

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

**Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) para
Caracterização do Efeito do Ciprofloxacino em Infecções com Biofilmes
de *Pseudomonas aeruginosa***

BRUNA GAELZER SILVA TORRES

PORTO ALEGRE, 2016

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

**Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) para
Caracterização do Efeito do Ciprofloxacino em Infecções com Biofilmes
de *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada por **Bruna Gaelzer
Silva Torres** para obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Macedo
Co-orientadora: Profa Dr. Lena Friberg

PORTO ALEGRE, 2016

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de agosto de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cícero Armidio Gomes Dias
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Karine Rigon Zimmer
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Torres, Bruna Gaelzer Silva
Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD)
para Caracterização do Efeito do Ciprofloxacino em
Infecções com Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* /
Bruna Gaelzer Silva Torres. -- 2016.
168 f.

Orientadora: Teresa Dalla Costa.
Coorientador: Alexandre Macedo.

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

1. Modelagem PK/PD semi-mecanística. 2. Modelagem
PopPK. 3. Biofilmes. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5.
Ciprofloxacino. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II.
Macedo, Alexandre, coorient. III. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento do CNPq/480366/2012-8. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES e CAPES/PDSE (processo 002416/2015-08) para doutorado sanduíche na Uppsala Universitet (Suécia).

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Teresa Dalla Costa, pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo profissional, por todas as oportunidades concedidas e principalmente por todas as reuniões regadas a excelentes discussões científicas.

Ao professor Alexandre Macedo, pelo auxílio e dedicação com este trabalho, por todo o entusiasmo e palavras de apoio e principalmente por sua disposição para excelentes discussões científicas.

À professora Lena Friberg e à Elisabet Nielsen, pela ótima acolhida em seu laboratório e na Suécia, por todo ensinamento, orientação e auxílio na modelagem dos dados. *Tack så mycket!*

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia.

À minha fiel escudeira Victória Helfer, pela sua colaboração incansável no desenvolvimento da parte experimental desta tese, pelo convívio diário, pelas risadas e cafés noturnos. Sem sua ajuda o caminho teria sido muito mais difícil.

Aos queridos amigos farmacocinéticos (conhecidamente os PKs): Maiara Pigatto, Izabel Alves, Fernando Carreño, Andressa Braga, Priscila Bernardi, Jaqueline Izolan, Eduardo Palma, João Victor Laureano, Estevan Zimmerman, Graziela Lock, meu muito obrigada, por todos os momentos e emoções compartilhados, pelo aprendizado, companheirismo e principalmente pela amizade construída. A caminhada é muito mais leve com vocês ao lado.

Aos meus pais, Bruno e Cláudia e à minha irmã Carina, por ser minha base, meu alicerce; pelo esforço e incentivo dado para que eu pudesse realizar meus sonhos, por ser a minha maior e melhor torcida, por todo o cuidado e carinho. Amo vocês!

Aos meus familiares e amigos, por todo apoio, torcida, por sempre estarem ao meu lado e principalmente por terem compreendido as minhas ausências.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Biofilmes são comunidades bacterianas complexas encapsuladas em matrizes poliméricas autoproduzidas e podem se desenvolver em superfícies inertes ou tecidos vivos. A formação do biofilme é um importante fator de virulência, pois permite à bactéria resistir às respostas do hospedeiro e à terapia antimicrobiana. Devido a essa elevada resistência aos antimicrobianos, é difícil estabelecer uma estratégia eficaz para o tratamento de infecções com formação de biofilmes, levando a falhas na erradicação das mesmas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é desenvolver um modelo farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD) para descrever o efeito do ciprofloxacino (CIP) na presença de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), visto que a modelagem PK/PD de antimicrobianos é uma ferramenta útil na escolha de regimes posológicos que atinjam o efeito bactericida máximo, minimizando o desenvolvimento de resistência. Para atingir esse objetivo, inicialmente um método analítico por CLAE/fluorescência foi desenvolvido para quantificar o CIP em amostras de plasma e microdialisado. O método desenvolvido foi simples, rápido e com sensibilidade adequada para corretamente caracterizar a farmacocinética plasmática e pulmonar do CIP. Posteriormente, um modelo animal de infecção pulmonar crônica foi adaptado da literatura e padronizado, permitindo a investigação da distribuição pulmonar do CIP em ratos Wistar sadios e infectados. Para tal, bactérias foram imobilizadas em *beads* de alginato a fim de manter a infecção por até 14 dias com cargas bacterianas superiores à 10^8 UFC/pulmão. Estudo de microdiálise foi então conduzido para avaliar as concentrações livres de CIP após administração intravenosa de 20 mg/kg. A análise não-compartimental (NCA) e a modelagem farmacocinética populacional (PopPK) dos dados foram realizadas nos softwares Phoenix® e NONMEM®, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas no *clearance* plasmático ($1,59 \pm 0,41$ L/h/kg e $0,89 \pm 0,44$ L/h/kg) e na constante de eliminação ($0,23 \pm 0,04$ h⁻¹ e $0,14 \pm 0,08$ h⁻¹) para ratos sadios e infectados, resultando em uma exposição plasmática maior nos animais infectados ($ASC_{0-\infty} = 27,3 \pm 12,1$ µg·h/mL) quando comparados com os animais sadios ($ASC_{0-\infty} = 13,3 \pm 3,5$ µg·h/mL) ($\alpha = 0,05$). Apesar da maior exposição plasmática, quando comparados com os animais saudáveis (fT = 1,69), animais infectados apresentaram uma penetração pulmonar quatro vezes menor (fT = 0,44). Diferenças na constante

de eliminação pulmonar não foram observadas. Dados plasmáticos e pulmonares foram simultaneamente descritos por modelo PopPK constituído de compartimentos venoso e arterial, dois compartimentos representativos de duas regiões pulmonares distintas e dois compartimentos periféricos, representando outros tecidos que não os pulmões. Um *clearance* pulmonar foi adicionado ao modelo apenas para os dados de microdiálise dos animais infectados ($CL_{lung} = 0,643 \text{ L/h/kg}$) afim de explicar a exposição tecidual diminuída. O modelo desenvolvido descreveu, com sucesso, os dados plasmáticos e teciduais de animais sadios e infectados, permitindo a correta caracterização das alterações observadas na disposição plasmática e pulmonar do CIP decorrentes da infecção com biofilme. Para os estudos de farmacodinâmica, o efeito bactericida do CIP frente a biofilmes e células planctônicas de *P. aeruginosa* foi simultaneamente avaliado através do uso de curvas de morte bacteriana. Para a construção destas curvas, biofilmes de *P. aeruginosa* foram formados na superfície de blocos de acrílico e sua formação foi confirmada pelo ensaio cristal violeta e por microscopia eletrônica de varredura. Os blocos foram expostos a concentrações constantes de CIP (de 0,0625 a 10 $\mu\text{g/mL}$) e, em tempos pré-determinados, células planctônicas e de biofilmes eram amostradas para quantificação. Um modelo semi-mecanístico que incorpora um modelo E_{max} sigmoidal foi utilizado para descrever o efeito do CIP frente a ambos estilos de vida bacteriano. Uma subpopulação pré-existente com menor suscetibilidade ao CIP foi incluída no modelo e o efeito do CIP nesta subpopulação também foi descrito pelo modelo E_{max} sigmoidal. A comparação dos parâmetros estimados pelo modelo demonstrou que o efeito *in vitro* do CIP é maior para as células planctônicas ($EC_{50} = 0,259 \text{ mg/L}$ e $0,123 \text{ mg/L}$ e $E_{max} = 2,25 \text{ h}^{-1}$ e $5,59 \text{ h}^{-1}$ para biofilmes e planctônicas, respectivamente). A potência estimada do CIP para a subpopulação resistente foi muito menor para ambos estilos de vida bacteriano ($EC_{50} = 2,71 \text{ mg/L}$ e $1,15 \text{ mg/L}$ para biofilmes e planctônicas, respectivamente). Os modelos desenvolvidos podem ser utilizados para a simulação de cenários não testados e servir como uma ferramenta para guiar a escolha dos regimes posológicos adequados, contribuindo para o sucesso terapêutico no tratamento de infecções associadas à biofilmes.

Palavras-chave: Infecções associadas a biofilmes, *P. aeruginosa*, ciprofloxacino, microdiálise em pulmão infectado, modelagem popPK, curvas de morte bacteriana, modelagem PK/PD semi-mecanística.

ABSTRACT

Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Model to Characterize Ciprofloxacin Effect in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection

Biofilms are complex bacterial communities enclosed in self-produced polymeric matrices that can develop in inert surfaces or living tissues. Biofilm formation is an important virulence factor that allows bacteria to resist host responses and antibacterial agents. Due to this high resistance to antibiotics, it is difficult to establish an efficacious strategy for treatment of infections with biofilm formation leading to failure in infection eradication. In this context, the goal of this study was to develop a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model to describe the antimicrobial effect of ciprofloxacin (CIP) in the presence of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), since PK/PD modeling for antibacterial agents can be a useful tool to choose dosing regimens and to achieve the maximum bactericidal effect, minimizing the development of resistance. To reach this goal, firstly an analytical method based on HPLC/fluorescence was developed in order to quantify CIP in plasma and lung microdialysate. The developed method was simple, fast and with enough sensibility to properly characterize CIP plasma and lung pharmacokinetics. Secondly, an animal model of chronic lung infection was adapted from literature and standardized, allowing the analysis of CIP lung distribution in infected and healthy Wistar rats. Bacteria were immobilized in alginate beads prior to inoculation to Wistar rats in order to sustain the pneumonia for 14 days, maintaining a bacterial load superior to 10^8 CFU/lung. A microdialysis study was then conducted to evaluate free CIP concentrations after an intravenous administration of 20 mg/kg. Non-compartmental analysis (NCA) and populational PK modeling (PopPK) of the data were performed in Phoenix® and NONMEM®, respectively. Statistical differences were observed in the plasma clearance (1.59 ± 0.41 L/h/kg and 0.89 ± 0.44 L/h/kg) and elimination rate constant (0.23 ± 0.04 h⁻¹ and 0.14 ± 0.08 h⁻¹) for healthy and infected rats, respectively, resulting in a significantly higher CIP plasma exposure in infected rats ($AUC_{0-\infty} = 27.3 \pm 12.1$ µg·h/mL) compared to healthy animals ($AUC_{0-\infty} = 13.3 \pm 3.5$ µg·h/mL) ($\alpha = 0.05$). Besides the plasma exposure, a four times lower pulmonary penetration was observed in infected rat's lungs ($f_T = 0.44$) in comparison to healthy animals ($f_T = 1.69$), with no

significant differences in the lung elimination rate constant. Plasma and lung data were simultaneously fitted using a PopPK model consisting of an arterial and a venous compartment, two compartments representing different regions of the lungs and two peripheral distribution compartments, representing tissues other than lungs. A lung clearance was added to the model for infected animals ($CL_{\text{lung}} = 0.643 \text{ L/h/kg}$) to explain the lower tissue exposure. The model successfully described the plasma and microdialysis data from both, healthy and infected rats and allowed to correctly describe the changes in CIP plasma and lung disposition in biofilm infections. For the pharmacodynamic studies, CIP bactericidal effect against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic shedding cells were simultaneously evaluated using the time-kill curves approach. For the time-kill curves construction, *P. aeruginosa* biofilms were formed in acrylic blocks, which was confirmed by the crystal violet assay and scanning electron microscopy. The blocks were placed in flasks containing Mueller-Hinton growth medium and exposed to constant CIP concentrations (ranging from 0.0625 to 10 $\mu\text{g/mL}$). At pre-determined time points, biofilm and planktonic cells were sampled for bacterial counting. A mechanism-based model which incorporates a sigmoidal E_{max} model was used to describe the CIP effect against *P.aeruginosa* in both lifestyles, biofilm and planktonic. The presence of a pre-existing resistant subpopulation was included in the model and also modeled with a sigmoidal E_{max} model to describe CIP effect in this subpopulation. Comparison of the parameter estimates showed that the *in vitro* effect of CIP is higher for planktonic cells ($EC_{50} = 0.259 \text{ mg/L}$ and 0.123 mg/L and $E_{\text{max}} = 2.25 \text{ h}^{-1}$ and 5.59 h^{-1} for biofilm and planktonic cells, respectively). CIP potency was much lower for the resistant subpopulation, for both bacteria lifestyles ($EC_{50} = 2.71 \text{ mg/L}$ and 1.15 mg/L for biofilm and planktonic, respectively). The developed models can be used to simulate untested scenarios and serve as a tool to guide dosing regimen selection, contributing for the therapeutic success of treatments of biofilm-associated infections.

Keywords: Biofilm-associated infections, *P. aeruginosa*, ciprofloxacin, infected lung microdialysis, popPK modeling, time-kill curves, semi-mechanistic PK/PD modeling.

