *Journal of Innate Immunity*. v.10, p.442-454, 2018.

SONG, Z., WU, H., CIOFU, O., KONG, K., HOIBY, N., RYGAARD, J., KHARAZMI, A. & MATHEE, K. *Pseudomonas aeruginosa* alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. *Journal of Medical Microbiology*. v.52, p.731-740, 2003.

STARKE, J. R., EDWARDS, M. S., LANGSTON, C. & BAKER, C. J. A mouse model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatric Research*. v.22(6), p. 698-702, 1987.

TASSO, L., BETTONI, C., OLIVEIRA, L. & DALLA COSTA, T. Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 358, p.96-101, 2008.

THEURETZBACHER, U. Tissue penetration of antibacterial agents: how should this be incorporated into pharmacodynamic analysis? *Current Opinion in Pharmacology*. v. 7, p. 498–504, 2007.

TORRES, B. G. S., HELFER, V. H., BERNARDES, P. M., MACEDO, A. J., NIELSEN, E. I., FRIEBERG, L. E. & DALLA COSTA, T. Population pharmacokinetic modeling as a tool to characterize the decrease in ciprofloxacin free interstitial levels caused by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lung infection in wistar rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.61(7), e02553-16, 2017.

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. *Environmental Microbiology*, v.15(10), p. 2865-2878, 2013.

WANG, Y., WONG, S. L., & SAWCHUK, R. J. Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net-flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus. *Pharmaceutical Research*, v.10(10), p.1411-1419, 1993.

WHO. *Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018.

WOONENBERG, B., TSCHERING, T., VOSS, M., BISCHOFF, M., MEIER, C., SCHIRMER, S. H., LANGER, F., BALS, ROBERT, B & BEISSWENGER, C. Probenecid reduces infection and inflammation in acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. International Journal of Medical Microbiology. V.304, p.725-79, 2014.

WOZNIAK, D. J., WYCKOFF, T. J. O., STARKEY, M., KEYSER, R., AZADI, 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(13), p.7907–12, 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. Journal of Nanjing Medical University. v.22(1), p.34-38, 2008.

ZHAO, M., LEPAK, A. J. & ANDES, D. R. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. v.24, p.6390-6400, 2016.

ZIMMERMANN, E. S., SILVA, C. de M., NERIS, C., TORRES, B. G. da S., SCHMIDT, S. & DALLA COSTA, T. Population pharmacokinetic modeling to establish the role of P-glycoprotein on ciprofloxacin distribution to lung and prostate following intravenous and intratracheal administration to Wistar rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences. v.127, p.319-329, 2019.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais da TOB após dose de 10 mg/kg i.v. *bolus* a ratos Wistar.

Parâmetros PK	Hígidos*	Infecção Aguda*	Infecção Crônica**	Bead alginato**		
	(n = 6)	(n = 5)	(n = 8)	(n = 4)		
Plasma	λ (h ⁻¹)	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,04	
	t _{1/2} (h)	4,5 ± 0,7	5,6 ± 1,3	5,5 ± 2,5	5,1 ± 1,4	
	ASC _{0-∞} (µg·h/mL)	128 ± 19	144 ± 35	31 ± 25 ^{a,b}	124 ± 54 ^c	
	MRT (h)	6,2 ± 0,1	7,5 ± 1,5	7,0 ± 3,7	7,2 ± 1,8	
	CL (L/h/kg)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,61 ± 0,33 ^{a,b}	0,10 ± 0,06 ^c	
	Vd _{ss} (L/Kg)	0,49 ± 0,10	0,56 ± 0,05	3,32 ± 0,58 ^{a,b}	0,74 ± 0,56 ^c	
Parâmetros PK	Hígidos*	Infecção Aguda*	Infecção Crônica**	Bead alginato**	Bead agarose	
	(n = 6)	(n = 5)	(n = 7)	(n = 6)	(n = 4)	
Pulmão	λ (h ⁻¹)	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,31 ± 0,19	0,40 ± 0,57	0,11 ± 0,04
	t _{1/2} (h)	4,2 ± 0,5	5,7 ± 2,4	3,2 ± 2,3	4,0 ± 2,4	6,9 ± 2,4
	ASC _{0-∞} (µg·h/mL)	105 ± 12	32 ± 17*	26 ± 13 ^d	26 ± 14 ^{d,g}	99 ± 30
	fT _{PULMÃO/PLASMA}	0,92	0,25	0,94	0,23	-
Parâmetros PK	Hígidos	Infecção Aguda	Infecção Crônica	Bead alginato		
	(n = 7)	(n = 6)	(n = 3)	(n = 4)		
PELF	λ (h ⁻¹)	0,27 ± 0,10	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,02	
	t _{1/2} (h)	3,0 ± 1,2	5,6 ± 2,3	5,5 ± 1,8	4,27 ± 0,44	
	ASC _{0-∞} (µg·h/mL)	8,7 ± 5,8	2,8 ± 1,8 ^{e,f}	8,1 ± 7,7	14,41 ± 4,08	
	fT _{PELF/PULMÃO}	0,08	0,09	0,31	0,50	

λ : constante de velocidade de eliminação; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; ASC: área sob a curva; MRT: tempo de residência médio; CL: *clearance*; Vd_{ss}: volume de distribuição no *steady state*; fT: fator de penetração tecidual. Dados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Teste de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

^aDiferença significativa do grupo plasma hígido; ^bDiferença significativa do grupo plasma infectado agudo; ^cDiferença significativa do grupo plasma infectado crônico;

^dDiferença significativa do grupo pulmão hígido; ^eDiferença significativa do grupo PELF hígidos; ^fDiferença significativa do grupo PELF *bead* alginato; ^gDiferença significativa do grupo pulmão *bead* agarose.

*Dados de BERNARDI, 2016; **Dados de LIMA, 2017.

ANEXO
PARECER COMITÊ DE ÉTICA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

NÚMERO: 32345

TÍTULO: Avaliação por microdiálise da penetração pulmonar intersticial e brônquica de tobramicina em modelo de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme mucóide e não-mucóide

PESQUISADORES: TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto 32345 em reunião realizada em 06/08/2018 - Sala 330 do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de 60 ratos machos Wistar, com 200-270g de peso, provenientes do CREAL da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa. Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.

Porto Alegre, 08 de agosto de 2018


Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Coordenador Substituto da CEUA/UFRGS