

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

Modelagem farmacocinética populacional da tobramicina em infecções pulmonares pré-clínicas agudas e crônicas por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme mucoide e não-mucoide

Bruna Bernar Dias

Porto Alegre, 2022.

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

Modelagem farmacocinética populacional da tobramicina em infecções pulmonares pré-clínicas agudas e crônicas por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme mucoide e não-mucoide

Dissertação de Mestrado apresentada por
Bruna Bernar Dias para obtenção do título de
Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Coorientador: Dr. Fernando Carreño

Porto Alegre, 2022.

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 2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Manuel Ibarra Viñales
Universidad de la República

Francine Johansson Azeredo
University of Florida

CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Bruna Bernar
Modelagem farmacocinética populacional da
tobramicina em infecções pulmonares pré-clínicas
agudas e crônicas por *Pseudomonas aeruginosa* formadora
de biofilme mucóide e não-mucóide / Bruna Bernar Dias.
-- 2022.
87 f.
Orientadora: Teresa Dalla Costa.

Coorientador: Fernando Carreño.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. tobramicina. 2. infecção pulmonar. 3.
Pseudomonas aeruginosa. 4. microdiálise. 5. modelo
popPK. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Carreño,
Fernando, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacocinética e Modelagem PK/PD da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

A todos aqueles que acreditam na ciência brasileira.

In honor to Prof. Dr. Hartmut Derendorf and his brilliant work.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Teresa Dalla Costa, pelo seu exemplo de liderança e responsabilidade. Obrigada por me confiar este trabalho e me ajudar nesta caminhada, se fazendo presente, mesmo on-line, com todo suporte que precisei. Obrigada pela formação de excelência, que me trouxe um pensamento crítico e me fez pensar além do comum.

Ao meu co-orientador, Dr. Fernando Carreño, por todo suporte nestes dois anos, pelas ricas discussões e reuniões a qualquer hora. Não tenho palavras para descrever minha gratidão por tua ajuda e apoio. Obrigada por compartilhar todo o teu conhecimento comigo, e por me fazer acreditar todos os dias que eu era capaz de desenvolver este trabalho. Obrigada por me dizer “Vá ler o Owen”. Obrigada por ser “sucessa”!

À Prof. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo, pelo exemplo de mulher pesquisadora, sempre questionadora, que não recua frente a uma dificuldade. Obrigada por ter se juntado ao nosso desafio, nas reuniões às 7h da manhã, no carro, no trânsito, nas férias, com os filhos, sempre de bom-humor, trazendo muito conhecimento aos nossos encontros.

Às *modelers*: pelos *codes* compartilhados, por terem dividido esses anos comigo, sempre dispostas a uma reunião de emergência, certamente o mestrado foi mais leve porque vocês estavam sempre on-line. À Victória Etges Helfer, por estar presente na construção deste trabalho. Obrigada pela amizade, pelos dias de experimento e pela sua inteligência compartilhada. À Graziela Lock, pelo seu bom-humor incondicional, mesmo depois de 12h de experimento. Obrigada pelas discussões *pseudomonísticas* e pela amizade. À Keli Staudt, que mesmo longe nestes 2 anos esteve sempre presente. Obrigada pela amizade e pelas parcerias.

Ao Laboratório de Farmacocinética e Modelagem PK/PD e a todos que por lá passaram, por ser um lugar que me acolheu desde a iniciação científica. Em especial, à Priscila Bernardi, Daiane Lima e Fabiano Barreto que contribuíram neste trabalho.

À Larissa Lachi, Laura Olivo, Julia Macente, e o clubinho da sexta-feira, pelas festinhas sempre muito bem agendadas no calendário, com direito à *english talks*.

Às farmacêuticas Camila Muneretto, Caroline Pavin e Marina Bastos, por serem as melhores amigas que a faculdade me deu, a minha razão, e por estarem sempre presentes na minha vida. Obrigada pela amizade verdadeira.

Às farmacêuticas Julia Werner, Cristiane Manoela da Silva e aos farmacêuticos Gabriel Chiomento, Otávio Américo Augustin e Rodrigo Silveira Pinto pelo “bom dia grupo” e por serem amigos tão queridos.

À minha irmã Paula Bernar Dias por ter sido sempre meu exemplo, e meu cunhado Ricardo Fortes da Silva pelo melhor churrasco do mundo.

À minha vó, Lourena Claro, pelos abraços na volta para casa, mesmo que demoradas, e por entender todas as vezes que não pude estar presente.

À minha mãe, Luciana Bernar Dias, por ser a melhor mãe e amiga que eu poderia ter. Obrigada pelo teu amor incondicional e por ter batalhado para me ver concluir o mestrado. Obrigada por ter me ajudado a realizar meu sonho e me apoiado em todas as decisões da minha vida.

We are like dwarves sitting on the shoulders of giants. We see more, and things more distant than They did, not because our sight is superior or because we are taller than They, but because They rise us up, and by their great stature add to ours.

John of Salisbury (1115-1180)

RESUMO

Introdução: Infecções pulmonares por bactérias formadoras de biofilmes são um desafio na prática clínica, devido à tolerância aos antimicrobianos que reduz as concentrações livres na biofase dificultando o sucesso terapêutico. Ao mesmo tempo, os processos infecciosos causam alterações fisiológicas que podem alterar a distribuição de antimicrobianos no sítio de ação. Em trabalhos prévios do grupo de pesquisa investigou-se a penetração pulmonar e no líquido de revestimento pulmonar (ELF) da tobramicina (TOB) utilizando microdiálise em modelo animal de infecção aguda e crônica por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme. Observou-se que as concentrações livres plasmáticas e livres pulmonares da TOB são semelhantes em animais hígidos, porém as concentrações brônquicas são 90% menores. Nos animais com infecção aguda (7 d) com cepa não-mucoide observou-se uma redução na penetração pulmonar e no ELF em torno de 70%. Nos animais com infecção crônica (14 d) com cepa mucoide observou-se concentrações plasmáticas e pulmonares reduzidas, com aumento do *clearance* plasmático do fármaco. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo farmacocinético populacional (popPK) para descrever as concentrações plasmáticas totais e livres pulmonares e no ELF da TOB em infecções agudas e crônicas causadas por *P. aeruginosa* e utilizar o modelo desenvolvido para avaliar a probabilidade de atingir o alvo terapêutico (PTA) de diferentes regimes posológicos. **Metodologia:** O modelo popPK foi desenvolvido no software NONMEM 7.4 (Icon®). Usando o modelo, simulações de concentrações livres no pulmão e no ELF de diferentes regimes posológicos recomendados na clínica foram feitas e a PTA do índice PK/PD concentração máxima livre/concentração inibitória mínima ($fC_{m\acute{a}x}/CIM$) > 10 foi investigado utilizando os dados de CIM de *P. aeruginosa* do EUCAST. Uma PTA > 90 % foi considerada como desfecho clínico favorável. **Resultados:** O modelo popPK com três compartimentos, incluindo o pulmão, foi capaz de descrever todos os cenários investigados. As concentrações de TOB no ELF foram menores do que as concentrações pulmonares e, em todos os grupos, foram descritas por um fator de distribuição derivado do compartimento pulmonar. A infecção foi uma covariável no volume do pulmão (V3) e apenas a infecção crônica foi incluída como covariável no volume do compartimento central (V1) e no *clearance* total (CL). As simulações demonstraram que a dose única diária tem maior PTA no pulmão do que a dose fracionada três vezes ao dia. Nenhuma posologia investigada pela via intravenosa gerou concentrações no ELF adequadas para erradicação bacteriana. Os tratamentos recomendados, que geram concentrações pulmonares adequadas para tratar pneumonias agudas e crônicas por *P. aeruginosa* formadora de biofilme (PTA > 90%) foram TOB 4,5 mg/kg q24h e 11 mg/kg q24h, respectivamente. **Conclusões:** O modelo foi capaz de descrever a redução nas concentrações pulmonares nos animais infectados e a proporcionalidade entre concentrações livres no pulmão e ELF nas condições hígido e infectados. Os resultados do PTA indicam a necessidade de investigar na clínica posologias alternativas para uso da TOB no tratamento de pneumonias.

Palavras-chave: Tobramicina, infecção pulmonar, biofilme, *Pseudomonas aeruginosa*, modelo popPK, microdiálise.