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1. Composição do biofilme.....	34
--	----

Capítulo 1

Table 1. Intra- and inter-day precision of HPLC method to quantify CIP in rat plasma.....	68
--	----

Table 2. Intra and inter-day precision of HPLC method to quantify CIP in microdialysate samples.....	69
---	----

Table 3: Accuracy for the analysis of CIP in rat plasma and microdialysate.....	69
--	----

Table 4. Stability results of CIP in rat plasma e microdialysate.....	70
--	----

Capítulo 2

Table 1. CIP pharmacokinetic parameters determined in plasma and lung after 20 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing to healthy, <i>P. aeruginosa</i> biofilm infected and blank beads Wistar rats determined by NCA.....	93
---	----

Table 2. Parameter estimates of the final CIP model.....	96
---	----

Capítulo 3

Table 1. Final model parameter estimates with typical values and relative standard errors (RSE%).....	128
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1.** Infecções relacionadas a biofilmes mais comuns.....31
- Figura 2.** Etapas da formação e desenvolvimento de biofilmes bacterianos....32
- Figura 3.** Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em biofilmes.....37
- Figura 4.** Prevalência idade-específica de patógenos causadores de infecções pulmonares em portadores de FC.....38
- Figura 5.** Biofilme de *P. aeruginosa* limita a penetração da tobramicina na sua biomassa.....42
- Figura 6.** Índices PK/PD utilizados para a otimização de posologias para antimicrobianos.....44
- Figura 7.** Concentrações de colistina (16 mg/kg, i.p.) no soro de camundongos versus CIM, CBM, MBIC e MBEC da *P. aeruginosa* PAO165307.....45
- Figura 8.** Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Nielsen e colaboradores.....49
- Figura 9.** Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Mohamed e colaboradores.....50
- Figura 10.** Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Khan e colaboradores.....51

Capítulo 1

- Figure 1.** Chemical structure of CIP.....60
- Figure 2.** Representative chromatograms of plasma.....66
- Figure 3.** Representative chromatograms of Ringer's solution.....67
- Figure 4.** Ciprofloxacin mean total plasma and free prostate concentration-time profiles.....72

Capítulo 2

Figure 1. Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained sections of lungs from infected and blank beads rats.90

Figure 2. Schematic representation of the final CIP lung and plasma model.....94

Figure 3. Individual and population fitted plasma and microdialysis (MD) concentration-versus-time profiles using the final popPK model.....97

Figure 4. Visual predictive checks (VPCs) of the final population PK model.....98

Capítulo 3

Figure 1. Scanning electron microscopy images of the *P. aeruginosa* biofilms upon Permanox® slides.....124

Figure 2. Time-kill curves of CIP against *P. aeruginosa* planktonic sheeding cells (A) and biofilm (B).....125

Figure 3. Mechanism-based model developed for ciprofloxacin and biofilm and planktonic cells of *P. aeruginosa*.....126

Figure 4. VPCs for the final model with all observations counts.....129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	25
REVISÃO DA LITERATURA.....	29
1. Biofilmes Bacterianos.....	31
2. Índices PK/PD utilizados na avaliação de antimicrobianos.....	43
3. Modelagem PK/PD de antimicrobianos.....	47
4. Microdiálise tecidual.....	52
CAPITULO 1: Validation of a Sensitive HPLC/Fluorescence Method for Assessment of Ciprofloxacin Levels in Plasma and Prostate Microdialysate Samples From Rats.....	55
CAPITULO 2: Population Pharmacokinetic Modeling as a Tool to Characterize the Decrease in Ciprofloxacin free Interstitial Levels Caused by Pseudomonas aeruginosa Biofilm Pneumonias.....	75
CAPÍTULO 3: Mechanism-based model for simultaneous assessment of the bactericidal effect of ciprofloxacin against Pseudomonas aeruginosa biofilms and planktonic cells.....	113
DISCUSSÃO GERAL	139
CONCLUSÕES.....	147
REFERÊNCIAS GERAIS.....	151
ANEXOS.....	159

INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos são comunidades estruturadas de células encapsuladas dentro de matrizes poliméricas autoproduzidas que podem se desenvolver em superfícies inertes ou tecidos vivos. Periodontite e infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística são exemplos de doenças associadas a biofilmes em órgãos ou tecidos (DARVEAU & TANNER, 1997; SINGH *et al.*, 2000). Por outro lado, infecções nosocomiais, como aquelas relacionadas ao uso de cateter venoso central (PASSERINI *et al.*, 1992), cateter urinário (MORRIS, STICKLER & McLEAN, 1999), válvulas cardíacas (HYDE, DAROUICHE & COSTERTON, 1998) e próteses ortopédicas (GRISTINA *et al.*, 1994) são exemplos de infecções onde biofilmes aderem-se a superfícies inertes.

A formação do biofilme começa quando ocorre a adesão de uma célula planctônica a essa superfície. A adesão inicialmente é um processo reversível, tornando-se irreversível em algumas horas, devido ao pili e ao glicocálice das bactérias (HØIBY *et al.*, 2001). O próximo passo é a formação de microcolônias por agregação às células já ligadas, através do recrutamento de mais células planctônicas (*quorum sensing*) ou pelo crescimento sésil da microcolônia (FONSECA & SOUSA, 2007). O biofilme crescente é constituído de múltiplas camadas e sua superfície irregular permite a liberação de células-filhas, que são destacadas do biofilme e levadas à nova superfície que será colonizada (HØIBY *et al.*, 2001).

Biofilmes constituem um modo protegido de crescimento bacteriano que permite a sobrevivência em um ambiente hostil (PARRA-RUIZ *et al.*, 2010). Quando na forma de biofilme, as bactérias são capazes de evadirem-se do sistema imune do hospedeiro e apresentam uma resistência aumentada aos antimicrobianos (STEWART e COSTERTON, 2001). Mecanismos clássicos de resistência a antimicrobianos - bombas de efluxo, mutações alvo e enzimas modificadoras – não são os únicos responsáveis pela resistência bacteriana na forma de biofilme (CERI *et al.*, 1999). Quando as bactérias são dispersas do biofilme e adquirem sua forma planctônica, geralmente tornam-se suscetíveis aos antimicrobianos, sugerindo que a resistência das bactérias no biofilme não é somente adquirida por mutações ou elementos genéticos (WILLIAMS *et al.*, 1997).

Devido a essas características intrínsecas dos biofilmes, a otimização de regimes posológicos de antimicrobianos para o tratamento de infecções associadas aos biofilmes é extremamente importante uma vez que, com a exposição correta ao antimicrobiano, é possível prevenir a resistência bacteriana e a formação de biofilme (HENGZHUANG *et al.*, 2013). Em

infecções onde o biofilme já se encontra formado, a otimização posológica permite controlar a infecção, não expondo os biofilmes a concentrações subinibitórias que estimulam a sua formação por representarem um ambiente hostil à célula bacteriana (KAPLAN, 2011; BALAJI, THENMOZHI & PADIAN, 2013).

A relação entre a farmacocinética (PK) e a farmacodinâmica (PD) de antimicrobianos tem sido tradicionalmente empregada com sucesso para otimizar esquemas terapêuticos visando alcançar o efeito máximo bactericida. Infelizmente, a maioria dos estudos PK/PD de antimicrobianos tem sido feito com a bactéria na sua forma livre (planctônica) e raros estudos têm sido conduzidos com as bactérias no fenótipo de biofilmes (HENZHUANG *et al.*, 2012). Nesse contexto, o desenvolvimento de um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK/PD) que descreva o efeito do antimicrobiano tanto sobre a bactéria planctônica quanto sobre a bactéria em biofilmes pode ser uma ferramenta extremamente útil, uma vez que modelos PK/PD convencionais, utilizados para as formas planctônicas bacterianas, podem não ser adequados para a correta previsão dos resultados clínicos em presença de biofilmes (NOREDDIN e ELKHATIB, 2009).

Modelos PK/PD para antimicrobianos geralmente são desenvolvidos com base em dados advindos de experimentos *in vitro* e *in vivo* para definir uma relação entre a exposição (PK) e o efeito (PD) de um fármaco. Perfis concentração/tempo plasmáticos e teciduais de antimicrobianos determinados *in vivo* são empregados para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos, enquanto um modelo de infecção *in vitro* em que a bactéria é exposta a concentrações constantes e flutuantes do antimicrobiano (curvas de morte bacteriana) é empregado para obtenção dos parâmetros farmacodinâmicos (BARBOUR, SCALIONE e DERENDORF, 2010).

Perfis concentração/tempo teciduais de antimicrobianos podem ser determinados empregando-se a técnica de microdiálise. A microdiálise possui a vantagem de medir apenas a fração livre do fármaco, farmacologicamente ativa, no fluído intersticial, que é o local de ação de muitos fármacos, entre eles alguns antimicrobianos (MÜLLER, 2000). Através dessa técnica, é possível comparar os perfis de concentração/tempo de fármacos em tecidos infectados e sadios e, assim, verificar se a infecção é responsável ou não por alterações na distribuição tecidual de fármacos (DHANANI *et al.*, 2010).

A modelagem matemática das curvas de morte bacteriana (*time-kill curves*) obtidas em modelos de infecção *in vitro*, nos quais diferentes perfis farmacocinéticos podem ser simulados, permite a determinação de parâmetros PK/PD como EC_{50} (concentração necessária para obter 50% do efeito máximo) e $E_{máx}$ (máxima velocidade de morte bacteriana). Esses parâmetros servem para descrever o efeito dos antimicrobianos e estimar o efeito de posologias não investigadas experimentalmente, permitindo a comparação de eficácia antibacteriana de diferentes regimes posológicos que levam à otimização de tratamentos (LIU *et al.*, 2005).

A fibrose cística (FC) é um exemplo de infecção associada à biofilmes na qual as doses de antimicrobianos tradicionalmente empregadas para células planctônicas não são capazes de erradicar os biofilmes presente no pulmão dos portadores. Estes biofilmes são capazes de gerar uma resposta inflamatória excessiva ocasionando dano tecidual progressivo e uma inflamação/infecção crônica das vias aéreas. Danos pulmonares são a principal causa de morbidade e mortalidade dos portadores de FC (CIOFU *et al.*, 2014). A infecção pulmonar destes pacientes ocorre com um espectro conhecido de patógenos, sendo que em adultos *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno mais comum, isolado em mais de 80% dos casos (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007). Para a FC, a otimização de regimes posológicos visando a erradicação dos biofilmes, ou o seu controle, contribui para a melhora no prognóstico da doença.

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva desenvolver um modelo PK/PD para antimicrobiano frente à bactéria formadora de biofilme com dados de PD *in vitro* e PK *in vivo*. Como bactéria e fármaco modelos para esta proposta será utilizada *Pseudomonas aeruginosa* (cepa ATCC 27853) e ciprofloxacino (CIP). *Pseudomonas aeruginosa* e CIP foram escolhidos devido a sua importância em infecções pulmonares crônicas e no tratamento dessas em pacientes com fibrose cística, respectivamente.

OBJETIVOS

O **objetivo geral** deste trabalho é desenvolver um modelo PK/PD para descrever o efeito antimicrobiano do ciprofloxacino frente a biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, visando auxiliar na determinação de regimes posológicos adequados para o tratamento de infecções pulmonares associadas a biofilmes.

Os objetivos específicos são:

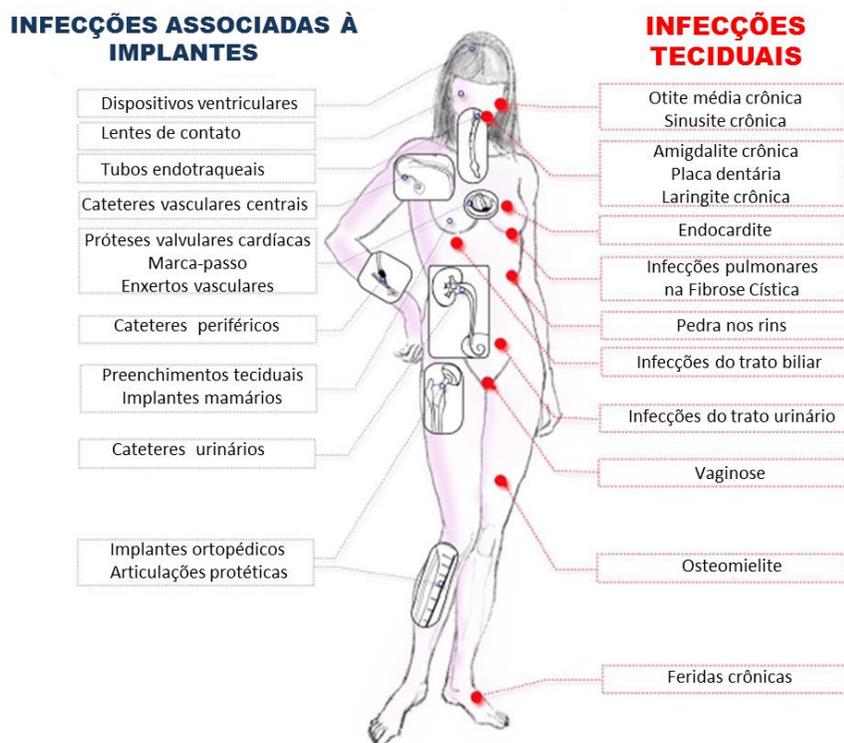
- Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificar o CIP em plasma e microdialisado de pulmão de ratos, através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência;
- Estabelecer e validar um modelo animal de infecção pulmonar crônica com formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em ratos Wistar;
- Determinar a penetração pulmonar do CIP em ratos Wistar saudáveis e infectados com biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* através da técnica de microdialise e modelar, por abordagem populacional os perfis plasmáticos e teciduais do fármaco nas duas situações (PK *in vivo*);
- Determinar o efeito bactericida *in vitro* de diferentes concentrações de CIP contra biofilmes e células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* através da construção de curvas de morte bacteriana (*time-kill curves* – PD *in vitro*);
- Desenvolver um modelo matemático mecanístico capaz de descrever os dados das curvas de morte bacteriana simultaneamente para os dois estilos de vida bacteriano (biofilme e planctônico).

REVISÃO DA LITERATURA

1. Biofilmes Bacterianos

Biofilmes bacterianos são tradicionalmente conceituados como comunidades estruturadas de células bacterianas, encapsuladas em matrizes poliméricas autoproduzidas, aderidas de maneira irreversível a uma superfície biótica (tecidos vivos) ou abiótica (superfícies inertes) (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999). A Figura 1 apresenta as principais superfícies (bióticas ou abióticas) onde biofilmes bacterianos podem se aderir no corpo humano (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Figura 1. Infecções relacionadas a biofilmes mais comuns (Adaptado de LEBEAUX *et al.*, 2013).



Biofilmes são considerados o modo de vida em comunidade dos microrganismos (SAWHNEY & BERRY, 2009) podendo esse ser composto de uma única ou várias espécies microbianas (DAVEY & O'TOOLE, 2000). Tais comunidades são formadas pois oferecem vantagens aos seus membros, tais como: i) ambiente seguro, protegido das defesas do hospedeiro, do tratamento com antimicrobianos e das condições adversas do ambiente; ii) disponibilidade de nutrientes e cooperação metabólica; iii) benefícios corporativos, permitindo

uma inter-relação benéfica aos microrganismos; iv) propicia um estilo de vida coletivo (DAVEY & O'TOOLE, 2000; KERKSIEK, 2008; SAWHNEY & BERRY, 2009).

A formação e desenvolvimento dos biofilmes são mediados por vários processos mecânicos, bioquímicos e genéticos (SAWHNEY & BERRY, 2009) envolvendo alguns passos que ocorrem sequencialmente (Figura 2) (STOODLEY *et al.*, 2002).

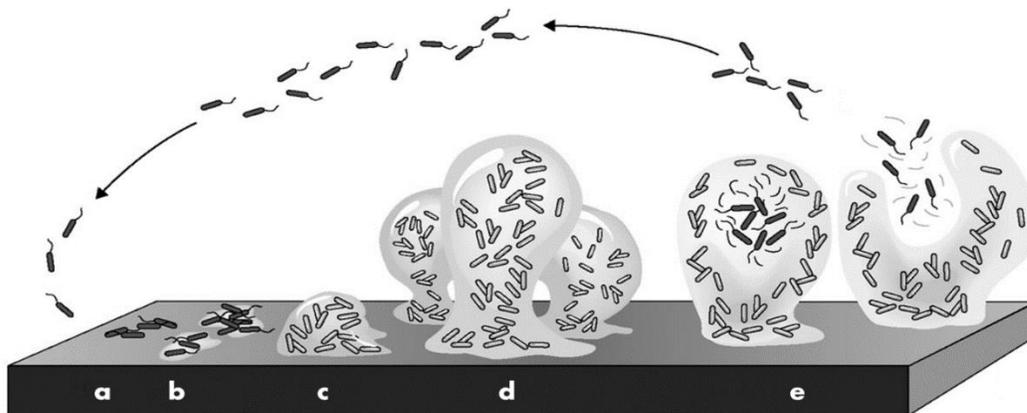


Figura 2. Etapas da formação e desenvolvimento de biofilmes bacterianos.

a: Adesão reversível à superfície; **b:** Adesão irreversível; **c:** Comunicação bacteriana (*quorum sensing*) e formação da microcolônia; **d:** Desenvolvimento e maturação do biofilme; **e:** Dispersão de células bacterianas ou pedaços de biofilmes (Adaptado de STOODLEY *et al.*, 2002).

