

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

**Modelagem PK/PD das Fluoroquinolonas Levofloxacino e Moxifloxacino
Visando o Tratamento da Prostatite**

FELIPE KELLERMANN HURTADO

PORTO ALEGRE, 2014

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

Modelagem PK/PD das Fluoroquinolonas Levofloxacino e Moxifloxacino Visando o
Tratamento da Prostatite

Tese apresentada por **Felipe Kellermann Hurtado**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Teresa Dalla Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Hartmut Derendorf

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2014, pela Banca Examinadora contituída por:

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

Prof. Dr. François Germain Noël
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Leandro Tasso
Universidade de Caxias do Sul

Kellermann Hurtado, Felipe
Modelagem PK/PD das Fluoroquinolonas
Levofloxacino e Moxifloxacino Visando o Tratamento
da Prostatite / Felipe Kellermann Hurtado. -- 2014.
153 f.

Orientadora: Teresa Dalla Costa.
Coorientador: Hartmut Derendorf.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2014.

1. Fluoroquinolonas. 2. Farmacocinética. 3.
Modelagem PK/PD. 4. Microdiálise. 5. Prostatite. I.
Dalla Costa, Teresa, orient. II. Derendorf, Hartmut,
coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES para doutorado sanduíche na *University of Florida* (USA) e do CNPq.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Teresa Dalla Costa, pela orientação durante a execução deste trabalho, apoio, confiança, oportunidades e exemplo profissional. Muito obrigado!

Ao Prof. Alexandre Macedo da UFRGS, pela gentileza de permitir o uso da estrutura do seu laboratório e pelas discussões científicas.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Afonso Barth do HCPA, pelo fornecimento das cepas bacterianas. Agradecimentos a Vanessa e Franciéli pela colaboração.

Aos Professores Bibiana Araujo (UFRGS) e Leandro Tasso (UCS) pela colaboração e discussões científicas.

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia.

Aos colegas e ex-colegas do grupo de Farmacocinética da UFRGS (PKs): Liberato, Sandra, Moacir, Estevan, Fabiano, Maiara, Bruna, Fernanda, Fernando, João Victor, Priscila, Carolina, Izabel, Andressa, Cristiane, Francine e Jaqueline, pelos bons momentos de convivência, auxílio e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Graziela, Jonas e Camila pelo auxílio nos experimentos.

Ao Prof. Hartmut Derendorf (*University of Florida*), pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa e co-orientação durante o doutorado.

Às agências de fomento CNPq e CAPES pelas bolsas de pesquisa e auxílio financeiro.

Aos meus pais, Simeon e Elsi, pelo amor, educação, dedicação e incentivo, e aos meus irmãos, pelo apoio e amizade.

À Silvana, pelo amor, apoio, carinho e companheirismo.

Ao casal de amigos Gustavo e Cibele, pelo carinho, apoio e incentivo durante meu período em Porto Alegre.

À todos aqueles que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

"The only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it."

(Steve Jobs)

RESUMO

Objetivo: O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um modelo farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD) para descrever o efeito bactericida *in vitro* das fluoroquinolonas levofloxacino (LEV) e moxifloxacino (MXF) contra *Escherichia coli*, baseando-se em dados *in vivo* de concentração livre prostática. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram utilizados nos experimentos *in vivo* para determinação da farmacocinética plasmática e prostática do LEV (7 mg/kg) e MXF (6 e 12 mg/kg) após dose i.v. *bolus*. As concentrações livres prostáticas foram determinadas por microdiálise. A coleta das amostras de plasma e dialisado de tecido foi realizada simultaneamente nos animais previamente anestesiados com uretano para determinação do fator de distribuição tecidual (f_T). Para a quantificação do LEV e MXF nas amostras de plasma e dialisado, métodos analíticos foram validados. Análise farmacocinética não-compartimental e modelagem compartimental dos dados foram realizadas utilizando o WinNonlin[®] e NONMEM[®] v. 6, respectivamente. Os experimentos de farmacodinâmica *in vitro* foram executados utilizando sistema composto de caldo de cultura Mueller-Hinton no qual a bactéria teste (*Escherichia coli* ATCC 25922) foi exposta a concentrações constantes e flutuantes dos antimicrobianos. O número de colônias bacterianas viáveis (CFU/mL) foi determinado em função do tempo e utilizado como parâmetro farmacodinâmico para construção das curvas de morte bacteriana (*time-kill curves*). Nos experimentos de *time-kill curves* estáticos, concentrações baseadas em múltiplos da MIC na faixa de 0.008–2 mg/L foram utilizadas, enquanto que no dinâmico a meia-vida de eliminação do LEV em humanos foi simulada no sistema *in vitro* através de diluição constante do caldo de cultura. **Resultados e Discussão:** Um método analítico por HPLC-fluorescência foi desenvolvido e validado para a quantificação do MXF nas amostras biológicas. Método analítico também foi validado para quantificação do LEV nas amostras. Os perfis plasmáticos e teciduais das duas fluoroquinolonas foram modelados simultaneamente utilizando modelo de três compartimentos considerando transporte linear (difusão passiva) e saturável (cinética de *Michaelis-Menten*). O modelo, que foi o mais adequado para descrever os dados experimentais, sugere a presença de transportadores de efluxo na próstata. A penetração prostática média do MXF foi significativamente maior que a do LEV ($f_T = 1.24$ vs. 0.78) e foi independente da dose. Em ratos, não foi observada diferença na

meia-vida plasmática média entre LEV (5.0 h) e MXF (4.9 h), embora a meia-vida tecidual foi ligeiramente maior para o MXF (3.3 vs. 2.3 h). Usando a abordagem populacional de modelagem PK/PD, modelo de E_{max} sigmoidal foi utilizado para descrever o efeito das duas quinolonas frente a *E. coli* tanto nos experimentos de concentração estática quanto dinâmica. A comparação dos parâmetros PK/PD estimados mostrou que o MXF apresenta potência superior ao LEV contra a cepa através da comparação dos valores de EC_{50} , embora ambos tenham apresentado eficácia comparável (E_{max} de 1.85 e 1.83 h^{-1} para MXF e LEV, respectivamente). Para o LEV, os esquemas posológicos de 500 mg q12 h e 1000 mg q24 h apresentaram maior eficácia no período de 24 h, pois promoveram a inibição completa do recrescimento bacteriano observado nos outros dois regimes de dose testados. **Conclusões:** A correlação dos dados de farmacocinética *in vivo* com os experimentos de farmacodinâmica *in vitro*, seguida da construção do modelo PK/PD de efeito máximo, possibilitou explorar a relação do efeito antimicrobiano em função do tempo baseada em concentrações livres esperadas na prostatite.

Palavras-chave: antimicrobianos; prostatite; fluoroquinolonas; levofloxacino; moxifloxacino; microdiálise; farmacocinética; modelagem PK/PD; *Escherichia coli*

ABSTRACT

PK/PD Modeling of the Fluoroquinolones Levofloxacin and Moxifloxacin Aiming at the Treatment of Prostatitis

Objective: The aim of this study was to develop a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model to describe the *in vitro* bactericidal effect of the fluoroquinolones levofloxacin (LEV) and moxifloxacin (MXF) against *Escherichia coli* based on free concentrations in prostate tissue measured *in vivo*. **Methods:** Pharmacokinetic experiments were conducted in male Wistar rats for the determination of plasma and free prostate concentrations of LEV (7 mg/kg) and MXF (6 and 12 mg/kg) after i.v. *bolus* administration. Blood and tissue dialysate samples were collected simultaneously in the group of rats previously anesthetized with urethane to determine the tissue distribution factor (f_T). To quantify MXF and LEV in plasma and dialysate samples obtained after administration of the quinolones, analytical methods based on HPLC-fluorescence were developed and validated accordingly. Non-compartmental analysis and compartmental PK modeling of the data was performed in WinNonlin[®] and NONMEM[®] v. 6, respectively. The *in vitro* pharmacodynamic experiments were executed by using a system composed of Mueller-Hinton growth medium in which the test bacterial strain (*Escherichia coli* ATCC 25922) was exposed to constant and fluctuating antimicrobial concentrations. The number of viable colony-forming units (CFU/mL) was determined as a function of time and used as the pharmacodynamic parameter for construction of bacterial time-kill curves. In the static time-kill curves, concentrations in the range of 0.008-2 mg/L were tested based on multiples of the MIC, whereas in the dynamic time-kill curves the half-life of LEV in humans was simulated in the *in vitro* system by stepwise dilution of the growth medium. **Results and Discussion:** An HPLC-fluorescence method was developed and fully validated to quantify MXF in biological fluids. A method was also validated to determine LEV in the samples. Plasma and prostate concentrations of both drugs were simultaneously fitted using a three-compartment model considering linear (passive diffusion) and saturable transport (Michaelis-Menten kinetics), suggesting the presence of efflux transporters in the prostate. The average tissue penetration of MXF in the prostate was significantly higher than that of

LEV ($f_T = 1.24$ vs. 0.78) and was independent of the dose. In rats, differences in average plasma half-life between plasma LEV (5.0 h) and MXF (4.9 h) were not observed, even though the tissue half-life was slightly longer for MXF (3.3 vs. 2.3 h). Using a population PK/PD modeling approach, a sigmoidal E_{max} model was used to describe the effect of the two quinolones against *E. coli* both in the static as well as in the dynamic time-kill curves. Comparison of the PK/PD parameter estimates showed that the *in vitro* potency of MXF is higher than LEV against the strain tested as shown by EC_{50} values, but both presented equivalent efficacy (E_{max} of 1.85 and 1.83 h^{-1} for MXF and LEV, respectively). For LEV, the dosing regimens of 500 mg q12 h and 1,000 mg q24 h showed overall greater efficacy over the 24 h period as they resulted in complete inhibition of bacterial regrowth observed in the other two dosing regimens tested. **Conclusions:** The correlation of *in vivo* pharmacokinetic data with *in vitro* pharmacodynamic experiments, followed by the development of an E_{max} PK/PD model, allowed determining the relationship between the bactericidal effect as a function of time based on free tissue concentrations expected in the site of infection.

Keywords: antimicrobials, prostatitis; fluoroquinolones; levofloxacin; moxifloxacin; microdialysis; pharmacokinetics; PK/PD modeling; *Escherichia coli*; time-kill curves

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 Prostatite bacteriana: aspectos gerais	25
3.2 Antimicrobianos no tratamento da prostatite	26
3.3 Aspectos farmacocinéticos de fluoroquinolonas	27
3.4 Microdiálise tecidual	29
3.5 Modelagem PK/PD de antimicrobianos	30
Capítulo 1	37
Capítulo 2	63
Capítulo 3	93
Capítulo 4	115
4 DISCUSSÃO GERAL	137
5 CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS GERAIS	149
ANEXOS	153

INTRODUÇÃO

Os problemas terapêuticos dos antimicrobianos no tratamento da prostatite estão relacionados, de um lado, com o diferente estado biológico dos patógenos, que freqüentemente estão na forma de biofilme, e de outro, com a barreira para penetração de muitos fármacos na próstata. A prostatite bacteriana, principalmente a crônica, é com freqüência uma condição de difícil tratamento, principalmente devido à inadequada penetração dos fármacos no tecido prostático, pois apenas alguns poucos antimicrobianos são capazes de atravessar a barreira plasma-próstata e atingir o fluido prostático (NABER & WEIDNER, 2000). Parte dessa dificuldade é devida, também, à identificação do patógeno, necessária para escolha do antimicrobiano mais apropriado. Além disso, a recorrência da prostatite bacteriana crônica é freqüente, sendo a barreira à penetração de antimicrobianos na glândula um dos fatores que contribuem para a persistência da infecção, além de contribuir para o desenvolvimento de resistência bacteriana (BRUNNER, 2005). Nesse contexto, o agente terapêutico de escolha deve possuir um espectro antibacteriano apropriado para o microorganismo suspeito e exibir propriedades farmacocinéticas adequadas (DRUSANO et al., 2000).

Os patógenos envolvidos na prostatite bacteriana compreendem basicamente os uropatógenos mais comuns como as bactérias da família Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiellaspp.* (NABER, 2008).

Devido à terapia antimicrobiana para tratamento da prostatite ser geralmente definida de forma empírica, é importante que os fármacos apresentem espectro de ação abrangente. As propriedades farmacocinéticas favoráveis aliadas ao amplo espectro antibacteriano das fluoroquinolonas fazem com que elas sejam fármacos de escolha para prostatite bacteriana crônica (NABER, 2008). Entre as quinolonas utilizadas no tratamento da prostatite crônica pode-se citar norfloxacino, ofloxacino, lomefloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino e moxifloxacino (NABER & WEIDNER, 2000; NABER, 2002; WAGENLEHNER & NABER, 2006).

Alguns trabalhos descritos na literatura avaliam a penetração de quinolonas no tecido prostático em humanos e a comparam às concentrações plasmáticas (PNG et al., 1997; DRUSANO et al., 2000; NABER et al., 2001; WAGENLEHNER et al., 2006; GIBERTI et al., 2009). A coleta das amostras é baseada na biópsia ou na coleta de secreção prostática. No entanto, dados obtidos de biópsias podem claramente superestimar as concentrações de fármacos que se acumulam no espaço intracelular do sítio alvo e subestimar as concentrações daqueles que se

equilibram exclusivamente com o fluido intersticial (MÜLLER et al., 1999). Além disso, a técnica está sujeita a contaminação com o fármaco presente no sangue, levando a resultados pouco conclusivos. Não é relatado na literatura trabalhos que avaliem as concentrações livres de fluoroquinolonas na próstata através de microdiálise, sendo essa informação importante para o estabelecimento da posologia adequada desses fármacos para o tratamento da prostatite.

O uso de concentrações plasmáticas totais de antimicrobianos e sua comparação ao MIC do patógeno de interesse para prever o desfecho clínico da infecção é atualmente uma abordagem muito questionada, visto que as concentrações do fármaco no plasma nem sempre correspondem aos seus níveis teciduais. Para o β -lactâmico piperacilina, foi observado que a previsão do desfecho microbiológico baseada na concentração plasmática do fármaco resultou em significativa superestimação da atividade antimicrobiana da piperacilina no local de infecção (ZEITLINGER et al., 2005). Dessa forma, o uso de técnicas que permitam obter concentrações livres do fármaco diretamente no tecido infectado, como a microdiálise, vem sendo encorajado.

A comparação da penetração prostática das quinolonas levofloxacino e moxifloxacino em animais sadios, determinada através de microdiálise *in vivo*, seguida da simulação *in vitro* dessas concentrações livres, esperadas após o uso de posologias diversas desses fármacos contra *E. coli*, permitirá a avaliação da efetividade desses fármacos no tratamento da prostatite, possibilitando indicar a posologia ideal para cada quinolona investigada. A avaliação do efeito das diferentes posologias dos dois fármacos investigados será conduzida através de modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD), que permitirá a comparação entre as fluoroquinolonas levando em consideração não apenas sua potência intrínseca contra a bactéria (PD) como também sua capacidade de penetração na próstata (PK).

Nesse sentido, as estratégias de pesquisa propostas nesse projeto, a saber, a avaliação da penetração de fluoroquinolonas em tecido prostático através de microdiálise e a modelagem PK/PD do efeito antibacteriano dessas concentrações contra *E. coli* visando tratamento da prostatite, são inéditas na literatura. Portanto, a proposta representa contribuição importante para o melhor entendimento da farmacocinética de fluoroquinolonas na prostatite e para o uso racional de antimicrobianos para o tratamento dessa infecção.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) para comparar a eficácia das fluoroquinolonas levofloxacino e moxifloxacino visando otimizar o tratamento da prostatite bacteriana.

2.2 Objectivos específicos

- Desenvolver e validar metodologias analíticas robustas para quantificação de levofloxacino e moxifloxacino em plasma e dialisado de tecido através de HPLC com detecção por fluorescência
- Avaliar a farmacocinética plasmática do levofloxacino e moxifloxacino após administração intravenosa em ratos Wistar sadios
- Avaliar a farmacocinética tecidual do levofloxacino e moxifloxacino em próstata através de microdialise em ratos
- Comparar os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e teciduais do levofloxacino e moxifloxacino através de análise não-compartimental
- Estabelecer modelos farmacocinéticos para caracterizar os perfis de concentração versus tempo do levofloxacino e moxifloxacino em plasma e fluido intersticial de próstata
- Investigar a farmacodinâmica do levofloxacino e moxifloxacino frente a *Escherichia coli* utilizando sistema farmacodinâmico *in vitro* a fim de se obter curvas de morte bacteriana em função do tempo para diferentes doses e intervalos de dose
- Desenvolver modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) para avaliar o efeito das fluoroquinolonas estudadas em função do tempo a fim de se estabelecer regimes posológicos equivalentes
- Comparar os parâmetros PK-PD obtidos a fim de se estabelecer regimes de dosagem otimizados para cada fármaco

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prostatite bacteriana: aspectos gerais

As infecções do trato urinário são um dos tipos mais comuns de infecção bacteriana. Nos Estados Unidos, estima-se que elas sejam responsáveis por cerca de 15% das prescrições médicas de antimicrobianos. Embora a maioria dos casos seja leve e de fácil tratamento, existem casos de pacientes com infecções complicadas do trato urinário, havendo o risco de consequências mais graves. Geralmente as infecções do trato urinário tendem a desenvolver maiores complicações em grupos específicos de pacientes, entre eles pacientes com diabetes mellitus, insuficiência renal e imunocomprometidos, homens, mulheres grávidas, crianças e idosos (MCGREGOR et al., 2008).

A prostatite é a inflamação do tecido prostático resultante de infecção ou alergia. Bactérias Gram-positivas e negativas são responsáveis pela maioria das infecções da próstata, porém, essa condição também pode ser causada por fungos, *Mycoplasmaspp.*, vírus e outros agentes infecciosos (DRACH, 1975). Dependendo da duração dos sintomas, a prostatite é descrita como aguda ou crônica, sendo que esta ocorre quando os sintomas estão presentes por no mínimo 3 meses. A forma aguda, a qual é diagnosticada clinicamente e a partir da cultura de urina, pode ser uma infecção bastante séria, geralmente causada por uropatógenos, ocorrendo dor local intensa, febre e outros sintomas sistêmicos. Nesse caso, a antibioticoterapia é a etapa essencial do tratamento e deve ser iniciada imediatamente após ter sido diagnosticada a doença. A terapia inicia pela administração parenteral de altas doses de antimicrobiano bactericida, tal como derivados da penicilina de amplo espectro, cefalosporina de 3ª geração ou fluoroquinolona. Após melhora inicial, um tratamento oral a base de fluoroquinolona por no mínimo 4 semanas é indicado para combater a infecção e prevenir o desenvolvimento da forma crônica (WAGENLEHNER et al., 2005).

A prostatite bacteriana crônica é a causa mais freqüente de infecções urinárias recorrentes em homens jovens e de meia-idade, sendo uma doença comumente encontrada na prática urológica, no entanto, de difícil tratamento em algumas ocasiões. O tratamento geralmente envolve doses diárias de antimicrobianos por longos períodos, sendo que a duração total da terapia da prostatite crônica varia de 4-6 semanas. Isso pode resultar em muitos efeitos

adversos devido ao medicamento utilizado, bem como o surgimento de resistência bacteriana (LEE et al., 2005; WAGENLEHNER & NABER, 2006).

Os tipos de patógenos envolvidos na prostatite bacteriana compreendem basicamente os uropatógenos mais comuns. Bactérias da família Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., estão freqüentemente envolvidas como agentes causadores de prostatite bacteriana (NABER, 2008). São considerados patógenos menos importantes *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. É reconhecido que o surgimento de uropatógenos resistentes, entre eles *E. coli*, contribuiu para a maior complicação dos casos de prostatite bacteriana (NABER & WEIDNER, 2000, GIBERTI et al., 2009).

3.2 Antimicrobianos no tratamento da prostatite

Em razão do seu perfil farmacocinético favorável e amplo espectro de atividade, as fluoroquinolonas são consideradas atualmente fármacos de escolha para tratamento da prostatite bacteriana aguda e crônica (CHARALABOPOULOS et al., 2003; GIBERTI et al., 2009).

Os antimicrobianos β -lactâmicos em geral possuem baixa penetração no fluido prostático, com exceção de algumas cefalosporinas. Por outro lado, as quinolonas apresentam boa a excelente penetração tanto no fluido prostático quanto no tecido (CHARALABOPOULOS et al., 2003), sendo geralmente utilizadas no tratamento da prostatite bacteriana aguda e crônica (KUNISHIMA et al., 2008).

Há uma grande variabilidade na capacidade de penetração das quinolonas no tecido prostático, sendo que esse fato depende de diversos fatores físico-químicos e farmacocinéticos, tais como solubilidade lipídica, constante de dissociação (pKa) e ligação às proteínas. Quinolonas mais lipofílicas, como gatifloxacino e moxifloxacino, tendem a distribuir-se de forma mais eficiente e acumular-se nas células/tecidos por difusão passiva pelas membranas lipídicas. Essas duas quinolonas, por exemplo, apresentaram maior penetração no humor aquoso de humanos em relação ao ciprofloxacino, que é mais hidrofílico. As quinolonas olamufloxacino e grepafloxacino apresentam acumulação no pulmão de ratos, atingindo razões tecido/plasma bem superiores às obtidas pelo ciprofloxacino (PERLETTI et al., 2009).

As fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, levofloxacino e moxifloxacino (Figura 1), atuam através da inibição de duas enzimas bacterianas essenciais, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV, responsáveis pela super-helicoidização e replicação do DNA da célula. Ambas as enzimas são necessárias para o crescimento bacteriano e divisão celular. Assim, as fluoroquinolonas são potentes agentes bactericidas. Essa classe de antimicrobianos vem sendo usada por décadas no tratamento de infecções do trato urinário, incluindo prostatite, em razão da sua eficácia clínica (DRLICA & ZHAO, 1997; WAGENLEHNER & NABER, 2005).

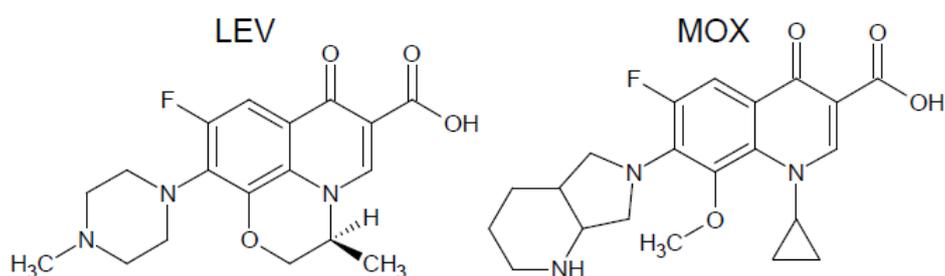


Figura 1. Estrutura química das fluoroquinolonas levofloxacino (LEV) e moxifloxacino (MOX)

3.3 Aspectos farmacocinéticos de fluoroquinolonas

O moxifloxacino (fluoroquinolona de 4ª geração) foi aprovado em 1999 para tratamento de infecções do trato respiratório, pele e tecidos moles. Ressalta-se que trabalhos (WAGENLEHNER et al., 2006; PERLETTI et al., 2009) sugerem que o moxifloxacino é um fármaco promissor no tratamento da prostatite bacteriana, apesar de não ter aprovação das agências regulatórias para essa indicação, por duas razões principais. A primeira delas é sua excelente capacidade de penetrar na próstata. Após infusão i.v. de 400 mg em humanos, o fármaco atinge níveis no tecido que excedem os valores de MIC dos patógenos mais importantes. A tendência à acumulação nesse órgão é evidenciada pela relação secreção prostática/plasma de 1,57, sendo relatada também concentrações teciduais duas vezes maiores do que no plasma. Esses valores de penetração prostática são maiores do que os obtidos para outras quinolonas mais antigas, como norfloxacino (razão 0,1) e ciprofloxacino (razão 0,2). A outra razão é o espectro de atividade estendido para bactérias atípicas e anaeróbias. A alta relação tecido/plasma do

moxifloxacino associada ao amplo espectro antibacteriano pode explicar a maior eficácia desse fármaco comparado as fluoroquinolonas de 2ª e 3ª geração no tratamento da prostatite bacteriana aguda e crônica (WAGENLEHNER et al., 2006; PERLETTI et al., 2009).

Em um estudo da penetração tecidual do moxifloxacino em voluntários sadios, determinada por microdiálise, observou-se que a fração livre do fármaco presente no plasma reflete bem as concentrações no fluido intersticial do tecido adiposo e do trato respiratório. O estudo indicou também que o fármaco possui uma penetração preferencial por lesões inflamadas (MÜLLER et al., 1999).

O levofloxacino é uma fluoroquinolona de 3ª geração de uso sistêmico que possui boa atividade contra os patógenos que causam a grande maioria das infecções da próstata. Em homens com prostatite bacteriana crônica tratados por 28 dias com dose única oral diária de 500 mg de levofloxacino, a eficácia clínica e bacteriológica foi similar a do ciprofloxacino 500 mg duas vezes ao dia. A penetração do levofloxacino na próstata de pacientes, determinada pela razão $AUC_{\text{tecido}}/AUC_{\text{plasma}}$, foi de 2,96, indicando que o fármaco penetra adequadamente no tecido e que deveria ser avaliado para a terapia da prostatite (DRUSANO et al., 2000). O fármaco foi aprovado em 2003 nos EUA para tratamento dessa doença quando causada pelos microorganismos *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus epidermidis* (CROOM & GOA, 2003).

Para o ciprofloxacino (fluoroquinolona de 2ª geração), fármaco até então de primeira escolha para o tratamento da prostatite, a relação entre as concentrações próstata/plasma encontrada foi de 0,70 após ingestão oral de 250 mg em humanos (PNG et al., 1997). Em um estudo prospectivo com grupo de pacientes que apresentavam sintomas de prostatite crônica, o ciprofloxacino foi o antimicrobiano mais comumente prescrito (PANAGOPOULOS et al., 2009). A terapia com levofloxacino 500 mg uma vez ao dia, durante 28 dias, mostrou-se tão eficaz e bem tolerada quanto o ciprofloxacino 500 mg duas vezes ao dia, com penetração prostática significativamente maior (NABER, 2008).

A penetração do levofloxacino no tecido pulmonar de humanos foi determinada por microdiálise. As concentrações livres do fármaco no fluido intersticial de tecido pulmonar foram comparadas aos níveis atingidos no plasma, músculo e tecido adiposo subcutâneo (HUTSCHALA et al., 2005; ZEITLINGER et al., 2007). A técnica é descrita também para determinação das concentrações do

levofloxacin em pulmão de ratos após infusão intravenosa (MARCHAND et al., 2008). A microdiálise foi usada para avaliar as concentrações livres de ciprofloxacino em pele, músculo esquelético e tecido adiposo subcutâneo de voluntários humanos (BRUNNER et al., 2002; BIELECKA-GRZELA & KLIMOWICZ, 2005) e para determinação da fração não-ligada à proteínas em plasma e fluido extracelular de pele de ratos (TSAI & WU, 2001; SAMMETA et al., 2009).

3.4 Microdiálise tecidual

A microdiálise é uma técnica semi-invasiva que permite a determinação da fração de fármaco não ligada a proteínas (farmacologicamente ativa) no fluido intersticial, que é o local alvo para maioria das infecções bacterianas (JOUKHADAR et al., 2001). As concentrações livres locais de fármacos em tecidos específicos do organismo podem ser diferentes daquelas encontradas na circulação sistêmica e, possivelmente, mais representativas da penetração dos fármacos no sítio de ação (ELMQUIST & SAWCHUK, 2000). A técnica consiste basicamente na implantação de uma pequena sonda no tecido a ser estudado, que é continuamente irrigada com líquido de perfusão. A parte da sonda que fica em contato direto com o órgão possui uma membrana semipermeável, que funciona como um filtro, impedindo a passagem de moléculas maiores que seu *cut off* para o líquido de perfusão. O fluido de perfusão (perfundido), geralmente uma solução fisiologicamente relevante, passa pela sonda a um fluxo baixo e constante (1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Apenas moléculas pequenas, não ligadas a proteínas, presentes no fluido intersticial sofrem difusão passiva pela membrana e são recolhidas pelo perfundido. O líquido recolhido pela outra extremidade da sonda é chamado de dialisado (BRUNNER & DERENDORF, 2006; CHAURASIA et al., 2007).

A microdiálise se destaca por ser uma ferramenta bastante utilizada para estudar a farmacocinética tecidual de fármacos, especialmente antimicrobianos. A localização da sonda no espaço intersticial, aliada às propriedades da membrana, possibilita o acesso seletivo à fração livre do antimicrobiano. Nosso grupo vem utilizando a técnica para estudar a penetração de antibacterianos e antifúngicos nos mais diversos órgãos, destacando-se o estudo da penetração das quinolonas norfloxacino em músculo esquelético (FREDDO & DALLA COSTA, 2002) e gatifloxacino em músculo e pulmão de ratos (TASSO et al., 2008).

A técnica de microdiálise foi empregada para avaliar a farmacocinética e o metabolismo do calcitriol na próstata de ratos, com o objetivo de investigar *in vivo* a capacidade da substância de inibir o crescimento de tumores prostáticos (KONETY et al., 2002). A microdiálise também foi utilizada para estudar a liberação de ATP e óxido nítrico a partir da próstata de ratos após estimulação do receptor adrenérgico (MUNCH et al., 2009). Não há relatos na literatura de utilização da microdiálise para avaliar a penetração prostática de antimicrobianos.

3.5 Modelagem PK/PD de antimicrobianos

A modelagem PK/PD é uma abordagem inovadora que pode racionalizar o desenvolvimento de fármacos e ajudar na tomada de decisões importantes, incluindo o delineamento do regime de dosagem ideal (SCHMIDT et al., 2008). Os modelos PK/PD são aplicados na simulação e previsão de efeito, assim como na otimização de posologias para diversos fármacos, através da combinação de parâmetros farmacocinéticos e propriedades farmacodinâmicas. A comparação das *time-kill curves* (curvas de morte bacteriana) de antimicrobianos contra diferentes cepas bacterianas em modelos de infecção *in vitro* ou de diferentes antimicrobianos contra a mesma bactéria, nos quais diferentes perfis farmacocinéticos do fármaco livre, obtidos através de estudos de microdiálise tecidual, podem ser simulados, permite a determinação de parâmetros PK/PD como EC_{50} (concentração necessária para 50% do efeito máximo) e k_{max} (máxima velocidade de morte bacteriana). Esses parâmetros servem não apenas para descrever o efeito de cada antimicrobiano e comparar os efeitos de diferentes fármacos de modo sistemático como também para realizar simulações de posologias não investigadas, permitindo a comparação da eficácia antibacteriana de diferentes moléculas e regimes de dosagem, levando a uma abordagem mais racional e a otimização dos tratamentos (LIU et al., 2005).

Algumas avaliações da relação PK/PD de quinolonas estão descritas na literatura. Nenhum estudo de modelagem PK/PD de quinolonas, no entanto, está descrito visando o tratamento da prostatite. A farmacocinética e a penetração prostática do ciprofloxacino e norfloxacino foram avaliadas em cães. As concentrações nos fluido prostático foram menores do que plasma para ambos os fármacos. A avaliação de índices PK/PD, como AUC/MIC e C_{max}/MIC , foram úteis para prever o efeito bacteriológico das fluoroquinolonas e indicar o regime de

dosagem mais favorável (ALBARELLOS et al., 2006). Estudo de PK/PD do levofloxacino e moxifloxacino foi realizado através da simulação das concentrações determinadas no plasma e tecido pulmonar de humanos em modelo *in vitro* de um compartimento. Os microorganismos usados para avaliação do efeito antibacteriano das quinolonas foram *S. pneumoniae*, *S. aureus* e *K. pneumoniae* (SCHUBERT et al., 2005).

Além das propriedades farmacocinéticas, tais como penetração tecidual e velocidade de eliminação, a susceptibilidade do patógeno responsável pela infecção aos fármacos comumente utilizados é aspecto igualmente importante a ser considerado na escolha do antimicrobiano e regime de dose ideais. A Figura 2 mostra a distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) das quinolonas moxifloxacino e levofloxacino contra *E. coli* retirados da literatura. É possível notar que a maioria das cepas apresentam susceptibilidade elevada aos antimicrobianos, visto os baixos valores de MIC. No entanto, na porção mais à direita da distribuição, nota-se a presença de subpopulações que apresenta altos valores de MIC, que deve-se a existência de isolados clínicos multirresistentes a quinolonas. O valor de MIC *breakpoint* de susceptibilidade de *Enterobacteriaceae* para LEV e MXF é de ≤ 1 mg/L e ≤ 0.5 mg/L, respectivamente (EUCAST, 2013).

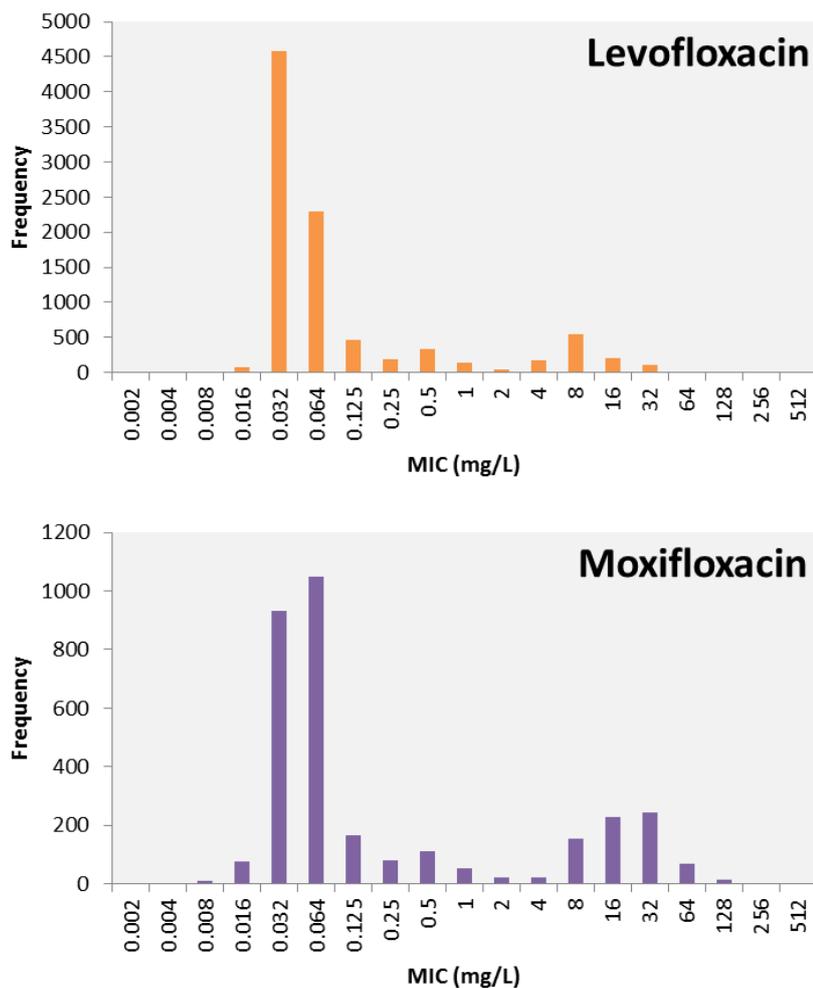


Figura 2. Distribuição da MIC das fluoroquinolonas levofloxacino e moxifloxacino contra *Escherichia coli* na faixa de 0.002–512 mg/L (dados disponíveis em: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>)

A parte experimental deste trabalho, incluindo breve revisão de cada tema, materiais e métodos, resultados e discussão, foi dividida em quatro capítulos, sendo cada um correspondente a um artigo científico. Os artigos encontram-se na sequência no texto conforme a seguir.

- **Capítulo 1**

"Fast and Sensitive RP-HPLC-Fluorescence Method for the Quantitative Analysis of Moxifloxacin in Rat Plasma and its Application to a Pre-Clinical Pharmacokinetic Study"

Felipe K. Hurtado, Moacir Kaiser, Leandro Tasso, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 2** (publicado em *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*)
“Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin Concentrations in Rat Plasma and Prostate Tissue Measured by Microdialysis”

Felipe K. Hurtado, Benjamin Weber, Hartmut Derendorf, Guenther Hochhaus, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 3** (aceito para publicação em *International Journal of Antimicrobial Agents*)
“Enhanced Penetration of Moxifloxacin into Rat Prostate Tissue Evidenced by Microdialysis”

Felipe K. Hurtado, João Victor Laureano, Graziela de A. Lock, Hartmut Derendorf, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 4**
“Integrated PK/PD Model for the Bactericidal Activity of Levofloxacin and Moxifloxacin against *Escherichia coli*”

Felipe K. Hurtado, João Victor Laureano, Fernando O. Carreño, Priscila M. Bernardi, Stephan Schmidt, Hartmut Derendorf, Teresa Dalla Costa

CAPÍTULO 1

"Fast and Sensitive RP-HPLC-Fluorescence Method for the Quantitative Analysis of Moxifloxacin in Rat Plasma and its Application to a Pre-Clinical Pharmacokinetic Study"

Fast and Sensitive RP-HPLC-Fluorescence Method for the Quantitative Analysis of Moxifloxacin in Rat Plasma and its Application to a Pre-Clinical Pharmacokinetic Study

Felipe K. Hurtado^{1,*}, Moacir Kaiser², Leandro Tasso³, and Teresa Dalla Costa^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

* Corresponding author address: Universidade Federal do Rio Grande Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308 5215. Fax: +55 51 3308 5437
Email: felipe.hurtado@ufrgs.br

ABSTRACT

A fast, simple and sensitive RP-HPLC method has been developed and validated for the determination of moxifloxacin (MXF) in rat plasma. MXF and gatifloxacin (internal standard, IS) were extracted from plasma by single step protein precipitation with acidified acetonitrile. Chromatographic separation was accomplished in less than 8 min on an Atlantis[®] T3 column with 0.4% aqueous triethylamine–methanol–acetonitrile (60:35:5, v/v/v) solution as mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Detection was achieved by fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 500 \text{ nm}$) and the calibration curves were found to be linear over the plasma concentration range of 10–2,500 ng mL⁻¹ with a mean correlation coefficient (r^2) of 0.9998 ($n = 6$). The intra- and inter-day precision was less than 2.4 and 3.3%, respectively, and the accuracy was within $\pm 8.1\%$. The mean extraction recoveries for MXF and IS from plasma were 77 and 82%, respectively. The method was also validated for specificity, sensitivity, and stability; all the results were within the acceptable range. The proposed method was then successfully applied to the quantitative analysis of MXF in rat plasma samples, being a valuable and high-throughput assay to support ongoing pharmacokinetic studies on this promising anti-infective agent.

Keywords: Moxifloxacin; Rat plasma; Validation; Pharmacokinetics; RP-HPLC; Fluoroquinolones

Running Title: RP-HPLC method for analysis of moxifloxacin in plasma

Highlights

- An efficient and reliable method for moxifloxacin assay in rat plasma is presented
- The method has numerous advantages over previously reported assays
- The method was successfully applied to study moxifloxacin pharmacokinetics in rats

CAPÍTULO 2

*“Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin Concentrations
in Rat Plasma and Prostate Tissue Measured by Microdialysis”*

(Antimicrob. Agents Chemother. 58(2): 678. DOI:10.1128/AAC.01884-13)

**Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin
Concentrations in Rat Plasma and Prostate Tissue Measured by Microdialysis**

Felipe K. Hurtado¹, Benjamin Weber², Hartmut Derendorf², Guenther Hochhaus², and
Teresa Dalla Costa^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto
Alegre, RS, Brazil

² Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, 1600 SW
Archer Road, P.O. Box 100494, Gainesville, FL 32610, USA

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande Sul, Faculdade de
Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga
2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5418; Fax: +55 51 3308
5437

Email: dalla.costa@ufrgs.br

ABSTRACT

Levofloxacin is a third-generation fluoroquinolone used in the treatment of both acute and chronic bacterial prostatitis. Currently the treatment of bacterial prostatitis is still difficult especially due to the poor distribution of many antimicrobials into the prostate, thus preventing the drug to reach effective interstitial concentrations at the infection site. Recent studies have shown that newer generation fluoroquinolones, such as levofloxacin and moxifloxacin, are able to penetrate into the prostate tissue in a more significant extent compared to older quinolones and to other antimicrobial agents such as β -lactams and cephalosporins. In the present study we compared the unbound levofloxacin prostate tissue concentrations measured by microdialysis to those in plasma after a 7 mg/kg i.v. *bolus* dose to Wistar rats. Plasma and dialysate samples were analyzed using a validated HPLC-fluorescence method. Both non-compartmental analysis (WinNonlin v. 5.3) and population-based compartmental modeling (NONMEM 6) were performed. Unbound prostate tissue concentrations represented 78% of unbound plasma levels over a period of 12 h by comparing the extent of exposure ($AUC_{0-\infty}$) of 11.7 and 4.8 h· μ g/mL in plasma and tissue, respectively. A three-compartment model with simultaneous passive diffusion and saturable distribution kinetics from the prostate tissue to the central compartment gave the best results in terms of curve fitting, precision of parameter estimates, and model stability. The following parameter values were estimated by the population model: V_1 (0.38 L), CL (0.22 L/h), k_{12} (2.27 h⁻¹), k_{21} (1.44 h⁻¹), k_{13} (0.69 h⁻¹), V_{max} (7.19 μ g/h), k_M (0.35 μ g/mL), $V_3/fu_{prostate}$ (0.05 L), and k_{31} (3.67 h⁻¹). The inter-individual variability values (% CV) for V_1 , CL , V_{max} , and k_M were 21, 37, 42, and 76%, respectively. Our results suggest that levofloxacin is likely to be substrate for efflux transporters in the prostate.

Keywords: Fluoroquinolones; Levofloxacin; Prostate distribution; Microdialysis; Population pharmacokinetics; NONMEM

Running Head: Unbound levofloxacin concentrations in rat prostate

Study Highlights

- First study reporting the tissue distribution of a fluoroquinolone in the prostate using the selectivity of the microdialysis technique;
- The feasibility of microdialysis to investigate rodents prostate penetration of antimicrobial agents was evidenced;
- The pharmacokinetics of unbound levofloxacin concentrations in plasma and tissue were compared by both non-compartmental approach and population pharmacokinetic modeling;
- The pharmacokinetic parameters were successfully estimated by the population PK model, which was also capable of identify the sources of inter-individual variability in the kinetic disposition of levofloxacin and quantify the unexplained residual variability;
- The proposed PK model allows the prediction of optimal doses to reach target $AUC_{\text{tissue}}/\text{MIC}$ ratios to treat prostatitis.

CAPÍTULO 3

*“Enhanced Penetration of Moxifloxacin into Rat Prostate Tissue Evidenced by
Microdialysis”*

(Artigo aceito para publicação em *International Journal of Antimicrobial Agents*)

Enhanced Penetration of Moxifloxacin into Rat Prostate Tissue Evidenced by Microdialysis

Felipe K. Hurtado¹, João Victor Laureano¹, Graziela de A. Lock¹, Hartmut Derendorf²,
and Teresa Dalla Costa^{1,*}

¹ Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

² Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, 1600 SW Archer Road, P.O. Box 100494, Gainesville, FL 32610, USA

* Corresponding author. Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308 5418. Fax: +55 51 3308 5437

Email: dalla.costa@ufrgs.br

ABSTRACT

Moxifloxacin is reported to have an increased distribution into the prostate compared with older quinolones such as norfloxacin and ciprofloxacin, being able to reach tissue-to-plasma concentration ratios greater than unity. However, most of these studies use tissue homogenates derived from biopsy samples, which can lead to overestimation of free concentrations as quinolones tend to accumulate in the intracellular space. The aim of this study is to investigate moxifloxacin pharmacokinetics (PK) in rat prostate interstitial fluid (ISF) by means of microdialysis. Tissue PK was performed by implanting a small microdialysis catheter in the prostate gland. Blood samples were simultaneously collected for assessing plasma PK. Analysis of plasma (N=154) and microdialysis (N=344) concentrations obtained after a single intravenous dose of 6 and 12 mg/kg moxifloxacin was conducted in the nonlinear mixed effect modeling software NONMEM v. 6 as well by non-compartmental approach. Moxifloxacin showed a significant tissue distribution in the prostate ($AUC_{\text{prostate,ISF}}/fu \cdot AUC_{\text{plasma}} = 1.24 \pm 0.37$), 59% higher than the value obtained for levofloxacin in a previous study. A 3-compartment model with nonlinear kinetics could adequately describe moxifloxacin PK in terms of curve fitting and precision in parameter estimation. The developed PK model indicates that passive diffusion and active transport are the mechanisms involved in the distribution of moxifloxacin within the prostate. These findings suggest that moxifloxacin could be a better alternative to levofloxacin for the treatment of chronic bacterial prostatitis due to its enhanced tissue penetration and higher AUC_{tissue}/MIC ratios, even though it is not yet approved by the U.S. FDA for this indication.

Keywords: Moxifloxacin; Fluoroquinolones; Pharmacokinetics; Microdialysis; Prostate; Tissue distribution; NONMEM

Running Head: Moxifloxacin penetration into rat prostate

CAPÍTULO 4

*“Integrated PK/PD Model for the Bactericidal Activity of Levofloxacin and
Moxifloxacin against Escherichia coli”*

Integrated PK/PD Model for the Bactericidal Activity of Levofloxacin and Moxifloxacin against *Escherichia coli*

Felipe K. Hurtado¹, João Victor Laureano¹, Fernando O. Carreño¹, Priscila M. Bernardi¹, Stephan Schmidt³, Hartmut Derendorf², and Teresa Dalla Costa^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

² Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, 1600 SW Archer Road, P.O. Box 100494, Gainesville, FL 32610, USA

³ Center for Pharmacometrics & Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, University of Florida, 6550 Sanger Road, Office 467, Orlando, FL 32827, USA

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 (51) 3308-5418; Fax: +55 (51) 3308-5437

Email: dalla.costa@ufrgs.br (T. Dalla Costa)

ABSTRACT

Bacterial prostatitis is a major cause of recurrent urinary tract infections and still is a tricky condition to treat especially due to poor distribution of many antimicrobials into the prostate. The impact of unbound drug concentrations in prostate tissue on the effect against commonly found pathogens, however, has not been still addressed in biomedical research. This work focused on establishing a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model to predict the bacterial-killing effect vs. time of two fluoroquinolones, levofloxacin (LVF) and moxifloxacin (MXF), based on free interstitial levels measured in prostate. The time-kill curve experiments were conducted in an *in vitro* infection model with *Escherichia coli* ATCC 25922 as test strain, in which static and dynamic antimicrobial concentrations were simulated and the number of viable bacteria was assessed within 24 h. PK parameters from human data sets for typical treatment regimens were used to predict free concentrations in prostate which were then simulated in the infection model *in vitro*. A susceptibility-based two-subpopulation model could fit both static and dynamic data with adequate precision in parameter estimation. MXF EC_{50} was 1.2-fold higher than LVF (0.285 vs. 0.342 mg/L) although E_{max} values were comparable for both drugs (1.85 vs. 1.83 1/h), evidencing the higher potency of MXF against the *E. coli* test strain. Our findings suggest that LVF 500 mg q12 h might be effective to eradicate the prostate infection caused by susceptible bacteria, but not for resistant strains based on target $fAUC_{0-24}/MIC$ ratios.

Keywords: Fluoroquinolones; Prostatitis; PK/PD modeling; Time-kill curves; *Escherichia coli*

Running Head: PK/PD model for Fluoroquinolones against *E. coli*

DISCUSSÃO GERAL

Os estudos de farmacocinética tecidual têm sido cada vez mais recomendados em virtude das concentrações de fármaco no local de ação serem mais representativas que a concentração presente na circulação sistêmica, especialmente no caso de antimicrobianos, em que o local de infecção geralmente é o fluido intersticial. Nesse sentido, a microdiálise tornou-se recentemente a principal ferramenta na determinação da fração não-ligada (farmacologicamente ativa) de fármacos no local de ação com aplicação em estudos de farmacocinética.

No presente trabalho, inicialmente foram estabelecidos os métodos analíticos para determinação das fluoroquinolonas levofloxacino e moxifloxacino em plasma e dialisado de tecido. Durante a etapa de desenvolvimento, buscaram-se métodos simples, rápidos e sensíveis, visando sua aplicação na quantificação das amostras obtidas nos estudos de farmacocinética em ratos. Os métodos desenvolvidos foram posteriormente validados de acordo com os guias atuais de validação de métodos analíticos aplicados a amostras biológicas. Os resultados do método desenvolvido para quantificação de moxifloxacino em plasma de rato foram organizados em um artigo científico e são apresentados no Capítulo 1. A metodologia proposta mostrou-se adequada para a aplicação pretendida e foi adotada nas etapas seguintes de quantificação do moxifloxacino em plasma e dialisado de tecido.

Iniciaram-se os estudos de farmacocinética com o levofloxacino, em razão da disponibilidade do fármaco. O estudo de cinética do levofloxacino foi conduzido em ratos Wistar macho sadios, com peso entre 0,25–0,35 kg, com administração do fármaco em dose única intravenosa de 7 mg/kg. A determinação das concentrações livres teciduais do fármaco na próstata dos animais foi realizada através de microdiálise. Após análise dos dados de plasma e tecido, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos para o levofloxacino no grupo de animais. Após dose *i.v. bolus*, o levofloxacino apresentou um decaimento das concentrações plasmáticas biexponencial, típica de fármacos que seguem modelo de 2 compartimentos, sendo uma queda inicial mais rápida, que representa a fase de distribuição, e uma fase terminal mais lenta, que representa o processo de eliminação do fármaco. Esses dados podem ser visto no Capítulo 2. Após correção das concentrações plasmáticas totais pela fração do fármaco não-ligada a proteínas, o levofloxacino apresentou um fator de penetração tecidual médio (f_T) na próstata de 0.78, indicando que os níveis teciduais livres são menores que as concentrações livres no plasma. No caso de fármacos em que a concentração plasmática não-ligada está em equilíbrio com a

concentração livre no tecido, o valor de f_T deve ser próximo a 1. Diferenças em relação a esse valor indicam a presença de transporte ativo do fármaco a partir do compartimento central para os tecidos, que não ocorre somente por difusão passiva.

Nos dados do levofloxacino em próstata de ratos, observou-se que os níveis no tecido são em média 22% inferiores às concentrações plasmáticas. Esse resultado levou a hipotetizar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na distribuição do fármaco entre o plasma e o tecido. Uma das hipóteses foi a presença de transportadores de efluxo presentes no tecido que teriam a função de transportar o fármaco de volta para a circulação, levando, portanto, a concentrações teciduais menores do que as esperadas. Além disso, é relatado que as quinolonas são substratos para alguns transportadores de efluxo de membrana, tais como P-gp e transportadores MRT (*multi-drug resistance transporters*), sendo que esse efeito já foi observado *in vivo* para quinolonas na barreira hematoencefálica e em estudos *in vitro* com células que expressam esses transportadores.

A etapa seguinte foi desenvolver um modelo farmacocinético na tentativa de descrever simultaneamente as concentrações do levofloxacino no plasma e tecido prostático, levando em conta mais de um compartimento e a presença de difusão passiva entre plasma-tecido e possíveis transportadores de efluxo, que seguem cinética não-linear e são, portanto, sujeitos à saturação pelo fármaco. A partir disso foi proposto um modelo de 3 compartimentos com cinética de primeira ordem e adicionada uma etapa não-linear, seguindo cinética de Michaelis-Menten, no retorno do fármaco do tecido para o compartimento central. Esses resultados estão apresentados no Capítulo 2. Esse modelo foi capaz de fazer o ajuste matemático dos perfis plasmáticos e teciduais e mostrou-se adequado para descrever os dados quando os valores observados foram comparados aos perfis baseados em simulações (Figura 3, Capítulo 2). O modelo farmacocinético desenvolvido com base na fisiologia possibilita simulação de concentrações livres prostáticas do levofloxacino para doses não investigadas, incluindo regimes de dose múltipla. Esses dados de simulações podem ser comparados aos valores de MIC do patógeno de interesse a fim de se verificar se determinado esquema posológico gera concentrações efetivas (acima do MIC), possibilitando um melhor delineamento do tratamento para a prostatite bacteriana.

O moxifloxacino foi a segunda fluoroquinolona escolhida para estudo, principalmente por ser um fármaco mais recente, de 4ª geração, que possui espectro

de atividade mais amplo do que as quinolonas mais antigas, sendo eficaz também contra alguns patógenos Gram-positivos e anaeróbicos. Além disso, artigos relatam que o moxifloxacino, por sua maior lipofilicidade em relação ao ciprofloxacino ou norfloxacino, possui maior capacidade de distribuição nos tecidos, podendo atingir concentrações até maiores do que no plasma em algumas situações. Cabe ressaltar que o moxifloxacino foi introduzido no mercado em 1999, sob o nome Avelox[®], sendo indicado para o tratamento de infecções respiratórias, infecções abdominais complicadas, de pele e tecidos moles causada por patógenos sensíveis ao antimicrobiano. Atualmente o moxifloxacino não é usado no tratamento da prostatite bacteriana, apesar de alguns relatos de literatura indicarem que o fármaco apresenta uma significativa penetração no tecido prostático, geralmente superior a das quinolonas mais antigas, principalmente devido a sua maior difusão através dos tecidos. Esses artigos sugerem, portanto, que o moxifloxacino poderia também ser utilizado na prostatite.

O estudo da farmacocinética plasmática e tecidual do moxifloxacino foi realizado de maneira semelhante ao protocolo usado no estudo anterior com o levofloxacino. Foram conduzidos os estudos de microdiálise *in vitro* previamente aos estudos nos animais, nos quais foram selecionados os parâmetros mais adequados da técnica para realização dos experimentos *in vivo*. As doses de 6 mg/kg e 12 mg/kg foram escolhidas baseadas na dose diária oral de 400 mg de moxifloxacino em humanos. O moxifloxacino apresentou uma rápida distribuição no tecido prostático, atingindo concentração máxima próxima aos níveis no plasma. O f_T para o moxifloxacino após dose i.v. *bolus* foi de $1,24 \pm 0,37$, indicando que os níveis teciduais são em média 24% maiores do que a concentração livre no plasma (Tabela 1, Capítulo 3). Se levarmos em conta o MIC *breakpoint* de susceptibilidade do moxifloxacino contra *Enterobacteriaceae* (MIC $\leq 0,5$ mg/L), podemos ver na Figura 1 (Capítulo 3) que o fármaco atinge concentrações teciduais livres superiores ao MIC durante a fase de distribuição (até 2 h após a dose, aproximadamente). A razão AUC_{tecido}/MIC é um índice PK-PD comumente utilizado prever o efeito bactericida de quinolonas com base na exposição total ao fármaco. A razão AUC_{tecido}/MIC foi em torno de duas vezes maior para o moxifloxacino do que o observado previamente para o levofloxacino, indicando que o primeiro teria um efeito mais pronunciado no tratamento da prostatite bacteriana. Portanto, os resultados indicam que o moxifloxacino, em dose semelhante à utilizada para o levofloxacino, teria um maior

efeito sobre o patógeno principalmente devido a sua maior capacidade de penetração no tecido prostático.

Na tentativa de entender o mecanismo de distribuição do moxifloxacino no plasma e fluido intersticial de próstata, foi utilizado o modelo popPK desenvolvido para o levofloxacino para modelar os dados experimentais. Após vários testes, esse modelo de 3 compartimentos assumindo cinética de primeira ordem e Michaelis-Menten entre os compartimentos mostrou-se o mais adequado. Como pode ser visto nas Figuras 1 e 2 (Capítulo 3), o modelo foi capaz de prever as concentrações teciduais livres na próstata, bem como as concentrações plasmáticas nas duas doses testadas. Os resultados da modelagem matemática sugerem que o processo de distribuição do moxifloxacino na próstata envolve difusão passiva e transporte de efluxo ativo, como havia sido previamente observado para o levofloxacino.

Dessa forma, portanto, a farmacocinética tecidual do levofloxacino e moxifloxacino na próstata foi elucidada utilizando modelo animal. O modelo desenvolvido pode ser utilizado com o objetivo de definir doses para atingir concentrações mais efetivas no tecido, através de simulações de novos esquemas posológicos. O modelo também poderá ser útil para descrever a penetração prostática de outras fluoroquinolonas de última geração. Com base nos resultados observados nos animais, pode-se também inferir concentrações livres prostáticas em humanos após a utilização de diferentes posologias, visando avaliar o efeito dessas concentrações livres para o tratamento da prostatite.

A etapa seguinte do projeto envolveu a realização dos experimentos de farmacodinâmica dessas duas fluoroquinolonas estudadas, utilizando um sistema *in vitro* para testar as diferentes concentrações prostáticas livres esperadas em humanos contra a bactéria *E. coli*, visto que esse patógeno é frequentemente associado à prostatite. No modelo de infecção *in vitro* simularam-se tanto concentrações constantes, múltiplas do MIC de cada fluoroquinolona (*static*) quanto concentrações flutuantes (*dynamic*) (Capítulo 4). Os perfis livres prostáticos do levofloxacino foram simulados através de diluição constante do caldo de cultura numa velocidade equivalente ao tempo de meia-vida de eliminação observado para o fármaco em humanos. A modelagem PK/PD das curvas de morte bacteriana (*time-kill curves*) gerou os parâmetros PK/PD que permitiram determinar a eficácia (k_{max}) e potência (EC_{50}) de cada fármaco frente à bactéria testada. A avaliação dos índices PK/PD gerados com as posologias investigadas no modelo de infecção *in vitro*

indicam que o moxifloxacino é mais potente que o levofloxacino. Os resultados ainda permitiram demonstrar que experimentos de concentração constante são adequados para prever os parâmetros PK/PD de experimentos de concentração flutuante para o mesmo fármaco/bactéria, o que é uma vantagem uma vez que os experimentos dinâmicos são mais trabalhosos e morosos.

CONCLUSÕES

- As metodologias analíticas desenvolvidas e validadas mostram-se adequadas para a quantificação de LVF e MXF nas amostras de plasma de rato e dialisado de tecido, podendo ser aplicadas, portanto, em estudos de farmacocinética com estas quinolonas;
- Os estudos de microdiálise mostraram que LVF e MXF diferem nas suas características farmacocinéticas plasmáticas e teciduais, principalmente em termos de concentrações livres atingidas no tecido prostático, diferença essa que pode ser atribuída a propriedades físico-químicas distintas, bem como a afinidades distintas por transportadores de efluxo;
- A modelagem matemática simultânea dos dados de plasma e microdialisado de tecido através de abordagem populacional sugere a participação de difusão passiva e transportadores de efluxo na distribuição das quinolonas LVF e MXF em próstata de ratos;
- O sistema farmacodinâmico *in vitro* utilizando *E. coli* como bactéria teste mostrou-se adequado para simulação de perfis de dose única e dose múltipla a partir de dados *in vivo* para avaliar o efeito de concentrações constantes ou flutuantes sobre a bactéria de interesse;
- O modelo PK/PD proposto mostrou-se adequado para descrição das curvas de morte bacteriana em função do tempo e comparação dos parâmetros EC_{50} e E_{max} entre as duas fluoroquinolonas, podendo ser utilizado para simular o efeito bactericida de regimes de dose alternativos bem como para otimização da posologia desses fármacos para o tratamento da prostatite bacteriana.

REFERÊNCIAS GERAIS

ALBARELLOS, G. A. et al. Ciprofloxacin and norfloxacin pharmacokinetics and prostatic fluid penetration in dogs after multiple oral dosing. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 334-339, 2006.

ARAÚJO, B. V. 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.

BIELECKA-GRZELA, S.; KLIMOWICZ, A. Penetration of ciprofloxacin and its desethylenemetabolite into skin in humans after a single oral dose of the parent drug assessed by cutaneous microdialysis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 30, p. 383-390, 2005.

BRUNNER, M. et al. Target site concentrations of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, p. 3724-3730, 2002.

BRUNNER, M.; DERENDORF, H. Clinical microdialysis: current applications and potential use in drug development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 674-680, 2006.

BRUNNER, M.; DERENDORF, H.; MÜLLER, M. Microdialysis for in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 495-499, 2005.

CHARALABOPOULOS, K. et al. Penetration of antimicrobial agents into the prostate. **Chemotherapy**, v. 49, p. 269-279, 2003.

CHAURASIA, C. S. et al. Microdialysis principles, application and regulatory perspectives. **The AAPS Journal**, v. 9, p. E48-E59, 2007.

CROOM, K. F.; GOA, K. L. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. **Drugs**, v. 63, p. 2769-2802, 2003.

DALLA COSTA, T. et al. Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 769-778, 1998.

DRACH, G. W. Prostatitis: man's hidden infection. **Urologic Clinics of North America**, v. 2, p. 499-520, 1975.

DRLICA, K; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 377-392, 1997.

DRUSANO, G. L. et al. A population pharmacokinetic analysis of the penetration of the prostate by levofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2046-2051, 2000.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Application of microdialysis in pharmacokinetics studies. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 267-288, 1997.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Use of microdialysis in drug delivery studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 123-124, 2000.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, 2001. <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2010.

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

GIBERTI, C. et al. Penetration of orally administered prulifloxacin into human prostate tissue. **Clinical Drug Investigation**, v. 29, p. 37-34, 2009.

HUTSCHALA, D. et al. In vivo measurement of levofloxacin penetration into lung tissue after cardiac surgery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 5107-5111, 2005.

JOUKHADAR, C.; DERENDORF, H.; MÜLLER, M. Microdialysis: a novel tool for clinical studies of anti-effective agents. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 211-219, 2001.

KONETY, B. R. Evaluation of intraprostatic metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) using a microdialysis technique. **Urology**, v. 59, p. 947-952, 2002.

KUNISHIMA, Y. et al. Gatifloxacin treatment for chronic prostatitis: a prospective multicenter clinical trial. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, p. 137-140, 2008.

LEE, Y. S. et al. Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. **International Journal of Urology**, v. 12, p. 383-389, 2005.

LIU, P. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 120-129, 2005.

MARCHAND, S. et al. Lung microdialysis study of levofloxacin in rats following intravenous infusion at steady state. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 3074-3077, 2008.

MCGREGOR, J. C.; ALLEN, G. P.; BEARDEN, D. T. Levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, p. 843-853, 2008.

MUELLER, M.; DE LA PEÑA, A.; DERENDORF, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 369-377, 2004.

MÜLLER, M. et al. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2345-2349, 1999.

MUNCH, E. et al. Release of ATP and NO from rat prostate: an in vitro and in vivo assessment of adrenergic receptor stimulation. **The Journal of Urology**, v. 181(supl. 1407), p. 503, 2009.

NABER, K. G. Concentrations of gatifloxacin in plasma and urine and penetration into prostatic and seminal fluid, ejaculate, and sperm cells after single oral administrations of 400 milligrams to volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 293-297, 2001.

NABER, K. G. Lomefloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 18-27, 2002.

NABER, K. G. Management of bacterial prostatitis: what's new? **British Journal of Urology International**, v. 101 (supl. 3), p. 7-10, 2008.

NABER, K. G.; WEIDNER, W. Chronic prostatitis – an infectious disease? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 157-161, 2000.

PANAGOPOULOS, P. et al. Fluoroquinolone treatment of chronic bacterial prostatitis: a prospective cohort study. **Journal of Chemotherapy**, v. 21, p. 317-321, 2009.

PERLETTI, G. et al. Enhanced distribution of fourth-generation fluoroquinolones in prostatic tissue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 206-210, 2009.

PNG, J. C. D. et al. A comparative study of the distribution of ofloxacin and ciprofloxacin in prostatic tissues after simultaneous oral ingestion. **British Journal of Urology**, v. 79, p. 781-784, 1997.

SAMMETA, S. M. et al. Transcutaneous sampling of ciprofloxacin and 8-methoxypsoralen by electroporation (ETS technique). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 24-29, 2009.

SCHMIDT, S. et al. PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 549-556, 2008.

SCHUBERT, S. et al. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin simulating human serum and lung concentrations. **Infection**, v. 33 (supl. 2), p. 15-21, 2005.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. 892 p.

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.

TSAI, T. H.; WU, J. W. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in the rat and its interaction with cyclosporine A: a microdialysis study. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, p. 195-199, 2001.

WAGENLEHNER, F. M. E. et al. Serum and prostatic tissue concentrations of moxifloxacin in patients undergoing transurethral resection of the prostate. **Journal of Chemotherapy**, v. 18, p. 485-489, 2006.

WAGENLEHNER, F. M. E. et al. The role of antibiotics in chronic bacterial prostatitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 1-7, 2005.

WAGENLEHNER, F. M. E.; NABER, K. G. Current challenges in the treatment of complicated urinary tract infections and prostatitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12 (supl. 3), p. 67-80, 2006.

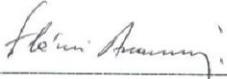
WAGENLEHNER, F. M. E.; NABER, K. G. Fluoroquinolone antimicrobial agents in the treatment of prostatitis and recurrent urinary tract infections in men. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, p. 9-16, 2005.

ZEITLINGER, M. A. et al. Plasma concentrations might lead to overestimation of target site activity of piperacillin in patients with sepsis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 703-708, 2005.

ZEITLINGER, M. A. et al. A pilot study testing whether concentrations of levofloxacin in interstitial space fluid of soft tissues may serve as a surrogate for predicting its pharmacokinetics in lung. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 44-50, 2007.

ANEXO

Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética Na Utilização De Animais	
CARTA DE APROVAÇÃO			
Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:			
Número: 18330			
Título: MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA DE FLUOROQUINOLONAS VISANDO AO TRATAMENTO DA PROSTATITE			
Pesquisadores:			
Equipe UFRGS:			
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/04/2010 Felipe Kellermann Hurtado - Aluno de Doutorado desde 01/04/2010			
<i>Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.</i>			
Porto Alegre, Sexta-Feira, 8 de Outubro de 2010			
 _____ FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO Coordenador da comissão de ética			