ABSTRACT

Population pharmacokinetic modeling of tobramycin in preclinical acute and chronic lung infection by mucoid and non-mucoid biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*

Introduction: Biofilm-forming lung infections are a challenge in clinical practice due to tolerance to antimicrobials that reduces free concentrations at the biophase, making therapeutic success difficult. At the same time, infectious cause physiological changes that can alter antimicrobial's distribution at the site of action. In previous work our research group have been studying tobramycin (TOB) lung and epithelial lining fluid (ELF) penetration in animal models of acute and chronic lung infection by biofilm-forming *P. aeruginosa*. It was observed that TOB free plasma and free lung concentrations are similar in healthy animals, however free ELF concentrations are 90% lower. In animals with acute infection (7 days) with non-mucoid biofilm-forming *P. aeruginosa*, there was a reduction in TOB lung and ELF penetration around 70%. In animals with chronic infection (14 days) with mucoid biofilm-forming *P. aeruginosa*, reduced TOB free plasma and free lung concentrations were observed, with increased plasma clearance of the drug. **Objective:** The aim of this work was to develop a population pharmacokinetic (popPK) model to describe TOB total plasma, free lung and free ELF concentrations in acute and chronic *P. aeruginosa* lung infection, and use this model to evaluate the probability of target attainment (PTA) of different therapeutic regimes. **Methods:** The popPK model was developed in NONMEM 7.4 (Icon®). Using the developed model, simulations of free lung and ELF concentrations in different therapeutic regimes recommended in clinical practice were performed and the PTA of the PK/PD index maximum free concentration/minimum inhibitory concentrations (fC_{max}/CIM) > 10 was investigated using the EUCAST database for *P. aeruginosa* MIC. A PTA > 90% was assumed as adequate clinical outcomes. **Results:** The popPK model with three compartments including the lung was able to describe all the investigated scenarios. The ELF concentrations were lower than the lung concentrations, and for all groups they were explained by a penetration factor derived from lung compartment. Infection was a covariate in the volume of the lung compartment (V3) and only the chronic infection was included as covariate for the central compartment (V1) and total clearance (CL). Simulations demonstrated that once daily dose has higher PTA in the lung than the same dose divided three times a day. None of the intravenous dosages investigated was able to achieve enough concentrations in ELF to bacterial eradication. The recommended treatments, which produced adequate lung free concentrations to treat acute and chronic pneumonia by biofilm-forming *P. aeruginosa* (PTA > 90%) were TOB 4.5 mg/kg q24h and 11 mg/kg q24h, respectively. **Conclusions:** The model was able to describe the reduction in TOB lung concentrations in the infected animals and the proportionality between free lung and ELF concentrations in healthy and infected conditions. The PTA results indicate the need to investigate alternative TOB posologies to treat pneumonia in the clinic.

Keywords: Tobramycin, lung infection, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, popPK model, microdialysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação genérica da penetração de fármacos no endotélio capilar e no epitélio alveolar, tendo como alvo o fluido de revestimento epitelial	36
Figura 2. Representação esquemática da sonda de microdiálise	37
Figura 3. Componentes de um modelo farmacocinético populacional: modelo estrutural, modelo de covariáveis e modelo estatístico	40
Figura 4. Representação esquemática do modelo final plasmático e pulmonar do ciprofloxacino	42
Figura 5. Índices PK/PD demonstrados em uma curva de concentração versus tempo.	43

CAPÍTULO

Figure 1. Schematic representation of the structure of the final TOB popPK model.	58
Figure 2. Predicted-corrected visual predictive check of the final popPK model stratified by plasma, lung and ELF.	60
Figure 3. Probability of target attainment for a PK/PD index of $fC_{max}/MIC > 10$ for <i>P. aeruginosa</i> for different TOB dosing regimens for free plasma, free lung, and free ELF concentrations.	61

Supplementary Material

Figure S1. Tobramycin concentration-time curves in total plasma, free lung and free epithelial lining fluid	70
Figure S2. Exploratory analysis of continuous covariable.	71
Figure S3. Box plot of exploratory analysis of categoric covariables.	72
Figure S4. Goodness-of-fit plots from the final popPK model for tobramycin.	74
Figure S5. Individual pharmacokinetic profiles from observed data, populational and individual predictions for the final popPK model for tobramycin.	75
Figure S6. Simulated concentration versus time profile for 10 mg/kg dosing of tobramycin, for free plasma and free ELF.	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 Infecções pulmonares agudas e crônicas por <i>P. aeruginosa</i> e a ação de seus biofilmes	33
3.2 Tobramicina no tratamento de infecções pulmonares por <i>P. aeruginosa</i>	34
3.3 Avaliação da penetração tecidual de antimicrobianos.....	36
3.4 Modelagem farmacocinética populacional	39
3.5 Índices PK/PD na avaliação da PTA em infecções.....	43
4. CAPÍTULO	47
1 INTRODUCTION	49
2 MATERIALS AND METHODS	51
2.1 Chemicals and reagents	51
2.2 Animals	52
2.3 Preclinical model of acute and chronic <i>P. aeruginosa</i> lung infection .	52
2.4 Pharmacokinetic experiments	53
2.4.1 Tobramycin plasma concentration–time profiles.....	53
2.4.2 Free lung and free ELF pharmacokinetic experiments	53
2.4.3 In vitro and in vivo microdialysis probes calibration	54
2.5 Population pharmacokinetic (popPK) model building.....	54
2.6 Probability of target attainment	56
3 RESULTS	56
4 DISCUSSION	62
5 CONCLUSION	64
6 REFERENCES	66
7 SUPPLEMENTARY MATERIAL	69
5 CONCLUSÕES GERAIS	77
6 REFERÊNCIAS GERAIS	81
7 ANEXO	87

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de pneumonias causadas por bactérias formadoras de biofilmes, como a *Pseudomonas aeruginosa*, são um grande desafio na clínica. O crescimento bacteriano em biofilme confere tolerância à penetração de antimicrobianos podendo levar a um aumento de até mil vezes na concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos frente a microrganismos susceptíveis, quando comparados à forma planctônica (HØIBY *et al.*, 2011; MACIÀ; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014; WANG *et al.*, 2012; WOZNIAK *et al.*, 2003).

Além da presença dos biofilmes, que dificulta a ação farmacológica, os processos infecciosos causam diversas alterações fisiológicas que podem alterar as concentrações livres de antimicrobianos no sítio da infecção. Em alguns casos, essas alterações podem levar a um aumento das concentrações farmacologicamente ativas acima da faixa terapêutica, provocando toxicidade, e em outros casos podem causar sua redução, aumentando a chance de falha terapêutica, contribuindo para o desenvolvimento de resistência bacteriana e dificultando ainda mais um desfecho clínico favorável (DHANANI, J. *et al.*, 2010).

Considerando que as concentrações livres dos antimicrobianos, não ligadas a proteínas plasmáticas, devem alcançar a biofase para exercerem o efeito farmacológico, em infecções teciduais são necessárias concentrações adequadas de fármaco no local de ação para o sucesso do tratamento antimicrobiano. Em infecções pulmonares as concentrações de antimicrobianos devem atingir a região intracelular do tecido pulmonar e o fluido de revestimento epitelial pulmonar (ELF, do inglês *epithelial lining fluid*), para garantir a erradicação microbiana. O início da infecção pulmonar se dá pela contaminação pelas vias aéreas, atingindo o ELF e posteriormente o tecido pulmonar; portanto, concentrações livres de antimicrobianos nestes locais são relevantes no tratamento (BERGONGNE-BEREZIN, 1981; DHANANI, J. *et al.*, 2010).

No tratamento das pneumonias causadas por *P. aeruginosa* são empregados antimicrobianos como as cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (CRAIG, 2011; GURJAR, 2015). A tobramicina (TOB) é um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de infecções pulmonares agudas e crônicas por *P. aeruginosa*, apresentando mecanismo de ação pela ligação à subunidade 30S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas bacterianas. O efeito antimicrobiano da TOB é concentração dependente, apresentando efeito pós-antibiótico (BARMADA *et al.*, 1993; LUND-PALAU *et al.*, 2016; REYES; ZHAO; BUENSALIDO, 2014).

Neste contexto, trabalhos que avaliam a distribuição tecidual de fármacos em processos infecciosos vêm sendo conduzidos em nosso grupo de pesquisa, visando entender o impacto da infecção na distribuição tecidual dos antimicrobianos e otimizar sua utilização, através da farmacometria. Um dos fármacos investigados pelo grupo é a tobramicina (TOB), um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes fibrocísticos. As investigações com TOB foram conduzidas em modelos animais de infecção aguda (cepa não-mucoide PA14, 7 dias de infecção) e crônica (cepa mucoide ATCC 27853, 14 dias de infecção) por *P. aeruginosa* para avaliar a penetração do fármaco no interstício pulmonar e no ELF, em comparação com a penetração observada nos animais hígidos, utilizando a técnica de microdiálise para mensurar as concentrações livres do antimicrobiano nas biofases.