O primeiro passo consiste em uma adesão primária ao substrato, que pode ser biótico ou abiótico (Figura 2a) (VASUDEVAN, 2014). Essa adesão geralmente é fraca e reversível, podendo a bactéria desligar-se do substrato (BRYERS, 2008). A ligação das células planctônicas à superfície é o passo mais crítico na formação do biofilme e depende das propriedades de superfície tanto do substrato quanto da célula bacteriana. A ligação à superfície provoca alterações nas expressões gênicas da bactéria que facilitam o crescimento na forma de biofilme (ISLAM *et al.*, 2012). Tais alterações reprimem os sistemas de motilidade bacteriana e induzem a síntese de exopolissacarídeos, levando a uma ligação irreversível ao substrato (Figura 2b) (STOODLEY *et al.*, 2002). Um estudo de Davies e Geesey (1995) demonstrou que células de *P. aeruginosa* aderidas a uma superfície de vidro por 15 minutos já iniciam um processo de super-expressão de *algC* (gene responsável pela produção de alginato) e este evento genético inicia o processo de formação do biofilme. O próximo passo é a formação de microcolônias por agregação de novas células bacterianas às células já ligadas, através do

recrutamento de mais células planctônicas (*quorum sensing*) ou pelo crescimento sésil da microcolônia (Figura 2c) (FONSECA & SOUZA, 2007). A próxima fase no desenvolvimento do biofilme é a sua maturação (Figura 2d), resultante da acumulação microbiana e da geração de uma arquitetura complexa, culminando na formação de uma matriz tridimensional, com poros, canais e uma redistribuição de bactérias longe do substrato (STOODLEY *et al.*, 2002; VASUDEVAN, 2014). A bactéria nessa fase possui características fisiológicas (perfis proteicos) totalmente diferentes da sua forma planctônica (STOODLEY *et al.*, 2002). Uma vez o biofilme maduro, células bacterianas ou mesmo pedaços do biofilme podem se destacar e dispersar para o ambiente. Desde modo, essas células bacterianas podem colonizar e estabelecer um novo biofilme em outra superfície gerando um mecanismo cíclico (Figura 2e) (BRYERS, 2008; VASUDEVAN, 2014).

1.1. Principais constituintes do biofilme

A formação e manutenção dos biofilmes dependem primariamente da presença de substâncias extracelulares que interconectam as células bacterianas (adesão célula-célula) e servem como a matriz do biofilme (CIOFU *et al.*, 2014). Essas substâncias extracelulares fornecem aos microrganismos um ambiente favorável para a sobrevivência, estabilidade mecânica aos biofilmes e adesão à superfície. Adicionalmente, permitem a transferência gênica e a comunicação célula-célula (*quorum sensing*) (VASUDEVAN, 2014). Vários tipos de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos podem fazer parte da matriz de biofilmes. Esses componentes são usualmente produzidos pela própria bactéria e uma mesma espécie bacteriana pode produzir diferentes componentes em ambientes específicos (CIOFU *et al.*, 2014). Na maioria dos biofilmes, os microrganismos podem representar menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz pode ser responsável por mais de 90% (Tabela 1) (FLEMMING & WINGENDER, 2010; VASUDEVAN, 2014).

Tabela 1. Composição do biofilme (Adaptado de SUTHERLAND, 2001).

Componente	Porcentagem do Biofilme
Água	Até 97%
Células Microbianas	2 – 5%
Polissacarídeos	1 – 2%
Proteínas	< 1 – 2% (incluindo enzimas)
DNA e RNA	< 1 – 2%
Íons	? (Ligados e Livres)

A matriz protege os microrganismos contra dessecação, oxidantes, antimicrobianos, radiação ultravioleta e defesas imunológicas do hospedeiro. Adicionalmente, a matriz dos biofilmes atua como um sistema digestivo externo, mantendo as enzimas extracelulares perto das células bacterianas, permitindo a essas metabolizar os biopolímeros tornando-os fontes de energia e nutrientes. Também funciona como um centro de reciclagem mantendo os componentes das células lisadas disponíveis para serem utilizados (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A matriz dos biofilmes possui uma arquitetura complexa e forma uma estrutura tridimensional coesiva que é altamente organizada e interconectada permitindo realizar funções especializadas (VASUDEVAN, 2014).

1.2 Resistência do biofilme a agentes antimicrobianos e às defesas imunes do hospedeiro

O crescimento na forma de biofilme permite às bactérias evadirem das defesas naturais do hospedeiro além de conferir resistência à quimioterapia antimicrobiana. Mesmo em indivíduos imunocompetentes, infecções com a presença de filme bacteriano são raramente resolvidas. Testes de suscetibilidade *in vitro* com modelos de biofilme demonstram que a célula bacteriana, quando em biofilmes, é capaz de sobreviver ao tratamento com antibióticos em concentrações centenas (e até milhares) de vezes maiores que a necessária para matar células planctônicas da mesma espécie (STEWART & COSTERTON, 2001).

A resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos é complexa e resulta da combinação de mecanismos de resistência intrínseca, adquirida e adaptativa (TAYLOR, YENG & HANCOCK, 2014). Vários mecanismos têm sido propostos para tentar explicar porque as bactérias em biofilmes apresentam resistência à terapia antimicrobiana.

O primeiro mecanismo é a limitação da difusão do antimicrobiano devido à arquitetura do biofilme, ocasionando uma penetração lenta ou incompleta do antimicrobiano no biofilme (Figura 3a) (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999; STEWART & COSTERTON, 2001, O'TOOLE, 2002). A matriz do biofilme é a primeira barreira que o antimicrobiano irá encontrar até chegar às células bacterianas. Esta pode atuar como um adsorvente ou reagente, limitando a quantidade do antimicrobiano disponível para atuar contra as bactérias e incapacitando o mesmo de penetrar em todas as áreas do biofilme (DAVIES, 2003). Esse mecanismo foi, por muito tempo, considerado o principal responsável pela resistência apresentada pelos biofilmes. Entretanto, com o passar dos anos, estudos *in vitro* de penetração de antimicrobianos em biofilmes demonstram que alguns desses fármacos são prontamente permeados pelos biofilmes, enquanto outros apresentam uma má penetração, dependendo do agente em particular e do biofilme (MAH, 2012; TSENG et al., 2013). Um exemplo de penetração antimicrobiana limitada em biofilmes é o dos aminoglicosídeos e biofilmes de *P. aeruginosa*. O alginato, principal exopolissacarídeo da matriz de biofilmes de *P. aeruginosa*, possui natureza aniônica sendo capaz de reter moléculas positivamente carregadas, como por exemplo, os aminoglicosídeos (MYSZKA & CZACZIK, 2011). Essa reduzida penetração no biofilme, proporciona tempo para as células bacterianas se adaptarem fisiologicamente, adotando um fenótipo mais tolerante ao antimicrobiano antes que concentrações altas sejam atingidas (TSENG et al., 2013).

Existe nos biofilmes uma sub-população de células bacterianas que adota um fenótipo distinto e altamente protegido, sendo conhecidas como dormentes ou persistentes (*persisters*) (Figura 3b). Células *persisters* têm sido propostas como um mecanismo inato adicional para a resistência apresentada pelo biofilme aos antimicrobianos. Uma vez que a concentração dos agentes antimicrobianos decai, as células *persisters* sobreviventes são capazes de restabelecer a população bacteriana, causando uma recidiva da infecção (LEWIS, 2012).

Outro mecanismo de resistência proposto leva em consideração o microambiente quimicamente alterado do biofilme (Figura 3c). Gradientes de concentração de nutrientes e oxigênio constituem-se em uma característica conhecida dos biofilmes. A partir disso, postula-se que as células bacterianas presentes na parte mais profunda do biofilme experimentam uma limitação de nutrientes e, portanto, passam a existir em um estado de crescimento lento. Células em crescimento lento ou quando não proliferativas são muito menos suscetíveis à terapia antimicrobiana, uma vez que antimicrobianos geralmente tem como alvo terapêutico mecanismos envolvidos na divisão e no metabolismo celular (STEWART & FRANKLIN, 2008).

Adicionalmente, biofilmes são ideais para a troca de material genético entre células bacterianas devido à proximidade uma com as outras. Resistência adquirida ocorre frequentemente em biofilmes, devido a transferências horizontais de material genético entre diferentes cepas e espécies (no caso de biofilmes multi-espécies). Resistência ocasionada pela produção de enzimas (p.ex. β -lactamases), também encontrada em bactérias planctônicas, pode ter maior influência na falha terapêutica quando em biofilmes, uma vez que estão em maior concentração no interior da matriz podendo desativar o antimicrobiano a medida que esse se difunde (TAYLOR, YENG & HANCOCK, 2014).

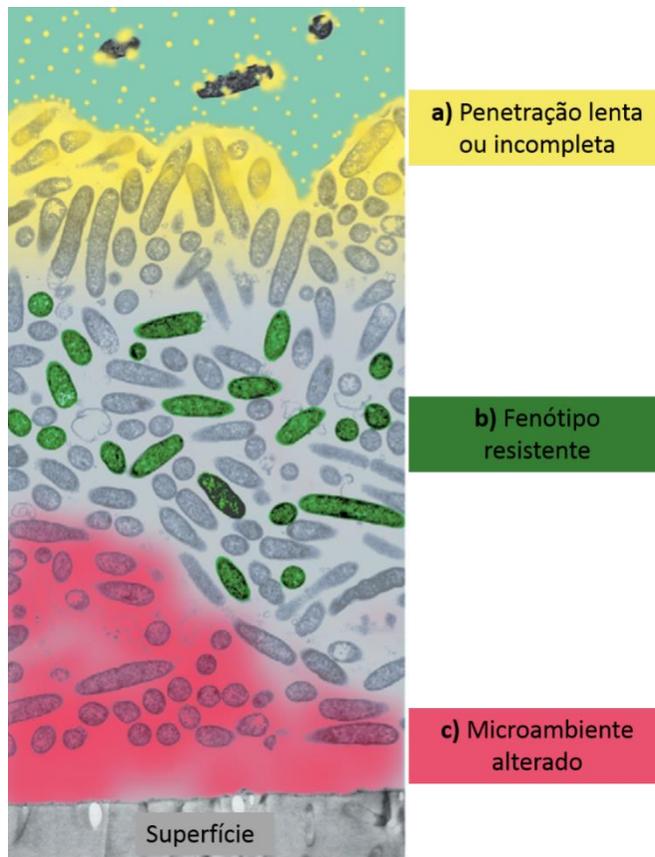


Figura 3. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em biofilmes: a) Limitada difusão de antibióticos pela matriz do biofilme; b) Sub-população de bactérias *persisters*; c) Presença de bactérias em crescimento lento devido ao microambiente alterado dos biofilmes, com regiões de redução de nutrientes e oxigênio (Adaptado de STEWART & COSTERTON, 2001).

Uma das razões para o desenvolvimento de infecções crônicas é que o sistema imune falha em reconhecer e erradicar o biofilme, deficiência que é independente da localização do biofilme no hospedeiro. A matriz exerce um efeito de blindagem aos microrganismos, diminuindo a penetração de células de defesa, como por exemplo, os polimorfonucleares (PMN). Adicionalmente, a matriz impede que o sistema imune reconheça os microrganismos no seu interior, protegendo-os contra a ação de anticorpos, fagócitos e outras células de defesa que usualmente são recrutadas para o combate de infecções (ALHEDE *et al.*, 2014).

Apesar de cada mecanismo acima descrito contribuir para uma maior resistência do biofilme, cada um isoladamente não é capaz de explicar a maior resistência apresentada pelas células bacterianas em biofilme quando comparada à sua forma planctônica. A resistência dos biofilmes é multifatorial e esses mecanismos são desenvolvidos em resposta a um estresse

bacteriano, uma vez que a vida em biofilme torna as células bacterianas menos suscetíveis às alterações ambientais (MAH, 2012).

1.3 Biofilmes e infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística

Biofilmes também são formados nas vias aéreas de pacientes portadores de Fibrose Cística (FC). A FC é uma doença autossômica recessiva, onde seus portadores possuem uma mutação no braço longo do cromossomo 7, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora de transporte iônico, chamada de regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR). Esta proteína é encontrada na superfície apical de vários epitélios secretores, funcionando como um canal para os íons cloreto (CATALDI *et al.*, 2014). FC é a doença genética letal mais comum entre caucasianos e infecções pulmonares são a principal causa de morbidade e mortalidade de seus portadores, pois uma vez estabelecido o biofilme no pulmão desses pacientes não é possível a erradicação da infecção, causando uma inflamação/infecção crônica das vias aéreas (CIOFU *et al.*, 2014). A colonização e a infecção pulmonar em paciente com FC ocorre com um espectro conhecido de patógenos bacterianos que são idade-dependentes. Em crianças os patógenos mais comuns são *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenza*. Mais tarde no decurso da doença, *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno mais comum, sendo isolada em mais de 80% das infecções (STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007) (Figura 4).

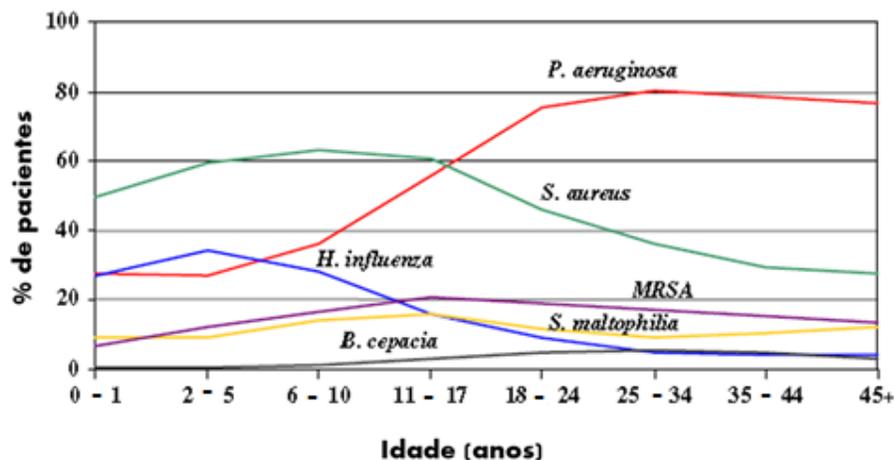


Figura 4. Prevalência idade-específica de patógenos causadores de infecções pulmonares em portadores de FC (Adaptado de STRAUSBAUGH & DAVIS, 2007).

Alguns fatores podem explicar o desenvolvimento de biofilmes no pulmão de portadores de FC. O primeiro e principal fator seria a redução da depuração mucociliar. Devido ao comprometimento funcional da proteína CFTR, portadores de FC possuem uma secreção reduzida de íons cloreto (Cl^-) no epitélio pulmonar. Essa reduzida concentração de íons cloreto (Cl^-) gera uma reabsorção de sódio (Na^+), reduzindo a quantidade de água presente na superfície epitelial. Uma vez que o líquido presente na superfície das vias aéreas é essencial para manter a estabilidade e funcionalidade ciliar, o transporte mucociliar acaba reduzido. A consequência é um ciclo vicioso de retenção de muco, infecção e inflamação (RATJEN, 2009). Outro fator importante seria a hipóxia existente dentro dos tampões de muco. Essa depleção de oxigênio torna o ambiente desfavorável para o crescimento na forma planctônica promovendo a conversão para uma forma mais protegida de crescimento, o biofilme. Fatores como aumento na densidade de receptores capazes de se ligar a bactérias presentes na superfície celular epitelial pulmonar e deficiência dessas na ingestão bacteriana também seriam propostos como responsáveis pelo desenvolvimento de biofilme no pulmão de portadores de FC (CATALDI *et al.*, 2014).

Biofilmes presentes no tecido pulmonar são capazes de gerar uma resposta inflamatória excessiva, ocasionando dano tecidual progressivo. A resposta inflamatória juntamente com a presença crônica das bactérias gera um infiltrado de neutrófilos no pulmão, onde a liberação excessiva de oxidantes e proteases geram um extenso dano tecidual (GROWCOTT *et al.*, 2011).

Apesar da elevada resposta inflamatória e terapia antimicrobiana intensa, biofilmes são capazes de persistir no pulmão de pacientes com FC levando à insuficiência respiratória, transplante pulmonar ou morte do paciente (CIOFU *et al.*, 2014).

1.4 Estratégias de combate aos biofilmes

O aumento do número de infecções causadas por patógenos resistentes a múltiplos antimicrobianos é considerado um importante problema médico e econômico. Os antimicrobianos utilizados atualmente, em sua maioria, foram desenvolvidos para atingir microrganismos que estejam em crescimento exponencial, sendo pouco efetivos contra biofilmes. Mesmo em altas concentrações, antimicrobianos bactericidas costumam ser inativos contra biofilmes ocasionando recidiva da infecção, mesmo quando os tempos de tratamento

são respeitados. As estratégias de combate aos biofilmes atualmente dividem-se em preventivas e curativas. Preventivas consistem em limitar a adesão bacteriana ou a formação dos biofilmes enquanto medidas curativas visam atingir os mecanismos de tolerância presentes em um biofilme já formado, como por exemplo, a morte de células *persister*. As estratégias são normalmente empregadas em conjunto, com o uso de compostos novos (inibidores de *quórum sensing*, bacteriófagos, terapia enzimática) juntamente com fármacos tradicionais (BELOIN *et al.*, 2014).

No caso de pacientes portadores de FC, os métodos atualmente empregados para prevenir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* nos pulmões consistem em: i) isolamento do paciente e medidas rígidas de higiene para evitar a infecção cruzada com outros pacientes já infectados; ii) terapia precoce para evitar a colonização, utilizando ciprofloxacino oral e nebulizações de colistina por três semanas, ou monoterapia com tobramicina inalatória por três meses; iii) nebulizações diárias com DNase (redução da viscosidade do muco) (HØIBY *et al.*, 2010; CIOFU *et al.*, 2014).

Para o tratamento de infecções pulmonares crônicas por biofilmes de *P. aeruginosa*, a metodologia empregada consiste na terapia antimicrobiana supressiva, que inicia assim que a infecção é diagnosticada. A terapia supressiva é realizada com colistina ou tobramicina inalatória, pelo resto da vida do paciente, combinada com ciclos de 2 semanas a cada 3 meses de antimicrobianos anti-*Pseudomonas* administrados intravenosamente (ceftazidima, piperacilina/tazobactam, carbapenêmicos ou ciprofloxacino). Adicionalmente, inalações diárias com DNase podem ser empregadas (HØIBY *et al.*, 2010; CIOFU *et al.*, 2014). Apesar de todo o esforço e uso combinado de diferentes antimicrobianos, o tratamento de infecções pulmonares por biofilmes de *P. aeruginosa* geralmente é ineficiente levando a recidivas. Isso ocorre principalmente devido à localização da bactéria em regiões onde a concentração de antimicrobianos administrados sistemicamente é subinibitória. A exposição bacteriana a concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) leva a ocorrência e seleção de bactérias resistentes ao antimicrobiano, além de estimular ainda mais a formação de biofilmes, por sinalizar um ambiente hostil à bactéria e essa passar a crescer em sua forma mais protegida (CIOFU *et al.*, 2014).

1.5. Ciprofloxacino e biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa que causa várias infecções oportunistas no homem, causando complicações em queimaduras, grandes cirurgias e em pacientes transplantados (THOMAS, CRIPPS & KID, 2009). É frequentemente isolada de pneumonias associadas à ventilação mecânica e em pacientes com FC (HOFFMANN, 2007). Foi demonstrado que 80-90% dos pacientes com FC possuem biofilmes de *P. aeruginosa* em seus pulmões (YAN *et al.*, 2008), sendo a principal causa de morbidade e mortalidade desses pacientes devido a um ciclo vicioso de infecção e inflamação que leva à deterioração progressiva da função pulmonar, levando à insuficiência respiratória e à morte (TRÉ-HARDY *et al.*, 2009).

Fluoroquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos são as três principais classes de antimicrobianos usadas no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (ELKHATIB, HAYNES & NOREDDIN, 2008). Dentre eles destacam-se o CIP, fluoroquinolona com a maior potência microbiológica (menor CIM) contra *P. aeruginosa*, e, portanto, considerada a flouroquinolona anti-pseudomonas (BURGESS & HALL, 2007).

O CIP é uma fluoroquinolona de segunda geração, possui amplo espectro de ação e é utilizado para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por décadas (SCHUCK *et al.*, 2005). O mecanismo de ação do CIP, bem como das fluoroquinolonas em geral, consiste na inibição de duas enzimas bacterianas: a DNA girase (ex-topoisomerase II) e a DNA topoisomerase IV. Tais enzimas são essenciais para os processos de replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano, sendo necessárias para o crescimento bacteriano e duplicação do material genético (HAWKEY, 2003). Fluoroquinolonas tendem a distribuir-se rapidamente nos tecidos periféricos e nos fluidos biológicos, atingindo concentrações muitas vezes superiores às encontradas no soro ou plasma (OLIPHANT & GREEN, 2002).

Preston e colaboradores (1996) demonstraram que o CIP foi significativamente mais eficaz que a tobramicina no tratamento de *P. aeruginosa* aderente a biomateriais, com uma concentração de eliminação do biofilme (MBEC) de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 X superior a CIM para as células planctônicas, enquanto a MBEC da tobramicina foi superior a 100 $\mu\text{g/mL}$, representando 75 – 100 X a CIM para as células planctônicas. Em conformidade com estes dados estão os resultados apresentados por Tseng e colaboradores (2013), que demonstraram que antimicrobianos carregados positivamente, como a tobramicina, são sequestrados na periferia

do biofilme, enquanto antimicrobianos neutros como o CIP conseguem facilmente penetrar no biofilme (Figura 10).

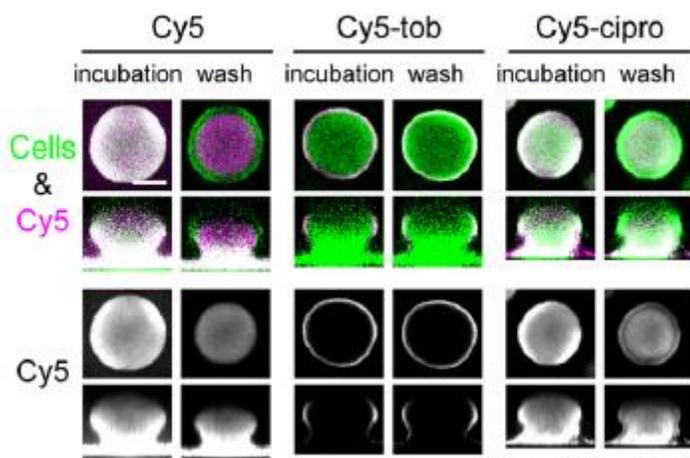


Figura 5. Biofilme de *P. aeruginosa* limita a penetração da tobramicina na sua biomassa. Biofilmes de *P. aeruginosa* PA01 expressando GFP foram incubadas com 21,4 μ M Cy5 (esquerda), tobramicina-Cy5 conjugada (centro) e ciprofloxacino-Cy5 conjugado (direita) por 30 minutos. As micrografias de varredura confocal a laser foram obtidas a cada 2,5 minutos durante a incubação e 30 minutos após lavagem. Imagens representativas após a incubação e lavagem estão demonstradas. Na fileira do topo, a biomassa está representada em verde e o Cy5 em roxo. Na fileira de baixo, está representado apenas o canal do Cy5 em escala de cinza (Retirado de TSENG *et al.*, 2013).

Em um estudo de Abdi-Ali e colaboradores (2006) a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos contra biofilmes de isolados clínicos de *P. aeruginosa* foi investigada. As fluoroquinolonas demonstraram maior potência que as outras classes investigadas, sendo os biofilmes completamente erradicados após um tratamento com 16 X a CIM para o CIP e 64 X a CIM para o ofloxacino. Kumar e colaboradores (2013) observaram o efeito do CIP em biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1 entre 1 e 7 dias. Durante os dias iniciais, do dia 1 ao dia 3, o CIP foi capaz de erradicar os biofilmes pré-formados, porém, demonstrou-se inefetivo em biofilmes a partir de 4 dias de idade. A arquitetura de biofilmes mais velhos é mais complexa e provavelmente limitou a penetração do CIP. Saini e colaboradores (2015) demonstraram que em concentrações próximas a CIM, o CIP é capaz de reduzir em 72% a formação do biofilme de *P. aeruginosa* PAO1. Em estudo conduzido por Dosler e Karaaslan (2014) ficou demonstrado que o CIP é capaz de inibir em mais de 70% a

fixação da *P. aeruginosa* (ATCC 27853) à superfície em concentrações sub-inibitórias (1/10 X CIM).

Tendo em vista a atual inabilidade no tratamento de infecções pulmonares crônicas em portadores de fibrose cística, salienta-se a importância do uso de metodologias capazes de guiar a escolha de doses dos agentes terapêuticos, a fim de evitar a exposição de populações bacterianas a concentrações subinibitórias dos antimicrobianos, o que permite ao microrganismo persistir por longos períodos levando a cronificação da inflamação/infecção responsáveis pela morbidade e mortalidade da doença.

Antimicrobianos têm sido tradicionalmente avaliados com base em índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD), estes possibilitam a indicação da melhor dose do antimicrobiano objetivando a eficácia do tratamento.

2. Índices PK/PD utilizados na avaliação de antimicrobianos

Um dos principais fatores que contribui para o surgimento de resistência bacteriana é a exposição inadequada ao antimicrobiano durante o tratamento (PAPICH, 2014). Sendo assim, uma estratégia para evitar o aparecimento de resistência é a otimização do esquema posológico dos antimicrobianos (PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015). Esquemas posológicos inadequados consistem em: seleção de doses muito baixas (doses subterapêuticas), administrações infrequentes, duração curta do tratamento e seleção de um fármaco pouco ativo contra a cepa bacteriana causadora da infecção (PAPICH, 2014). Por outro lado, altas exposições a antimicrobianos estão relacionadas à alta incidência de efeitos colaterais o que leva a não-adesão ao tratamento, ocasionando falha terapêutica e surgimento de resistência por não se respeitar o tempo adequado de tratamento (PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015).

A otimização posológica ideal exige conhecimento dos mecanismos envolvidos no efeito dos antimicrobianos (Farmacodinâmica – PD) e o conhecimento das concentrações atingidas no organismo do paciente (Farmacocinética – PK). A relação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) integra esses dois conhecimentos e define o regime posológico necessário para aumentar a possibilidade de sucesso terapêutico, minimizando efeitos colaterais e o surgimento de resistência (PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015).

Antimicrobianos têm sido tradicionalmente avaliados com base em índices PK/PD tais como: tempo no qual a concentração livre do fármaco permanece acima da concentração

inibitória mínima (CIM) ($T > CIM$), razão entre a concentração máxima (C_{max}) e a CIM (C_{max}/CIM) e a razão entre a área sob a curva de 24 horas (ASC_{0-24}) e a CIM (ASC_{0-24}/CIM) (BARBOUR, SCALION & DERENDORF, 2010; PAPICH, 2014; PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015) (Figura 5).

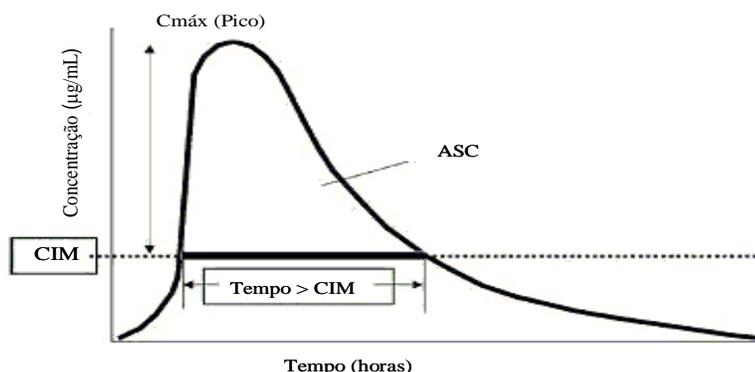


Figura 6. Índices PK/PD utilizados para a otimização de posologias para antimicrobianos.

A seleção do índice PK/PD mais preditivo, bem como a magnitude do mesmo necessária para eficácia antibacteriana, é essencial para a otimização do regime posológico (VELKOV *et al.*, 2013).

A escolha do índice PK/PD depende do padrão de efeito antibacteriano de cada fármaco, podendo ser divididos em 3 classes principais (PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015):

- Antimicrobianos concentração-dependente com efeito pós-antimicrobiano: os índices PK/PD para estes fármacos são C_{max}/CIM e ASC_{0-24}/CIM , pois quanto maiores as concentrações do fármaco maiores os efeitos observados. Além disso, o efeito pós-antimicrobiano mantém o efeito antibacteriano mesmo quando as concentrações do fármaco estão abaixo da CIM. Exemplos: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas.

- Antimicrobianos tempo-dependente: o melhor índice PK/PD para esse grupo de fármacos é o tempo no qual a concentração livre plasmática do fármaco permanece acima da CIM ($T > CIM$). Normalmente é expresso como uma porcentagem do intervalo de doses. Exemplos: todos os β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos.

- Antimicrobianos concentração-independente com efeito pós-antimicrobiano: devido a existência de efeito mesmo quando as concentrações estão abaixo da CIM, os índices PK/PD

mais preditivos para essa classe de fármacos são C_{max}/CIM e ASC_{0-24}/CIM . Exemplos: tetraciclinas, macrolídeos, sulfonamidas e cloranfenicol.

A maioria dos estudos PK/PD de antimicrobianos têm sido feitos com células planctônicas e a extrapolação dos resultados para biofilmes é inadequada, uma vez que biofilmes diferem grandemente das células livres conforme descrito anteriormente (CIOFU *et al.*, 2014). Os conceitos tradicionais de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) utilizados para as células planctônicas possuem uma baixa correlação clínica quando utilizados para bactérias em biofilmes. Concentração inibitória mínima no biofilme (MBIC) e concentração mínima para a erradicação do biofilme (MBEC) são mais precisas e refletem melhor a atividade dos antimicrobianos no biofilme (VELKOV *et al.*, 2013). Tal fato deve ser levado em consideração quando os índices PK/PD são utilizados para a racionalização de doses em infecções onde ocorre a formação de biofilmes (Figura 6).

Atingir concentrações próximas ao MBEC *in vivo* é praticamente impossível devido aos efeitos colaterais e toxicidade dos antimicrobianos. Quando o MBIC é utilizado para otimização de esquemas posológicos, observa-se que altas doses e longos períodos de tratamento são indicados. Entretanto, a presença de efeitos colaterais pode resultar na não-adesão do paciente resultando em falha terapêutica em grande parte das infecções com biofilmes. Geralmente, a erradicação de biofilmes utilizando-se monoterapia e administração sistêmica não é possível (CIOFU *et al.*, 2014).

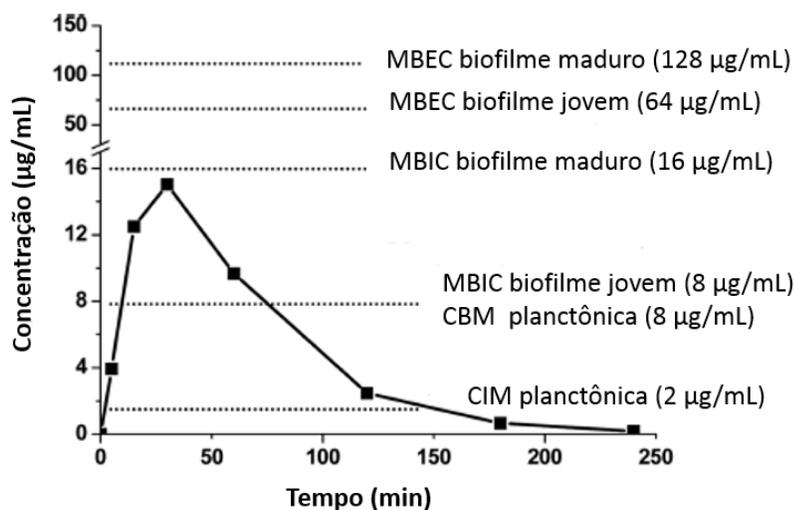


Figura 7. Concentrações de colistina (16 mg/kg, i.p.) no soro de camundongos *versus* CIM, CBM, MBIC e MBEC da *P. aeruginosa* PAO165307 (Adaptado de HENGZHUANG *et al.*, 2011).

Usualmente o mesmo índice PK/PD é utilizado tanto para a forma planctônica quanto para biofilmes, apresentando apenas diferenças de magnitude. Em um estudo realizado com a colistina, tanto a forma planctônica quanto biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1 apresentaram um comportamento concentração-dependente, sendo o índice que melhor se correlacionou com a eficácia do tratamento foi a ASC/CIM para as células planctônicas e ASC/MBIC para o biofilme (HENGZHUANG *et al.*, 2012). Já para a ceftazidima, um antimicrobiano β -lactâmico, observou-se um comportamento tempo-dependente para biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1 e um comportamento concentração-dependente para biofilmes de *P. aeruginosa* super-produtoras de β -lactamases (PA Δ DDh2Dh3). Tal fato pode ser explicado pela inativação do antimicrobiano na matriz do biofilme, necessitando de maiores concentrações para exercer o efeito. No mesmo estudo, o imipenem (antimicrobiano estável frente às β -lactamases) apresentou um comportamento tempo-dependente para ambos os tipos de biofilmes (HENGZHUANG *et al.*, 2013).

Apesar de amplamente empregados para a otimização posológica, os índices PK/PD possuem várias falhas uma vez que são valores estanques (fixos) que possibilitam a indicação da dose do antimicrobiano baseados no fato que se deve atingir um determinado valor estabelecido, p.e. $ASC_{0-24}/CIM > 125$. No entanto, a mesma dose total do antimicrobiano administrada em 24 horas pode ser subdividida em diversas doses diárias, mantendo a mesma ASC_{0-24} : 1 g q24h, 500 mg q12h ou 250 mg q6h. Todas essas posologias geram perfis de concentração/tempo distintos e, conseqüentemente, perfis bactericidas ou bacteriostáticos distintos, apesar de cumprirem o índice PK/PD estabelecido (DALLA COSTA & DERENDORF, 1996; NIELSEN & FRIBERG, 2013). Além disso, a CIM é um valor estimado após a incubação da bactéria na presença de uma concentração estática de antimicrobiano, não se tendo informações sobre o crescimento bacteriano na presença de concentrações flutuantes, uma vez que no organismo, a concentração de antimicrobiano não é constante (PRIETO, GASCÓN & ISLA, 2015). Sendo assim, CIM não é um bom parâmetro farmacodinâmico, pois não caracteriza as relações entre concentração flutuante na qual a bactéria é exposta e efeito (NIELSEN & FRIBERG, 2013). Desse modo, os índices PK/PD não permitem a descrição da curva de morte bacteriana por tempo resultante da utilização da posologia indicada, não sendo úteis para fazer previsões da relação temporal do efeito quando a posologias são alteradas.

Apenas a modelagem PK/PD permite a descrição temporal do efeito e previsão dos desfechos do tratamento investigado.

3. Modelagem PK/PD de antimicrobianos

A modelagem PK/PD pode ser definida como a descrição matemática que correlaciona efeito e tempo, ou seja, permite descrever e prever a variação do efeito de um fármaco relacionado com a variação da concentração do mesmo, em função do tempo (DERENDORF & HOCHHAUS, 1995).

Modelos PK/PD podem correlacionar experimentos *in vitro* e *in vivo* para definir uma relação entre a exposição (PK) e o efeito (PD) de um fármaco. Desse modo, facilitam a descrição e a previsão da relação efeito farmacológico/tempo de um fármaco em determinada situação patológica, resultante da posologia utilizada (DERENDORF & MEIBOHM, 1999; BARBOUR, SCALIONE & DERENDORF, 2010). No caso de antimicrobianos, parâmetros farmacocinéticos *in vivo* são usualmente determinados pelos perfis plasmáticos e teciduais do fármaco, enquanto parâmetros farmacodinâmicos *in vitro* são normalmente determinados através de curvas de morte bacteriana (*time-kill curves*) (BARBOUR, SCALIONE & DERENDORF, 2010).

O modelo farmacodinâmico tradicionalmente empregado na modelagem de antimicrobianos é o modelo de E_{max} -Sigmoidal, no qual o efeito do fármaco é descrito em relação à variação de concentração pela equação:

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (1)$$

onde E é o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo atingido por um determinado tratamento com o fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração do fármaco que produz 50% do efeito máximo; γ é o fator sigmoidal que define o formato da curvatura da curva concentração-efeito.

A concentração da bactéria (B) em função do tempo em um inóculo sem exposição ao antimicrobiano pode ser descrita pela equação:

$$\frac{dB}{dT} = K_{cres} \cdot B - K_{morte} \cdot B \quad (2)$$

onde o crescimento exponencial da bactéria é descrito como um resultado líquido da taxa de crescimento (K_{cres}) e a constante para a morte natural das células (K_{morte}). O efeito

antibacteriano pode ser incluído, seja para inibir a taxa de crescimento, seja para aumentar a taxa de morte bacteriana. Assim, incorporando-se o efeito do fármaco (Equação 1) na taxa de crescimento bacteriano (Equação 2), tem-se:

$$\frac{dB}{dT} = \left(K_{cres} - \frac{E_{max} \cdot C^{\gamma}}{EC_{50} \cdot C^{\gamma}} \right) \cdot B - \left(K_{morte} + \frac{E_{max} \cdot C^{\gamma}}{EC_{50} \cdot C^{\gamma}} \right) \quad (3)$$

Na Equação 3, C é substituído pela equação que descreve o perfil de concentração do fármaco no tecido infectado. Desse modo, a variação do tempo leva à variação tanto na concentração de fármaco na biofase quanto no número de bactérias presente no local de infecção (efeito), construindo-se assim o modelo PK/PD.

Uma vez que o modelo foi desenvolvido, baseado tanto nos dados de PK quanto nos dados de PD, ele pode ser utilizado, através de simulações computacionais, para explicar e prever diferentes cenários que não foram investigados experimentalmente. Modelagem e simulações PK/PD são uma importante ferramenta na escolha de regimes posológicos que resultem em um perfil concentração *versus* tempo que irá garantir a eficácia clínica, ou seja, permite comparar o efeito resultante de diferentes doses e intervalos de doses de maneira mais dinâmica e efetiva. Modelos PK/PD também podem ser utilizados para a individualização terapêutica e no desenvolvimento e melhoria de regimes posológicos para antimicrobianos (NIELSEN & FRIBERG, 2013).

Modelos PK/PD capazes de descrever a resistência bacteriana observada em células bacterianas planctônicas já foram descritos na literatura. Nielsen e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo semi-mecanístico no qual as bactérias foram subdivididas em suscetíveis e resistentes. Esta divisão foi proposta para corretamente descrever a diminuição na taxa de crescimento líquido e a diminuição do efeito antimicrobiano observado quando o sistema se aproxima da fase estacionária de crescimento. Com isso, as bactérias foram descritas como proliferativas e suscetíveis à ação do fármaco (S) e em repouso e resistentes ao fármaco (R) (Figura 7). O modelo foi capaz de descrever com sucesso a cinética de crescimento e morte de *Streptococcus pyogenes* quando exposto a concentrações estáticas de cinco agentes antimicrobianos de diferentes classes (benzilpenicilina, cefuroxima, eritromicina, moxifloxacino e vancomicina).

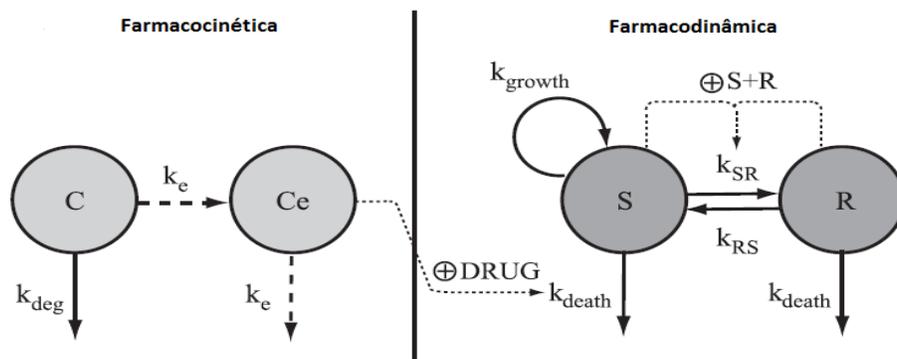


Figura 8. Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Nielsen e colaboradores. O modelo farmacocinético é de um compartimento (C) com eliminação de primeira ordem devido a degradação do fármaco (k_{deg}) e um compartimento de efeito (Ce) com uma constante de eliminação de primeira-ordem (k_e). O modelo farmacodinâmico inclui um compartimento proliferativo e suscetível à ação do fármaco (S) e um compartimento não-proliferativo e resistente ao fármaco (R). O sistema bacteriano é descrito com uma constante para a taxa de crescimento da bactéria no compartimento suscetível (k_{growth}), uma taxa para a morte natural das células bacterianas (k_{death}) em ambos os compartimentos, e taxas para a transferência entre compartimentos (k_{SR} e k_{RS}). O fármaco atua causando a morte das bactérias em S. O número total de bactérias presentes no sistema é representado pela soma dos números presentes nos compartimentos S e R. A concentração do antimicrobiano presente no compartimento de efeito é responsável por estimular a taxa de morte das bactérias no estágio suscetível (DRUG) (Retirado de NIELSEN *et al.*, 2007).

O modelo semi-mecanístico proposto por Nielsen e colaboradores foi posteriormente utilizado para descrever e prever dados advindos de experimentos *in vitro* com perfis concentração/tempo dinâmicos (NIELSEN *et al.*, 2011). O modelo foi capaz de corretamente caracterizar o crescimento e morte bacteriana quando estas eram expostas a concentrações dinâmicas com diferentes taxas de eliminação para os cinco antibióticos investigados. Além disso, demonstrou-se que o modelo com os parâmetros estimados com base nos experimentos estáticos foi capaz de prever a maioria das curvas de morte bacteriana provenientes do estudo com concentrações dinâmicas, indicando que o modelo pode limitar a necessidade de execução de experimentos *in vitro* mais trabalhosos, como os experimentos dinâmicos (NIELSEN *et al.*, 2011).

Mohamed e colaboradores (2012) desenvolveram um modelo PK/PD para a gentamicina e *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizando como base o modelo proposto por Nielsen e colaboradores (2007), no qual a resistência adaptativa observada para os aminoglicosídeos foi

corretamente descrita (Figura 8). No modelo proposto, foi adicionado a capacidade da gentamicina em estimular a resistência bacteriana adaptativa, diminuindo o efeito bactericida do fármaco. As bactérias foram novamente divididas em suscetíveis e resistentes e a troca de fenótipos proposta é unidirecional (sensível para resistente). O mesmo modelo estrutural foi posteriormente utilizado pelos mesmos autores para descrever as curvas de morte bacteriana de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e a resistência adaptativa observada para a colistina (MOHAMED, CARS & FRIBERG, 2014), demonstrando que modelos semi-mecanísticos são capazes de descrever corretamente dados de diferentes cepas bacterianas e antibióticos.

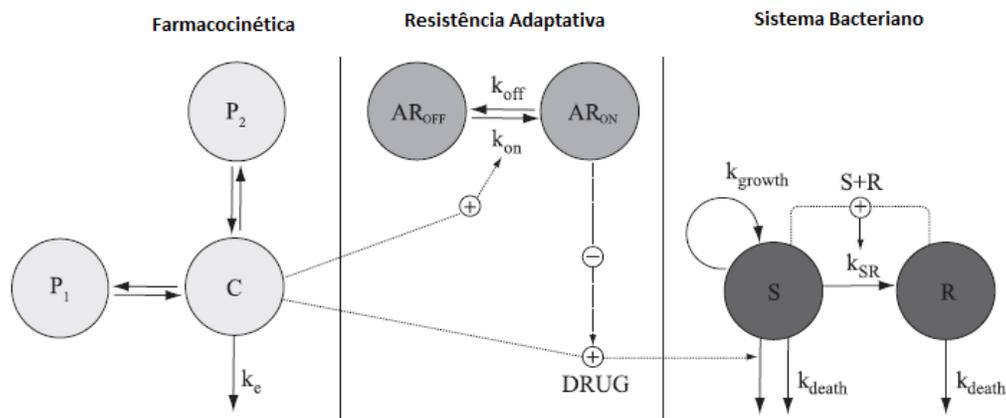


Figura 9. Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Mohamed e colaboradores. O modelo farmacocinético é de três compartimentos, onde o antimicrobiano é eliminado do compartimento central (C) com uma constante de eliminação de primeira-ordem (k_e) e possui dois compartimentos periféricos (P_1 e P_2). A bactéria encontra-se ou em um compartimento proliferativo e suscetível ao fármaco (S) ou em um compartimento não-proliferativo e resistente ao antimicrobiano (R). A bactéria se multiplica com uma constante de primeira-ordem no compartimento suscetível (k_{grow}) e em ambos compartimentos a bactéria é afetada por uma taxa de morte natural (k_{death}). O fármaco atua aumentando a velocidade de morte bacteriana de S. O modelo farmacodinâmico inclui um modelo de ligação com uma constante para o desenvolvimento (K_{on}) de resistência adaptativa (AR) o qual é estimulado pela concentração de gentamicina, e uma constante de retorno ao estado suscetível (k_{off}). A quantidade de bactéria expressando resistência adaptativa (AR_{on}) reduz o efeito bactericida da gentamicina (DRUG) (Retirado de MOHAMED *et al.*, 2012).

A estratégia empregada por Khan e colaboradores (2015) para corretamente descrever as curvas de morte bacteriana de diferentes cepas de *E. coli* expostas ao ciprofloxacino foi a inclusão de um compartimento para bactérias não-suscetíveis e não-formadoras de colônias

(Nc). Esse estágio não-formador de colônia ocorre devido à formação de filamentos quando a bactéria é exposta a concentrações próximas à CIM. Além disso, os autores foram capazes de corretamente descrever o recrescimento bacteriano observado nos experimentos através da inclusão de subpopulações pré-existentes com diferentes sensibilidades ao ciprofloxacino (Figura 9).

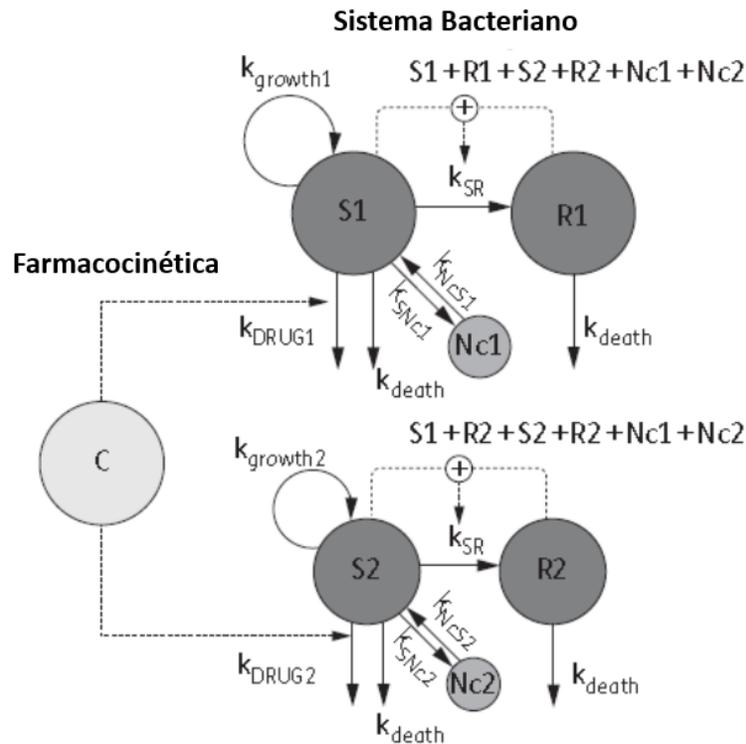


Figura 10. Ilustração esquemática do modelo PK/PD proposto por Khan e colaboradores. A bactéria encontra-se ou em um compartimento proliferativo e suscetível ao fármaco (S) ou em um compartimento não-proliferativo e resistente ao antimicrobiano (R) ou em um compartimento não-formador de colônia (Nc). O sistema bacteriano encontra-se dividido em 2 subpopulações, subpopulação 1 (S1, R1 e Nc1) e subpopulação 2, mais resistente ao fármaco (S2, R2, Nc2) (Retirado de KHAN *et al.*, 2015).

Modelos PK/PD para descrever o efeito de antimicrobianos na presença de biofilmes ainda não foram descritos na literatura. O desafio de construir estes modelos encontra-se no fato de ser necessário modelar resultados provenientes de duas formas bacterianas, planctônica e biofilme, que reagem diferentemente ao tratamento com o antimicrobiano. Modelos desenvolvidos para células planctônicas podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de um modelo PK/PD para biofilmes. As diferentes estratégias utilizadas para

descrever a resistência antimicrobiana de células planctônicas podem ser agrupadas a fim de abranger todos os mecanismos de resistência apresentados pelos biofilmes, e assim, ser capaz de descrever o efeito de antimicrobiano frente a biofilmes.

O desenvolvimento de um modelo PK/PD no qual a bactéria encontra-se tanto em sua forma planctônica quanto em biofilmes pode ser uma ferramenta extremamente útil, podendo responder questões que ainda permanecem em aberto em infecções com biofilmes como: i) a otimização de regimes posológicos de antimicrobianos para prevenir a resistência e formação de biofilme; ii) a previsão de alterações nas subpopulações bacterianas (sensíveis e resistentes) ao longo do tempo em função da concentração dos antimicrobianos; iii) o efeito da associação de fármacos para o tratamento da infecção com biofilme.

Para se desenvolver modelos PK/PD mais fidedignos para antimicrobianos e com maior capacidade preditiva é importante determinar as concentrações do fármaco atingidas no local da infecção (tecido infectado), uma vez que as concentrações plasmáticas podem não ser representativas das concentrações atingidas no tecido infectado. A microdiálise é uma ferramenta que permite a medida das concentrações livres do fármaco no local de ação, gerando perfis concentração *versus* tempo detalhados do fármaco de interesse no tecido alvo para correlacionar com a ação do mesmo (HAMMARLUND-UDENAES, 2007).

4. Microdiálise tecidual

Dentre as técnicas utilizadas para a determinação das concentrações teciduais de fármacos, a microdiálise (MD) possui a vantagem de medir seletivamente a fração livre, ou seja, a fração farmacologicamente ativa do fármaco no fluido intersticial, local que cerca as estruturas alvo do fármaco e, em alguns casos, pode ser considerado o sítio de ação destes compostos (MÜLLER, 2000). A técnica de MD consiste, basicamente, na implantação de uma pequena sonda no tecido a ser estudado, sendo esta continuamente irrigada com líquido de perfusão. Na porção terminal da sonda, a qual fica em contato direto com o órgão, situa-se uma membrana semi-permeável, que obedece aos princípios da difusão passiva e, devido à contínua irrigação da sonda com o líquido de perfusão, a condição *sink* é mantida constantemente (CHAURASIA, 2007). A membrana semi-permeável possui a função de filtro, permitindo apenas a passagens de moléculas menores que seu *cut off*. Com isso – e devido à diferença de gradientes de concentração – apenas substâncias com baixo peso molecular são difundidas

através da membrana, sendo recolhidas pelo líquido de perfusão e coletadas na outra extremidade da sonda (JOHANSEN, NEWMAN & MADDEN, 1997). Essa técnica permite, portanto, determinar as concentrações livres da substância sob investigação, uma vez que apenas a fração não ligada às proteínas poderá sofrer o processo de difusão passiva através da membrana semi-permeável.

Apenas uma fração do fármaco consegue ser capturada do tecido para o microdialisado durante a microdiálise. O tamanho dessa fração depende: i) do fluxo no qual o líquido de perfusão passa pela sonda (quanto menor o fluxo maior a fração recuperada); ii) do comprimento da membrana semi-permeável da sonda (quanto maior a membrana maior a recuperação); iii) das propriedades de distribuição do fármaco no tecido de interesse; iv) da temperatura. Por isso, se fazem necessários estudos para determinar a capacidade de recuperação da sonda para possibilitar a determinação da verdadeira concentração tecidual livre de um determinado fármaco (HAMMARLUND-UDENAES, 2007).

Usualmente assume-se que as concentrações livres do fármaco são as mesmas em todo o organismo quando se atinge o *steady-state*, ou seja, as concentrações plasmáticas livres são semelhantes as concentrações teciduais livres. Porém, estudos de microdiálise demonstraram que essa premissa nem sempre é verdadeira e discrepâncias podem ocorrer em tecidos que possuam alta densidade de transportadores de influxo e efluxo e zonas de oclusão, como o cérebro. Condições patológicas, como infecções, por exemplo, também podem alterar a relação tecido-sangue no que diz respeito às concentrações livres do fármaco (HAMMARLUND-UDENAES, 2007).

A microdiálise permite comparar a penetração de antimicrobianos em tecidos infectados e sadios, possibilitando investigar se o processo inflamatório que ocorre no local da infecção, associado à esta, altera a distribuição tecidual do fármaco. Em uma revisão realizada por Dhanani e colaboradores (2010), é relatado que em um estudo realizado com animais para o imipenem, não há diferença estatística para os parâmetros farmacocinéticos determinados no sangue, músculo e pulmão na presença de infecção pulmonar por *Acinetobacter baumannii*. No entanto, a mesma revisão mostra que concentrações variáveis de piperaciclina e tazobactam são encontradas em diferentes partes do pulmão de pacientes com pneumonia, demonstrando que o tecido infectado não é homogêneo e que a infecção pode alterar a penetração pulmonar de alguns antimicrobianos. Em nosso grupo de pesquisa, um estudo desenvolvido por Araújo e

colaboradores (2011) demonstrou uma redução em torno de 30% nos níveis intersticiais de piperacilina (PIP) livre em um modelo de miosite por *Escherichia coli*. O estudo concluiu que a infecção altera as relações entre as concentrações plasmáticas totais e as concentrações musculares livres de PIP, sendo necessário atribuir um fator de proporcionalidade para possibilitar que os dados plasmáticos fossem capazes de prever os níveis teciduais do fármaco em estudo.

Desse modo, a investigação da distribuição tecidual de antimicrobianos durante um processo infeccioso se faz necessária para cada fármaco, não sendo possível extrapolar resultados para a mesma classe terapêutica. Não há, até o momento, relato na literatura sobre a variação da penetração pulmonar de antimicrobianos, determinada por microdiálise, em infecções com formação de biofilme.

A parte experimental deste trabalho será apresentada a seguir, incluindo breve revisão sobre o tema, metodologia, discussão e conclusões, organizada na forma de três capítulos, sendo cada um correspondente a um artigo científico. Os capítulos tratam da validação de método analítico para a quantificação de CIP em plasma e microdialisado; investigação da penetração tecidual de CIP em pulmões de ratos saudáveis e infectados com desenvolvimento de um modelo populacional para a descrição dos dados; e o desenvolvimento de um modelo semi-mecanístico para a descrição do efeito do CIP frente à biofilmes de *P. aeruginosa* em experimentos de curvas de morte bacteriana, como indicado a seguir:

- **Capítulo 1:** *Validation of a Sensitive HPLC/Fluorescence Method for Assessment of Ciprofloxacin Levels in Plasma and Prostate Microdialysate Samples from Rats*. Esse artigo foi publicado na revista Biomedical Chromatography, 2015, DOI: 10.1002/bmc.3552.
- **Capítulo 2:** *Population Pharmacokinetic Modeling as a Tool to Characterize the Decrease in Ciprofloxacin free Interstitial Levels Caused by Pseudomonas aeruginosa Biofilm Pneumonia*.
- **Capítulo 3:** *Mechanism-based model for simultaneous assessment of the bactericidal effect of ciprofloxacin against Pseudomonas aeruginosa biofilms and planktonic cells*.

O Capítulo 1 é constituído por artigo que trata da validação do método analítico para quantificação do ciprofloxacino em diferentes matrizes (páginas 57-74):

Zimmermann ES, Torres BG, Dalla Costa. Validation of a Sensitive HPLC/Fluorescence Method for Assessment of Ciprofloxacin Levels in Plasma and Prostate Microdialysate Samples from Rats. *Biomedical Chromatography*, 2016 Mar;30(3):330-6. doi: 10.1002/bmc.3552.

O capítulo 2, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 77 – 112, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consta da validação de um modelo animal de infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme (ATCC 27853) e da avaliação da penetração pulmonar do ciprofloxacino, empregando a técnica de microdiálise, em animais sadios e infectados conforme o modelo animal validado. Um modelo farmacocinético populacional (popPK) foi desenvolvido para descrever os dados obtidos no estudo de penetração pulmonar.

O capítulo 3, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 115 – 137, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição dos experimentos *in vitro* de curvas de morte bacteriana desenvolvidos para avaliar o efeito do ciprofloxacino frente a biofilmes e células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os dados gerados nesses experimentos foram empregados para o desenvolvimento de um modelo PK/PD semi-mecanístico capaz de descrever o efeito do ciprofloxacino no biofilme e em células planctônicas, demonstrando uma menor eficácia do antimicrobiano quando empregado no tratamento de infecções com formação de biofilme.

DISCUSSÃO GERAL

O tratamento de infecções associadas a biofilmes é atualmente realizado de forma empírica e geralmente baseado em estudos realizados com bactérias na forma planctônica. Por possuírem características específicas e uma maior resistência aos antimicrobianos, o tratamento de infecções onde ocorre a formação de biofilmes é frequentemente ineficiente, levando a recidivas. O uso de metodologias científicas capazes de guiar a escolha de doses dos antimicrobianos tendo como base estudos realizados com bactérias em biofilmes é importante para maximizar o efeito dos fármacos e contribuir com o sucesso terapêutico.

Neste contexto, a proposta do presente trabalho foi o desenvolvimento de um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK/PD) visando aprimorar o conhecimento sobre o efeito de antimicrobianos em infecções associadas a biofilmes e contribuir cientificamente para otimização posológica nestas condições. Para tal, *Pseudomonas aeruginosa* e CIP foram escolhidos, respectivamente, como bactéria e fármaco modelos, devido a sua prevalência em infecções pulmonares com formação de biofilme e sua importância no tratamento das mesmas, principalmente em pacientes com fibrose cística. O modelo PK/PD proposto consiste na descrição matemática de dados obtidos de experimentos *in vivo*, para obtenção de parâmetros farmacocinéticos, e experimentos *in vitro*, para obtenção dos parâmetros farmacodinâmicos.

Para a realização dos experimentos farmacocinéticos, inicialmente foi necessário desenvolver e validar metodologias analíticas capazes de quantificar CIP em amostras de plasma e microdialisado tecidual de ratos. As amostras foram analisadas por CLAE com detecção por fluorescência e o método desenvolvido foi validado de acordo com guias internacionais de validação de métodos analíticos para amostras biológicas conforme descrito no Capítulo 1. O método validado foi simples e rápido: as amostras de microdialisado foram analisadas sem a necessidade de processamento prévio e as amostras plasmáticas foram processadas em apenas uma etapa, por precipitação de proteínas. O método apresentou sensibilidade suficiente para quantificar CIP em amostras de plasma e microdialisado tecidual por até 12 horas após a administração do fármaco a ratos, caracterizando adequadamente os perfis concentração por tempo plasmáticos e teciduais.

O sucesso dos tratamentos antimicrobianos é determinado, em parte, pelas concentrações do fármaco que atingem o tecido infectado, uma vez que a exposição a concentrações subinibitórias não conduzem à erradicação bacteriana, propiciando o surgimento de resistência e outros mecanismos de virulência bacteriana, como a formação de biofilme. As concentrações plasmáticas de antimicrobianos podem não ser representativas das concentrações teciduais do fármaco, discrepâncias podem ocorrer devido a presença de transportadores de influxo e efluxo e devido a características físico-químicas do fármaco, que permitem que fenômenos como *ion trapping* ocorram. Somado a isso, tecidos infectados podem ter a penetração de antimicrobianos modificada devido às alterações teciduais resultantes do processo infeccioso e inflamatório, como redução de pH, aumento de temperatura e permeabilidade capilar, aumento do fluxo sanguíneo e presença de células imunes.

Nesse contexto, para um modelo PK/PD possuir uma boa capacidade preditiva, o conhecimento das concentrações dos antimicrobianos alcançadas no tecido infectado é fundamental. Como o projeto objetivava determinar as concentrações pulmonares de CIP visando investigar uma condição semelhante ao que ocorre em pacientes fibrocísticos foi necessário estabelecer um modelo animal de infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, cuja descrição e validação encontram-se no Capítulo 2. No modelo utilizado, células planctônicas de *P. aeruginosa* foram imobilizadas em *beads* de alginato, representando um biofilme artificial. Os animais infectados com os *beads* de alginato mantiveram a infecção por pelo menos 14 dias após a inoculação intratraqueal dos *beads*, caracterizando assim uma infecção crônica e indicando o êxito do modelo adotado.

Após o estabelecimento de um modelo animal de infecção pulmonar crônica, capaz de gerar alterações pulmonares semelhantes às encontradas em pacientes com fibrose cística, a farmacocinética plasmática e pulmonar do CIP em ratos Wistar sadios e infectados foi avaliada empregando-se a técnica de microdiálise (Capítulo 2). Quando analisados os perfis concentração por tempo plasmáticos, animais sadios e infectados diferiram principalmente na eliminação do CIP, com redução significativa do *clearance* e constante de velocidade de eliminação ($\alpha = 0,05$). Conseqüentemente, animais infectados apresentaram uma exposição aumentada ao fármaco (maior ASC). Apesar desta maior

exposição plasmática, animais infectados com *P. aeruginosa* formadora de biofilmes tiveram uma menor exposição pulmonar ao CIP quando comparados com animais saudáveis. A penetração pulmonar nos ratos saudáveis ($fT = 1.69$) foi reduzida em aproximadamente 4 vezes nos ratos infectados ($fT = 0.44$). A avaliação do grupo que recebeu apenas os *beads* de alginato controle (sem bactéria) permitiu determinar que as alterações de penetração pulmonar observadas são devidas à presença de *P. aeruginosa* e não aos *beads* de alginato utilizados para imobilizar a bactéria

Um modelo farmacocinético populacional foi desenvolvido para descrever simultaneamente as concentrações plasmáticas totais de CIP e as concentrações livres pulmonares observadas em ratos saudáveis e infectados (Capítulo 2). Os dados plasmáticos foram adequadamente descritos com um modelo de 3 compartimentos com eliminação de primeira ordem. Quando o modelo foi expandido para descrever os dados pulmonares, o compartimento central foi dividido em compartimento venoso e arterial para explicar os níveis elevados de CIP obtidos primeiramente nos pulmões. O modelo final desenvolvido possui o compartimento central dividido em venoso e arterial, dois compartimentos que representam regiões distintas dos pulmões e dois compartimentos periféricos de distribuição, representando outros tecidos que não os pulmões. Do mesmo modo que a análise não-compartimental, uma redução em torno de 32% foi observada no valor estimado para o *clearance* sistêmico (CL) dos animais infectados. Além de diferenças de *clearance* sistêmico, animais infectados apresentam diferenças significativas no *clearance* intercompartimental entre os dois compartimentos pulmonares e no volume do segundo compartimento pulmonar. Tais diferenças somadas à adição de um *clearance* pulmonar para os animais infectados foram capazes de explicar e descrever a menor exposição pulmonar nesses animais. Esses resultados reafirmam a ideia de que, para alguns fármacos, as concentrações plasmáticas não são boas substitutas das concentrações livres teciduais e a otimização de posologias feita através dos níveis plasmáticos são inadequadas.

O modelo farmacocinético populacional desenvolvido possibilita a simulação de diferentes regimes posológicos e a previsão das concentrações livres pulmonares do CIP, tanto para tecidos saudáveis como infectados. O modelo pode, desse modo, ser utilizado para guiar a escolha de doses que atinjam

concentrações livres pulmonares efetivas, evitando expor as bactérias a concentrações subinibitórias que podem levar ao desenvolvimento de resistência.

Na etapa farmacodinâmica do projeto avaliou-se as curvas de morte bacteriana de *P. aeruginosa* na forma de biofilmes e de células planctônicas frente à exposição a diferentes concentrações do CIP (Capítulo 3). Para tal, biofilmes homogêneos de *P. aeruginosa* foram pré-formados na superfície de blocos de acrílico e estes colocados em um frasco de cultura contendo caldo com concentrações constantes de CIP. Alíquotas de caldo, contendo células planctônicas e um bloco com biofilme eram amostrados em tempos pré-determinados e, após processamento e plaqueamento, a carga bacteriana determinada. Os dados farmacodinâmicos (*time-kill curves*) foram modelados empregando-se uma abordagem semi-mecanística para descrever o efeito bactericida do CIP tanto no biofilme quanto nas células planctônicas liberadas por estes no meio de cultura.

O modelo desenvolvido inclui compartimentos para bactérias sensíveis e proliferativas e para bactérias em estágio de latência, divididas em tipo celular, biofilme ou planctônicas. A presença de uma subpopulação pré-existente com menor suscetibilidade ao CIP foi incorporada ao modelo. A estrutura do modelo permite a transferência de células do biofilme para a forma planctônica e vice-versa e foi capaz de descrever com sucesso as curvas de morte bacteriana de ambos os estilos de vida. O efeito do CIP foi descrito empregando-se o modelo de $E_{máx}$ sigmoidal. Conforme esperado, os parâmetros obtidos para o biofilme demonstram uma maior resistência ao CIP, com valores de $E_{máx}$, indicativos da eficácia do tratamento, inferiores aos estimados para células planctônicas, e valores de EC_{50} , indicativos de potência, maiores, sugerindo que o CIP possui um menor efeito nos biofilmes e que maiores concentrações são necessárias para exercer seu efeito quando comparado com células planctônicas.

A proposta do presente trabalho de desenvolver um modelo PK/PD para o estilo de vida bacteriano de biofilmes é uma abordagem ainda inédita na literatura. O modelo popPK desenvolvido é o primeiro modelo capaz de caracterizar alterações na exposição sistêmica e pulmonar de um antimicrobiano, o ciprofloxacino, ocorridas devido à uma infecção associada a biofilmes. Igualmente, o modelo farmacodinâmico desenvolvido é o primeiro

modelo capaz, através de uma abordagem semi-mecanística, de descrever os diferentes mecanismos de resistência apresentados pelos biofilmes, além de permitir a descrição simultânea da eficácia e potência de um antimicrobiano para ambos estilos de vida bacterianos (planctônico e biofilme). Os modelos desenvolvidos podem servir como base para o desenvolvimento de novos modelos PK/PD para descrever diferentes combinações de fármacos e espécies bacterianas e assim permitir que o tratamento de infecções associadas a biofilmes não seja mais realizado de forma empírica, contribuindo para o seu sucesso terapêutico.

CONCLUSÕES

- A metodologia analítica validada mostrou-se adequada para a quantificação do CIP em plasma e microdialisado de ratos sadios e infectados, podendo ser utilizada em estudos de farmacocinética plasmática e tecidual deste antimicrobiano;
- O modelo animal de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* ATCC 27853 impregnada em *beads* de alginato empregado no presente trabalho foi capaz de manter a infecção por pelo menos 14 dias, caracterizando-se uma infecção crônica semelhante ao observado em portadores de fibrose cística, podendo ser empregado para a avaliar a influência da infecção com formação de biofilme na penetração pulmonar de antimicrobianos;
- Os estudos de farmacocinética demonstraram que a infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* altera a exposição tecidual e sistêmica do CIP de modos opostos, aumentando a exposição sistêmica e diminuindo a tecidual, evidenciando que, nesse caso, concentrações plasmáticas não são boas substitutas das concentrações pulmonares livres;
- O modelo farmacocinético populacional desenvolvido foi capaz de simultaneamente descrever os dados plasmáticos e pulmonares do CIP, além de incluir as diferenças farmacocinéticas observadas em animais sadios e infectados, podendo ser empregado para a simulação de perfis concentração por tempo em ambas as situações;
- O sistema farmacodinâmico *in vitro* proposto no presente trabalho, no qual biofilmes de *P. aeruginosa* foram pré-formados em blocos de acrílico, mostrou-se adequado para avaliar simultaneamente o efeito de concentrações constantes de CIP contra bactérias de ambos estilos de vida;
- O modelo semi-mecanístico utilizado para descrever as curvas de morte bacteriana em função do tempo foi desenvolvido incorporando

características específicas dos biofilmes e mostrou-se adequado para a comparação de parâmetros de efeito ($E_{máx}$ e EC_{50}) entre os dois estilos de vida bacteriano (biofilme e planctônico).

REFERÊNCIAS GERAIS

ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MER, M.; ALAEI, Y. A. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, p. 196-200, 2006.

ALHEDE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Mechanisms of Immune Evasion. **Advances in Applied Microbiology**. v. 86, p. 1-40, 2014.

ARAÚJO, B. V. et al. PK-PD modeling of β -lactam antibiotics: *In vitro* or *in vivo* models? **The Journal of Antibiotics**. v. 64, p. 439–446, 2011.

BALAJI, K.; THENMOZHI, R.; PADIAN, S. K. Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. **Indian J. Med. Res.** v. 137, p. 963-971, 2013.

BARBOUR, A.; SCALIONE, F.; DERENDORF, H. Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, p. 431-438, 2010.

BELOIN, C. et al. Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 18, p. 61–68, 2014.

BREYERS, J. D. Medical Biofilms. **Biotech and Bioeng.** v. 100, p. 1-18, 2008.

BURGESS, D. S.; HALL, R. G. Simulated Comparison of the pharmacodynamics of Ciprofloxacin and Levofloxacin Against *Pseudomonas aeruginosa* Using Pharmacokinetic Data from Healthy Volunteers and 2002 Minimum Inhibitory Concentration Data. **ClinTher**, v. 29, n.7, p. 1421-1427, 2007.

CATALDI, M. et al. Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 28, p. 98-108, 2014.

CERI, H. et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **J ClinMicrobiol**, v. 37, p. 1771-1776, 1999.

CHAURASIA, C. S. et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, 2007.

CIOFU, O. et al. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Article in press, 2014.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H.; AUIC- General target for the optimization of dosing regimens of antibiotics? **Annals Pharmacother**, v. 80, p. 1024-1028, 1996.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 64, p. 847-867, 2000.

DAVIES, D. G.; GEESEY, G. G. Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. **Applied and environmental microbiology**. v. 61, p. 860-867, 1995.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 2, p. 114-122, 2003.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; Page RC. The microbial challenge in periodontitis. **Periodont 2000**, v. 14, p. 12-32, 1997.

DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G. **Pharmacokinetics Pharmacodynamics Correlation**. Boca raton: CRC Press, 1995.

DERENDORF, H.; MEIBOHM, B. Modeling of Pharmacokinetic / Pharmacodynamic (PK/PD) relationships: Concepts and perspectives. *Pharma Research*, v. 16, n.2, p. 176-185, 1999.

DHANANI, J. et al. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, p. 491-500, 2010.
efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*. v.90, p. 73–78, 2013.

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

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FONSECA, A. P.; SOUSA, J. C. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, p. 236-241, 2007.

GRISTINA, A. G. et al. The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. **Semin Arthroplasty**, v. 5, p. 160-170, 1994.

GROWCOTT, E. J. et al. Characterisation of a refined rat model of respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of ciprofloxacin. **Journal of Cystic Fibrosis**. v.10, p. 166–174, 2011.

HAMMARLUND-UDENAES, M. Microdialysis for characterization of PK/PD relationships. **Handbook of Microdialysis**. v. 16, p. 589-599, 2007.

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

HENGZHUANG, W. et al. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Colistin and Imipenem on Mucoïd and Nonmucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 55, p. 4469–4474, 2011.

HENGZHUANG, W. et al. *In Vivo* Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Colistin and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** p. 2683–2690, 2012.

HENGZHUANG, W. et al. High β -Lactamase Levels Change the Pharmacodynamics of β -Lactam Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 57, p. 196–204, 2013.

HOFFMANN, N. Animal models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. **Drug Discov Today Dis Models**, v.4, n.3, p. 99-104, 2007.

HØIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. **Microbes Infect**, v. 3, p. 23-25, 2001.

HYDE, J. A.; DAROUICHE, R. O.; COSTERTON, J. W. Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. **J Heart Valve Dis**, v. 7, p. 313-315, 1998.

ISLAM, M. S. et al. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. **Expert. Rev. Anti Infect. Ther.** v.10, p. 1055–1066, 2012.

JOHANSEN, M. J.; NEWMAN, R. A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetic and pharmacodynamic. **Pharmacother.**, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.

KAPLAN, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs.* v. 34, p. 737-751, 2011.

KERKSIEK, K. A life in slime-biofilms rule the world. **Infec. Res.** (Perspectives), 2008.

KHAN, D.D. et al. A mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model allows prediction of antibiotic killing from MIC values for WT and mutants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 70, p. 3051-3060, 2015.

KUMAR, L. et al. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Fitoterapia.** v.90, p. 73-78, 2013.

LEBEAUX, D. et al. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**. v. 2, p. 288-356, 2013.

LEWIS, K. Persister Cells: Molecular Mechanisms Related to Antibiotic Tolerance. Antibiotic Resistance, **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012.

LIU, P. et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Activity of Cefpodoxime and cefixime in *in vitro* Kinetic Models. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 120 – 129, 2005.

MAH, T. F. Biofilm- Specific Antibiotic Resistance. **Future Microbiol.** v.7, p. 1061–1072, 2012.

MOHAMED, A. F. et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 179–188, 2012.

MOHAMED, A.T.; CARS, O.; FRIBERG, L.E. A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. **J Antimicrob Chemother.** v.69, p.1350–1361, 2014.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; McLEAN, R. J. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. **World J Urol**, v. 17, p. 345-350, 1999.

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

MYSKA, K.; CZACZIK, K. Bacterial Biofilms on food contact surfaces – a Review. **Pol. J. Food Nutr. Sci.** v. 61, p. 173-180, 2011.

NIELSEN, E. I. et al. Semimechanistic Pharmacokinetic / Pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n.1, p. 128-136, 2007.

NIELSEN, E. I.; CARS, O.; FRIBERG, L. E. Predicting *In Vitro* Antibacterial Efficacy across Experimental Designs with a Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n.4, p. 1571-1579, 2011.

NIELSEN, E. I.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Drugs. **Pharmacol. Rev.** v. 65, p. 1053–1090, 2013.

NOREDDIN, A. M.; ELKHATIB, W. F. Novel *in vitro* pharmacodynamic model simulating ofloxacin pharmacokinetics in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated infections. **J Infect Public Health**, v.2, p. 120-128, 2009.

- O'TOOLE, G. A. A resistance switch. **Nature**. v. 416, p. 695, 2002.
- OLIPHANT, C. M.; GREEN, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. **Clinical Pharmacology**. v. 65, p. 455-464, 2002.
- PAPICH, M. G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. **Veterinary Microbiology**. v. 171, p. 480-486, 2014.
- PARRA-RUIZ, J. et al. Activities of High-Dose Daptomycin, Vancomycin, and Moxifloxacin Alone or in Combination with Clarithromycin or Rifampin in a Novel *In Vitro* Model of *Staphylococcus aureus* Biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 4329 – 4334, 2010.
- PRESTON. C. A. K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms are more susceptible to ciprofloxacin than to tobramycin. **Int J Antimicrob Agents**, v. 7, p. 251-256, 1996.
- PRIETO, E. A.; GASCÓN, A. R.; ISLA, A. Applications of the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. **J. Infect. Chemother.** v.21, p. 319-329, 2015.
- RATJEM, F. A. Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Future Treatment Strategies. **Respiratory Care**. v. 54, p. 595- 605, 2009.
- SAINI, H. et al. Azithromycin and ciprofloxacin: A possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Article in press, 2015.
- SAWHNEY, R.; BERRY, V. Bacterial Biofilm Formation, Pathogenicity, Diagnostics and Control: An Overview. **Indian J. Med. Sci.** v. 63, p. 313-321, 2009.
- SCHUCK, E. L. et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) evaluation of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. **Infection**, v.33, p. 22-28, 2005.
- SINGH, P. K. et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, p. 762-762, 2000.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 56, p. 187–209, 2002.
- STRAUSBAUGH, S. D.; DAVIS, P. B. Cystic Fibrosis: A Review of Epidemiology and Pathobiology. **Clin. Chest. Med.** v.28, p. 279–288, 2007.

STWEART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews**, v. 6, p. 199-210, 2008.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**. v.9, p. 222-227, 2001.

TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal of Biotechnology**. v.191, p. 121–130, 2014.

THOMAS, L. D.; CRIPPS, A. W.; KID, J. M. Immune response mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* associated with mucosal immunization with protein antigens in a rat model of acute lung infection. **Vaccine**, v.27, p. 3324-3330, 2009.

TRÉ-HARDY, M. et al. Evaluation of long-term co-administration of tobramycin and clarithromycin in a mature biofilm model of cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicro Agents**, v.34, p. 370-374, 2009.

TSENG, B. S. et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. **Environmental Microbiology**. v.15, p. 2865–2878, 2013.

VASUDEVAN, R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. **J. Microbiol. Exp.** v. 1, p. 1-16, 2014.

VELKOV, T. et al. PK/PD models in antibacterial development. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, p. 573-579, 2013.

WILLIAMS, I. et al. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 143, p. 2407-2413, 1997.

YAN, P. et al. Pathogenic effects of biofilm with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in rats. **J Nanjing Med Univer**, v.22, n.1, p. 34-38, 2008.

ANEXOS

PARECER COMITÊ DE ÉTICA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 24140

Título: DESENVOLVIMENTO DE MODELO FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÂMICO (PK/PD) PARA O ANTIMICROBIANO FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/09/2012
ALEXANDRE JOSE MACEDO - pesquisador desde 01/09/2012
Bruna Gaelzer Silva Torres - Aluno de Doutorado desde 01/09/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/02/2013 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 140 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 27 de Fevereiro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

LAUDOS NECRÓPSIA ANIMAIS INFECTADOS



Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Faculdade de Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária



Resultado de Exame de Necropsia

N-0690-16

<u>Espécie:</u> <i>Rattus norvegicus</i>	<u>Requisitante:</u> Bruna Goelzers Silva Torres
<u>Identificação:</u> Infectado 1	<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.
<u>Sexo:</u> Machos	<u>E-mail:</u> bru_s_torres@hotmail.com
<u>Idade:</u> 60 dias	<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646
<u>Proprietário:</u> Bruna Goelzers Silva Torres	<u>Plantonista:</u> Marina e Fernando Soares.
<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646	<u>Data da morte:</u> 26/07/2016
<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.	<u>Data da necropsia:</u> 26/07/2016
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: **Exame interno:** **cavidade torácica:** pulmões: áreas multifocais com pontos enegrecidos e áreas focais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: **Pulmão:** nas secções avaliadas foi observado multifocalmente infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de neutrófilos íntegros e degenerados por vezes no interior de brônquios e bronquíolos. Observou-se ainda, congestão multifocal moderada e espessamento de septos alveolares, além de áreas multifocais com enfisema e (formação de bordas em clava). Visualiza-se ainda, algumas áreas com centro apresentando material eosinofílico amorfo envolto por intenso infiltrado de neutrófilos degenerados. **Fígado:** congestão multifocal discreta. **Cerebelo:** hemorragia focalmente extensa nas leptomeninges. **Rim, baço, coração, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Broncopneumonia piogranulomatosa.

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Resultado de Exame de Necropsia

N-691-16

Espécie: *Rattus norvegicus*

Identificação: Infectado 2

Sexo: Machos

Idade: 60 dias

Proprietário: Bruna Goelzers Silva Torres

Telefone: (51) 8127-1646

Endereço: Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.

Requisitante: Bruna Goelzers Silva Torres

Endereço: Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.

E-mail: brunatorres@hotmail.com

Telefone: (51) 8127-1646

Plantonista: Marina e Fernando Soares.

Data da morte: 26/07/2016

Data da necropsia: 26/07/2016

Material coletado: órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: Exame interno: **cavidade torácica:** pulmões: áreas multifocais com pontos enegrecidos e áreas focais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: **Pulmão:** nas seções avaliadas foi observado multifocalmente infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos íntegros e degenerados por vezes no interior de brônquios e bronquíolos e em menor número por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Observou-se ainda congestão multifocal moderada e espessamento de septos alveolares, além de áreas multifocais com enfisema acentuado (formação de bordas em clava) e hemorragia discreta. **Fígado:** congestão multifocal discreta. **Rim, baço, coração, esôfago, estômago, cerebelo, músculo esquelético, intestino delgado e grosso:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: **Broncopneumonia piogranulomatosa.**

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Resultado de Exame de Necropsia

N-0692-16

<u>Espécie:</u> <i>Rattus norvegicus</i>	<u>Requisitante:</u> Bruna Goelzers Silva Torres
<u>Identificação:</u> Infectado 3	<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.
<u>Sexo:</u> Machos	<u>E-mail:</u> brunatorres@hotmail.com
<u>Idade:</u> 60 dias	<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646
<u>Proprietário:</u> Bruna Goelzers Silva Torres	<u>Plantonista:</u> Marina e Fernando Soares.
<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646	<u>Data da morte:</u> 26/07/2016
<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.	<u>Data da necropsia:</u> 26/07/2016
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: **Exame interno:** **cavidade torácica:** **pulmões:** áreas multifocais com pontos enegrecidos e áreas focais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: **Pulmão:** nas secções avaliadas foi observado multifocalmente infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos íntegros e degenerados por vezes no interior de brônquios e bronquíolos e em menor número por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, observou-se ainda congestão multifocal moderada e espessamento de septos alveolares, além de áreas multifocais com enfisema (formação de bordas em clava) e hemorragia. **Cerebelo:** hemorragia focalmente extensa nas leptomeninges. **Fígado, rim e baço:** congestão multifocal moderada. **Intestino delgado e grosso, cérebro, linfonodo e estômago:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Broncopneumonia piogranulomatosa.

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

LAUDOS NECRÓPSIA ANIMAIS *BEADS BRANCOS*



Faculdade de Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária



Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Resultado de Exame de Necropsia

N-0693-16

<u>Espécie:</u> <i>Rattus norvegicus</i>	<u>Requisitante:</u> Bruna Goelzers Silva Torres
<u>Identificação:</u> Bead Branco 1	<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.
<u>Sexo:</u> Machos	<u>E-mail:</u> bru_s_torres@hotmail.com
<u>Idade:</u> 60 dias	<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646
<u>Proprietário:</u> Bruna Goelzers Silva Torres	<u>Plantonista:</u> Marina e Fernando Soares.
<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646	<u>Data da morte:</u> 26/07/2016
<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.	<u>Data da necropsia:</u> 26/07/2016
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: **Exame interno:** **cavidade torácica:** pulmões: áreas multifocais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: **Pulmão:** nas secções analisadas observou-se congestão e hemorragia difusa acentuada, áreas com edema intra-alveolar e enfisema multifocal moderado com formação de bordas em clava. Há ainda discreta hiperplasia de BALT. **Cérebro e cerebelo:** hemorragia multifocal discreta em leptomeninges. **Fígado, baço, intestino grosso e delgado, estômago, pâncreas, coração, adrenal e rim:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Hemorragia pulmonar de causa não determinada.

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Resultado de Exame de Necropsia

N-0694-16

<u>Espécie:</u> <i>Rattus norvegicus</i>	<u>Requisitante:</u> Bruna Goelzers Silva Torres
<u>Identificação:</u> Bead Branco 2	<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.
<u>Sexo:</u> Machos	<u>E-mail:</u> bru_s_torres@hotmail.com
<u>Idade:</u> 60 dias	<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646
<u>Proprietário:</u> Bruna Goelzers Silva Torres	<u>Plantonista:</u> Marina e Fernando Soares.
<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646	<u>Data da morte:</u> 26/07/2016
<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.	<u>Data da necropsia:</u> 26/07/2016
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: **Exame interno:** **cavidade torácica:** **pulmões:** áreas multifocais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: **Pulmão:** nas secções analisadas observou-se congestão e hemorragia difusa acentuadas, áreas com edema intra-alveolar e enfisema multifocal moderado com formação de bordas em clava. **Fígado, baço e coração:** congestão multifocal discreta. **Encéfalo, intestino grosso e delgado, estômago, traquéia, esôfago e pâncreas:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Hemorragia pulmonar de causa não determinada.

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

Porto Alegre, 08 de agosto de 2016.

Resultado de Exame de Necropsia

N-695-16

<u>Espécie:</u> <i>Rattus norvegicus</i>	<u>Requisitante:</u> Bruna Goelzers Silva Torres
<u>Identificação:</u> Bead Branco 3	<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.
<u>Sexo:</u> Machos	<u>E-mail:</u> bru_s_torres@hotmail.com
<u>Idade:</u> 60 dias	<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646
<u>Proprietário:</u> Bruna Goelzers Silva Torres	<u>Plantonista:</u> Marina e Fernando Soares.
<u>Telefone:</u> (51) 8127-1646	<u>Data da morte:</u> 26/07/2016
<u>Endereço:</u> Avenida Ipiranga 2752, primeiro andar.	<u>Data da necropsia:</u> 26/07/2016
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Não informado.

Exame Macroscópico: Exame interno: cavidade torácica: pulmões: áreas multifocais com hemorragias puntiformes. Demais órgãos sem alterações.

Exame Microscópico: Pulmão: na secções analisadas observou-se congestão e hemorragia multifocal moderada, áreas com edema intra-alveolar e enfisema multifocal moderado com formação de bordas em clava. Visualiza-se também discreta hiperplasia de BALT. **Encéfalo, fígado, baço, esôfago, traqueia, intestino grosso e delgado, pâncreas e coração:** sem alterações microscópicas.

Diagnóstico: Hemorragia pulmonar de causa não determinada.

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

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

AUTORIZAÇÃO REPRODUÇÃO IMPRESSA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY

11/08/2016

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 11, 2016

This Agreement between Bruna Torres ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3926020331946
License date	Aug 11, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Biomedical Chromatography
Licensed Content Title	Validation of a sensitive HPLC/fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats
Licensed Content Author	Estevan Sonogo Zimmermann, Bruna Gaelzer Silva Torres, Teresa Dalla Costa
Licensed Content Date	Aug 31, 2015
Licensed Content Pages	7
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Model to Characterize Ciprofloxacin Effect in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infection
Expected completion date	Aug 2016
Expected size (number of pages)	160
Requestor Location	Bruna Torres Av Ipiranga 2752 Porto Alegre, 90610-000 Brazil Attn: Bruna Torres
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice