

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

**Avaliação por microdiálise das concentrações livres
pulmonares intersticiais e brônquicas de ciprofloxacino em
ratos Wistar sadios e infectados com diferentes cepas de
Pseudomonas aeruginosa formadoras de biofilme**

GRAZIELA DE ARAÚJO LOCK

PORTO ALEGRE, 2018

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

**Avaliação por microdiálise das concentrações livres
pulmonares intersticiais e brônquicas de ciprofloxacino em
ratos Wistar saudáveis e infectados com diferentes cepas de
Pseudomonas aeruginosa formadoras de biofilme**

Dissertação apresentada por **Graziela
de Araújo Lock** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa Dra. Teresa Dalla Costa
Co-orientadora: Dra. Bruna Gaelzer Silva Torres

PORTO ALEGRE, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Bibiana Verlindo de Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Danielle da Silva Trentin
Universidade Federal das Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr Estevan Sonogo Zimmermann
Universidade Federal de Santa Maria

CIP - Catalogação na Publicação

Lock, Graziela de Araújo
Avaliação por microdiálise das concentrações livres pulmonares intersticiais e brônquicas de ciprofloxacino em ratos Wistar sadios e infectados com diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biofilme / Graziela de Araújo Lock. -- 2018.
92 f.
Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.

Coorientador: Bruna Gaelzer Silva Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Ciprofloxacino. 2. Microdiálise brônquica. 3. Microdiálise pulmonar. 4. Infecção pulmonar aguda e crônica. 5. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Torres, Bruna Gaelzer Silva, 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 Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) e no Laboratório 405 da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES.

“A mente que se abre para uma idéia, jamais retorna ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A vida deve ser leve, diante de todas as turbulências que trazer. É necessário muitas vezes paciência com o imutável e sabedoria para lidar com as mudanças. Frases que foram meus mantras, sem saber. Nesses dois anos, percebi que nossa vontade de trabalhar tem que ser grande o suficiente para enxergar longe e tentar fazer o impossível diante daquela fase desafiadora em que tudo para. A persistência tem que ser nossa força motriz. Mesmo que implique em cinco horas tentando resolver um problema. Mesmo que seja para aprendermos que existe um limite tênue entre a persistência e a hora certa de mudar: às vezes as mesmas cinco horas te ensinam que você poderia ter substituído uma simples peça.

Depois de tanto tempo como IC, o mais difícil é motivar a nós mesmos. É nos questionarmos na segunda-feira as 07:00 “por quê ir ao laboratório se nada dá certo!” E pacientemente ir, porque dormir não resolve nada. Cada dia é um dia. O principal? Os problemas diminuem substancialmente de tamanho na presença de amigos PKs: a vida fica mais leve. É entre amigos é que aprendemos a questionar, a melhorar, a ouvir e a construir conhecimento. Quando percebemos, os equipamentos funcionam, temos reagentes, o furacão apazigua e as sondas chegam via alfândega - com emoção -, e você descobre as diversas maneiras pelas quais os pacotes podem acabar sendo entregues em outros prédios da UFRGS.

Comprovei que a lei do retorno existe. A cada dia um amigo me trouxe um sorriso, um apoio, um bolo, outro bolo (maçã?), uma conversa, uma consultoria, uma crítica, um artigo, uma Lancheria do Parque. Um mate, um pouso, uma hora da bolacha, um parque, uma ajuda, um sono. Uma, duas, três madrugadas, muitos Mc Donald's, Sópizzas, Subway, queijo-quente, café, batatas, horas da coxinha e cachorros do bigode (acaba por aqui a propaganda). Um especial agradecimento a um quarteto fantástico que muito arranhou portunhol. Ganhei amigos de muitos andares, alguns de fora da faculdade embora também a serviço dela, e todas as vezes que precisei, fosse qualquer dia, sempre foram um motivo a mais para ter vontade de trabalhar. Desfiz amizades que o tempo há de trazer de volta, refiz vínculos, alguns em processo. A todos vocês, obrigada pela companhia.

Para aquelas horas, em que precisei urgentemente de uma opinião, discutir técnicas e resultados, seja para uma consultoria rápida, via e-mails gigantescos (confusos até eu diria), via celular ou Skype, uma amiga me mostrou que uma vez PK, sempre PK. Embora não tivéssemos trabalhado juntas quando eu era IC, eu sabia o quanto ela era genial. Trabalhar com ela me fez pensar o quanto certas pessoas aparecem na vida da gente por algum motivo. Até hoje ela me faz pensar: “Poxa, que

bom que quando mal nos conhecíamos caprichei na personalização do presente”. À minha co-orientadora, obrigada pela distância não ser um problema, pela disposição de ajuda a qualquer fuso-horário, e pela inspiração com o trabalho com os biofilmes.

Às vezes, o nosso pensamento parece um grande fio de linha, todo embaraçado. Conheci uma pessoa que consegue pacientemente enrolar toda a linha bonitinha e mostrar que está tudo certo, ou onde está errado. Com um jeito ímpar de dizer que vai ficar tudo bem. De traduzir o que dizemos (qualquer “idioma”), e ensinar o quão importante é termos foco, e alinhar o raciocínio (confesso, que nesse caso dei trabalho). Que a informação não pode ser jogada: merece cuidado, zelo. Nesses dois anos, cada vez que apareciam obstáculos no caminho, ela pacientemente os resolvia, dava força. Nessa etapa final, a sua paciência me fez lembrar as razões de eu estar aqui. Imagino que ela saiba o quão importante é o seu papel, mas não custa dizer que o exerce como poucos. Obrigada pelo jeito que torna todo o conteúdo mais fácil e objetivo, e pelo carinho e dedicação que demonstra diante do nosso trabalho. À minha orientadora, obrigada pelo apoio, pelo clarear de ideias, por me entender e pela grande oportunidade.

Fora da vida acadêmica, minha engrenagem familiar continuou com horas divertidas, desabafos, conselhos, arte, saudade, serviços de infraestrutura, transporte, portaria, opiniões, carinho e madrugadas. Entretanto, o tempo muito sábio nos colocou diante de uma despedida muito dura. A vida, afinal, é muito curta para não comermos aquele arroz com galinha com o nosso tempero. Por isso, devemos dormir mais que dois sonos, para acordarmos bem no dia seguinte. De sete, minha pequena grande família passou a cinco. Foi a primeira vez que entendi o que é precisar parar tudo. E também aprendi o que é continuar porque é preciso. Então obrigada à minha família, porque o que sou hoje é fruto de tudo que deixam gravado em mim.

Dos ajudantes na escrita nos últimos meses, três irmãos de quatro patas (um deles já familiarizado com o TCC, outro prefere não opinar, e o terceiro está correndo pelos campos atrás de muitos passarinhos em outro plano), uma filha de quatro patas (pronta para todas as madrugadas, mesmo que já em sua toca), e um quase filho, pois agora sou dinda de um gatinho muito doce e arteiro que me fez entender que realmente quem ama, liberta.

Aprendi que somos muito mais capazes do que pensamos, mas que sempre é bom ter muita gente apoiando e acreditando junto. Do CBIM e fora, obrigada aos meus amigos de uma vida toda, nossas conversas fizeram a diferença e cada um está em um pedacinho deste trabalho. Obrigada por darem sentido à ideia de que conhecimento se constrói em conjunto. É constante troca.

RESUMO

Objetivo: Avaliar as concentrações pulmonares e brônquicas de ciprofloxacino (CIP) utilizando modelos animais de pneumonia aguda e crônica causada por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme. **Metodologia:** Pneumonia aguda (2 dias) foi desenvolvida pela inoculação intratraqueal de ratos Wistar com 10^8 UFC/mL de *P. aeruginosa* formadora de biofilme não-mucóide (PA14), enquanto pneumonia crônica (14 dias) foi desenvolvida pela inoculação de *beads* de alginato impregnados com *P. aeruginosa* mucóide ATCC 27853 (10^7 UFC/mL). A investigação farmacocinética plasmática, pulmonar e brônquica (fluido de revestimento epitelial pulmonar – PELF) foi conduzida após dose i.v. *bolus* de CIP 20 mg/kg. Sondas de microdiálise (CMA 20[®], 4 mm, 20 kDa) foram utilizadas para avaliar as concentrações livres pulmonares e brônquicas. CIP foi quantificado nas amostras biológicas por CLAE/fluorescência previamente validado. Análise farmacocinética não-compartimental foi conduzida com o software Phoenix[®] e os parâmetros comparados estatisticamente por ANOVA (Graphpad[®]) ($\alpha = 0,05$). **Resultados e Discussão:** A infecção aguda gera parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do CIP intermediários entre os previamente relatados para animais sadios e infectados cronicamente (TORRES *et al.* AAC, 61, 2017), com redução de *clearance* devido ao comprometimento das rotas de eliminação do CIP. A infecção aguda mostrou uma tendência de redução das concentrações livres intersticiais de CIP, com redução de 1,5 vezes no fator de penetração pulmonar em relação do grupo sadio ($fT = 1,69$ para $fT = 1,02$), intermediária em comparação com o grupo cronicamente infectado ($fT = 0,44$). No PELF as concentrações livres de CIP não foram alteradas pela infecção. O fator de penetração pulmonar/brônquico mostrou que animais sadios e agudamente infectados têm concentrações livres no PELF equivalentes a 46% das concentrações no fluido intersticial pulmonar, enquanto nos animais cronicamente infectados esta razão aumenta para 65%. **Conclusões:** A microdiálise brônquica é uma ferramenta importante para elucidar a penetração de fármacos no PELF. Concentrações plasmáticas livres de CIP aumentam com a cronificação da infecção não se mostrando adequadas para ajustes posológicos do fármaco no tratamento de pneumonias.

Palavras-chave: Ciprofloxacino, microdiálise brônquica, microdiálise pulmonar, infecção pulmonar aguda, infecção pulmonar crônica, *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme.

ABSTRACT

Ciprofloxacin free pulmonary and bronchial concentrations evaluated by microdialysis in healthy and biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* infected Wistar rats

Purpose: To evaluate ciprofloxacin (CIP) pulmonary and bronchial concentrations using animal models of acute and chronic biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Methods:** Acute pneumonia (2 days) was developed by intratracheal inoculation of Wistar rats with 10^8 CFU/mL of non-mucoid biofilm-forming *P. aeruginosa* (PA14) while chronic infection (14 days) was developed by inoculation of beads impregnated with mucoid *P. aeruginosa* ATCC 27853 (10^7 CFU/mL). Plasma, pulmonary and bronchial (Pulmonary Epithelial Lining Fluid – PELF) pharmacokinetics investigation was conducted following CIP 20 mg/kg i.v. *bolus* dosing. Microdialysis probes (CMA 20[®] 4 mm, 20 kDa) were used to evaluate free pulmonary and bronchial concentrations. For plasma concentrations, the carotid artery was cannulated. CIP concentrations were determined by a HPLC/fluorescence validated method. Non-compartmental analysis was conducted using Phoenix[®] software and pharmacokinetic parameters statistically compared by ANOVA (Graphpad[®]) ($\alpha = 0.05$). **Results and Discussion:** Acute infection resulted in CIP intermediate plasma pharmacokinetic parameters, between those previously reported for healthy and chronically infected animals (TORRES *et al.*, AAC, 61, 2017), with reduction of clearance due to compromised drug' elimination routes. A tendency of lower free interstitial pulmonary concentrations due to acute infection was observed, with a 1.5 times reduction of pulmonary penetration factor in comparison with healthy animals ($fT = 1.60$ to $fT = 1.02$), intermediate in comparison with that observed in chronically infected animals ($fT = 0.44$). Free CIP concentrations were not altered in PELF due to infection. The pulmonary/bronchial penetration factor showed that healthy and acutely infected animals had free PELF concentrations equivalent to 46% of pulmonary interstitial fluid concentrations, while in chronically infected animals this ratio increases to 65%. **Conclusions:** Bronchial microdialysis is an important tool to elucidate drug's concentrations in PELF. CIP free plasma concentrations augment with infection chronicity and are not adequate for posological adjustment to treat pneumonias.

Keywords: Ciprofloxacin, bronchial microdialysis, pulmonary microdialysis, acute pulmonary infection, chronic pulmonary infection, biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	25
REVISÃO DA LITERATURA.....	29
1. Pneumonias bacterianas.....	31
1.1 Pneumonias crônicas com formação de biofilmes.....	32
1.1.1 Pneumonias por biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	34
2. Modelos animais de infecção pulmonar.....	36
2.1 Modelos de infecção aguda.....	36
2.2 Modelos de infecção crônica.....	37
3. Microdiálise.....	38
3.1 Microdiálise pulmonar.....	41
3.2 Microdiálise brônquica.....	43
4. Farmacoterapia antimicrobiana.....	45
5. Ciprofloxacino.....	47
PROPOSTA DE ARTIGO: Influence of acute and chronic biofilm-forming <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection on ciprofloxacin free pulmonary interstitial and epithelial lining fluid concentrations.....	49
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS GERAIS.....	79
ANEXOS.....	89

INTRODUÇÃO

As concentrações livres no sítio de ação dos fármacos são as responsáveis pelo sucesso da terapia farmacológica (DHANANI *et al.*, 2010). Entretanto, para a adequação de regimes posológicos de antimicrobianos, assume-se que essas sejam semelhantes às concentrações livres plasmáticas, partindo-se da premissa de que o transporte do fármaco do plasma para o tecido e vice-versa ocorre por difusão. No entanto, sabe-se que para antimicrobianos essa premissa nem sempre é verdadeira (ROTTBOLL & FRIIS, 2014), visto que transportadores de influxo e efluxo podem contribuir para que as concentrações teciduais sejam maiores ou menores do que as concentrações livres plasmáticas, como relatado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa para o levofloxacino avaliado na próstata e no pulmão de animais sadios (HURTADO *et al.*, 2014; ZIMMERMANN *et al.*, 2015), bem como em outros trabalhos publicados na literatura, como por exemplo, para a amoxicilina avaliada no ouvido médio de animais sadios e infectados (HUANG *et al.*, 2007).

A falta de semelhança entre as concentrações livres plasmáticas e teciduais de antimicrobianos pode também ser devida às alterações observadas no tecido em função do processo infeccioso e inflamatório a ele associado. Alterações da temperatura local e pH tecidual, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento tecidual de proteínas e migração de células de defesa podem aumentar a degradação local do antimicrobiano, aumentar sua ligação tecidual às proteínas e aumentar a concentração intracelular de fármacos, além de acarretar no aprisionamento local de fármacos anfóteros, como ocorre com as fluoroquinolonas (MARTINEZ *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2017). Essas alterações podem produzir redução ou aumento da concentração de fármaco livre no local da infecção, não havendo mais correspondência com as concentrações livres plasmáticas.

No caso de infecções causadas por microrganismos formadores de biofilme, outros fatores podem alterar as concentrações livres teciduais. Biofilmes são agregados bacterianos envoltos por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida capazes de evitar a resposta imune inata do hospedeiro (ação fagocítica, opsonização de anticorpos, ação do complemento e ação ciliar do epitélio respiratório) (ELKHATIB & NOREDDIN, 2014). Relatos na literatura indicam que a estrutura dos biofilmes dificulta a difusão de

antimicrobianos favorecendo, desse modo, a continuidade do processo infeccioso. Estando nesse fenótipo os microrganismos podem apresentar uma concentração inibitória mínima (CIM) cerca de 10 a 1000 vezes maior do que a CIM da sua forma livre (planctônica). Além disso, na região basal do biofilme estão localizadas células com baixa atividade metabólica, que podem não ser erradicadas diante de uma farmacoterapia convencional, considerando o mecanismo de ação dos fármacos atuais, que necessitam que a bactéria esteja em fase de crescimento para serem efetivos (DONLAN, 2002; CATALDI *et al.*, 2014; WILKINS *et al.*, 2014).

Em se tratando de pneumonias, as concentrações pulmonares totais de antimicrobianos são avaliadas comumente utilizando-se técnicas como lavagem bronco-alveolar (BAL), aspiração direta, homogeneização de tecido, análise de escarro e de secreções brônquicas. Essas técnicas têm como desvantagem a possível superestimação das concentrações dos fármacos devido à eventual contaminação com o fluido intracelular, células e outras secreções (TYVOLD *et al.*, 2007, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013). As técnicas citadas permitem determinar as concentrações totais do fármaco na matriz biológica, ou seja, o somatório das concentrações livres e ligadas às proteínas, mas inviabilizam o conhecimento das concentrações livres, farmacologicamente ativas, no tecido-alvo. Nesse contexto, a microdiálise se apresenta como uma técnica aplicável ao monitoramento das concentrações livres dos fármacos em qualquer matriz biológica, livre de contaminantes, possibilitando uma melhor compreensão do processo de distribuição tecidual e dos fatores que podem influenciá-lo tanto em tecidos saudáveis quanto em processos infecciosos.

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado a microdiálise como ferramenta para o estudo das concentrações teciduais livres de antifúngicos (DE ARAÚJO, *et al.* 2009; AZEREDO *et al.*, 2012; ALVES, *et al.*, 2017) e antimicrobianos (FREDDO & DALLA COSTA, 2002; TASSO, *et al.*, 2008; DE ARAÚJO *et al.*, 2011; HURTADO *et al.*, 2014; BERNARDI, 2016; ZIMMERMANN *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2017), em diferentes tecidos (fígado, próstata, músculo, pulmão e cérebro). Temos também investigado a influência da infecção no processo de distribuição de antimicrobianos e antifúngicos (ARAÚJO *et al.*,

2009, ARAUJO *et al.*, 2011; AZEREDO *et al.*, 2012; BERNARDI, 2016; TORRES *et al.*, 2017).

Ao contrário das infecções agudas, caracterizadas pela presença de microrganismos planctônicos e cuja farmacoterapia já é bem estabelecida na literatura, as infecções crônicas, comumente associadas à formação de biofilmes, requerem adequação das doses de antimicrobianos utilizadas uma vez que as posologias convencionais adotadas na clínica acabam por expor o biofilme a concentrações sub-terapêuticas. A erradicação dos biofilmes acaba sendo mais difícil, visto que a vida em comunidade aumenta os mecanismos de resistência e dificulta a permeabilidade de diversos fármacos, se comparada com uma infecção por bactéria planctônica (DHANANI, *et al.*, 2010).

Recentemente nosso grupo iniciou a investigação da influência do biofilme bacteriano na penetração pulmonar de antimicrobianos através de dois modelos de pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme utilizando a microdiálise para coleta das concentrações livres teciduais. Um modelo de infecção crônica utilizando *beads* de alginato impregnados com *P. aeruginosa* mucóide (ATCC 27853), foi adaptado a partir dos relatos de Johansen & Hoiby (1999) e um modelo de infecção subaguda, que utiliza cepa de *P. aeruginosa* não-mucóide (PA14) que, por ser mais virulenta, não precisou da utilização dos *beads* para produzir a infecção. Em ambos os modelos o sistema imune dos animais não foi alterado farmacologicamente. Torres e colaboradores (2017), utilizando o modelo de infecção pulmonar crônica por cepa mucóide, verificaram que houve redução na exposição tecidual ao ciprofloxacino nos animais infectados (fator de penetração tecidual $fT = 0,44$) quando comparados aos sadios ($fT = 1,69$). Bernardi (2016) demonstrou que a tobramicina também tem sua penetração pulmonar reduzida ($fT = 0,94$ para $fT = 0,25$) diante de infecções subagudas com *P. aeruginosa* formadora de biofilmes não-mucóides.

Nos estudos com bactérias formadoras de biofilme conduzidos até o momento, as concentrações livres de fármacos foram determinadas no interstício do tecido pulmonar, em regiões pulmonares mais irrigadas como a zona respiratória. No entanto, sabe-se que a pneumonia em geral inicia-se a partir da adesão bacteriana à mucosa brônquica e que a invasão para o interstício tecidual ocorre apenas com a evolução da infecção (ZEITLINGER *et*

al., 2005; KENTARCHOS *et al.*; 2006). Desse modo, a concentração adequada de antimicrobianos na mucosa e no fluido de revestimento epitelial pulmonar (*Pulmonar Epithelial Lining Fluid* – PELF) pode significar inibição da adesão bacteriana e da consequente invasão tecidual. Em virtude do exposto, torna-se importante investigar por microdiálise as concentrações brônquicas livres de antimicrobianos, obtidas após administração sistêmica dos fármacos, a fim de determinar se concentrações suficientes para erradicação de cepas formadoras de biofilme são obtidas no PELF com as posologias tradicionais desses fármacos.

No estudo com ciprofloxacino em modelo de pneumonia crônica com *P. aeruginosa* formadora de biofilme mucóide (TORRES *et al.*, 2017) foi levantada a hipótese de que a redução das concentrações intersticiais do fármaco observada durante a infecção, em comparação com as determinadas em pulmão sadio, poderia ser parcialmente devida a sua maior distribuição para o PELF, em função do aumento de permeabilidade tecidual, extravasamento de líquido e proteínas além da presença do próprio biofilme nesse local. A verificação dessa hipótese e o teste da validade do modelo farmacocinético populacional (popPK) previamente desenvolvido são o foco atual das investigações do grupo.

O ciprofloxacino é uma fluoroquinolona de segunda geração que apresenta boa penetração pulmonar. Na clínica, dentre outros usos, é utilizado para evitar o declínio da função respiratória em pacientes fibrocísticos com pneumonias causadas por *P. aeruginosa*, sendo administrado por via intravenosa ou oral (CIPOLLA, BLANCHARD & GONDA, 2016). Pneumonias por *P. aeruginosa* em pacientes fibrocísticos em geral tornam-se crônicas. Desse modo, é fundamental conhecer os níveis de ciprofloxacino obtidos no PELF em infecções agudas e crônicas, na tentativa de utilizarem-se doses que permitam evitar o agravamento de uma infecção aguda para um processo crônico, cuja erradicação torna-se mais complexa devido ao amadurecimento e ampliação do biofilme.

Atualmente não existem tratamentos específicos para erradicar infecções pulmonares com biofilmes. Em geral são utilizadas as mesmas doses adotadas para tratar microrganismos planctônicos. A maioria dos tratamentos para pneumonias crônicas busca melhorar a qualidade de vida do paciente em

função da impossibilidade de erradicação bacteriana (CIOFU *et al.*, 2014), como ocorre em pacientes fibrocísticos.

OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo é comparar as concentrações de ciprofloxacino no PELF (brônquicas) e no interstício pulmonar (pulmonares) em animais sadios e com pneumonia aguda e crônica induzida por cepas de *P. aeruginosa* formadora de biofilme.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- o Determinar, através de microdiálise, as concentrações livres brônquicas de ciprofloxacino (20 mg/kg i.v. *bolus*) em ratos Wistar infectados cronicamente com *P. aeruginosa* formadora de biofilme (ATCC 27853);
- o Determinar, através de microdiálise, as concentrações livres pulmonares de ratos Wistar com infecção aguda por *P. aeruginosa* formadora de biofilme não-mucóide (PA14), bem como as concentrações plasmáticas totais, após dose única i.v. *bolus* de 20 mg/kg;
- o Determinar, por microdiálise, as concentrações brônquicas do ciprofloxacino em ratos Wistar sadios, com infecção aguda por *P. aeruginosa* formadora de biofilme não-mucóide (PA 14) e crônica por *P. aeruginosa* formadora de biofilme mucóide (ATCC 27853) após dose única i.v. *bolus* de 20 mg/kg;
- o Avaliar a influência da infecção bacteriana aguda e crônica na penetração pulmonar e brônquica do ciprofloxacino através de análise farmacocinética não-compartimental.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Pneumonias bacterianas

Pneumonias resultam de infecções no parênquima pulmonar devido à exposição a microrganismos patogênicos (ALCÓN; FÀBREGAS & TORRES, 2005) que conseguem transpor barreiras como a filtração de partículas pelas vias respiratórias, o *clearance* mucociliar e ação da resposta imune composta por macrófagos alveolares, neutrófilos e anticorpos circulantes (KUKAVICA-IBRULJ & LEVESQUE, 2008). O PELF é um dos mais importantes alvos das infecções respiratórias por patógenos extracelulares. Encontra-se isolado do compartimento vascular por uma membrana capilar não fenestrada e um epitélio contendo junções celulares justapostas (*tight junctions*) (RODVOLD; GEORGE & YOO, 2011). Segundo a revisão de Dhanani e colaboradores (2010), com o avanço da infecção, o patógeno passa do PELF para o epitélio pulmonar acarretando sua lesão e posterior entrada no interstício pulmonar, caracterizando um quadro de pneumonia (Figura 1).

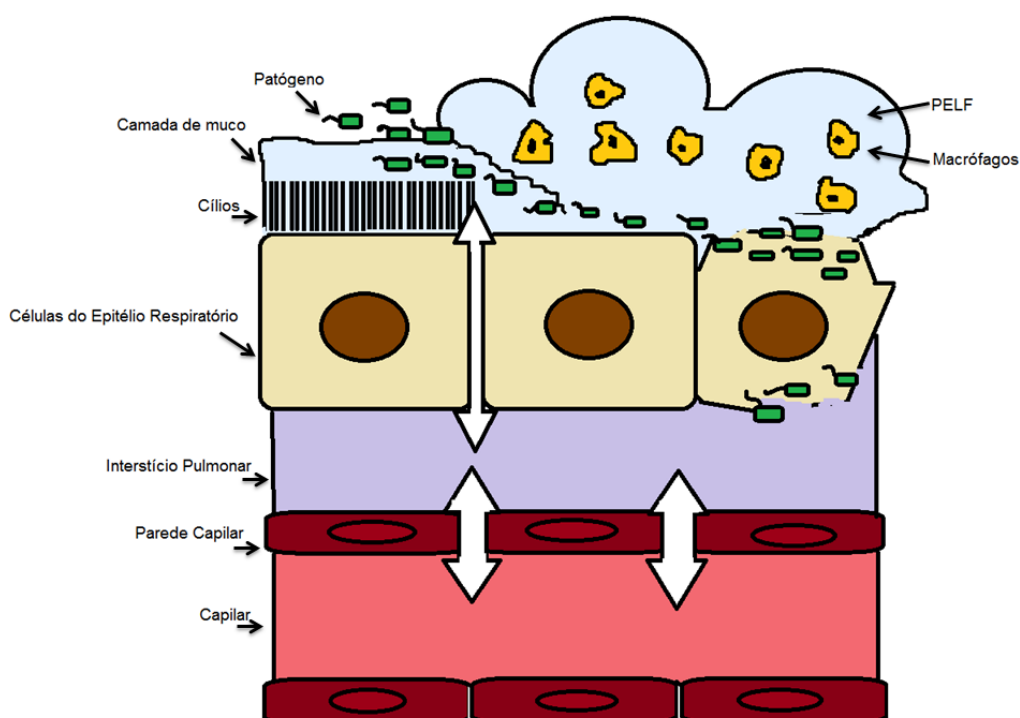


Figura 1. Representação esquemática da barreira hemato-pulmonar.

A difícil erradicação das bactérias do PELF se deve em parte à sua localização no escarro e na mucosa brônquica, pois se encontram distantes da

resposta do hospedeiro. Além disso, múltiplos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos contribuem para a sobrevivência desses patógenos, estando envolvidos na (1) prevenção de acesso ao alvo, limitando a entrada de antimicrobianos a partir de alterações de proteínas de transporte como as porinas, ou aumentando a expressão de bombas de efluxo (MESAROS *et al.*,2007; LEID *et al.*,2009); (2) modulação do sítio alvo de atuação do antimicrobiano; (3) modulação do antimicrobiano através de degradação enzimática (produção de β -lactamases, por exemplo) ou inativação química (BALDWIN; HONEYBOURNE & WISE, 1992; LODISE; LOMAESTRO & DRUSANO, 2007; MESAROS *et al.*, 2007; BEAUDOIN *et al.*, 2010; KONTOU *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.* 2014). De maneira geral, infecções pulmonares agudas estão relacionadas a procedimentos de intubação para ventilação mecânica e aspiração de conteúdo da orofaringe. Quadros crônicos envolvem inalação de aerossóis, presença de colonização bacteriana e formação de biofilmes, sendo consideradas também como infecções tardias (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011). Estas se caracterizam pela progressão da doença devido à inabilidade da resposta imune do paciente em combater a infecção. Nesse cenário, a presença de biofilmes dificulta a atuação do sistema imune do hospedeiro (ROBERTS & KRAGH, 2015). No início da infecção as concentrações livres de antimicrobianos no PELF são importantes para evitar a colonização e o desenvolvimento da infecção. Na infecção crônica, no entanto, as concentrações do fármaco no líquido intersticial pulmonar passam a ser determinantes para a erradicação da infecção. Zeitingler, Müller & Joukhadar (2005) em sua revisão sobre uso da microdiálise para avaliar concentrações pulmonares de antimicrobianos, destacaram que fluoroquinolonas e macrolídeos, por exemplo, acumulam-se nas células e isso poderia resultar em concentrações mais elevadas desses fármacos em homogeneizados de tecido e no PELF do que no fluido intersticial pulmonar.

1.1 Pneumonias crônicas com formação de biofilmes

Os biofilmes são um modelo de agregação bacteriana que adere a superfícies bióticas ou abióticas, originado em resposta a alterações ambientais que possam, por exemplo, colocar em risco a sobrevivência da espécie (resposta imune do hospedeiro, falta de nutrientes, presença de

antimicrobianos) (CATALDI *et al.*, 2014). São constituídos de uma matriz polimérica composta por lipídios, proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e polissacarídeos bacterianos. A formação dos biofilmes é modulada pelo mecanismo de *quorum sensing*, que coordena a expressão gênica de maneira a liberar moléculas auto-indutoras que indicam a necessidade de agregação ou desagregação dos microrganismos (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011; KONEMAN, 2012).

Os biofilmes estão presentes nas infecções crônicas por doenças prévias que acabam por favorecer a invasão e o crescimento microbiano. Podem levar à colonização inicial de superfícies de diversos órgãos como pulmões, rins, coração e tecido epitelial, como ocorre na fibrose cística, na qual o paciente apresenta uma grande viscosidade e hiperosmolaridade do muco ciliar que favorece o crescimento de microrganismos; ou mesmo por doenças provocadas por contaminação de superfícies abióticas, como nas infecções associadas a cateteres intravenosos e pneumonias por ventilação mecânica (CATALDI *et al.*, 2014; WILKINS *et al.*, 2014).

Em muitos casos, os patógenos extracelulares responsáveis pelas infecções das vias aéreas podem ser cepas formadoras de biofilme, como é o caso do *Streptococcus pneumoniae* e do *Staphylococcus aureus*, que se localizam predominantemente nos sítios nasal, faríngeo e traqueobrônquico, e *P. aeruginosa*, que tem afinidade por células do epitélio ciliado traqueal (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011). A invasão dos pulmões ocorre quando as bactérias passam pela traqueia. A exemplo, casos em que bactérias aderidas ao aparato de ventilação mecânica colonizam e formam biofilme em menos de 12 h após o procedimento de intubação (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011). Essas bactérias aderidas podem se desprender da superfície do dispositivo de intubação passando a se localizar nos pulmões, no PELF dos brônquios (ALCÓN; FÀBREGAS & TORRES, 2005; TYVOLD *et al.*, 2007; CATALDI *et al.*, 2014) e, à medida que o processo infeccioso evolui, acaba por se estender para o interstício pulmonar (DHANANI *et al.*, 2010). A formação de biofilme no trato respiratório também pode ocorrer devido à passagem da bactéria da forma planctônica à forma de biofilme diante de ameaças ou condições ambientais favoráveis, como ocorre com o patógeno oportunista *P. aeruginosa*, que forma biofilmes principalmente no trato respiratório inferior, levando à

cronificação da infecção (AOKI *et al.*, 2008; BEAUDOIN *et al.*, 2010; SHUNMUGAPERUMAL, 2010).

1.1.1 Pneumonias por biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo oportunista que atinge preferencialmente pacientes imunocomprometidos, sendo responsável, anualmente, por importantes infecções nosocomiais, como pneumonias por ventilação mecânica, infecções relacionadas a cateteres bem como pneumonias em unidades de tratamento intensivo (LYCZAK; CANNON & PIER, 2000; ELKHATIB & NOREDDIN, 2014), sendo seu estudo cada vez mais relevante em ambientes hospitalares (LYCZAK; CANNON & PIER, 2000; SIEVERT *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2014).

Pseudomonas aeruginosa pode apresentar fenótipo formador de biofilme, aderindo a superfícies bióticas e abióticas, desprendendo-se e colonizando outras regiões do hospedeiro. Como na forma planctônica, na forma de biofilme, a resistência a diversos antimicrobianos inclui mecanismos como bombas de efluxo, modificações enzimáticas e dificuldade de penetração do antimicrobiano na matriz, fazendo com que o fármaco permaneça na superfície do biofilme, ou até mesmo inativação do fármaco por ligação covalente com componentes da matriz polimérica extracelular (SHARMA *et al.*, 2014).

O biofilme de *P. aeruginosa* pode apresentar-se mucóide (como na cepa ATCC 28753) ou não-mucóide (como nas cepas PA14 e PAO1). O fenótipo mucóide está associado a desfechos clínicos desfavoráveis (AUERBACH *et al.*, 2015), sendo que a bactéria nessa forma de biofilme pode sobreviver em superfícies inanimadas por 48 horas, eventualmente até oito dias (escarro deixado em superfície seca, por exemplo) (CANTÓN *et al.*, 2015). O biofilme mucóide apresenta maior produção de alginato na matriz polimérica extracelular e confere à bactéria potencial para cronicidade, podendo ser encontrado na zona condutora e na zona respiratória pulmonar (CIOFU *et al.*, 2014). O fenótipo não-mucóide garante sobrevivência à bactéria por até 24 horas em superfícies inanimadas (CANTÓN *et al.*, 2015), costuma estar localizado na zona pulmonar condutora e apresenta reduzida produção de alginato, que

deixa de ser o componente majoritário da matriz (WOZNIAK *et al.*, 2003a; BRAGONZI *et al.*, 2005; CIOFU *et al.*, 2014). Sendo assim, outros polímeros apresentam-se como principais formadores de matriz, como o Pel (polissacarídeo de manose e galactose) e o Psl (polissacarídeo de glicose), responsáveis pela integridade da matriz, tendo papel na formação de microcolônias e na adesão à superfícies, respectivamente (RYBTKE *et al.*, 2015).

O alginato é um polímero acetilado composto por monômeros de ácido manurônico e ácido gulurônico (BARTH & BARROS, 2001; WOZNIAK *et al.*, 2003a; RYBTKE *et al.*, 2015) que confere aos biofilmes sua estrutura tridimensional bem como a aparência mucóide das colônias de *Pseudomonas* quando em meio de cultura (CATALDI *et al.*, 2014). Além disso, ele previne a fagocitose por células do hospedeiro e liga-se a antimicrobianos catiônicos como os aminoglicosídeos (BJARNSHOLT *et al.*, 2008), dificultando a ação desses.

Os biofilmes de *P. aeruginosa* podem ser encontrados impregnados ao muco na zona condutora (traquéia, brônquios e bronquíolos), contrapondo-se às formas planctônicas predominantemente localizadas na zona respiratória (bronquíolos terminais, bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares) sendo essa região rica em polimorfonucleares do hospedeiro, susceptível, portanto, à resposta inflamatória (WANG *et al.*, 2014; RABIN *et al.*, 2015). Desse modo, os pacientes podem apresentar quadros de infecção localizada, em que mesmo com a função pulmonar aparentemente normal, coexistem regiões destruídas pela resposta inflamatória gerada pela presença dos biofilmes (BJARNSHOLT *et al.*, 2009).

A infecção por *P. aeruginosa* comumente predomina em pacientes mais velhos, sendo responsável pela cronicidade de 90% das infecções em adultos fibrocísticos (TRÉ-HARDY *et al.*, 2009). É comum a infecção em pacientes jovens infectados previamente por *S. aureus*, havendo piora no prognóstico dos pacientes devido à presença de *P. aeruginosa* (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013). Cepas não-mucóides, como a PA14, são mais virulentas e estão envolvidas na colonização inicial das vias aéreas inferiores em pacientes fibrocísticos (WOZNIAK *et al.*, 2003b; BRAGONZI, 2010).

2 Modelos animais de infecção pulmonar

Os processos infecciosos acarretam mudanças na permeabilidade tecidual, alterando a distribuição dos fármacos nos seus respectivos sítios-alvo. Modelos animais podem auxiliar a investigação de diferentes estágios da infecção, mimetizando a patofisiologia da doença. Sua utilização em estudos pré-clínicos visa refletir um quadro infeccioso em humanos sem interferência de comorbidades (BIELEN *et al.*, 2017).

2.1 Modelos de infecção aguda

Modelos de infecção aguda são considerados ideais para investigar quadros de pneumonia não associados à fibrose cística, permitindo avaliar as concentrações de um fármaco diante da colonização bacteriana, sendo comum sua aplicação em estudos de virulência e imunoprofilaxia (JOHANSEN; CRYZ JR & HQIBY, 1994; MUNDER *et al.*, 2011). Através deles podem-se mimetizar patologias como pneumonias agudas e pneumonias adquiridas em ambiente hospitalar (BIELEN *et al.*, 2017).

Na literatura, os modelos de infecção são descritos majoritariamente em camundongos, fazendo uso de bactérias com fenótipo planctônico. O método de inoculação pode variar, podendo envolver administração intranasal, intratraqueal, transtraqueal ou por inalação de aerossol (BIELEN, *et al.*, 2017). O modelo agudo de infecção pulmonar tem sua duração influenciada pela ação do *clearance* pulmonar do animal, através da ação dos macrófagos alveolares sob o inóculo bacteriano. A carga bacteriana acaba por diminuir em dois a três dias após inoculação, levando inclusive à erradicação completa dos microrganismos (JOHANSEN *et al.*, 1993; JOHANSEN & HOIBY, 1999; HEECKEREN *et al.*, 2006; BRAGONZI, 2010).

Embora os modelos de infecção aguda permitam grandes contribuições na pesquisa com antimicrobianos, a desvantagem que se apresenta importante é a alta mortalidade dos animais em função da necessidade de utilização de inóculos muito concentrados a fim de evitar o *clearance* pulmonar, que muitas vezes levam a quadros de bacteremia (BAKKER-WOUDENBERG *et al.*, 2002; BIELEN, *et al.*, 2017).

Com base no modelo de Johansen & Hoiby (1999), nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de infecção subaguda de sete dias através da administração intratraqueal de um inóculo de *P. aeruginosa* (PA 14) não-mucóide, sem utilização de *beads* para aprisionar a bactéria. Esse modelo foi aplicado ao estudo da penetração pulmonar da tobramicina em ratos Wistar infectados. A tobramicina é inativada na presença do alginato, assim a cepa PA 14 foi escolhida em virtude de o alginato não ser o componente majoritário da matriz do biofilme, evitando esse processo (BERNARDI, 2016). Os resultados mostraram que a infecção subaguda com formação de biofilme não alterou a farmacocinética plasmática da tobramicina após dose i.v. *bolus* de 10 mg/kg, entretanto reduziu em cerca de 70% a penetração pulmonar do fármaco. Desse modo, as concentrações plasmáticas da tobramicina, utilizadas para ajuste posológico, superestimam as concentrações ativas no pulmão infectado.

2.2 Modelos de infecção crônica

Modelos crônicos são utilizados em geral para estudos que envolvam a fibrose cística (KUKAVICA-IBRULJ & LEVESQUE, 2008), pois neles são encontradas propriedades semelhantes às que se apresentam na prática clínica, como a persistência do inóculo no indivíduo e alterações na histopatologia pulmonar, vista através de inflamação das vias aéreas superiores, brônquios e parênquima pulmonar. São largamente aplicados quando se deseja avaliar as concentrações teciduais de um fármaco diante de bactérias formadoras de biofilmes.

Quanto à utilização de espécies animais, este modelo apresenta-se mais diversificado do que os modelos de infecção aguda, sendo encontrados estudos em ratos, camundongos, porcos e outras espécies. A sua principal característica, justamente advinda da formação de biofilmes, é a imobilização das bactérias em *beads* (esferas de alginato ou ágar, por exemplo) (JOHANSEN *et al.*, 1993; JOHANSEN; CRYZ JR & HQIBY, 1994) ou então o aumento do número de administrações do inóculo utilizado caso não seja adotada a utilização de *beads* (HEECKEREN *et al.*, 2006). Uma vez no pulmão do animal, os *beads* permitem que o biofilme se desenvolva sem que sofra ação da resposta imune do hospedeiro a ponto de eliminá-lo precocemente.

Além de sua grande aplicação no ambiente científico, o uso de modelos crônicos ainda apresenta como vantagens a ausência de bacteremia e a baixa mortalidade dos animais (BAKKER-WOUDENBERG *et al.*, 2002).

Johansen & Hoiby desenvolveram um modelo experimental de infecção pulmonar crônica em ratos, utilizando o aprisionamento bacteriano em *beads* de alginato, a partir de modificações do protocolo descrito por Cash e colaboradores (1979) que utilizava *beads* de ágar. Como o alginato é o componente majoritário da matriz do biofilme da maioria das cepas de *P. aeruginosa* a utilização de *beads* dessa substância impregnados com a bactéria para indução da infecção se assemelharia ao processo que ocorre nos pacientes infectados por esse patógeno. Em nosso grupo de pesquisa, através de pequenas modificações no modelo de Johansen & Hoiby (1999), padronizamos um modelo de infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* (ATCC 27853) de 14 dias, cuja aplicação permitiu avaliar a influência da infecção pulmonar por bactéria formadora de biofilme na penetração tecidual do CIP (TORRES *et al.*, 2017), conforme relatado anteriormente. Utilizando esse protocolo de infecção crônica, 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) do CIP entre ratos sadios e infectados após dose i.v. *bolus* de 20 mg/kg, 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), sem haver, no entanto, diferenças na constante de eliminação pulmonar entre os dois grupos.

3. Microdiálise

No estudo de distribuição do fármaco é importante avaliar as concentrações livres teciduais, tendo em vista que o sítio da infecção geralmente é o fluido intersticial. Nos tratamentos de processos infecciosos utiliza-se do monitoramento das concentrações plasmáticas para estimar as

concentrações livres teciduais dos fármacos no local da infecção, realizando assim, o ajuste de doses para o paciente, partindo-se da premissa que a difusão governa o processo de transporte do fármaco do plasma para o tecido e vice-versa (ZEITLINGER; MÜLLER & JOUKHADAR, 2005; ONG *et al.*, 2013; KUTI & NICOLAU, 2015). Entretanto, para muitos antimicrobianos, a relação entre as concentrações plasmáticas livres e teciduais pode ser diferente da esperada por difusão, pois processos de transporte via transportadores de influxo e efluxo contribuem para o aumento ou a redução das concentrações livres teciduais em relação às concentrações livres plasmáticas (ARAÚJO *et al.*, 2013; HURTADO *et al.*, 2014b; ZIMMERMANN *et al.*, 2015).

Alterações de pH tecidual, mudanças nas ligações às proteínas e possíveis alterações na farmacocinética do fármaco devido ao estadiamento da infecção também podem influenciar nas concentrações locais livres (MARCHAND *et al.*, 2016). Há que considerar ainda a anatomia do pulmão, que por conter diferentes compartimentos (interstício e PELF) pode apresentar concentrações variadas conforme o local avaliado. Em infecções no interior dos brônquios, é possível que o antimicrobiano se concentre na parede ou no lúmen bronquial em caso de patógenos extracelulares (ZEITLINGER; MÜLLER; JOUKHADAR & 2005; MARCHAND *et al.*, 2016). Dessa forma, a quantificação das concentrações deve ser realizada nos tecidos ou em fluidos relevantes como o PELF ao invés de utilizar da determinação das concentrações plasmáticas como preditivas das concentrações teciduais (MARCHAND *et al.*, 2016).

Entre as metodologias disponíveis para determinar as concentrações de fármaco nas vias aéreas e no PELF a microdiálise é a ferramenta que permite a obtenção da fração livre do fármaco, farmacologicamente ativa, no tecido alvo utilizando para isso um número reduzido de animais (RODVOLD; HOPE & BOYD, 2017).

Na microdiálise uma sonda, continuamente irrigada com uma solução de perfusão, é inserida no tecido de interesse e as amostras de dialisado contendo o fármaco que se difundiu do tecido para a sonda são coletadas após a exposição do líquido de perfusão a uma membrana semipermeável que está em contato com o tecido (Figura 2). Devido ao *cut-off* de 20 kDa, a membrana da sonda permite apenas a passagem de moléculas de baixo peso molecular,

consequentemente não ligadas a proteínas (BRUNNER & LANGER, 2006; KENTARCHOS, 2006; CHAURASIA *et al.*, 2007; HAMMARLUND-UDENAES *et al.*, 2017). Em função do baixo fluxo de perfusão se estabelece uma condição *sink* entre o líquido de perfusão, isosmótico com o líquido intersticial (Ringer, salina, Ringer lactato, entre outros) e o meio intersticial, permitindo a difusão de substâncias de baixo peso molecular presentes no tecido, e ausentes no perfundido. A condição *sink*, na qual não há equilíbrio de concentrações da molécula sob investigação entre o líquido de perfusão e o líquido intersticial, mimetiza um capilar sanguíneo, carreando o fármaco do local onde a sonda é colocada (CHAURASIA *et al.*, 2007; GUILLON *et al.*, 2018). O fluido coletado, chamado de microdialisado, pode então ser analisado sem pré-tratamento, diferentemente das coletas de sangue ou lavagem broncoalveolar, em que o fármaco precisa ser extraído da matriz por meio de técnicas como precipitação de proteínas ou extração líquido-líquido, entre outras.

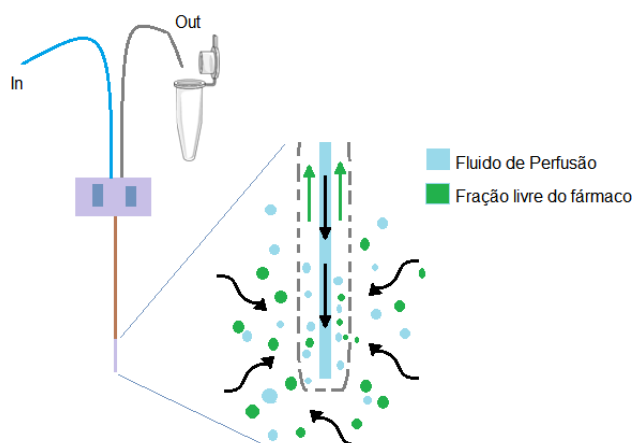


Figura 2. Representação esquemática da sonda de microdialise. A técnica permite a coleta da fração livre do fármaco, não ligada às proteínas, por meio de processo difusional.

Como na microdialise se trabalha em condição *sink* o equilíbrio de difusão não é alcançado, sendo necessário conhecer-se a taxa de recuperação relativa das sondas que expressa o percentual da concentração real tecidual que a sonda consegue coletar. Sabendo-se a recuperação relativa da sonda para o fármaco de interesse é possível determinar as concentrações livres teciduais reais e, desse modo, analisar o processo de distribuição tecidual do

mesmo (ARAUJO *et al.*, 2009; HAMMARLUND-UDENAES *et al.*, 2017; GUILLON *et al.*, 2018).

A microdiálise é uma técnica versátil que permite avaliar as concentrações livres em diferentes tecidos, como o tecido pulmonar (TORRES *et al.*, 2017), renal (ARAUJO *et al.*, 2009), hepático (ANDRADE *et al.*, 2014), prostático (HURTADO *et al.*, 2014a), dentre outros. Em se tratando de pneumonias, ela pode ser uma grande aliada na obtenção de informações sobre a penetrabilidade de fármacos no tecido infectado em relação ao sadio. Na literatura, para o estudo de infecções do parênquima pulmonar, a microdiálise divide-se em microdiálise pulmonar e brônquica.

3.1 Microdialise pulmonar

Nessa técnica o animal é entubado para em seguida ser realizada uma incisão entre duas costelas para acessar o pulmão. A sonda de microdiálise é inserida no lobo médio direito a partir de um orifício aberto com auxílio de uma agulha (Figura 3). Embora a sonda também esteja em contato com o alvéolo, as trocas que ocorrem por diálise acontecem entre a fase fluida e não com o ar alveolar (ZEITLINGER; MÜLLER & JOUKHADAR & 2005; DHANANI *et al.*, 2010). A vantagem da microdiálise pulmonar é que permite monitorar de forma dinâmica o perfil concentração *versus* tempo no líquido intersticial pulmonar. A desvantagem para a aplicabilidade clínica é que costuma estar restrita a pacientes cuja situação requera cirurgia torácica (ZEITLINGER; MÜLLER & JOUKHADAR, 2005).

A microdiálise pulmonar em geral é utilizada para investigar as concentrações teciduais de antimicrobianos, visto seu potencial para elucidar os níveis adequados de fármaco no sítio da infecção. Marchand e colaboradores (2008) utilizaram a técnica para investigar a distribuição do levofloxacino em ratos, a fim de avaliar possível influência de transportadores de efluxo como a glicoproteína-P (P-gp). Os autores determinaram um fator de penetração tecidual de 1,06 sugerindo distribuição por difusão passiva para o levofloxacino. Em 2015, em um estudo do nosso grupo de pesquisa, Zimmermann e colaboradores utilizaram a microdiálise para avaliar a presença influencia da P-gp através na distribuição tecidual desse fármaco após

administração intravenosa e intratraqueal do levofloxacin associado a um inibidor de P-gp, o tariquidar. Para o grupo da administração intratraqueal, a presença do inibidor aumentou a biodisponibilidade de 40% para 86% em relação ao grupo que recebeu a dose de levofloxacin sem o inibidor. Entretanto, verificou-se que a P-gp tem um impacto menor no efluxo do pulmão quando o fármaco é administrado por via intravenosa, visto que não houve diferença na penetração pulmonar entre os grupos com (fT 0,69) e sem (fT 0,81) inibidor para essa via de administração. Esse resultado-se deve à localização da P-gp na região apical dos pneumócitos.

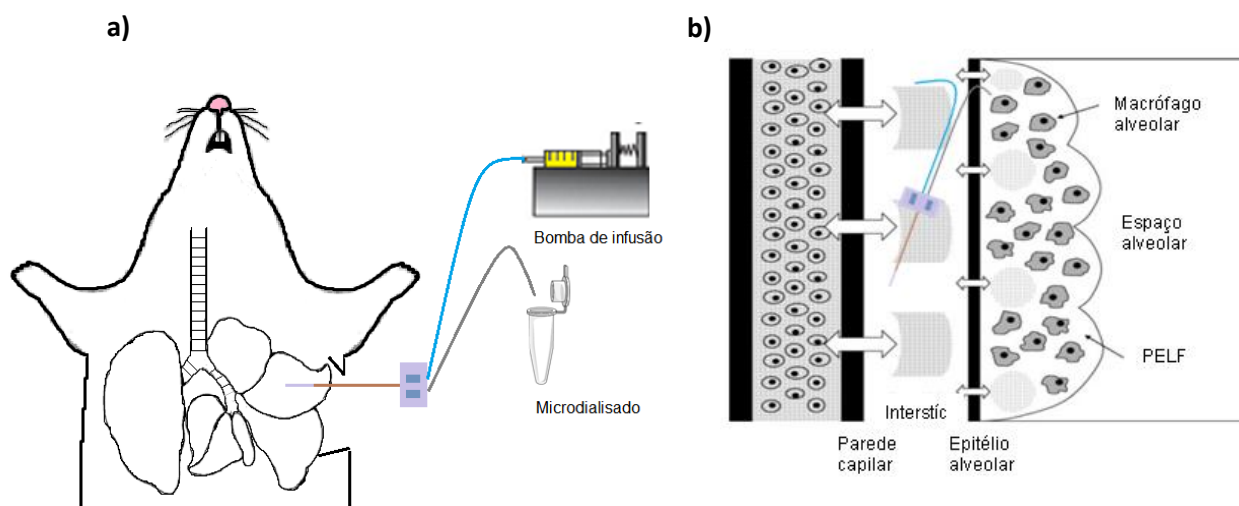


Figura 3. Representação da microdiálise pulmonar: a) Sonda de microdiálise inserida no lobo médio direito; b) Detalhe do posicionamento da sonda no interstício (Adaptado de KIEM & SCHENTAG, 2008).

Além da investigação da penetração de fármacos em tecidos saudios, a microdiálise pode ser empregada para avaliar a penetração tecidual em tecidos infectados, como no estudo de Mauric e colaboradores (2010), que avaliaram as concentrações teciduais de fluconazol no tecido pulmonar de animais saudios e sépticos, verificando que o processo inflamatório ocasionado pela infecção não altera a capacidade do fármaco de penetrar nos tecidos afetados.

Embora forneça dados de grande valia para a elucidação das concentrações que efetivamente atingem o sítio alvo, quando se trata de

processos infecciosos, as concentrações de antimicrobianos que conseguem permear as membranas biológicas a fim de chegar à mucosa brônquica tornam-se importantes para a prevenção da colonização bacteriana, evitando que o microrganismo lesione o tecido e venha a invadir o interstício, caracterizando um quadro de pneumonia intersticial (KENTARCHOS *et al.*, 2006). Nesse aspecto, a microdiálise brônquica se apresenta como uma ramificação da técnica de microdiálise que permite a determinação das concentrações livres no PELF (EISENBERG *et al.*, 1993; AOKI *et al.*, 2008 ; ZHANG *et al.*, 2010)

3.2 Microdiálise brônquica

Apesar da existência de relatos na literatura de estudos de microdiálise brônquica, essa técnica pode ser considerada ainda pouco explorada, especialmente em roedores. Na microdiálise brônquica a sonda é inserida diretamente no brônquio do animal, mediante anestesia (EISENBERG *et al.*, 1993; AOKI *et al.*, 2008) (Figura 4). A técnica foi inicialmente desenvolvida por Eisenberg e colaboradores (1993) em ratos saudáveis, nos quais foram avaliadas as concentrações de tobramicina e gentamicina após dose i.v. *bolus* dos fármacos, obtendo-se taxas de penetração brônquica de $0,36 \pm 0,06$ e $0,56 \pm 0,09$ para gentamicina e tobramicina, respectivamente.

Em 2008, Aoki e colaboradores avaliaram as concentrações livres brônquicas de ulifloxacino por BAL e microdiálise em ratos que receberam o fármaco por via intravenosa (7,9 mg/kg, infusão 2,5 mg/kg/h), utilizando ureia como marcador endógeno. A microdiálise permitiu a obtenção da razão das concentrações livres de ulifloxacino no PELF/concentrações livres plasmáticas ($2,90 \pm 0,18$), caracterizando a taxa de penetração brônquica do fármaco. Quando comparados aos dados de penetração encontrados por BAL ($4,59 \pm 0,23$) que relaciona a concentração total de fármaco no PELF pela concentração livre plasmática, vê-se a importância da microdiálise para esclarecer as concentrações efetivas para a ação antimicrobiana.

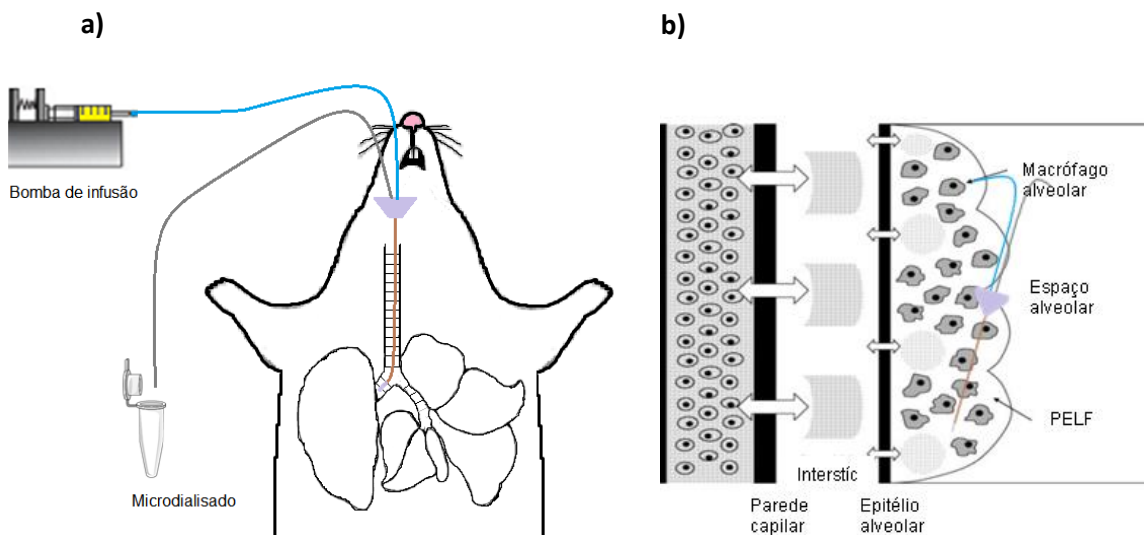


Figura 4. Esquema da implantação da sonda de microdiálise brônquica: a) sonda de microdiálise entre brônquio primário e secundário do animal; b) Detalhe do posicionamento da sonda no PELF (Adaptado de KIEM & SCHENTAG, 2008).

O potencial de formulação inalatória de azitromicina foi avaliado por Zhang e colaboradores (2010) em ratos, através da microdiálise brônquica. Foram comparadas as administrações intravenosa e intratraqueal do fármaco. A técnica permitiu verificar que diante de administrações intratraqueais o fármaco atinge concentrações maiores no PELF, havendo menor passagem para a corrente sanguínea devido a ação fagocítica dos macrófagos. Já na administração intravenosa, a azitromicina tem sua retenção prolongada em nível celular, o que contribui para menores concentrações no PELF. Isso pôde ser verificado pela avaliação da exposição observada após dose intratraqueal ($ASC_{0-\infty} 226,31 \pm 121,56 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$), que se apresentou cerca de 83 vezes maior do que a exposição observada após dose intravenosa ($ASC_{0-\infty} 2,74 \pm 1,18 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$).

Há relatos na literatura de estudos que avaliam a necessidade da utilização de marcadores de permeabilidade para garantir que a sonda inserida no brônquio está em contato com o PELF. No monitoramento do PELF a sonda de microdiálise é colocada no lúmen brônquico, relativamente rígido, e que se encontra em constante movimento devido ao ciclo respiratório. Assim, a utilização de um marcador permitiria aumentar a exatidão do método e garantir que a membrana da sonda está posicionada corretamente, apesar do ciclo

respiratório (BALDWIN; HONEYBOURNE & WISE, 1992; TYVOLD *et al.*, 2007, 2010). Em 2007, Tyvold e colaboradores investigaram possíveis marcadores de permeabilidade para a microdiálise brônquica de porcos, incluindo ureia, lactato e isocianato fluoresceína-dextran (FD-4). Os estudos de microdiálise brônquica com utilização de marcadores de permeabilidade e de lesão ou contaminação foram realizados em animais de médio porte (porcos). Poucos são os relatos sobre a utilização desses marcadores em roedores, o que pode ser devido ao reduzido número de estudos realizados nessa espécie ou a não necessidade de sua utilização (TYVOLD *et al.*, 2010). Até o momento, dois estudos que aplicam microdiálise brônquica em roedores não utilizaram esses marcadores (EISENBERG *et al.*, 1993 e ZHANG *et al.*, 2010) e um estudo utilizou ureia como marcador endógeno (AOKI *et al.*, 2008).

4 Farmacoterapia antimicrobiana

A estratégia adotada para o tratamento de processos infecciosos consiste em implementar medidas profiláticas, erradicação da infecção ou supressão da infecção crônica (FLUME & VANDEVANTER, 2014). O tratamento das infecções causadas por bactérias formadoras de biofilmes faz uso das mesmas doses de antimicrobianos que são utilizadas no tratamento dos processos ocasionados por bactérias planctônicas, não-formadoras de biofilmes. Entretanto, o biofilme funciona como mecanismo de tolerância aos antimicrobianos devido a sua heterogeneidade (CIOFU *et al.*, 2017) de maneira que concentrações insuficientes do fármaco são atingidas no sítio alvo. Além disso, os biofilmes possuem camadas de células em diferente situação de atividade metabólica e as células em estado de latência, à medida que o tratamento é descontinuado visto a evolução positiva do paciente, levam à recidiva da infecção (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011; RYBTKE *et al.*, 2015). Ainda, os antimicrobianos podem se ligar aos componentes da matriz ou da própria membrana dos microrganismos inativando o fármaco e diminuindo sua penetração no biofilme (CIOFU *et al.*, 2014). É sabido também que os genes responsáveis pelo desenvolvimento de resistência acabam sendo expressos no biofilme e não na fase planctônica do microrganismo (FRICKS-LIMA *et al.*, 2011; ELKHATIB & NOREDDIN, 2014).

Segundo a revisão de Ciofu e colaboradores (2017), para cada classe de antimicrobianos alguns fatores específicos são mais importantes para o desenvolvimento de tolerância, seja física, fisiológica ou adaptativa, por parte dos biofilmes. No caso das fluoroquinolonas, a tolerância física por parte da matriz não tem impacto tão relevante como ocorre com os β -lactâmicos, que tem sua difusão parcialmente prejudicada. Entretanto, a atividade das fluoroquinolonas é fisiologicamente afetada por condições de anaerobiose, e adaptativamente em função do aumento da expressão das bombas de efluxo em resposta a ação do antimicrobiano. Aminoglicosídeos, seguindo a mesma lógica, teriam prejuízos tanto na difusão, quanto diante de células que não estão em divisão, bem como por influência de bombas de efluxo. Dessa forma, a combinação de dois ou mais antimicrobianos torna-se ideal para atuar em diferentes frentes a fim de erradicar a infecção.

Uma das estratégias para o tratamento de infecções por biofilmes é a administração de adjuvantes que atuem no processo de formação dos biofilmes, seja utilizando moléculas quelantes, inibidores de bombas de efluxo, enzimas ou inibidores de *quorum sensing* em associação com o antimicrobiano (FLUME & VANDEVANTER, 2014; CIOFU *et al.*, 2015).

Em pacientes fibrocísticos, as doses adotadas para o tratamento são diferenciadas em relação a pacientes não portadores da doença. Preconiza-se a prevenção da colonização, pois uma vez que a infecção por *P. aeruginosa* crônica, raramente é erradicada, visto a formação de biofilmes e consequente dificuldade em atingir as concentrações efetivas do antimicrobiano na mucosa respiratória (CANTÓN *et al.*, 2015). O tratamento nesse caso envolve combinação de diferentes antimicrobianos bem como distintas vias de administração (intravenosa, inalatória e oral). Dentre os esquemas posológicos tem-se, por exemplo, a utilização de tobramicina inalatória por 28 dias associada a ciprofloxacino por via oral (30 mg/kg/dia) (DAS; KABRA & SINGH, 2013). No tratamento das exacerbações (quadros agudos) a terapia empírica baseada no teste de sensibilidade *in vitro* nem sempre corresponde à realidade *in vivo*, dessa forma, são utilizadas associações de dois antimicrobianos com distintos mecanismos de ação como, por exemplo, β -lactâmicos antipseudomonas associados a fluoroquinolonas (CANTÓN *et al.*, 2015).

Atualmente não existem tratamentos específicos para erradicar infecções pulmonares com biofilmes. A maioria dos tratamentos busca melhorar a qualidade de vida do paciente em caso da impossibilidade de erradicação bacteriana (CIOFU *et al.*, 2014).

5 Ciprofloxacino

O ciprofloxacino faz parte da classe das fluoroquinolonas de segunda geração, tendo boa penetração pulmonar inclusive no PELF. Atua inibindo as enzimas bacterianas DNA girase e DNA topoisomerase IV, de modo a impedir a replicação do DNA de bactérias gram-negativas e gram-positivas (TORGE *et al.*, 2017). Atua de forma concentração-dependente, ou seja, sua eficácia está relacionada à relação entre área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo e a concentração inibitória mínima (ASC_{24h}/MIC) (VAN BAMBEKE *et al.*, 2005; KENTARCHOS, 2006; CIPOLLA; BLANCHARD & GONDA, 2016).

O ciprofloxacino, de modo geral, atravessa o epitélio por via transcelular, por difusão simples e difusão facilitada (ONG *et al.*, 2013). Alguns transportadores de membrana contribuem para que o ciprofloxacino permeie o epitélio pulmonar. A presença desses é um fator importante quando se busca estabelecer regimes posológicos que atinjam concentrações adequadas do fármaco na região em que ocorre o processo infeccioso. No estudo de ONG e colaboradores (2013) foram investigados, através de modelos *in vitro* utilizando células Calu-3, possíveis transportadores de efluxo e influxo envolvidos no transporte do pulmonar do ciprofloxacino. O estudo demonstrou pela primeira vez a influência de transportadores de influxo como transportadores de cátions orgânicos (OCTs) e polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs) na absorção do fármaco através do epitélio pulmonar. A utilização de moléculas inibidoras da P-gp e da proteína de resistência a múltiplos fármacos (MRP) comprovou que o ciprofloxacino sofre também efluxo por meio destes transportadores, embora em menor magnitude que o influxo.

Na clínica, o ciprofloxacino é administrado por via intravenosa ou oral para infecções respiratórias tanto de patógenos extracelulares quanto intracelulares. Dentre outras aplicações, atua evitando o declínio da função respiratória de pacientes fibrocísticos com pneumonias causadas por *P.*

aeruginosa, sendo o antimicrobiano mais ativo contra esse microrganismo (VAN BAMBEKE *et al.*, 2005; ONG *et al.*, 2013).

Como indicado nos objetivos, neste trabalho a microdiálise pulmonar e brônquica serão utilizadas para melhor entender a influência da infecção por *P. aeruginosa* formadora de biofilme na penetração do CIP em animais com pneumonia aguda e crônica.

PROPOSTA DE ARTIGO

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

LOCK, G. A.^{a,b}; TORRES, B.G.S.^{a,b}; CARREÑO, F.O.^{a,b}; MACEDO, A.J.^{a,c};
DALLA COSTA, T.^{a,b*}

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

^bPharmacokinetics and PK/PD Modeling Lab, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratory of Biofilms & Microbial Diversity, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author address:

Teresa Dalla Costa

Federal University of Rio Grande do Sul

College of Pharmacy

Pharmaceutical Sciences Graduate Program

Av. Ipiranga, 2752 – 90610-000 – Porto Alegre, RS – Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5418

E-mail: dalla.costa@ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-forming chronic infection reduces ciprofloxacin (CIP) pulmonary penetration to one-fourth of that observed in healthy rodents. This reduction could be due to drug's larger distribution into pulmonary epithelial lining fluid (PELF), as a response to increased tissue permeability associated to the presence of biofilm, among other factors. **Aim:** To verify this hypothesis by comparing CIP PELF free concentrations reached in acutely and chronically infected lung with those in pulmonary interstitium. **Methods:** Acute pneumonia (2 days) was developed by Wistar rats intratracheal inoculation with 10^8 CFU/mL of non-mucoid biofilm-forming *P. aeruginosa* (PA14) while chronic infections (14 days) was developed by inoculation of beads impregnated with mucoid *P. aeruginosa* ATCC 27853 (10^7 CFU/mL). Plasma, pulmonary and bronchial (PELF) pharmacokinetic investigation was conducted following CIP 20 mg/kg i.v. *bolus* dosing. Microdialysis probes (CMA 20[®]) were used to evaluate free pulmonary and bronchial concentrations. Non-compartmental analysis was conducted using Phoenix[®] software and pharmacokinetic parameters statistically compared by ANOVA (Graphpad[®]) ($\alpha = 0.05$). **Results:** With exception of volume of distribution, the acute infection resulted in CIP intermediate plasma parameters between those observed for healthy and chronically infected animals. Significant reduction of clearance was observed only in chronically infected animals. Lung penetration was progressively reduced with infection, with pulmonary tissue penetration factor reducing 1.5-fold in acutely infected ($fT = 1.02$) and a 4-fold in chronically infected ($fT = 0.44$) animals in comparison to healthy ones ($fT = 1.69$). PELF concentrations equivalent to 46% of pulmonary interstitial fluid concentrations were observed in healthy and acutely infected animals, while in chronically infected it was increased to 65%. **Conclusions:** These results indicate that the hypothesis is viable. They also confirm that CIP free plasma concentrations are not a good surrogate for free lung concentrations and should not be used for drug adjustment in chronically infected individuals.

Keywords: Ciprofloxacin, bronchial and pulmonary microdialysis, acute and chronic pulmonary infection, biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*.

1. INTRODUCTION

Pneumonia is characterized by an infection of the pulmonary parenchyma originated when pathogens reach the airways through inhalation of contaminated aerosols, haematogenous dissemination, aspiration or after intubation process (BEIGELMAN-AUBRY *et al.*, 2012). The acute phase of the infection starts with pathogen adhesion and colonization of the respiratory epithelium. When the immune system and treatment are not able to eradicate the microorganism, the infection process occurs and could evolve to a chronic phase.

In bacterial pneumonia, the chronic phase can be associated with biofilm-forming microorganisms. Biofilms are bacterial aggregates involved by a self-produced polymeric matrix that protects the bacteria from the host immune response and environmental conditions, such as lack of nutrients (ELKATIB & NOREDDIN, 2014). The biofilm structure impairs the antimicrobial treatment due to factors as matrix constitution, efflux pumps and bacterial cells with different degrees of metabolic activity. When bacteria express the biofilm phenotype, the minimum inhibitory concentration (MIC) can be about 100 to 1000 times greater than the planktonic form leading to difficulties for pathogen eradication (DONLAN *et al.*, 2002; CATALDI *et al.*, 2014).

Currently, the dose regimen used to treat biofilm infections is the same used for treating bacteria in the planktonic phenotype, exposing biofilms to drug levels below those necessary for their eradication (DHANANI *et al.*, 2010). To better select a rational dosing regimen for biofilm infections, the knowledge of the unbound (F_u) antimicrobial concentrations at the target tissue are of essential importance. Unbound concentrations are responsible for antimicrobial's pharmacological effect and plasma free concentrations are used as surrogate for free tissue concentrations. At the target tissue, however, influx and/or efflux transporters contribute to increase or decrease free drug concentrations and could lead to therapeutic failure (DHANANI *et al.*, 2010; ROTTBOLL & FRIIS, 2014; ZIMERMANN, *et al.*, 2015b). Additionally, in infected tissues drug penetration can be alter, once infection can change local temperature, pH, vascular permeability. Furthermore, the presence of defense cells at the infection site could increase intracellular drug concentration and

protein binding. Fluoroquinolones, that are amphoteric molecules, can be entrapped inside the cells, leading to decreased free fraction at tissue target (MARTINEZ *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2017).

To measure pulmonary concentrations, bronchoalveolar lavage (BAL), direct aspiration, tissue homogenate, sputum and bronchial secretions could be analyzed. These techniques have the disadvantages of measuring total drug concentration (bound and unbound to proteins) leading to an overestimation of effective concentrations at the infection site due to contamination of intracellular fluid, cells and other secretions (KENTARCHOS *et al.*, 2006; TYVOLD *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2013). In this context, microdialysis (MD) is a tool for monitoring free unbound pulmonary concentrations, allowing a better comprehension of tissue distribution in healthy and infected targets.

Recently, our research group started the investigation of the influence of biofilm infection on ciprofloxacin (CIP) lung penetration in a chronic pulmonary infection model with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-forming (ATCC 27853) strain (TORRES *et al.*, 2017). It was observed that the tissue penetration factor was almost 4 times reduced in the chronically infected rodents ($fT = 0.44$) in comparison to the healthy rodents ($fT = 1.69$). CIP concentrations were determined by microdialysis at the interstitial fluid, and the authors hypothesized that the reduction observed in the interstitial concentrations in the chronically infected group could be due to drug's large distribution into pulmonary epithelial lining fluid (PELF), as a response to increased tissue permeability associated to the presence of biofilm.

In this context, the aim of this study was to compare CIP PELF concentrations reached in chronically infected animals with those in pulmonary interstitium previously obtained by Torres *et al.* (2017), in order to verify that hypothesis. Since concentrations achieved in PELF at the acute phase of infection are responsible for inhibition of bacterial adhesion and the following tissue invasion (ZEITLINGER; MÜLLER & JOUKHADAR, 2005; KENTARCHOS *et al.* 2006), this study also investigated the influence of biofilm-forming bacterial infection on CIP interstitial and PELF concentrations of acutely infected rats.

2. MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain, chemicals, and solutions. *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 and ATCC 27583 strains were used in this study. Mueller Hinton broth was purchased from Himedia (Mumbai, India), agar Mueller Hinton was purchased from Kasvi (Curitiba, Brazil). Ciprofloxacin (purity \geq 98.0%), levofloxacin (internal standard - IS, purity \geq 98.0%), urethane (ethyl carbamate, purity \geq 99.0%) and alginic acid sodium salt from brown algae (CAS 9005-38-3) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Heparin was purchased from Blausiegel (São Paulo, Brazil). Ringer's solution consisted of 147 mM NaCl, 1.3 mM CaCl₂ and 4 mM KCl. Sodium chloride, calcium chloride and potassium chloride were of analytical reagent grade and purchased from commercial sources. Ciprofloxacin was prepared in saline solution (10 mg/mL) with addition of few drops of 0.1 HCl, and the pH was adjusted to 5.5 ± 0.5 prior to administration to the animals. Tiopental, lidocain, xilazin and ketamin were purchased from commercial sources. HPLC Ultrapure water was obtained through Millipore Milli-Q system grade (Millipore®, Billerica, USA) was used throughout the analyses. Triethylamine for synthesis, phosphoric acid 85% P.A and HPLC grade methanol and acetonitrile were purchased from MERCK (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland).

Animals. The study protocols were approved by the Ethics in Animal Use Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (protocol #31651). Male Wistar rats (weight 250-350 g) were purchased from the University animal's facilities (CREAL, Porto Alegre, Brazil). Animals were housed under controlled temperature and humidity with a 12-h light/dark cycles. Food and water were provided *ad libitum* until the start of the experiments.

Acute Infection by *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 procedure. *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 inoculum was prepared according to the methodology previously described (JOHANSEN *et al.*, 1994; Van HEECKEREN *et al.*, 2006; ANTONELLI *et al.*, 2017). Briefly, 10 μ L of frozen strain in skin milk at -80 °C were plated in a Mueller Hinton agar plate and incubated for 18 h at 37 ± 1 °C. After incubation, the inoculum was prepared by suspending a

bacterial loop in saline. The suspension was read in spectrometer at 625 nm and adjusted to an absorbance of 0.500. One fraction of the inoculum was incubated in Mueller Hinton broth at 37 ± 1 °C for 2 h to reach bacteria's log-growth phase (ANTONELLI *et al.*, 2017). Next, the broth was centrifuged in 1800 g for 15 min and the pellet was resuspended in saline. This procedure was repeated twice. The bacterial pellet formed was resuspended in saline solution at 37 ± 1 °C. The inoculum in the log-growth phase read once again at 625 nm and adjusted to an absorbance of 0.350, approximately before administering to the animals. The number of colony forming units (CFU) in the inoculum was confirmed by plating and counting one day after administration (4×10^8 CFU/mL). For the intratracheal inoculation an adaptation of the method described in literature was used (MUNDER *et al.*, 2011; ANTONELLI *et al.*, 2017). The animals were anesthetized with ketamine and xylazine solution (70 mg/kg + 10 mg/kg) and were positioned in an inoculation support followed by teeth fixation. With a spatula the tongue was immobilized for the localization of the air entrance. By positioning a flashlight in the region of the animal's neck it was possible to identify the trachea like a luminous and moving point inside the larynx. Then a flexible arterial 18-gauge catheter was inserted on the trachea and approximately 150 μ L of the inoculum were instilled directly into the respiratory tree, observing the velocity of the administration to avoid alveoli rupture. Rapidly the inoculum syringe was removed and a syringe containing 100 μ L of air was positioned in the catheter, and this volume of air was administered to guarantee that all inoculum was administered. After the inoculation, the animal was rapidly removed from the apparatus and positioned lying on its side at 45 degrees inclination to recover from anesthesia.

Lungs acutely infected were analyzed microscopically 2 days after inoculation (n = 2 animals). The histopathological analysis was conducted by veterinary pathologists (Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil). Pharmacokinetic experiments were conducted 2 days after bacterial inoculation.

Chronic Infection by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 procedure.

For chronic infection, the protocol previously described by Torres *at al.* (2017) was used. In this model, agar-bead embedded with bacteria was utilized. The

preparation of inoculum consisted of mixing 1 mL of the *P. aeruginosa* ATCC 27853 inoculum (10^9 CFU/mL) with 9 mL of a sterile alginate solution (11 mg/mL). The viscous suspension was sprayed by compressed air into a cross-linking solution of 0.1 M CaCl₂ in TRIS-HCl buffer (0.1M, pH 7.0). The newly formed beads (around 488 μ m) were cured for 1 h in the calcium bath with continuous stirring, after which they were centrifuged at 180 g for 10 min and washed twice in sterile saline. The inoculation procedure was the same described for acute infection. After inoculation, the animals were maintained for 14 days under standard conditions before the start of the pharmacokinetic experiments.

Ciprofloxacin quantification in rat plasma and microdialysate. Ciprofloxacin concentration in microdialysate and plasma samples were assayed by a slightly modified method of Zimmermann *et al.* (2015) as described below. Briefly, plasma samples were spiked with 10 μ L of internal standard (levofloxacin, 5000 μ g/mL) followed by protein precipitation with ice-cold solution of methanol with 0.5% formic acid. After centrifugation, supernatant was used for analysis. The microdialysates samples were analyzed without pre-treatment.

Analysis were performed on HPLC/fluorescence using a C18 column (Phenomenex Gemini 150 x 4.6 mm, particle size 5 μ m; Torrance, USA) coupled to a C18 guard cartridge (Phenomenex 4.0 x 3.0 mm, particle size 4 μ m, Torrance, USA). For plasma samples, the mobile phase consisted of a 0.4% aqueous triethylamine solution (pH 3.0 ± 0.1), acetonitrile and methanol (85:5:10 v/v/v). The temperature of the oven was adjusted to 37 ± 1 °C during analysis and the volume of injection was 20 μ L. Drugs were quantified by fluorescence at excitation and emission wavelengths of 278 nm and 453 nm, respectively. The peak area ratio of CIP/IS was used to quantify the samples. For microdialysis samples were used the same mobile phase components with a modified proportion (0.4% aqueous triethylamine solution (pH 3.0 ± 0.1)/acetonitrile/methanol, 85:10:5 v/v/v). CIP's peak area was used for quantification.

The method was validated in the concentration range of 15.0 - 2000 ng/mL for plasma and 7.5 - 1000 ng/mL for microdialysate. The limit of quantification was 15.0 ng/mL and 7.5 ng/mL for plasma and microdialysate.

The method was precise (RSD \leq 5.46% for microdialysate and \leq 10.88% for plasma) and accurate (RE 105.65% – 112.94% for microdialysate and RE 104.48 – 111.93% for plasma).

Microdialysis system. For MD, CMA/20 probes (pulmonary probe: membrane length, 4 mm; shaft 30 mm; bronchial custom-made probe: membrane length, 2 mm; shaft 70 mm; *cut-off* 20 kDa; CMA Microdialysis, Kista, Sweden) were used. The probes were coupled to a microliter syringe (500 μ L, Hamilton®, Reno, USA) to perfuse the Ringer's solution using a PHD 2000 syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, USA).

***In vitro* calibration of microdialysis probes.** CIP relative recovery of CMA/20 probes used for the investigation of drug pulmonary concentrations were previously investigated by dialysis and retrodialysis (ZIMMERMAN *et al* (2015a)). In the present study, the influence of perfusion fluid flow rate and CIP concentration on relative recovery (RR) of custom-made bronchial MD probe was investigated.

For dialysis, the MD probes ($n = 2$) were placed in a tube containing CIP in Ringer solution at 0.75 μ g/mL. Blank Ringer's solution was pumped through the probe at 1.5 μ L/min and five samples of 45 μ L each were collected every 30 min, and analyzed by the HPLC/fluorescence. Equation 1 was used to calculate the relative recovery by dialysis (RR_D , in percent):

$$RR_D = \frac{C_{dial}}{C_{ext}} \times 100 \quad (1)$$

where C_{dial} is CIP's concentration in the microdialysate and C_{ext} is the concentration in the medium surrounding the probe.

For retrodialysis, the MD probes ($n = 2$) were placed in a tube containing blank Ringer's solution and CIP at 0.75 μ g/mL in Ringer was pumped through the probes at the same flow rate and five samples of 45 μ L each were collected every 30 min. Relative recovery by retrodialysis (RR_{RD} , in percent) was determined using Equation 2:

$$RR_{RD} = 100 - \left(\frac{C_{dial}}{C_{perf}} \right) / C_{perf} \times 100 \quad (2)$$

where C_{dial} is the concentration of CIP sampled and C_{perf} is the concentration in the perfusate solution.

***In vivo* calibration of microdialysis probes.** Retrodialysis was conducted for CIP recovery *in vivo*. The rodents were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.) and the pulmonary and bronchial probes inserted as described above. The probes were prefunded with Ringer's solution containing CIP at 0.75 µg/mL at 1.5 µL/min, and five samples of 45 µL each were collected every 30 min. The recovery was calculated using Equation 2. The mean *in vivo* recoveries for both probes were utilized to correct free drug concentration of each experiment (PELF and pulmonary).

Pharmacokinetic experiments design. To determine CIP plasma (n = 11) and pulmonary free concentrations (n = 8) in acutely infected animals, male Wistar rats were inoculated with PA 14 strain two days before CIP administration. To determine CIP PELF concentrations, the animals were distributed in four groups: healthy (n = 5), blank beads (n = 5), acute (n = 5) and chronic (n = 8) infected. Plasma and pulmonary data from healthy, blank beads and chronically infected animals (n = 6/group) were obtained from previous work (TORRES *et al.*, 2017).

Plasma pharmacokinetics experiments. For the plasma experiments, the acutely infected Wistar rats were anesthetized with ethyl carbamate (1.25 g/kg i.p.) before surgery. The carotid arteria was cannulated and the CIP 20 mg/kg was administrated via i.v. *bolus* injection. Blood samples were collected into heparinized tubes at 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, and 720 min after dosing and plasma samples were processed for CIP quantification as described.

Pulmonary microdialysis experiments. For pulmonary microdialysis experiments, the acutely infected Wistar rats were anesthetized (ethyl carbamate 1.25 mg/kg, i.p.), and the trachea was isolated to connect the animals to a rodents ventilator (Harvard®, frequency - 64-68 min⁻¹, air volume - 2.5 mL). The right lung was exposed with an incision between two ribs and the MD probe was inserted on the intermediate lobe through a hole made with a needle. The probe was perfused with Ringer solution at 1.5 µL/mL flow. After 60 min for probe stabilization, CIP 20 mg/kg was administered as i.v. *bolus* via

femoral vein. Microdialysate samples were collected every 30 min for 12 h after dosing to characterize the pulmonary profile.

Bronchial microdialysis experiment. For bronchial microdialysis experiments, Wistar rats were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.). The trachea was isolated and an incision was made between two cartilaginous tracheal rings for probe insertion. The probe was inserted directly on the trachea until it reached the primary bronchi. The extent of the insertion was determined according to a pilot study and observing the rodent's breath patterns. This procedure did not require animal intubation, no changes were observed in the respiratory patterns given the insertion of the probe. After insertion, probes were perfused with Ringer's solution at 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate during 60 minutes, for the probe stabilization. CIP 20 mg/kg i.v. *bolus* via femoral vein was administered and the bronchial microdialysate samples were collected every 30 min for 12 h. At the end of each experiment, animals were euthanized with thiopental and lidocaine (100 mg/kg + 10 mg/kg) and dissected to verify the positioning of the probe at the primary bronchus.

Pharmacokinetic and statistical analysis. The pharmacokinetic parameters were determined in plasma and tissue by non-compartmental approach (NCA). Each animal concentration *versus* time profile was individually analyzed using Phoenix[®] WinNonlin software (Certara[®], Princeton, USA). For microdialysate samples, the midpoint of the collection interval was used as the time of the data collection, assuming that the concentration determined was the average concentration of the interval. The pharmacokinetic parameters determined were elimination rate constant (λ), half-life ($t_{1/2}$), area under the concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$), total clearance (CL), volume of distribution at steady state ($V_{d_{ss}}$) and mean resident time (MRT). The drug penetration factor (f_T) was determined as the ratio between the mean free lung tissue and the mean free plasma area under the concentration-time curve from time zero to infinity ($f_T = \text{AUC}_{0-\infty, \text{free, tissue}} / \text{AUC}_{0-\infty, \text{plasma}} \cdot f_u$), where f_u is the free fraction in plasma, assumed to be 0.70 (TORRES, *et al.*, 2017). The pharmacokinetic parameters were compared among groups by one-way ANOVA using Graphpad[®] ($\alpha = 0.05$).

3. RESULTS

Acute model of lung infection. The animal model was capable of sustaining the infection for two days. After this period, bacterial concentration was below the limit of quantification due to pulmonary clearance. According with literature, a two days infection model resembles an acute pulmonary infection (BRAGONZI, 2010).

The histopathological analysis allowed verifying that an accentuated inflammatory infiltrate composed of neutrophils, macrophages, lymphocytes and occasional eosinophils associated to fibrillar eosinophilic material was produced inside the alveoli, bronchioles and interior of vessels. A diffuse and accentuated hyperemia and intra alveolar multifocal hemorrhage were observed characterizing a pronounced purulent bronchopneumonia (Fig. 1 a to d).

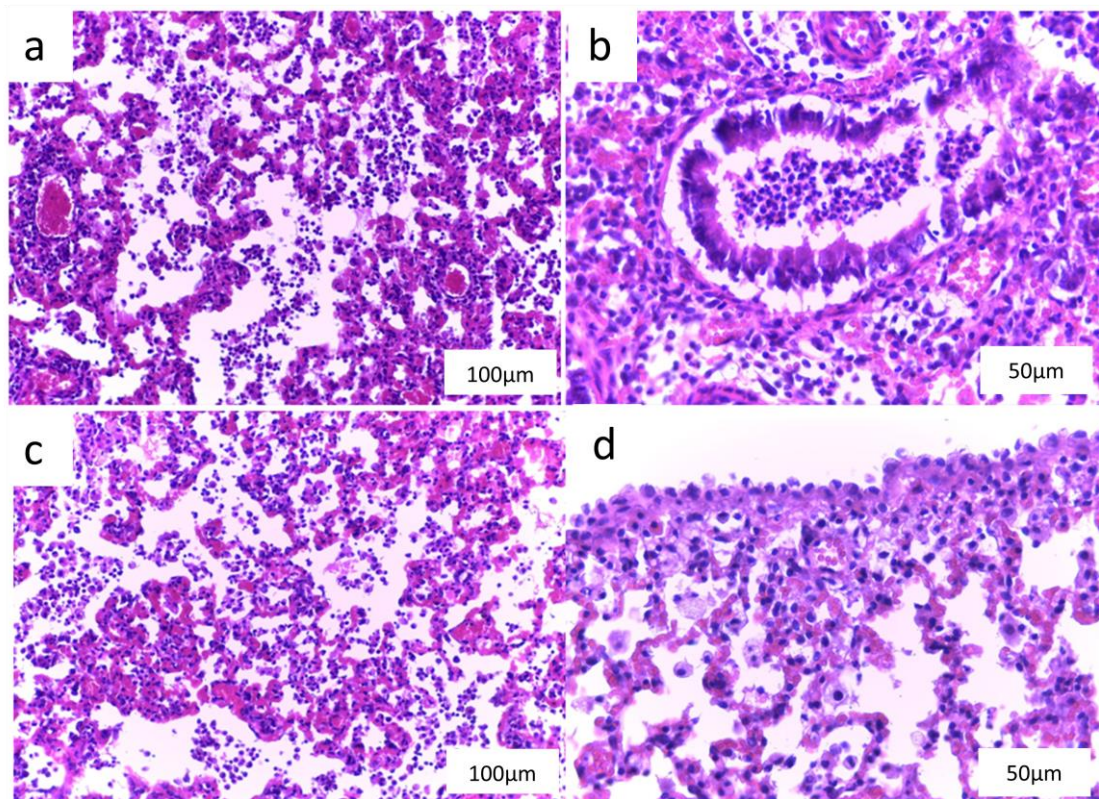


Figure 1. Lung pathohistology photomicrographs. Sections of lungs from acutely infected rats (n = 2) inoculated with *P. aeruginosa* PA 14 after 48h stained with hematoxylin-eosin. Panels a and b refer to animal 1; panels c and d to animal 2, both with purulent bronchopneumonia.

***In vitro* and *in vivo* calibration of microdialysis probes.** The best perfusion flow rate for probes calibration were chosen previously (TORRES *et al.*, 2017) were it was shown that CIP relative recovery is independent of drug concentration and drug binding to probe tubing's is negligible. For *in vitro* calibration of pulmonary CMA/20 MD probes similar recoveries were observed for dialysis ($RR_D = 33.2 \pm 2.3\%$) and retrodialysis ($RR_{RD} = 34.8 \pm 1.5\%$) ($\alpha = 0.05$), corroborating results already reported. The *in vivo* pulmonary probe recovery by retrodialysis was $13.9 \pm 3.3\%$ and this value was used to calculate the lung true free levels measured during MD experiments.

For the bronchial CMA/20 custom-made microdialysis probes the mean relative recovery by dialysis ($RR_D = 18.4 \pm 4.6\%$) and by retrodialysis ($RR_{RD} = 19.4 \pm 2.9\%$) were also statistically similar ($\alpha = 0.05$). The custom-made bronchial CMA/20 probe recovery was lower than that of the CMA/20 pulmonary recovery due to the reduction on the membrane length (from 4 to 2 mm). The *in vivo* probe recovery by retrodialysis was $5.8 \pm 1.8\%$ and this value was used to calculate the bronchi true free levels.

Non-compartmental analysis. CIP total plasma profiles after i.v. *bolus* dosing of 20 mg/kg are shown in Figure 2 for the healthy, acutely and chronically infected groups. Table 1 shows the pharmacokinetic parameters determined for these groups. The $AUC_{0-\infty}$ of chronic group ($27.3 \pm 12.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) was statistically different from the exposition observed for acutely infected ($16.8 \pm 4.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and healthy ($13.3 \pm 3.5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) groups, which did not present statistical differences. A tendency of increasing CIP plasma exposition with the evolution of infection stages was observed resulting in a significant higher exposition in chronically infected animals. In the same way, a tendency of increasing MRT and half-live and reducing total plasma clearance was observed with the progression of infection. Although not statistically significant, the acute infection resulted in pharmacokinetic parameters levels intermediate between healthy and chronically infected stages. The volume of distribution was the only parameter where this tendency was not observed.

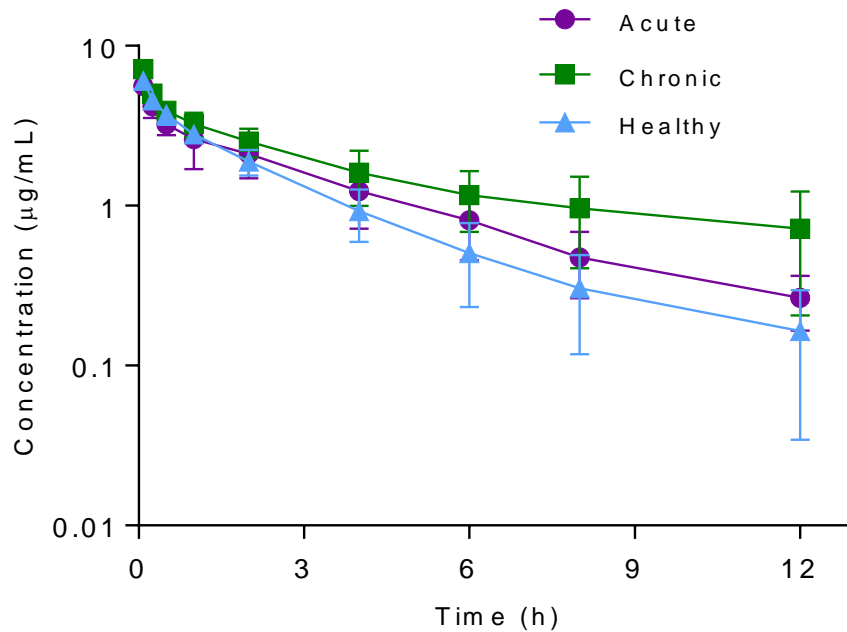


Figure 2. CIP mean total plasma profiles after 20 mg/kg i.v. *bolus* dosing to healthy (n = 6), acutely (n = 11) and chronically (n = 6) infected Wistar rats (Mean \pm S.D.).

Table 1. CIP pharmacokinetic parameters determined in plasma after 20 mg/kg i.v. *bolus* dosing to healthy, chronically and acutely *P. aeruginosa* infected Wistar rats determined by NCA.

PK Parameters	Healthy* (n = 6)	Acutely Infected (n = 11)	Chronically Infected* (n = 6)
λ (h ⁻¹)	0.23 \pm 0.04	0.18 \pm 0.08	0.14 \pm 0.08
t _{1/2} (h)	3.1 \pm 0.8	4.5 \pm 2.1	5.9 \pm 2.7
AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	13.3 \pm 3.5	16.8 \pm 4.3	27.3 \pm 12.1 ^{a,b}
MRT (h)	3.4 \pm 1.2	5.45 \pm 2.1	7.8 \pm 3.9 ^a
CL (L/h/kg)	1.59 \pm 0.41	1.27 \pm 0.32	0.89 \pm 0.44 ^a
Vd (L/kg)	5.1 \pm 0.7	6.7 \pm 2.7	5.6 \pm 1.1

*Parameters from TORRES *et al.*, 2017.

^aStatistical difference detected by one-way ANOVA with Tukey's test compared to healthy group ($\alpha = 0.05$). ^bStatistical difference detected by one-way ANOVA with Tukey's test compared to acute group ($\alpha = 0.05$). Data represent mean \pm S.D., $fT = AUC_{\text{tissue}}/AUC_{\text{plasma-fu}}$; fu = 0.7)

Figure 3 shows the free pulmonary concentration time profiles for blank beads, healthy and infected animals while Table 2 shows the calculated pharmacokinetic parameters for all groups investigated. It can be seen that the use of blank beads did not interfere with CIP lung tissue distribution and elimination indicating that the presence of alginate does not interfere with the drug pharmacokinetics parameters. Furthermore, free pulmonary concentrations half-life was similar in all groups investigated. The AUC was statistically different between healthy and chronically infected groups. Acute infection did not produce a significant reduction on CIP pulmonary exposure. An intermediate exposure to CIP, between healthy ($AUC_{0-\infty\text{healthy}} = 15.8 \pm 6.6 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and chronically infected ($AUC_{0-\infty\text{chronic}} = 8.4 \pm 1.8 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$), was observed in acutely infected animals ($AUC_{0-\infty\text{acute}} = 12.1 \pm 5.3 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$).

No significantly differences in lung elimination constant (λ) were observed among groups ($\lambda_{\text{healthy}} = 0.23 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$; $\lambda_{\text{blank bead}} = 0.22 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$; $\lambda_{\text{acute}} = 0.17 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$; $\lambda_{\text{chronic}} = 0.22 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$). The tissue penetration factor observed in the infected groups ($fT_{\text{acute}} = 1.02$; $fT_{\text{chronic}} = 0.44$) was lower than that found in healthy and blank beads groups ($fT_{\text{healthy}} = 1.69$; $fT_{\text{blank bead}} = 1.63$).

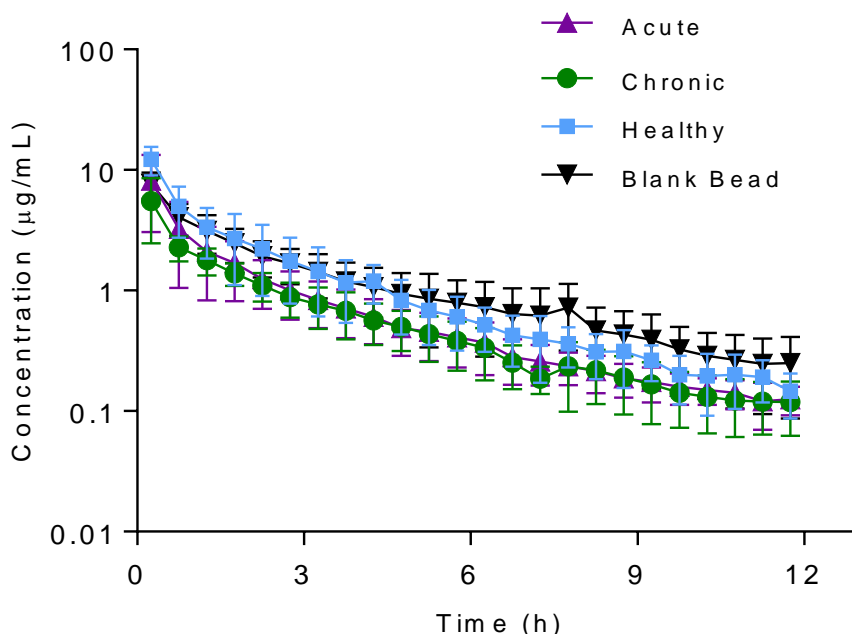


Figure 3. CIP profiles determined in pulmonary tissue after 20 mg/kg i.v. bolus dosing to healthy (n = 6), acutely (n = 8), chronically (n = 6) infected Wistar rats and blank beads group (n = 6) (mean \pm S.D.).

CIP free bronchial concentration *versus* time profiles are presented in Figure 4. The respective pharmacokinetic parameters are presented in Table 2. In average, acutely infected group showed slightly lower free CIP bronchial levels than the other groups allowing for drug quantification in microdialysate samples only up to 6 h after dosing while the other groups drug quantification could be carried out up to 12 h. CIP pharmacokinetic parameters determined for acutely and chronically infected groups, however, were statistically similar to those determined for healthy and blank bead groups (Table 2) indicating that the infection does not produce alterations on CIP bronchial disposition and elimination. The variability of free bronchial concentrations observed, reflected in the standard deviation of the parameters estimated, can be attributed to the local of probe insertion and the lung movement due to breathing that can reposition the probe constantly, differently from the pulmonary site where the probe is kept more immobilized.

CIP penetration factor to both lung sites investigated were determined assigning drug plasma free fraction of 70% (TORRES *et al.*, 2017). Table 2 shows that blank beads did not change pulmonary or bronchial tissue penetration factors in comparison to the penetration observed in healthy animals. CIP presents two higher distribution into healthy pulmonary tissue ($f_T = 1.69$) than into PELF ($f_T = 0.78$). A tendency of reducing CIP tissue penetration factor in both lung sites was observed with the progression of infection. These results corroborate the tendency of reduction of tissue exposition with the evolution from acute to chronic infection in pulmonary tissue. Pulmonary interstitial penetration was reduced in average to 60% and 26% in acute and chronic infection in comparison to healthy tissue, while PELF penetration was reduced to 60% and 36% with infection evolution.

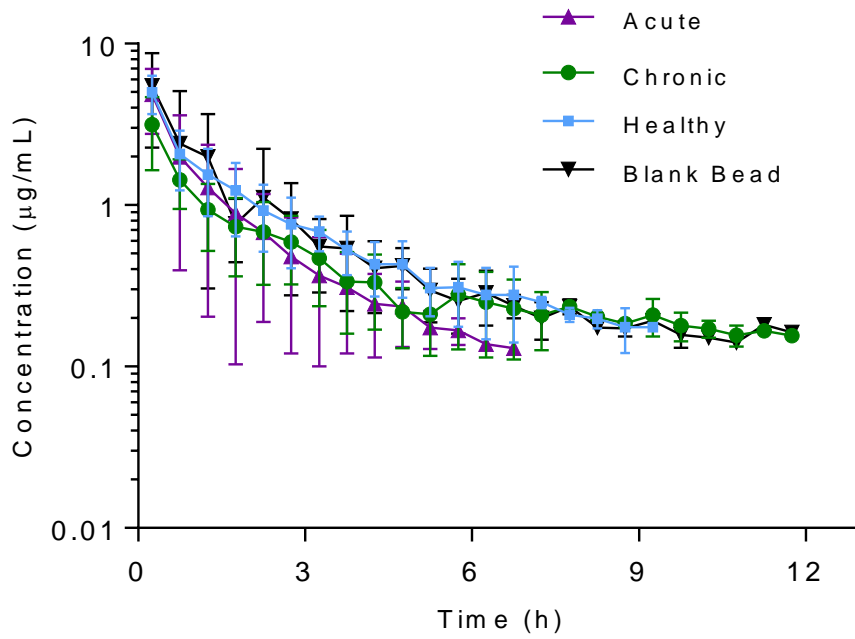


Figure 4. CIP profiles determined in bronchi after 20 mg/kg i.v *bolus* dosing to healthy (n = 5), acutely (n = 5), chronically (n = 8) infected Wistar rats and blank bead group (n = 5) (mean \pm S.D.).

Table 2. CIP pharmacokinetic parameters determined in pulmonary tissue and bronchi after 20 mg/kg i.v *bolus* dosing to Wistar healthy and *P. aeruginosa* infected rats determined by NCA.

PK Parameters	Pulmonary Microdialysis				Bronchial Microdialysis			
	Healthy* (n = 6)	Acutely Infected (n = 8)	Chronically Infected* (n = 6)	Blank Beads* (n = 6)	Healthy (n = 5)	Acutely Infected (n = 5)	Chronically Infected (n = 8)	Blank Beads (n = 5)
λ (h ⁻¹)	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0.30 ± 0.10	0.38 ± 0.15	0.25 ± 0.12	0.21 ± 0.08
t _{1/2} (h)	3.0 ± 0.4	4.5 ± 1.7	3.3 ± 0.8	3.3 ± 0.7	2.6 ± 0.9	2.1 ± 0.8	4.9 ± 2.0	4.2 ± 2.7
AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	15.8 ± 6.6	12.1 ± 5.3	8.4 ± 1.8 ^{a,b}	15.2 ± 5.9	7.3 ± 2.4	5.6 ± 3.3	5.4 ± 2.2	8.6 ± 5.1
fT	1.69	1.02	0.44	1.63	0.78	0.48	0.28	0.92

*Parameters from Torres *et al.*, 2017.

^aStatistical difference by one-way ANOVA with Tukey's test compared to MD lung healthy group ($\alpha = 0.05$).

^bStatistical difference by one-way ANOVA with Tukey's test compared to MD lung blank beads group ($\alpha = 0.05$).

fT = AUC_{free,tissue}/AUC_{plasma}.fu; fu = 0.7. Data represent Mean ± S.D.

4. DISCUSSION

In the present study, we evaluate CIP PELF concentrations in chronically and acutely infected rodent's lung using animal models of infection with biofilm-forming strains of *P. aeruginosa*. Furthermore, CIP pulmonary concentrations of chronically infected animal's data obtained from previous study (TORRES *et al.*, 2017) were used to compare with data of acutely infected lungs investigated. It was observed that the stage of infection influences CIP lung distribution in the PELF and in the pulmonary interstitial fluid, with a significant decrease on free drug concentrations in the chronic infection stage.

CIP plasma pharmacokinetics was also investigated using both acute and chronic lung infection models simulating. Although significant differences between CIP pharmacokinetic parameters observed in healthy and acutely infected animals were not found, intermediate parameters between those observed for healthy and chronically infected animals were determined, except for volume of distribution. These results suggest that, with the progression of infection, CIP renal and metabolic routes of elimination are compromised, resulting in a decrease in clearance as previously reported (TORRES *et al.*, 2017).

Although plasma exposure to CIP was increased due to infection evolution, lung penetration was progressively reduced as evidenced by the pulmonary tissue penetration factor that showed a 1.5-fold reduction in acutely infected ($fT = 1.02$) and a 4-fold reduction in chronically infected ($fT = 0.44$) animals in comparison to healthy animals ($fT = 1.69$). Tissue penetration factors greater than 1, as observed for healthy group, suggests the existence of influx transporters carrying the drug from blood to tissue (SAWCHUK & CHEUNG, 2007). Evidences of CIP influx transport in lung, besides passive diffusion, have already been demonstrated *in vitro* (ONG *et al.*, 2013) and *in vivo* (ZIMMERMAN, 2015b). The present results indicate that, with the progression of lung infection from acute to chronic, the influence of physiological alterations related to the diseases such as changes in vascular permeability, tissue pH and blood flow to the lung and migration of defense cells (DHANANI *et al.*, 2010; CIOFU *et al.*, 2015) overcome the effect of the influx transporters, leading to a reduction of free CIP concentrations in pulmonary interstitial fluid. These findings also indicate that CIP free plasma concentrations are not a good surrogate for free

pulmonary concentrations, indicating the need of dose increase to reach effective lung concentrations especially in chronically infected individuals.

The interpretation of CIP distribution to PELF during lung infection is trickier. Torres *et al.* (2017) suggested that the reduction of CIP pulmonary interstitial fluid concentrations on chronically infected animals could be due to its large distribution to PELF, as a response to increased permeability and presence of biofilm. To investigate this hypothesis the bronchial microdialysis was utilized to access the free drug concentrations in the PELF of healthy, blank bead, acutely, and chronically infected groups. For fT calculations, the ratio of $AUC_{0-\infty, \text{tissue}}$ to $AUC_{0-\infty, \text{plasma}} \cdot fu$ was used, with a fraction unbound of 0.70. Similar results to those observed in pulmonary tissue were observed following bronchial microdialysis, when CIP PELF penetration factor was reduced in acutely ($fT = 0.48$) and chronically ($fT = 0.28$) infected animals in comparison with healthy ones ($fT = 0.78$). In the PELF, however, free exposure to CIP was similar in healthy and infected animals as shown in Table 2 by the AUCs calculated, indicating that the reduction of fT is solely related to the increased exposure observed in plasma during infection and not due to CIP bronchial reduced penetration.

In pulmonary infection, the alveolar wall can be disrupted with bacteria invasion to the interstitial space resulting in a pneumonia involving pulmonary interstitial fluid and PELF (FOSTER *et al.* 2016). For antimicrobial penetration into the PELF it is necessary the diffusion across the blood-lung barrier, passing by capillary wall, interstitial space and alveolar wall. Since the alveolar wall is not fenestrated it impairs drug penetration by diffusion, which is strongly dependent on the characteristics of the drugs like lipophilicity and diffusibility (KIEM & SCHENTAG, 2008; DHANANI *et al.*, 2010). However, fluoroquinolones and macrolides, that are lipophilic drugs, can cross easily the alveolar wall (KENTARCHOS, 2006). In this scenario, a more relevant correlation, between free pulmonary and free bronchial exposures, should be contemplated. The bronchial/pulmonary penetration factor shows that healthy and acutely infected animals have free PELF concentrations equivalent to 46% of pulmonary interstitial fluid concentrations, while in chronically infected animals this ratio increases to 65%. In other words, while the infection reduces CIP pulmonary penetration, especially on its chronic stage, CIP concentrations are relatively increased in PELF probably because tissue damage is

established at this stage, although the role of respiratory secretions composition and endotracheal pH cannot be discarded.

The maintenance of similar free PELF concentrations in infected and healthy animals corroborates with our previous hypothesis that CIP clear from pulmonary interstitial space to PELF in chronic infections (TORRES *et al.*, 2017). Although free PELF concentrations are similar in chronically and acutely infected animals, total PELF concentrations may increase. It is known that during infection, proteins (as antibodies, complement proteins, C-reactive protein, identified in serum from patients with pneumonia) and cells (neutrophils, alveolar macrophages) are recruited to PELF (MIZGERD, 2008). The increased levels of proteins and number of defense cells in this site during infection raises the probability of augmented total fluorquinolone concentrations in PELF. To quantify total PELF drug concentrations, BAL collection is used. Although an important disadvantage of this technique is the possibility of PELF contamination with intracellular content leading to an overestimation of PELF concentrations (KIEM & SCHENTAG, 2008), it allows the investigation of amount of drug that reaches the bronchi if the volume of PELF is known.

A reduction on PELF total concentrations during infectious processes was observed by KUTI & NICOLAU (2015) in a retrospective study with levofloxacin (750 mg/kg, oral) that compares BAL samples of infected and uninfected patients. In this study, where infected patients were diagnosed with acute exacerbations of chronic bronchitis, a twofold reduction on total PELF penetration of uninfected patients ($fT = 3.5 \pm 3.7$) was observed in infected patients ($fT = 1.4 \pm 1.8$), indicating reduced PELF exposure due to infection. Although another fluoroquinolone was used and reduced total PELF concentrations were estimated, the results of this study contradicts our expectations of increased CIP total PELF concentrations in chronically infected rats, indicating that further studies must be conducted to investigate CIP distribution behavior on our model of chronic infection with biofilm-formation.

In conclusion, the present results indicate that bronchial microdialysis is a very accurate tool to determine PELF free concentrations of drugs. Biofilm forming *P. aeruginosa* lung infection gradually decreased CIP free interstitial pulmonary concentrations following infection progression from acute to chronic, although drug plasma exposure is progressively increased. This result confirms that CIP free plasma concentrations are not a good surrogate for free pulmonary concentrations and should not be used for drug adjustment in chronically infected individuals. The

present results also indicated that, although free CIP pulmonary interstitial concentrations decrease with infection advance, free bronchial concentrations are not affected by the disease, showing a relative increase when compared to pulmonary free levels. The set of results indicate that the hypothesis that the reduction observed on CIP interstitial concentrations in the chronically infected group could be due to broader distribution of the drug into PELF is viable. The knowledge of total PELF concentrations is necessary to decisively confirm the hypothesis. Furthermore, the mathematical description of CIP concentrations in PELF and pulmonary interstitial fluid in acutely and chronically infected animals by a popPK model should produce a tool that allows better dose adjustment of this antimicrobial to treat lung infections with biofilm formation. These investigations are the perspectives of the present study.

5. REFERENCES

ANTONELLI, A. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta The shedding-derived soluble receptor for advanced glycation endproducts sustains inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 354–364, 2017.

ARAÚJO, B. V. de *et al.* Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 919-920, p. 62–66, 2013.

BEIGELMAN-AUBRY, C.; GODET, C.; CAUMES, E. Lung infections : The radiologist ' s perspective. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 93, n. 6, p. 431–440, 2012.

CATALDI, M. *et al.* Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 98–108, 2014.

CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance , respiratory tract infections and role of bio films in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 85, p. 7–23, 2015.

DHANANI, J. *et al.* Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: A review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 6, p. 491–500, 2010.

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

ELKHATIB, W.; NOREDDIN, A. Efficacy of Ciprofloxacin-Clarithromycin Combination Against Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mature Biofilm Using In Vitro Experimental Model. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 20, n. 6, p. 575–582, 2014.

FOSTER, D. M.; MARTIN, L. G.; PAPICH, M. G. Comparison of Active Drug Concentrations in the Pulmonary Epithelial Lining Fluid and Interstitial Fluid of Calves Injected with Enrofloxacin, Florfenicol, Ceftiofur, or Tulathromycin. **PLoS ONE** 11(2) p. 1–16, 2016.

HEECKEREN, A. M. Van *et al.* Response to Acute Lung Infection with Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Mice. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. V.173, p 288-296, 2006.

JOHANSEN, H. K.; CRYZ JR, S. J.; HQIBY, N. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from normal rat lungs after immunization with somatic antigens or toxin A. **APMIS**, v. 102, p. 545–553, 1994.

KENTARCHOS, N. E. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of antibiotics revisited in lungs. **Antibiotics**, v. 8, p. 232–241, 2006.

KIEM, S.; SCHENTAG, J. J. MINIREVIEW Interpretation of Antibiotic Concentration Ratios Measured in Epithelial Lining Fluid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 1, p. 24–36, 2008.

KUTI, J. L.; NICOLAU, D. P. Presence of infection influences the epithelial lining fluid penetration of oral levofloxacin in adult patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 5, p. 512–518, 2015.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal** v. 172, p. 10–28, 2006.

MIZGERD, J. P. Acute Lower Respiratory Tract Infection. **The New England journal of medicine**, p. 716–27, 2008.

MUNDER, A. *et al.* Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. **Respiratory Research**, 12:148, p. 1–15, 2011.

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

ROTTBOLL, L. a H.; FRIIS, C. Microdialysis as a tool for drug quantification in the bronchioles of anaesthetized pigs. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, p. 226–232, 2014.

SAWCHUK, R. J.; CHEUNG, B. W. Y. Chapter 6.7 Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. In: **Handbook of Microdialysis**. 16p. 601–622, 2007.

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

TYVOLD, S. S. *et al.* Continuous monitoring of the bronchial epithelial lining fluid by microdialysis. **Respiratory research**, v. 8, p. 78, 2007.

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

ZIMMERMANN, E.S. Modelagem Farmacocinética Populacional na Avaliação do Papel da Glicoproteína-P na Penetração Tecidual de Fluoroquinolonas. Tese para obtenção do grau de doutor. UFRGS, Porto Alegre, 2015b.

CONCLUSÕES

- A microdiálise brônquica mostrou-se uma técnica adequada para a determinação das concentrações livres brônquicas do ciprofloxacino em animais sadios e infectados;
- A infecção pulmonar por *P. aeruginosa* formadora de biofilme reduz o *clearance* do CIP de modo gradual ao avanço da infecção aguda para crônica, sem alterar o volume de distribuição do fármaco;
- Ocorre um decréscimo gradual nas concentrações livres intersticiais pulmonares de CIP conforme a evolução da infecção com *P. aeruginosa* formadora de biofilme, sendo essas significativamente menores na infecção crônica;
- As concentrações livres de CIP no PELF não são alteradas pela infecção por *P. aeruginosa* formadora de biofilme, sendo a exposição nesse local relativamente aumentada no caso de infecção pulmonar crônica;
- Para ajuste de posologias para o tratamento de pneumonias com CIP, as concentrações livres plasmáticas não são adequadas, pois superestimam as concentrações livres pulmonares e brônquicas disponíveis para ação antimicrobiana.

REFERÊNCIAS GERAIS

ALCÓN, A.; FÀBREGAS, N.; TORRES, A. Pathophysiology of Pneumonia. **Clinics in chest medicine**, v. 26, p. 39–46, 2005.

ALVES, I.A. *et al.*, Influence of Experimental Cryptococcal Meningitis in Wistar Rats on Voriconazole Brain Penetration Assessed by Microdialysis. **Antimicrobial Agents**, v.61, n.7, e00321-17, 2017.

ANDRADE, C. De *et al.* Validation of LC-MS / MS method applied to evaluation of free tissue concentrations of vildagliptin in diabetic rats by microdialysis. **Biomedical Chromatography** October 2013, p. 1722–1727, 2014.

ANTONELLI, A. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta The shedding-derived soluble receptor for advanced glycation endproducts sustains inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 354–364, 2017.

AOKI, M. *et al.*, Proposal of membrane transport mechanism of protein-unbound ulifloxacin into epithelial lining fluid determined by improved microdialysis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 9, p. 1773–7, 2008.

ARAUJO, B. V. de *et al.* Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp. infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 154–159, 2009.

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

ARAUJO, B. V. de *et al.* Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 919-920, p. 62–66, 2013.

AUERBACH, A. *et al.* Is infection with hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* clinically significant? **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 14, n. 3, p. 347–352, 2015.

AZEREDO, F. J. *et al.* Comparison of Fluconazole Renal Penetration Levels in Healthy and *Candida albicans* Infected Wistar Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 56, n. 11, p. 5852–5857, 2012.

BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. *et al.* Ciprofloxacin in Polyethylene Glycol-Coated Liposomes: Efficacy in Rat Models of Acute or Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 8, p. 2575–2581, 2002.

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

BARTH, L. A.; BARROS, E. Estrutura, fisiologia e classificação bacteriana. In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMONI, M. L.; MACHADO, A. (Ed.). **Antimicrobianos: Consulta rápida**. 3rd. ed. p. 17–25.

BEAUDOIN, T *et al.* Characterization of clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Ontario, Canada. **Canadian journal of microbiology**, v. 56, p. 548–557, 2010.

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

BIELEN, K. *et al.* Animal models of hospital-acquired pneumonia: current practices and future perspectives. v. 5, n. 6, p. 1–13, 2017.

BJARNSHOLT, T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.

BJARNSHOLT, T. *et al.* Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p. 2–10, 2008.

BRAGONZI, A. International Journal of Medical Microbiology Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 584–593, 2010.

BRAGONZI, A. *et al.* Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Expresses Alginate in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis and in a Mouse Model. **Journal of Infectious Diseases** v. 192, 1 august, 2005.

BRUNNER, M.; LANGER, O. Microdialysis versus other techniques for the clinical assessment of in vivo tissue drug distribution. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E263–E271, 2006.

CANTÓN, R. *et al.* Spanish Consensus on the Prevention and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Bronchial Infections in Cystic Fibrosis Patients. **Arch Bronconeumol**, v. 51, n. 3, p. 140–150, 2015.

CASH, H. A. *et al.* A Rat Model of Chronic Respiratory Infection *Pseudomonas aeruginosa*. **American Review of Respiratory Disease**, v. 119, p. 453–459, 1979.

CATALDI, M. *et al.* Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 98–108, 2014.

CHAURASIA, C. S. *et al.* Workshop Report AAPS-FDA Workshop White Paper : Microdialysis Principles , Application and Regulatory Perspectives. **Pharmaceutical Research** v. 24, n. 5, p. 1014–1025, 2007.

CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance , respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fi brosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 85, p. 7–23, 2015.

CIOFU, O. *et al.* Antibiotic treatment of biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. January, p. 304–319, 2017.

CIPOLLA, D.; BLANCHARD, J.; GONDA, I. Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections. **Pharmaceutics**, v. 8, n. Figure 1, p. 6, 2016.

DA SILVA FILHO, L. V. R. F. *et al.* Artigo de Revisão Infecção por em pacientes com *Pseudomonas aeruginosa* fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 39, n. 4, p. 495–512, 2013.

DAS, R. R.; KABRA, S. K.; SINGH, M. Treatment of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* bronchopulmonary infection in patients with cystic fibrosis. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. June, 2013.

DHANANI, J. *et al.* Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: A review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 6, p. 491–500, 2010.

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

EISENBERG, E. J. *et al.* Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: Aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 29, n. 2, p. 93–98, 1993.

EISENBERG, E. J.; EICKHOFF, W. M. A Method for Estimation of Extracellular Concentration of Compounds by Microdialysis Using Urea as an Endogenous Recovery Marker in vitro Validation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 30, n. 1, p. 27–31, 1993.

ELKHATIB, W.; NOREDDIN, A. Efficacy of Ciprofloxacin-Clarithromycin Combination Against Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mature Biofilm Using In Vitro Experimental Model. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 20, n. 6, p. 575–582, 2014.

FLUME, P. A.; VANDEVANTER, D. R. Clinical applications of pulmonary delivery of antibiotics ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014.

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

FRICKS-LIMA, J. *et al.* Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 4, p. 309–315, 2011.

GUILLON, A. *et al.* Insights on animal models to investigate inhalation therapy: Relevance for biotherapeutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 536, n. 1, p. 116–126, 2018.

HAMMARLUND-UDENAES, M. Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology — a Historical and Methodological Review. **The AAPS journal**, 2017.

HEECKEREN, A. M. Van *et al.* Response to Acute Lung Infection with Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 2006.

HUANG, Y. *et al.* Estimating Amoxicillin Influx / Efflux in Chinchilla Middle Ear Fluid and Simultaneous Measurement of Antibacterial Effect. **American Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 12, p. 4336–4341, 2007.

HURTADO, F. K. *et al.* Enhanced penetration of moxifloxacin into rat prostate tissue evidenced by microdialysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 327–333, 2014a.

HURTADO, F. K. *et al.* Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin. **American Agents and Chemotherapy** v. 58, n. 2, p. 678–686, 2014b.

JOHANSEN, H. K.; CRYZ JR, S. J.; HQIBY, N. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from normal rat lungs after immunization with somatic antigens or toxin A. **APMIS**, v. 102, p. 545–553, 1994.

JOHANSEN, H. K.; HOIBY, N. Rat Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. **Handbook of Animal Models of Infection**, v. Chapter 61, p. 517–526, 1999.

JOHANSEN, H. L. *et al.* Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in normal and athymic rats. **APMIS**, v. 101, n. 207-225, 1993.

KENTARCHOS, N. E. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of antibiotics revisited in lungs. **Antibiotiques**, v. 8, p. 232–241, 2006.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 6th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 941–968 p.

KONTOU, P. *et al.* Pharmacokinetics of ciprofloxacin and its penetration into bronchial secretions of mechanically ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4149–4153, 2011.

KUKAVICA-IBRULJ, I.; LEVESQUE, R. C. Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies. **Laboratory Animals**, v. 42, p. 389–412, 2008.

KUTI, J. L.; NICOLAU, D. P. Presence of infection influences the epithelial lining fluid penetration of oral levofloxacin in adult patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 5, p. 512–518, 2015.

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

LODISE, T. P.; LOMAESTRO, B.; DRUSANO, G. L. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 3, p. 357–363, 2007.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection : lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, p. 1051–1060, 2000.

MARCHAND, S. *et al.* Microdialysis as a way to measure antibiotics concentration in tissues. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 201–207, 2016.

MAURIC, O. *et al.* The ability of fluconazole to penetrate into ventilated, healthy and inflamed lung tissue in a model of severe sepsis in rats. **Pharmacology**, v. 87, p. 130–134, 2011.

MESAROS, N. *et al.* Review: *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 560–578, 2007.

MUNDER, A. *et al.* Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. **Microbes and Infection** p. 1–15, 2011.

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

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medical Chemistry**, v. 2, n. 5253, p. 493–512, 2015.

ROBERTS, A. E. L.; KRAGH, K. N. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 23, p. 3646–3661, 2015.

RODVOLD, K. A.; GEORGE, J. M.; YOO, L. Penetration of Anti-Infective Agents into Pulmonary Epithelial Lining Fluid Focus on Antibacterial Agents. **Clinical Pharmacokinetics** v. 50, n. 10, p. 637–664, 2011.

RODVOLD, K. A.; HOPE, W. W.; BOYD, S. E. Considerations for effect site pharmacokinetics to estimate drug exposure: concentrations of antibiotics in the lung. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 36, n. October, p. 114–123, 2017.

ROTTBOLL, L. a H.; FRIIS, C. Microdialysis as a tool for drug quantification in the bronchioles of anaesthetized pigs. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, p. 226–232, 2014.

RYBTKE, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections : Community Structure , Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 23, p. 3628–3645, 2015.

SHARMA, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 42, p. 1–7, 2014.

SHUNMUGAPERUMAL, T. **Chapter 1** - Biofilm eradication and prevention: a pharmaceutical approach to medical device infections. 423 p.

SIEVERT, D. M. *et al.* Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare- Associated Infections . p. 2009–2010, 2013.

TAYLOR, P.K.; YEUNG, T.Y.; HANCOCK, 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.

TASSO, L. *et al.* Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 96-101, 2008.

TORGE, A. *et al.* Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 527, n. 1-2, p. 92–102, 2017.

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

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*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 370–374, 2009.

TYVOLD, S. S. *et al.* P. Bronchial microdialysis of cytokines in the epithelial lining fluid in experimental intestinal ischemia and reperfusion before onset of manifest lung injury. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34, n. 5, p. 517–24, 2010.

TYVOLD, S. S. *et al.* P. Continuous monitoring of the bronchial epithelial lining fluid by microdialysis. **Respiratory research**, v. 8, p. 78, 2007.

VAN BAMBEKE, F. *et al.* Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, 2005.

WANG, Y. *et al.* The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines — A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 112–128, 2014.

WILKINS, M. *et al.* New approaches to the treatment of biofilm-related infections. **Journal of Infection**, v. 69, p. S47–S52, 2014.

WOZNIAK, D. J. *et al.* Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. v. 100, n. 13, p. 7907–7912, 2003a.

WOZNIAK, D. *et al.* Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7907–12, 2003b.

ZEITLINGER, M.; MÜLLER, M.; JOUKHADAR, C. Lung microdialysis--a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). **The AAPS journal**, v. 7, n. 3, p. E600–8, 2005.

ZHANG, Y. *et al.* High azithromycin loading powders for inhalation and their in vivo evaluation in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 205–214, 2010.

ZIMMERMANN, E. S. *et al.* Simultaneous Semimechanistic Population Analyses of Levofloxacin in Plasma , Lung , and Prostate To Describe the Influence of Efflux. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.v. 60, n. November, p. 946–954, 2015.

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

ANEXOS

PARECER CEUA



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: 31651

Título: Avaliação por microdiálise das concentrações livres pulmonares intersticiais e brônquicas de ciprofloxacino em ratos Wistar sadlos e infectados com diferentes cepas de Pseudomonas aeruginosa formadora

Vigência: 21/07/2016 à 31/03/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 21/07/2016
Graziela de Araújo Iank - Aluno de Mestrado desde 21/07/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 03/10/2016 - NA SALA 330 DO ANEXO I - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 90 ratos Wistar, machos, com peso entre 250-300 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 14 de Outubro de 2016.

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Vice Coordenador da comissão de ética

LAUDOS HISTOLOGIA



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



Porto Alegre, 13 de julho de 2017.

Resultado de Exame de Necropsia

N-0611-17

<u>Espécie:</u> rato wistar	<u>Requisitante:</u> Graziela de Araujo Lock
<u>Identificação:</u> R1D	<u>E-mail:</u> graziela_lock@yahoo.com.br
<u>Raça:</u> wistar	<u>Telefone:</u> 5133085498 ou 996297793
<u>Sexo:</u> NI	<u>Plantonista:</u> Tainã e Ronaldo
<u>Idade:</u> 50 dias	<u>Data da morte:</u> 21/06/2017
<u>Proprietário:</u> Graziela de Araujo Lock	<u>Data da necropsia:</u> 21/06/2017
	<u>Material coletado:</u> órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Ratos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*. Modelo de infecção de 2 dias. R2E: morte após 24 horas de administração do inóculo. R1D e R2D: eutanásia por overdose anestésica. Favor enviar histologia pulmonar e fotos do exame macroscópico do pulmão.
Suspeita clínica: Pneumonia por agente infeccioso. Aguda?

Exame Macroscópico: exame externo: rato wistar, em bom estado corporal. mucosas oral e ocular róseas. Exame interno: **pulmão:** não colabado, com áreas avermelhadas principalmente no lobo cranial esquerdo e mais discreto no lobo cranial direito.

Exame Microscópico: **Pulmão:** no interior de alvéolos, bronquíolos e ao redor de vasos observa-se acentuado infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e ocasionais eosinófilos associado a material eosinofílico fibrilar (fibrina), além de hiperemia difusa acentuada, hemorragia intra-alveolar multifocal discreta, hiperplasia de BALT e acentuada leucocitose.

Diagnóstico: Broncopneumonia purulenta acentuada.

Profa. Luciana Sonne
CRMV-RS 7847
Setor de Patologia Veterinária UFRGS

Prof. Luciana Sonne
SPVCLIN-03
CRMVRS 7847

Porto Alegre, 13 de julho de 2017.

Resultado de Exame de Necropsia

N-0612-17

Espécie: rato wistar	Requisitante: Graziela de Araujo Lock
Identificação: R3D	E-mail: graziela_lock@yanco.com.br
Raça: wistar	Telefone: 5133085499 ou 996297793
Sexo: NI	Plantonista: Tainã e Ronaldo
Idade: 50 dias	Data da morte: 21/06/2017
Proprietário: Graziela de Araujo Lock	Data da necropsia: 21/06/2017
	Material coletado: órgãos em formol 10%

Histórico (segundo o requisitante): Ratos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*. Modelo de infecção de 2 dias. R2E: morte após 24 horas de administração do inoculo. R1D e R2D: eutanásia por overdose anestésica. Favor enviar histologia pulmonar e fotos do exame macroscópico do pulmão. Suspeita clínica: Pneumonia por agente infeccioso. Aguda?

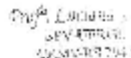
Exame Macroscópico: **exame externo:** rato wistar, em bom estado corporal. mucosas oral e ocular róseas. **Exame interno:** pulmão: não colabado, com áreas avermelhadas e edema.

Exame Microscópico: **Pulmão:** observa-se moderado infiltrado inflamatório de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, hiperemia difusa acentuada, com hemorragia intra-alveolar multifocal discreta, edema intra-alveolar multifocal discreto e moderada leucocitostase. Há ainda moderada espessamento da pleura devido a hipertrofia de células mesoteliais.

Diagnóstico: Broncopneumonia purulenta moderada.



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


Prof. Luciana Sonne
CRMV-RS 7947