Os resultados dessas investigações, analisadas por uma abordagem não-compartimental, mostraram que as concentrações livres plasmáticas e pulmonares da TOB são semelhantes em animais hígidos, porém as concentrações no ELF representam apenas 10% das concentrações plasmáticas livres. Nos animais com infecção aguda produzida pela *P. aeruginosa* PA14, observa-se as mesmas concentrações plasmáticas dos animais hígidos, porém houve uma redução na penetração pulmonar em torno de 70%, também observada nas concentrações no ELF. Nos animais com infecção crônica, produzida pela *P. aeruginosa mucoide* ATCC 27853, observou-se concentrações de TOB reduzidas no plasma, no pulmão e no ELF, além de aumento do *clearance* plasmático do fármaco (BERNARDI, 2016; DIAS, 2019; LIMA, 2017).

A avaliação dos perfis de concentração livre teciduais dos antimicrobianos e o estabelecimento da relação desses com as concentrações plasmáticas podem ser feitos por farmacometria, através do desenvolvimento de modelos farmacocinéticos populacionais (popPK). A modelagem popPK, além de permitir entender as fontes de variabilidade interindividual, possibilita a descrição de forma mecanística a farmacocinética e distribuição dos fármacos, permitindo a previsão de exposição individual ao fármaco de estudo e de realização de simulações em cenários clínicos. Desse modo, pode auxiliar no estabelecimento de regimes terapêuticos otimizados, quando construídos para uma população específica, e na avaliação da probabilidade de atingir alvos terapêuticos (PTA) empregando índices PK/PD, por exemplo,

utilizados para escolha de posologias visando a erradicação bacteriana. O índice PK/PD que melhor se relaciona com a eficácia terapêutica da TOB é a razão entre concentração máxima livre/concentração inibitória mínima ($fC_{m\acute{a}x}/CIM$), tendo como alvo valores maiores que 10 (DE VELDE *et al.*, 2018).

O presente estudo visou reunir dados pré-clínicos já obtidos por microdiálise para o estabelecimento de modelo popPK para TOB em pneumonia por *P. aeruginosa*, possibilitando descrever a relação entre concentrações livres no plasma, pulmão e ELF de animais hígidos, aguda e cronicamente infectados por *P. aeruginosa*, melhorando a compreensão do processo de distribuição pulmonar desse fármaco. A partir do desenvolvimento do modelo, os regimes posológicos recomendados na clínica para o tratamento de infecções agudas e crônicas foram avaliados em relação à probabilidade de atingir o alvo terapêutico no plasma, pulmão e ELF, considerando o índice PK/PD utilizado para TOB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo farmacocinético populacional (popPK) para descrever as concentrações plasmáticas totais e livres pulmonares e no ELF da TOB em infecções agudas e crônicas causadas por *P. aeruginosa* e utilizar o modelo desenvolvido para avaliar a probabilidade de atingir o alvo terapêutico (PTA) de diferentes regimes posológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver modelo popPK capaz de descrever as concentrações plasmáticas, pulmonares e no ELF da TOB em ratos Wistar hípidos e infectados com *P. aeruginosa* formadora de biofilme de forma aguda (PA 14, 7 dias infecção) e crônica (ATCC 27853, 14 dias de infecção) através de modelagem popPK;
- Usando o modelo popPK, realizar simulações de doses de TOB alometricamente escalonadas de humanos para ratos para avaliar a PTA da $fC_{\text{máx}}/CIM >10$ de diferentes regimes posológicos utilizando na clínica para tratamento de infecções pulmonares agudas e crônicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecções pulmonares agudas e crônicas por *P. aeruginosa* e a ação de seus biofilmes

Pneumonias estão entre as dez causas de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021). Nas pneumonias a contaminação dos pacientes se dá pela via respiratória superior, se propagando pelo fluído de ELF e atingindo o tecido pulmonar (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019; DHANANI, J. *et al.*, 2010).

Um dos patógenos bacterianos associados a infecções pulmonares agudas e crônicas em ambiente hospitalar é *Pseudomonas aeruginosa*, que, por sua característica oportunística, costuma acometer pacientes com imunidade comprometida (SMITH *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* adere-se ao epitélio pulmonar do hospedeiro e, pela ação de fatores de virulência como flagelo, pili, componentes da membrana externa e exotoxina-S, rompe o tecido do hospedeiro causando danos ao epitélio, proporcionando a sua proliferação e infecção (CURRAN; BOLIG; TORABI-PARIZI, 2018).

A formação de biofilme em *P. aeruginosa* se apresenta como um fator de virulência tornando os tratamentos antimicrobianos mais difíceis. A presença do crescimento bacteriano em forma de biofilme favorece a evasão à resposta do sistema imune do hospedeiro. Além disso, os biofilmes podem aumentar de 100 a 1000 vezes a CIM de antimicrobianos frente a bactérias susceptíveis, comparado à forma planctônica, causando tolerância à ação antimicrobiana (MACIÀ; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

Os biofilmes são caracterizados por comunidades compostas de microrganismos que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas, envoltos por uma matriz de polimérica contendo polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA), proteínas e lipídeos (HØIBY *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2019; THI; WIBOWO; REHM, 2020). A maturação do biofilme de *P. aeruginosa* inicia pela adesão reversível da forma planctônica a uma superfície, envolvida por uma camada de proteínas. Dentro de 5 a 7 dias, a micro colônia de bactérias se multiplica e sua adesão se torna irreversível, aumentando a camada de proteínas e se multiplicando, produzindo a matriz polimérica e se transformando no biofilme maduro. O *quorum sensing* (QS), uma forma de comunicação entre as bactérias capaz de regular a expressão gênica, auxilia na resposta bacteriana ao ambiente e é fundamental para o estabelecimento das

infecções e maturação do biofilme (CURRAN; BOLIG; TORABI-PARIZI, 2018; HØIBY *et al.*, 2011).

Os exopolissacarídeos presente na matriz extracelular dos biofilmes de *P. aeruginosa* estão envolvidos na adesão, formação e estabilidade do biofilme (DING *et al.*, 2020). Em cepas produtoras de biofilme mucoide, a principal característica da matriz extracelular é a superprodução de alginato, resultado de mutações do gene que codificam o modulador negativo da produção do polissacarídeo. O alginato é um polímero heterogêneo aniônico, composto de ligação de ácidos manurônico e gulurônico. Em cepas não mucoides, os genes de biossíntese de alginato não são expressos, levando à presença de outros polissacarídeos para a formação da matriz extracelular do biofilme, como Pel (rico em glicose) e Psl (pentassacarídeo contendo D-manose, D-glicose e L-ramnose). O Pel é essencial para formação do biofilme em superfícies ar-líquido, enquanto Psl está associado ao ancoramento e aderência em superfícies. Além dos polissacarídeos, eDNA também está presente na matriz extracelular dos biofilmes não mucoides (COULON *et al.*, 2010; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Além dos biofilmes, a ação inflamatória e a presença bacteriana associados ao sistema imunológico do hospedeiro podem causar alterações teciduais como aumento da temperatura tecidual, diminuição do pH, migração leucocitária, que também podem alterar a concentração de fármacos no sítio de ação, geralmente diminuindo-a, trazendo dificuldades para o tratamento dessas infecções (DHANANI, J. *et al.*, 2010).

Algumas estratégias são utilizadas para melhorar o tratamento de infecções pulmonares e minimizar a ação dos biofilmes. As associações de fármacos são uma das ações para combater infecções por *P. aeruginosa*, em que podem ser empregados um aminoglicosídeo, como a gentamicina, amicacina ou TOB, em associações com um β -lactâmico: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos ou quinolonas (CRAIG, 2011; GURJAR, 2015).

3.2 Tobramicina no tratamento de infecções pulmonares por *P. aeruginosa*

A TOB é um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de infecções pulmonares agudas e crônicas por *P. aeruginosa*, sendo especialmente utilizando em pacientes

com fibrose cística (FC), como profilaxia da colonização e no tratamento de exacerbações agudas da infecção. Apresenta efeito majoritariamente em patógenos Gram-negativos e tem ação em ambiente aeróbio. Seu mecanismo de ação é através da ligação permanente à subunidade 30S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas bacterianas, apresentando efeito pós-antibiótico (BARMADA *et al.*, 1993; LUND-PALAU *et al.*, 2016; REYES; ZHAO; BUENSALIDO, 2014).

Em relação à farmacocinética, a TOB possui baixa biodisponibilidade oral e baixa ligação a proteínas plasmáticas (em torno de 10%). A meia-vida no plasma é aproximadamente 2 h, em pacientes com função renal normal, quando administrada por via intravenosa (i.v.) ou intramuscular (i.m.). Apresenta um volume de distribuição de aproximadamente 30% do volume corporal, e é excretada majoritariamente por via renal, por filtração glomerular, sem sofrer metabolização. Seus efeitos tóxicos incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade neuromuscular e reações de hipersensibilidade (ISRAEL; WELLES; BLACK, 1976; NEU, 1976; REYES; ZHAO; BUENSALIDO, 2014).

Os regimes posológicos de TOB utilizados no tratamento de infecções pulmonares por *P. aeruginosa* consistem em uma infusão intravenosa de 30 min na dose de 1-3 mg/kg a cada 8h (q8h) para pacientes que não possuem FC. Para pacientes que possuem FC, é utilizada a dose de 10 mg/kg, com estudos recentes sugerindo que a dose de 11 mg/kg pode ser mais eficaz (HENNIG *et al.*, 2013). Em pacientes com FC, uma dose única diária é preferida e apresenta melhor eficácia no tratamento, comparado à dose total diária administrada em três vezes (q8h), utilizada em pacientes sem FC. As doses recomendadas objetivam atingir concentrações plasmáticas de vale ≤ 1 mg/L (q24h) e ≤ 2 mg/L (q8h) e pico na faixa de 20–40 mg/L (q24h) e 5–20 mg/L (q8h) (BURKHARDT *et al.*, 2006).

Apesar das concentrações de TOB serem monitoradas em ambiente hospitalar, visando atingir os alvos terapêuticos, as doses empregadas não levam em consideração a presença do biofilme nas infecções. A ligação da TOB ao alginato presente na matriz polimérica dos biofilmes mucoides de *P. aeruginosa* reduz a penetração do fármaco no biofilme, aumentando a CIM da TOB frente à *P. aeruginosa* em 100 e 900 vezes, em meio de crescimento e em meio de crescimento na presença de muco, respectivamente (MÜLLER *et al.*, 2018).

A redução da penetração do fármaco no sítio de ação gera concentrações menores de antimicrobianos disponíveis para exercer o efeito bactericida ou bacteriostático, podendo levar à falha terapêutica e ao desenvolvimento de resistência bacteriana (BERGONGNE-BEREZIN, 1981).

3.3 Avaliação da penetração tecidual de antimicrobianos

A avaliação das concentrações livres de antimicrobianos no sítio de ação é relevante para garantir o ajuste de dose necessário para tratamento das infecções, pois são as concentrações livres farmacologicamente ativas disponíveis para interagir com os receptores e gerar o efeito biológico do fármaco (BERGONGNE-BEREZIN, 1981).

A penetração de fármacos a partir do sangue para os locais de interesse na infecção pulmonar, o espaço intersticial pulmonar e posteriormente para o espaço do ELF, pode ser prejudicada pelas diferentes barreiras que separam os compartimentos pulmonares (Figura 1). O endotélio vascular tende a ser mais permeável para fármacos hidrofílicos, como a TOB, do que a membrana alveolar, gerando diferentes concentrações ao longo do caminho percorrido pelo fármaco até chegar ao ELF.

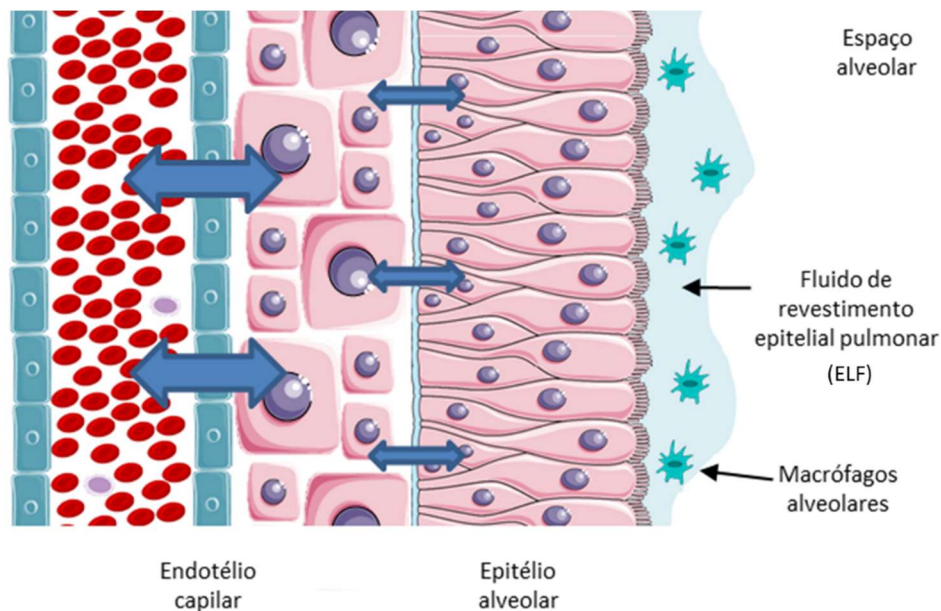


Figura 1. Representação genérica da penetração de fármacos no endotélio capilar e no epitélio alveolar, tendo como alvo o fluido de revestimento epitelial (ELF). Fonte: autor.

As concentrações livres de fármaco no espaço intersticial pulmonar e no ELF podem ser determinadas por microdiálise (HAMMARLUND-UDENAES, 2017). A técnica de microdiálise utiliza uma sonda com uma membrana semipermeável na extremidade, que é inserida no tecido de interesse ou fluido a ser analisado (Figura 2). A sonda é constantemente perfundida por uma solução fisiológica isosmolar ao tecido onde está inserida, em 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 a solução perfundida pela sonda, possibilitando a coleta de moléculas presentes no tecido que se difundem pela membrana. Como o fluxo de perfusão é constante, não ocorre equilíbrio entre as concentrações extracelulares e as concentrações no microdialisado, coletadas pela sonda, ocorrendo o estabelecimento de uma condição *sink* (CHAURASIA *et al.*, 2007; ZEITLINGER; MÜLLER; JOUKHADAR, 2005).

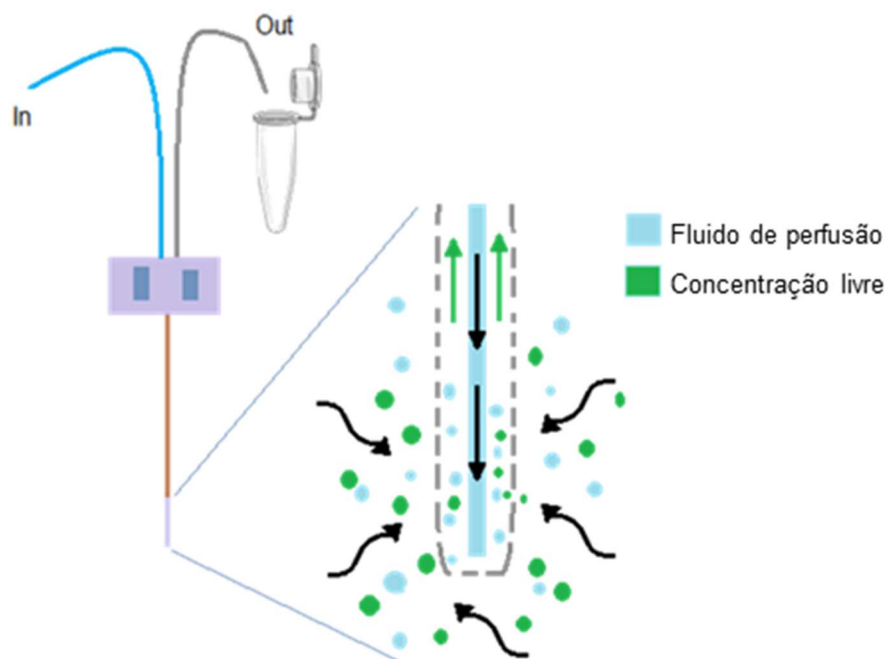


Figura 2. Representação esquemática da sonda de microdiálise. No detalhe demonstra-se as trocas que ocorrem na membrana semipermeável: o fluido de perfusão a ser bombeado em um fluxo constante propicia a diálise de moléculas livres do meio extracelular para serem coletadas pela sonda. Fonte: autor.

Para a correta determinação das concentrações coletadas no microdialisado é necessário a determinação da recuperação relativa das sondas, utilizando um método de calibração. Os métodos mais empregados são os métodos de retrodiálise por fármaco, que se baseiam na teoria de que a difusão de moléculas pela membrana é

a mesma em ambos os sentidos, seja do meio extracelular o líquido de perfusão, para ser coletado pelo microdialisado (diálise ou ganho), ou do meio fluido de perfusão para o meio extracelular (retrodiálise ou perda). Para permitir o uso desse método de calibração, a diálise e a retrodiálise devem resultar em uma mesma recuperação, fato que é confirmado por experimentos *in vitro*. Como há diferenças entre a difusão das moléculas em solução e no tecido, a real recuperação da sonda, geralmente menor do que a observada *in vitro*, deve ser determinada *in vivo*, onde que a presença das células e a tortuosidade do tecido interferem no caminho da molécula sob investigação (AZEREDO; DALLA COSTA; DERENDORF, 2014; DE LANGE; DE BOER; BREIMER, 2000; HAMMARLUND-UDENAES, 2017).

A técnica de microdiálise vem sendo empregada em nosso grupo de pesquisa para a avaliação de concentrações livres de antimicrobianos em tecidos hígidos e infectados em diferentes classes de antimicrobianos (DE ARAUJO *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2017; ZIMMERMANN *et al.*, 2008). Estudos que avaliaram as concentrações livres de TOB são escassos na literatura. Dhanani e colaboradores (2018), utilizaram a microdiálise para descrever concentrações pulmonares de TOB em ovelhas, após uma dose de 400 mg por via i.v. ou por via inalatória. As concentrações pulmonares livres máximas atingidas pela TOB após a dose inalatória foram maiores, atingindo $C_{máx}$ de 40.8 mg/L, que as observada após o uso da via i.v. ($C_{máx} = 19.0$ mg/L) (Dhanani *et al.*, 2018).

Eisenberg e colaboradores (1993) estabeleceram a técnica de microdiálise brônquica para mensurar as concentrações livres de aminoglicosídeos no ELF, visto que na técnica de lavado broncoalveolar (BAL) determinam-se as concentrações totais do fármaco. Gentamicina e TOB na dose de 20 mg/kg i.v. *bolus* foram administradas a ratos Wistar e amostras de plasma e de microdialisado brônquico foram coletadas. Os autores determinaram uma penetração média da TOB e da gentamicina no ELF, expressa por AUC_{ELF}/AUC_{PLASMA} de $0,36 \pm 0,06$ e $0,56 \pm 0,09$, respectivamente, indicando que as concentrações dos fármacos no ELF são menores do que as encontradas no plasma (EISENBERG *et al.*, 1993).

Em nosso grupo de pesquisa, Bernardi (2016) avaliou a penetração pulmonar da TOB em ratos hígidos e com infecção aguda (7 dias) por *P. aeruginosa* PA14 utilizando microdiálise após dose única iv. *bolus* de 10 mg/kg. O fator de penetração pulmonar nos animais hígidos foi de 0,94, indicando uma alta penetração da TOB no

tecido pulmonar. Apesar das concentrações plasmáticas da TOB não se alterarem na infecção aguda, as concentrações pulmonares foram reduzidas, alterando a penetração pulmonar do fármaco em torno de 70% (BERNARDI, 2016). Lima (2017) estudou a penetração pulmonar da TOB em ratos com infecção crônica (14 dias) 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 pulmonares do fármaco (LIMA, 2017). As concentrações livres no ELF, determinadas após a mesma dose única i.v. *bolus* administrada a animais hígidos e infectados aguda e cronicamente (DIAS, 2019), mostraram uma redução de 70% da concentração livre da TOB no ELF nos animais hígidos, comparado com as concentrações livres pulmonares, levando a uma penetração de TOB no ELF de 10%. Nos animais infectados aguda e cronicamente, foi observado uma redução da exposição, na mesma proporção da redução pulmonar previamente observada.

3.4 Modelagem farmacocinética populacional

A avaliação dos perfis de concentração livre teciduais dos antimicrobianos e o estabelecimento da relação matemática desses com as concentrações plasmáticas totais podem ser feitos por farmacometria, como por exemplo através do desenvolvimento de modelos popPK. O conceito de modelagem populacional foi descrito por Sheiner e colaboradores em 1977, que desenvolveram essa abordagem para trabalhar com dados de monitoramento terapêutico. Atualmente, é utilizada para diferentes propósitos, desde o desenvolvimento de novos fármacos até o melhor entendimento das relações de concentrações de fármacos e resposta farmacodinâmica (popPK/PD). A modelagem popPK permite entender as fontes de variabilidade interindividual e, desse modo, prever a exposição individual ao fármaco, podendo auxiliar no estabelecimento de regimes terapêuticos otimizados, quando construídos para uma população específica (MOULD; UPTON, 2012).

Na modelagem popPK os dados experimentais são descritos por um modelo matemático construído utilizando modelos não-lineares de efeitos mistos (NLEM), podendo quantificar e explicar a variabilidade da exposição dos indivíduos ao fármaco. Um modelo popPK do tipo NLEM é “não-linear”, pois refere-se ao fato de que a variável dependente (concentração do fármaco) não se relaciona linearmente com a

variável independente (tempo) e com os parâmetros do modelo (*clearances*, volumes), e de “efeitos-mistos”, pois apresenta parâmetros não variáveis entre os indivíduos – efeitos fixos, e parâmetros variáveis – efeitos aleatórios (MOULD; UPTON, 2012; TUNBLAD; HAMMARLUND-UDENAES; JONSSON, 2004).

O modelo é composto basicamente de três partes, como descrito na Figura 3: os elementos fixos, representados pelo modelo estrutural que descreve o perfil de concentração *versus* tempo na população; o modelo estatístico, que quantifica as fontes de variabilidade desconhecidas na população (elemento aleatório) e o modelo de covariáveis, que quantifica as fontes de variabilidade interindividuais conhecidas (MOULD; UPTON, 2012).

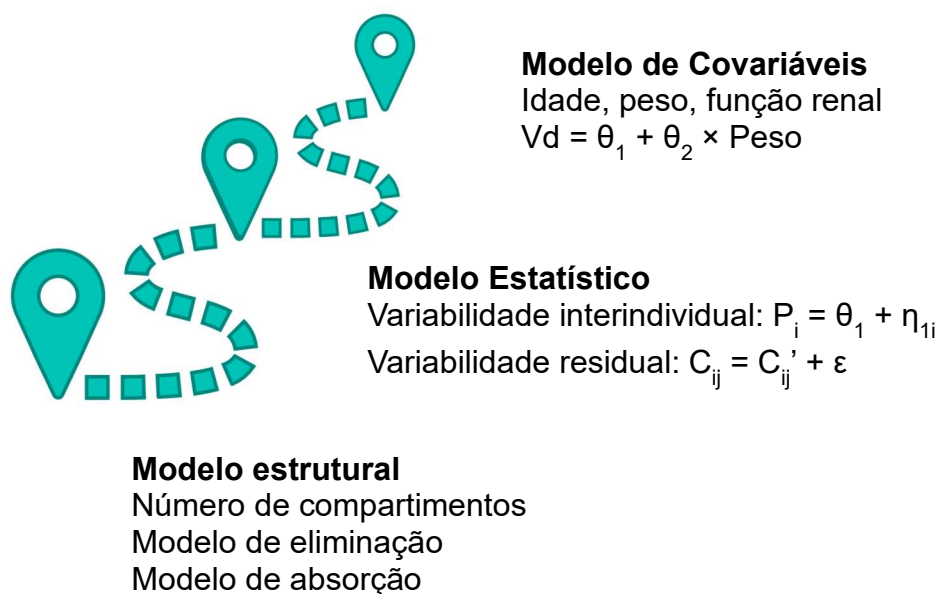


Figura 3. Componentes de um modelo farmacocinético populacional: modelo estrutural, modelo de covariáveis e modelo estatístico. Vd : volume de distribuição; θ_1 e θ_2 : valores típicos da população; P_i : parâmetros individuais; η_i : variabilidade individual; C_{ij} : concentração individual medida; C_{ij}' : concentração individual predita pelo modelo; ε : erro residual. Fonte: autor.

A abordagem utilizada para a construção destes modelos usualmente é a construção do modelo estrutural, seguido do modelo estatístico, e então a avaliação das covariáveis. Os parâmetros individuais (P_i) são estimados em uma abordagem combinada, estimando parâmetros típico da população (θ_1) com a variabilidade de cada indivíduo representada por η (éta). Ainda, quando disponível, pode-se estimar a variabilidade intra-ocasional, descrita pela resposta entre diferentes medidas, em um mesmo indivíduo. A variabilidade residual estima o erro aleatório das medidas,

incluindo variabilidade de ensaios e erros de medida. É atribuída por ϵ (épsilon), calculado pelo valor da concentração individual medida (C_{ij}) e pelo valor da concentração individual predita pelo modelo (C_{ij}'). O modelo estrutural e o modelo estatístico, com as variabilidades interindividual e interocasional e o erro residual, compõem o modelo base. As covariáveis são avaliadas para identificar os fatores relevantes que podem interferir nos parâmetros farmacocinéticos, como a influência do *clearance* de creatinina no *clearance* total do fármaco ou o peso no volume de distribuição (V_d). A influência da covariável no parâmetro pode ser estimada como uma função (linear, aditiva, exponencial, combinada), de forma que melhor descreva os dados (CARTER; ROSENBAUM; DUDLEY, 1995).

O modelo final descreve os parâmetros farmacocinéticos da população, inserindo as variabilidades interindividuais (IIV ou BSV, do inglês *interindividual variability* ou *between subject variability*, respectivamente) e intraocasionais (BOV, do inglês *between occasions variability*), erros residuais (RE, do inglês *residual error*) e covariáveis importantes para a descrição dos dados, possibilitando a realização de simulações e otimização dos regimes de doses (KIANG *et al.*, 2012; MOULD; UPTON, 2012, 2013).

No cenário pré-clínico, a modelagem popPK descreve os processos farmacocinéticos de forma mais refinada do que as análises farmacocinéticas tradicionais (como análise não-compartimental). Em indivíduos hígidos, pode ser aplicada de forma explorativa para descrever parâmetros relacionados a biodisponibilidade, absorção e eliminação. Em modelos de doenças, a modelagem popPK é utilizada na avaliação da disposição dos fármacos, que pode ser diferente dos animais hígidos, e na avaliação de efeito (PORZIO, 2013).

A modelagem popPK tem sido utilizada como ferramenta de análise em investigações pré-clínicas e clínicas de antimicrobianos. O seu uso possibilita a compreensão da variabilidade na farmacocinética de diferentes classes e a melhora dos regimes posológicos dos antimicrobianos já utilizados. Além disso, auxilia no monitoramento terapêutico de fármacos (TDM, do inglês *therapeutic drug monitoring*) com a possibilidade de personalização de doses para o tratamento de infecções de acordo com as características clínicas do paciente (DE VELDE *et al.*, 2018).

Torres e colaboradores (2017) utilizaram a modelagem popPK para caracterizar a diminuição das concentrações livres de ciprofloxacino (CIP) em pulmões de ratos

Wistar infectados cronicamente (14 dias) com *P. aeruginosa* produtora de biofilme (ATCC 27853) (Figura 4). O modelo que melhor descreveu os dados foi o modelo de três compartimentos, com eliminação de primeira ordem, dividindo o compartimento central em venoso, em que o animal recebia a dose, e arterial, de onde foram feitas as coletas de sangue. Além desses três compartimentos, o modelo foi composto por dois compartimentos pulmonares, visando descrever o tecido pulmonar, onde foram feitas as coletas do CIP, no líquido intersticial, e o líquido de revestimento alveolar (ELF) que banha os brônquios. A infecção foi a covariável que apresentou efeito significativo ($P < 0,01$) para a determinação do *clearance* (CL), *clearance* intercompartimental (Q_3) para o compartimento pulmonar e volume dos compartimentos pulmonares (V_5 e V_6).

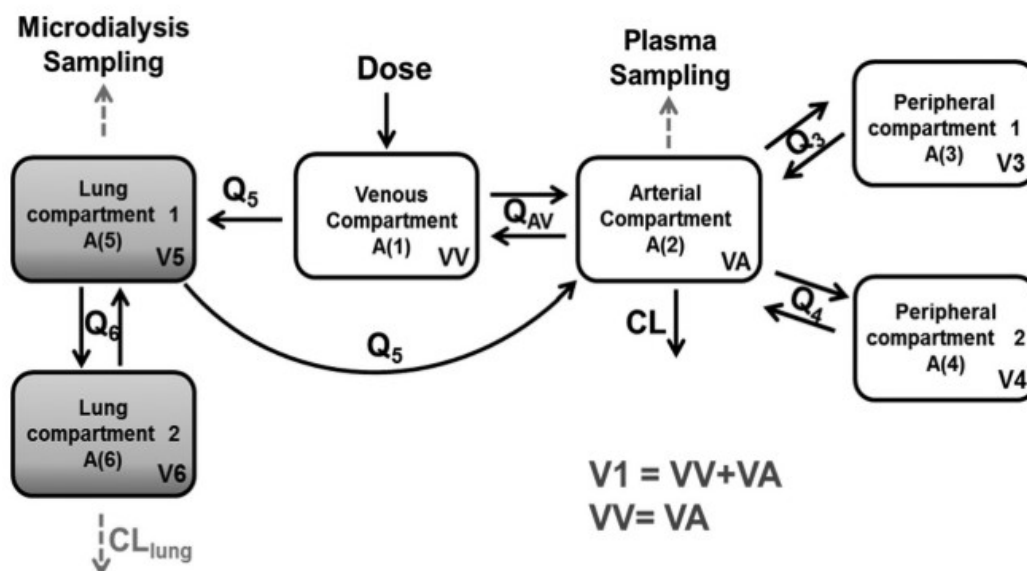


Figura 4. Representação esquemática do modelo final plasmático e pulmonar do CIP. Abreviações: A(1), quantidade de fármaco no compartimento venoso central; A(2), quantidade de fármaco no compartimento arterial central; A(3) e A(4), quantidade de fármaco nos compartimentos periféricos; A(5) e A(6), quantidade de fármaco nos dois compartimentos pulmonares; Q_{AV} , clearance intercompartimental no sangue; Q_3 , Q_4 , Q_5 e Q_6 , clearances intercompartimentais; VV, volume do compartimento venoso, VA, volume do compartimento arterial; V_3 e V_4 , volumes dos dois compartimentos periféricos; V_5 e V_6 , volumes dos compartimentos pulmonares; CL, clearance central; CL_{lung} , clearance pulmonar. (Fonte: retirado de TORRES et. al, 2017).

Através desse trabalho pode-se observar a importância do desenvolvimento de modelos popPK para estabelecer a correlação entre as concentrações plasmática totais, facilmente determinadas em pacientes, e as concentrações livres ativas na

infecção, determinadas na biofase. Além disso, a magnitude do impacto da covariável infecção em parâmetros como *clearance* e volume de distribuição tecidual foi determinada, possibilitando uma ferramenta mais segura e confiável para escolha de doses de CIP que gerem as concentrações pulmonares livres necessárias para erradicação da pneumonia por *P. aeruginosa*, com base nas concentrações plasmáticas do indivíduo.

3.5 Índices PK/PD na avaliação da PTA em infecções

Para identificar se as concentrações de fármacos são efetivas em um tratamento antimicrobiano são utilizados, não somente na pesquisa quanto na prática clínica, os índices PK/PD (Figura 5). Os índices PK/PD de antimicrobianos representam a relação quantitativa entre a sua farmacocinética e parâmetros microbiológicos relacionados ao patógeno alvo. Para isso, descrevem a relação entre os parâmetros farmacocinéticos, como $C_{m\acute{a}x}$ (concentração máxima), ASC (área sob a curva) tempo que a concentração plasmática permanece acima de determinado nível com o efeito do antimicrobiano, avaliado pelo CIM, permitindo o estabelecimento de uma relação entre exposição do organismo ao fármaco e resposta microbiológica (DE VELDE *et al.*, 2018; MOUTON *et al.*, 2005).

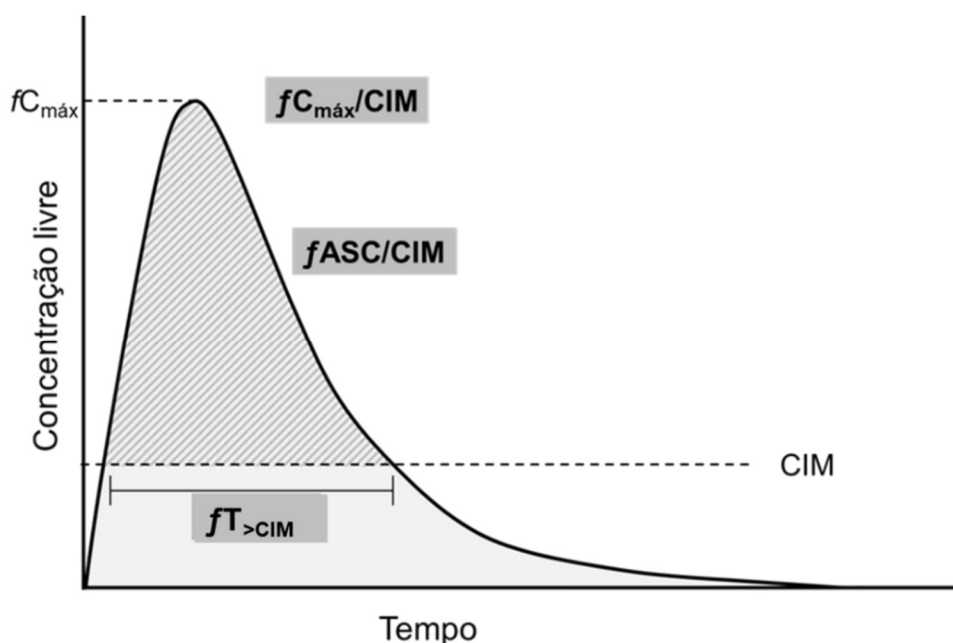


Figura 5. Índices PK/PD demonstrados em uma curva de concentração versus tempo: $fC_{m\acute{a}x}/CIM$ (razão entre a CIM e a concentração livre máxima atingida pelo fármaco), $fAUC/CIM$ (razão da área sob a curva livre do fármaco e a CIM) e $fT_{>CIM}$ (tempo que a concentração livre do fármaco permanece acima da CIM); CIM: concentração inibitória mínima. Fonte: autor.

O índice PK/PD a ser escolhido para cada antimicrobiano é baseado principalmente no seu mecanismo de ação, considerando que estes podem ter sua eficácia descrita como *tempo* ou *concentração* dependente. Os fármacos que possuem ação *tempo dependente* são avaliados pelo tempo em que a sua concentração livre permanece acima da CIM ($f_{T>CIM}$). Já os fármacos *concentração dependente* podem ser relacionados aos índices de razão entre a concentração livre máxima e a CIM ($f_{C_{máx}/CIM}$) ou razão da área sob a curva de concentração livre e a CIM ($f_{ASC/CIM}$) (Figura 5). A avaliação dos alvos PK/PD usando concentrações livres teciduais assegura uma melhor avaliação da efetividade dos tratamentos (AZEREDO; DALLA COSTA; DERENDORF, 2014; MOUTON *et al.*, 2005; RAO; LANDERSDORFER, 2021).

Os alvos PK/PD são definidos de acordo com os valores mínimos que asseguram uma probabilidade de um tratamento ter sucesso, e variam para cada classe de antimicrobiano. Conforme o objetivo, pode-se desejar estase ou morte bacteriana, supressão de resistência ou cura clínica (DE VELDE *et al.*, 2018). Para a TOB o índice PK/PD que melhor se associa à eficácia clínica é $f_{C_{máx}/CIM}$. Apesar de $f_{ASC/CIM}$ também ser utilizado, uma maior correlação com o efeito foi identificada para o índice $f_{C_{máx}/CIM}$. Segundo a literatura, independente do regime de dosagem investigado, o alvo de $f_{C_{máx}/CIM} > 10$ deve ser aplicado para maximizar a resposta clínica (BLAND; PAI; LODISE, 2018; BURKHARDT *et al.*, 2006; MOORE; LIETMAN; SMITH, 1987).

Utilizando os índices PK/PD, um determinado regime posológico pode ser avaliado em relação a sua probabilidade de atingir o sucesso terapêutico. Na determinação de regimes posológicos adequados os modelos popPK podem ser utilizados para simular os perfis de concentração-tempo esperados de diferentes posologias, permitindo a determinação dos valores de $C_{máx}$, ASC e tempo em que as concentrações livres efetivas para erradicar a infecção na biofase fiquem acima de determinado limite. Os parâmetros PK determinados nos perfis simulados são então utilizados para investigar a probabilidade de que o índice PK/PD obtidos sejam suficientes atingir o alvo terapêutico. Em outras palavras, a determinação da PTA é utilizada para avaliar a chance de um tratamento ser efetivo. A PTA calculada com o índice PK/PD é avaliada para diferente CIMs, referentes as CIM prevalentes na população para bactéria em estudo frente àquele antimicrobiano, de acordo com o

EUCAST (EUCAST, 2021). Usualmente, uma PTA maior do que 90% é definida como um desfecho clínico adequado (DE VELDE *et al.*, 2018).

Considerando que as infecções causadas por bactérias produtoras de biofilme podem alterar as concentrações livres de antimicrobianos, neste estudo descreveu-se as concentrações plasmáticas totais e livres pulmonares e no fluido de revestimento epitelial pulmonar da TOB em infecções agudas e crônicas causadas por *P. aeruginosa* utilizando um modelo popPK. A partir do modelo desenvolvido, simulações de regimes posológicos, alometricamente escalonados, foram utilizadas para avaliar a probabilidade de concentrações livres de TOB no pulmão e no ELF atingirem o alvo PK/PD estabelecido de $fC_{\text{máx}}/\text{CIM} > 10$, investigando-se a eficácia dos regimes terapêuticos utilizados na clínica atualmente.

4. CAPÍTULO

Probability of target attainment of tobramycin treatment in acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection based on preclinical population pharmacokinetic modeling

O texto completo do Capítulo, que na versão integral da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 51 – 76, foi suprimido por tratar-se de um manuscrito a ser submetido para publicação em um periódico científico. O resumo do Capítulo é apresentado a seguir.

**Probability of target attainment of tobramycin treatment in acute and chronic
Pseudomonas aeruginosa lung infection based on preclinical population
pharmacokinetic modeling**

Bruna Bernar Dias¹, Fernando Carreño², Victória Etges Helfer¹, Priscila Martini Bernardi Garzela¹, Daiane Maria Fonseca Lima¹, Fabiano Barreto³, Bibiana Verlindo de Araújo¹, Teresa Dalla Costa¹

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

² Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill/US;

³ Federal Laboratory of Animal and Plant Health and Inspection – LFDA/RS, Porto Alegre/Brazil;

ABSTRACT

Biofilms and infectious process may alter free antimicrobial concentrations at the site of infection. Tobramycin (TOB), an aminoglycoside used to treat lung infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, binds to alginate present in biofilm extracellular matrix increasing its minimum inhibitory concentration (MIC). This work aimed to investigate the impact of biofilm-forming *P. aeruginosa* infection on TOB lung and ELF penetration, using microdialysis, and to develop a population pharmacokinetic (popPK) model allowing to evaluate the probability of therapeutic target attainment of the current dosing regimens employed in CF and non-CF patients. The popPK model developed has three compartments including the lung. ELF concentrations were described by a penetration factor derived from lung compartment. Infection was a covariate in lung volume (V3) and only chronic infection was covariate in central volume (V1) and total clearance (CL). Simulations of the recommended treatments for acute and chronic infection achieved > 90% PTA in lung with 4.5 mg/kg q24h and 11 mg/kg q24h, respectively, for the most prevalent *P. aeruginosa* MIC (0.5 mg/mL). The model was successfully applied to evaluate the PTA of current TOB dosing regimens used in the clinic, indicating the need to investigate alternative posology.

Keywords: Tobramycin, popPK model, *Pseudomonas aeruginosa* infection model, biofilm, microdialysis, PTA.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, o presente estudo atingiu os objetivos propostos, tendo sido desenvolvido modelo popPK que permitiu descrever as concentrações plasmáticas, pulmonares e do ELF de TOB em infecções agudas e crônicas causadas por *P. aeruginosa* formadora de biofilme. O modelo foi capaz de descrever a redução nas concentrações livres pulmonares de TOB em animais infectados e a proporcionalidade entre as concentrações pulmonares e no ELF nas condições hígido e infectados. Até o momento, não há outro modelo na literatura que tenha estabelecido essa relação, mostrando o ineditismo dos resultados deste trabalho.

O modelo popPK foi utilizado com sucesso para gerar simulações de perfis livres plasmáticos, pulmonares e no ELF de diferentes regimes posológicos, alometricamente escalonados, empregados na clínica para tratamento de pneumonias de pacientes fibrocísticos ou não, visando avaliar a probabilidade de atingir o alvo terapêutico dessas posologias. Os resultados mostraram que a TOB administrada na dose i.v. de 3 mg/kg q24h tem maior probabilidade de sucesso que a administração da dose de 1 mg/kg q8h usada para tratar infecção pulmonar aguda por *P. aeruginosa*. Nenhum dos tratamentos investigados gerou concentração livres no ELF adequadas para erradicação bacteriana, não sendo possível estabelecer-se uma dose intravenosa que garanta esse desfecho terapêutico. Os regimes de dosagem de 4,5 mg/kg q24h e 11 mg/kg q24h atingiram PTA \geq 90% no plasma e pulmão para o tratamento da infecção aguda e crônica, respectivamente. Os resultados apontam para a necessidade de investigar-se na clínica posologias alternativas para o tratamento de infecções com TOB.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

AZEREDO, F. J.; DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: Current status and future directions. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 205–212, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40262-014-0131-8>

BARMADA, S. *et al.* Correlation of Tobramycin-Induced Inhibition of Protein Synthesis with Postantibiotic Effect in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 2678–2683, 1993.

BERGONGNE-BEREZIN, E. Penetration of antibiotics into the respiratory tree. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 8, p. 171–174, 1981.

BERNARDI, P. M. Avaliação por microdiálise da penetração pulmonar da tobramicina em modelo de pneumonia por microrganismo formador de biofilme. *In*: DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UFRGS. [S. l.: s. n.], 2016.

BLAND, C. M.; PAI, M. P.; LODISE, T. P. Reappraisal of Contemporary Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles for Informing Aminoglycoside Dosing. **Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 1229–1238, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/phar.2193>

BURKHARDT, O. *et al.* Once-daily tobramycin in cystic fibrosis: Better for clinical outcome than thrice-daily tobramycin but more resistance development? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 822–829, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl328>

CARTER, A. A.; ROSENBAUM, S. E.; DUDLEY, M. N. Review of methods in population pharmacokinetics. **Clinical Research and Regulatory Affairs**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–21, 1995. Available at: <https://doi.org/10.3109/10601339509079574>

CHAURASIA, C. S. *et al.* 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**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. E48–E59, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1208/aapsj0901006>

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents— how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. e913, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>

COULON, C. *et al.* Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e14220, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014220>

CRAIG, W. A. Optimizing Aminoglycoside Use. **Critical Care Clinics**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 107–121, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2010.11.006>

CURRAN, C. S.; BOLIG, T.; TORABI-PARIZI, P. Mechanisms and targeted

therapies for pseudomonas aeruginosa lung infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 197, n. 6, p. 708–727, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-1043SO>

DE ARAUJO, B. V. *et al.* PK-PD modeling of β -lactam antibiotics: In vitro or in vivo models? **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 439–446, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1038/ja.2011.29>

DE LANGE, E. C. M.; DE BOER, A. G.; BREIMER, D. D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 45, n. 2–3, p. 125–148, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00107-1)

DE VELDE, F. *et al.* Clinical applications of population pharmacokinetic models of antibiotics: Challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 134, n. May, p. 280–288, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.005>

DHANANI, J. *et al.* Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: A review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 491–500, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.08.013>

DHANANI, J. A. *et al.* A research pathway for the study of the delivery and disposition of nebulised antibiotics: an incremental approach from in vitro to large animal models. **Intensive Care Medicine Experimental**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0180-7>

DIAS, B. B. Influência da pneumonia experimental aguda e crônica por *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações livres de tobramicina no fluido de revestimento epitelial pulmonar. [s. l.], 2019.

DING, J. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intensive Antituberculosis Treatment of Tuberculous Meningitis. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 1023–1033, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/cpt.1783>

EISENBERG, E. J. *et al.* Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: Aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 93–98, 1993. Available at: [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(93\)90056-K](https://doi.org/10.1016/1056-8719(93)90056-K)

EUCAST. Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values. [s. l.], n. June, 2021.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, [s. l.], v. 8, p. 623–633, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>

GURJAR, M. Colistin for lung infection: an update. **Journal of intensive care**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40560-015-0072-9>

HAMMARLUND-UDENAES, M. Microdialysis as an Important Technique in

Systems Pharmacology—a Historical and Methodological Review. **The AAPS Journal**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1294–1303, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0108-2>

HENNIG, S. *et al.* Population pharmacokinetics of tobramycin in patients with and without cystic fibrosis. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 289–301, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0036-y>

HØIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 3, p. 55–65, 2011. Available at: <https://doi.org/10.4248/IJOS11026>

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 Disease**, [s. l.], v. 134, p. S97–S103, 1976.

KIANG, T. K. L. *et al.* Fundamentals of Population Pharmacokinetic Modelling Modelling and Software. [s. l.], v. 51, n. 8, p. 515–525, 2012.

LIMA, D. M. Influência de pneumonia crônica experimental por *Pseudomonas aeruginosa* mucóide na disposição plasmática e pulmonar da tobramicina. *In*: TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. UFRGS. [S. l.: s. n.], 2017.

LUND-PALAU, H. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. **Expert Review of Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 685–697, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460>

MACIÀ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>

MOORE, R. D.; LIETMAN, P. S.; SMITH, C. R. Clinical Response to Aminoglycoside Therapy: Importance of the Ratio of Peak Concentration to Minimal Inhibitory Concentration. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 93–99, 1987. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/155.1.93>

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–14, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/psp.2012.4>

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development - Part 2: Introduction to pharmacokinetic modeling methods. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1038/psp.2013.14>

MOUTON, J. W. *et al.* Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: An update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 601–607, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dki079>

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 1–12, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>

MÜLLER, L. *et al.* Human airway mucus alters susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin, but not colistin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 2762–2769, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dky241>

NEU, H. C. Tobramycin : An Overview. **The Journal of Infectious Disease**, [s. l.], v. 134, p. S3–S19, 1976.

PORZIO, S. Application of population pharmacokinetics for preclinical safety and efficacy studies. **Bioanalysis**, [s. l.], v. 5, n. 16, p. 2053–2069, 2013. Available at: <https://doi.org/10.4155/bio.13.147>

RAO, G. G.; LANDERSDORFER, C. B. Antibiotic pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling: MIC, pharmacodynamic indices and beyond. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 106368, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106368>

REYES, M. P.; ZHAO, J. J.; BUENSALIDO, J. A. L. Current Perspectives: Therapeutic Uses of Tobramycin. **Journal of Pharmacovigilance**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 1000123, 2014. Available at: <https://doi.org/10.4172/2329-6887.1000123>

ROCHA, A. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence factors and antibiotic resistance Genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 62, p. 1–15, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503>

SHEINER, L. B.; ROSENBERG, B.; MARATHE, V. V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 445–479, 1977. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01061728>

SMITH, W. D. *et al.* Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 364, n. 14, p. 1–9, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx121>

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 22, p. 1–25, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

TORRES, B. G. S. *et al.* Population pharmacokinetic modeling as a tool to characterize the decrease in biofilm lung infection in Wistar rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 1–14, 2017.

TUNBLAD, K.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; JONSSON, E. N. An integrated model for the analysis of pharmacokinetic data from microdialysis experiments. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1698–1707, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000041468.00587.c6>

WANG, H. *et al.* In Vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 2683–2690, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.06486-11>

WHO. WHO. **Who**, [s. l.], 2021. Available at: <http://www.who.int/emergencies/attacks-on-health-care/surveillance-system/en/>

WOZNIAK, D. J. *et al.* Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 13, p. 7907–7912, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1231792100>

ZEITLINGER, M.; MÜLLER, M.; JOUKHADAR, C. Lung microdialysis - A powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). **AAPS Journal**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 600–608, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1208/aapsj070362>

ZIMMERMANN, E. *et al.* Population analysis of levofloxacin in plasma, lung and prostrate measured by microdialysis in Wistar rats after intravenous and intratracheal administration. [s. l.], v. 4, n. 2005, p. 2008, 2008.

7 ANEXO

PARECER COMITÊ DE ÉTICA



U F R G S

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: 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

Vigência: 16/12/2016 à 31/03/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 16/12/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 09/01/2017 - SALA MULTIMEIOS DA BIBLIOTECA CENTRAL – ANDAR TÉRREO DO PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 60 ratos Wistar, machos, com peso aproximado de 250-300 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (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.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 20 de Janeiro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética