

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/06/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**FARMACOCINÉTICA DA GENTAMICINA EM EQUINOS: ESTUDO
COMPARATIVO DAS CONCENTRAÇÕES EM PLASMA E EM
LÍQUIDO SINOVIAL NA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA OU
INTRAVENOSA REGIONAL**

LEANDRO AMÉRICO RAFAEL

Botucatu – SP

Dezembro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**FARMACOCINÉTICA DA GENTAMICINA EM EQUINOS: ESTUDO
COMPARATIVO DAS CONCENTRAÇÕES EM PLASMA E EM
LÍQUIDO SINOVIAL NA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA OU
INTRAVENOSA REGIONAL**

LEANDRO AMÉRICO RAFAEL

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor

Orientador: Prof. Dr. Celso Antônio
Rodrigues

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rafael, Leandro Américo.

Farmacocinética da gentamicina em equinos: estudo comparativo das concentrações em plasma e em líquido sinovial na administração intravenosa ou intravenosa regional / Leandro Américo Rafael. – Botucatu, 2015

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Celso Antônio Rodrigues
Capes: 50501003

1. Cavalo. 2. Farmacocinética. 3. Gentamicina. 4. Perfusão isolada (Fisiologia).
5. Líquido sinovial. 6. Doppler, Ultrassonografia. 7. Articulação

Palavras-chave: Articulação; Cavalos; Doppler; Perfusão regional.

Nome do autor: Leandro Américo Rafael

Título: FARMACOCINÉTICA DA GENTAMICINA EM EQUINOS: ESTUDO COMPARATIVO DAS CONCENTRAÇÕES EM PLASMA E EM LÍQUIDO SINOVIAL NA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA OU INTRAVENOSA REGIONAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Antônio Rodrigues

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Antônio José de Araújo Aguiar

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva

Membro

Departamento de Cirurgia

FMVZ-USP-São Paulo

Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Membro

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia

FcFar – UNESP – Araraquara

Data da defesa: 17 de dezembro de 2015

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família. Principalmente, meus pais e meu irmão, pois mesmo longe, sempre me incentivaram e encorajaram a seguir meus sonhos e buscar meus objetivos, sendo sempre minha base e inspiração;

Ao professor Celso Antônio Rodrigues, por esses quase 5 anos de orientação, por toda paciência e ensinamentos, contribuindo muito para meu crescimento profissional e pessoal;

À minha namorada Raissa, por me aguentar até mesmos nos dias em que nem eu me aguentava, por todo seu carinho e parceria;

Aos meus amigos, Emiliano e Mirian, pela amizade e pela ajuda direta no desenvolvimento deste trabalho. Sem os quais, não seria possível essa realização. Principalmente, à Karoline (Karol), com quem tive o prazer de conviver durante toda a execução desse trabalho e espero conviver por muito mais tempo;

Aos alunos de iniciação científica Vitória, Pedro e Renan pela ajuda e dedicação nas longas madrugadas de experimento.

Aos demais amigos de pós-graduação e de república, que conquistei ao longo deste período, Giovane, Cesar, Dietrich, Thiago, Diego, Luiz, Carlos, Campo, Fábio que fazem com que a estadia longe dos familiares seja mais agradável.

Aos funcionários e residentes do setor de cirurgia de grandes animais.

À professora Rosângela e toda sua equipe (pós-graduandos e funcionários) pela ajuda na padronização e processamento das amostras;

À empresa Ouro Fino pelo auxílio através dos medicamentos utilizados neste estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e Fapesp pelo auxílio financeiro.

Agradeço também a todos os outros amigos e familiares, que não foram nomeados aqui, mas que uma forma direta ou indireta, durante minha vida, me ajudaram a transpor mais este degrau.

LISTA DE ABREVIACÕES

kg: quilogramas

mL: mililitros

mg: miligramas

mm: milímetros

mmHg: milímetros de mercúrio

cm: centímetros

MTE: membro torácico esquerdo

MTD: membro torácico direito

GIV: grupo intravenoso

GTT: grupo torniquete tubular

CIM: concentração inibitória mínima

MTCF: articulação metacarpofalângica

RC: articulação radiocárpica

°C: graus Celsius

MHZ: mega hertz

M0: momento antes da infusão (normalidade)

M15: quinze minutos após infusão

M30: trinta minutos após infusão

M1: uma hora após a infusa

M2: duas horas após infusão

M4: quatro horas após infusão

M6: seis horas após infusão

M12: doze horas após infusão

M24: vinte e quatro horas após infusão

M48: quarenta e oito horas após infusão

M72: setenta e duas horas após infusão

G: gauge

PI: índice de resistividade

RI: índice de resistividade

SP: pico sistólico

ED: final diastólico

VM: velocidade média

DI: Diâmetro da artéria

VF: volume de fluxo da artéria

PRIVA: Perfusão Regional Intravenosa de Antimicrobianos

PRA: Perfusão Regional de Antimicrobianos

Lista de Tabelas

Capítulo 3

Tabela 1- Concentrações de gentamicina ($\mu\text{g/mL}$), média e desvio padrão no plasma e líquido sinovial das articulações radiocárpica (RC) e metacarpofalângica (MTCF), dos equinos tratados por via intravenosa (6,6 mg/kg) (n=6) e intravenosa regional com gentamicina (2,2 mg/kg) (n=5), ao longo do tempo (momentos). 41

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos, média e desvio padrão (DP) da gentamicina no plasma, e líquido sinovial das articulações radiocárpica (RC) e metacarpofalângica (MTCF), após infusão intravenosa (6,6 mg/kg) no Grupo Intravenoso (GIV) e perfusão regional intravenosa (2,2 mg/kg) no Grupo Torniquete Tubular (GTT). 43

Capítulo 4

Tabela 1 - Valores dos índices e velocidades observados no Doppler da artéria Mediana dos 6 equinos.....57

Lista de Figuras

Capítulo 3

Figura 1 - Representação gráfica dos valores médios das concentrações de gentamicina ($\mu\text{g/mL}$) ao longo do tempo (momentos), no plasma e líquido sinovial da articulação radiocárpica (RC) e metacarpofalângica (MTCF) dos animais submetidos ao tratamento intravenoso sistêmico (GIV - dose 6,6 mg/kg, n=6) e dos animais submetidos ao tratamento intravenoso regional (GTT - dose 2,2 mg/kg, n=5). 42

Capítulo 4

Figura 1- Representação gráfica das médias e desvio padrão em cada momento das variáveis avaliadas da artéria mediana através de Ultrassom Doppler: índice de pulsatilidade (PI), índice de resistividade (RI), pico sistólico (SP), final diastólico (ED), velocidade média (VM), Diâmetro da artéria (DI) e volume de fluxo da artéria (VF). (*) diferença significava em relação a M0. 58

Figura 2 - Ultrassonografia Color Doppler antes da realização da perfusão regional (M0), evidenciando o fluxo sanguíneo da veia cefálica (a); Ultrassonografia Color Doppler após a realização da perfusão regional, evidenciando o fluxo sanguíneo da veia cefálica com padrão mosaico e presença do trombo em M6 (b); imagem em modo B evidenciando o trombo aderido a parede da veia cefálica em M6 (c). 59

Sumário	
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo 1	ii
1. Introdução e Revisão de Literatura	3
1.1. Introdução e justificativa	3
1.2. Perfusão regional de antimicrobianos	4
1.3. Resistência adaptativa aos aminoglicosídeos	8
1.4. Ultrassografia Doppler	11
1.5. Referências	13
Capítulo 2	19
Objetivos	20
Objetivos	21
Capítulo 3	22
Artigo 1	23
Resumo	24
Introdução	25
Materiais e Métodos	26
Resultados	29
Discussão	31
Referências	37
Capítulo 4	44
Artigo 2	45
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48
Materiais E Métodos	49
Resultados	51
Discussão	52
Referências	544
Anexo 1	60
Anexo 2	82

RAFAEL, L.A. Farmacocinética da gentamicina em equinos: estudo comparativo das concentrações em plasma e em líquido sinovial na administração intravenosa ou intravenosa regional. Botucatu, 2015, 97p. Tese (Doutorado), UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Resumo

A Perfusão regional de antimicrobianos (PRA) é uma técnica que possibilita aumentar a concentração de antimicrobianos em infecções que acometem a porção distal dos membros, abaixo ou na altura dos ossos rádio, carpo e tarso, contribuindo para a sua eliminação. Essa técnica utiliza baixas doses de antimicrobiano, se comparada com a terapia sistêmica utilizando o mesmo fármaco. Dessa forma, aumenta a eficácia do mesmo, devido às elevadas concentrações do antimicrobiano nos tecidos distais dos membros, além de minimizar os riscos de toxicidade. O objetivo do estudo foi avaliar a farmacocinética da gentamicina no plasma e líquido sinovial de equinos hípidos, após administrações em doses únicas, por via intravenosa e intravenosa regional, e avaliar as alterações vasculares ocasionadas pela perfusão regional. Foram utilizados 12 equinos hípidos (8 fêmeas e 4 machos), mestiços, com idade variando de 8 a 15 anos, e pesando $354,8 \pm 42,3$ kg, divididos aleatoriamente em dois grupos de seis cada. O grupo intravenoso-GIV recebeu 6,6 mg/kg de sulfato de gentamicina por via sistêmica (veia jugular) e o grupo torniquete tubular-GTT recebeu 2,2 mg/kg de sulfato de gentamicina adicionado à solução fisiológica q.s.p. 40 mL, por via regional (veia cefálica), após o posicionamento de um torniquete tubular de látex no terço médio do rádio. As amostras de sangue da veia jugular e líquido sinovial das articulações radiocárpica e metacarpofalângica de todos os animais foram coletadas antes da administração da gentamicina e após 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A concentração de gentamicina foi mensurada através do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e as alterações vasculares através da ultrassonografia Doppler. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism 6, empregando-se o teste Mann Whitney nos momentos entre os grupos e teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunns nos momentos dentro dos grupos. O nível de

significância foi definido como $P < 0,05$. As concentrações de gentamicina no grupo torniquete tubular (GTT) no líquido sinovial da articulação radiocárpica (RC) e na articulação metacarpofalângica (MTCF), foram até 36 vezes e até 28 vezes maiores, respectivamente, que no grupo intravenoso (GIV). Não houve alterações nos parâmetros de ultrassonografia Doppler utilizados para avaliar o fluxo sanguíneo, após a realização da perfusão regional intravenosa. Entretanto, houve a formação de pequenos trombos aderidos à parede da veia cefálica, em três dos equinos submetidos a perfusão regional. A farmacocinética da gentamicina mostrou que a meia vida e o MRT são maiores no líquido sinovial, tanto na administrada por via sistêmica, quanto por via intravenosa regional, comparada ao plasma na administração via sistêmica. A perfusão regional não foi capaz de provocar alterações de fluxo significativas.

Palavras-chave: Cavalos; Doppler; Perfusão regional; articulação.

RAFAEL, L.A. Pharmacokinetics of gentamicin in horses: comparative study of concentration in plasma and synovial fluid in intravenous or intravenous regional administration. Botucatu, 2015, 97p. Thesis (Doctorate), UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Abstract

Regional Perfusion antimicrobials is a technique that makes it possible to increase the concentration of antibiotics in infections involving the distal portion of the limbs, below or at the time of radio, carpus and tarsus, contributing to their elimination. This technique uses low doses of antimicrobial compared to systemic drug therapy using the same antimicrobial. Thus, increasing the effectiveness thereof, because the high concentrations of the antimicrobial in tissue distal members, while minimizing the risk of toxicity. The technique is based on the placement of a tourniquet on the limb, with obstruction of the venous and arterial flow, access to superficial veins, administration and retrograde spread of drug distally to the application site. The aim of the study was to evaluate the pharmacokinetics of gentamicin sulfate in plasma and synovial fluid of healthy horses after administration in single doses by intravenous and regional intravenously and evaluate vascular changes caused by regional perfusion. 12 healthy horses were used (8 females and 4 males), crossbred, aged 8-15 years and weighing 354.8 ± 42.3 kg, random divided into two groups of six each. Intravenous group (IVG) that received 6.6 mg / kg systemically gentamicin (jugular vein) and the narrow rubber group (NRG) received 2.2 mg / kg gentamicin added to the saline solution qs 40 ml per region via (cephalic vein) after the positioning of a narrow rubber in the middle third of the radius. Blood samples from the jugular vein, and synovial fluid of the radiocarpal joint and metacarpophalangeal of all animals were collected prior to the gentamicin administration, 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 hours after administration. The concentration of gentamicin was measured by Liquid Chromatography Method High Efficiency (HPLC) and vascular changes by Doppler ultrasound. Statistical analyzes performed by Graphpad Prism 6 program, using the Mann Whitney test in the moments

between groups and Kruskal-Wallis test with Dunns post-test at times within the groups. The level of significance was set at $P < 0.05$. The gentamicin concentrations in the tubular tourniquet group (GTT) in the synovial fluid of the radiocarpal joint (RC) and the metacarpophalangeal joint (MTCF) were up to 36 times and even 28 times higher, respectively, than in the intravenous group (GIV). No change in the Doppler ultrasound parameters used to evaluate the blood flow after the completion of the intravenous regional perfusion. However, there was the formation of small thrombus adhered to the wall of the cephalic vein of three animals underwent regional perfusion. The pharmacokinetics of gentamicin showed that the half-life and MRT is higher in the synovial fluid, both systemically administered, as by intravenous regional compared to the plasma via systemic administration. Regional perfusion was not capable of causing significant flow changes.

Keywords: horses; Doppler; Regional perfusion; articulation

Capítulo 1

Introdução e Revisão de Literatura

1. Introdução e Revisão de Literatura

1.1. Introdução e justificativa

As afecções que induzem as claudicações se constituem em um dos mais importantes problemas que acometem a espécie equina. A maioria das claudicações na espécie equina é originária de doenças podais que apresentam opções de tratamento restritas, especialmente quando os processos infecciosos atingem ossos e articulações. Os processos infecciosos que acometem os dígitos podem atingir estruturas profundas, culminando com a osteomielite do sesamóide distal ou da falange distal, artrite interfalângica distal, tendossinovite do flexor digital profundo.

As bactérias Gram negativas, reconhecidamente apresentam papel fundamental na etiopatogenia das enfermidades infecciosas podais. Desta forma, a escolha de um antimicrobiano deve estar baseada na sensibilidade microbiana à substância e também nas suas características farmacocinéticas, devendo esta escolha recair sobre um fármaco eficiente e capaz de atingir elevadas concentrações nos diversos tecidos acometidos na infecção podal. Baseando-se nesses princípios a administração de gentamicina, um aminoglicosídeo, pode ser considerada uma excelente opção terapêutica.

A perfusão regional de antimicrobianos (PRA) vem sendo utilizada com mais frequência na rotina de clínica equina, no entanto, alguns pontos ainda não estão completamente elucidados, por isso, objetiva-se determinar a farmacocinética da gentamicina administrada pela via intravenosa regional e compará-la à via intravenosa, convencionalmente utilizada e amplamente avaliada por estudos farmacológicos.

Além disso, objetiva-se mensurar o potencial trombogênico desta técnica com o intuito de estabelecer protocolos de utilização mais seguros e com menor probabilidade de complicações secundárias.

1.2. Perfusão regional de antimicrobianos

As estruturas sinoviais e ossos distais nos membros dos equinos são frequentemente acometidos por processos sépticos de difícil tratamento, e prognóstico reservado. A perfusão regional de antimicrobianos (PRA) é uma terapia adjuvante no tratamento das infecções dos membros, alcançando altos níveis teciduais do fármaco nos tecidos comprometidos (KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006). A técnica pode ser indicada no tratamento de infecções ósseas, articulares, tendíneas e de tecidos moles da porção distal dos membros, abaixo ou na região do osso rádio, carpo ou tarso (WHITEHAIR et al., 1992a; SCHEUCH et al., 2002; KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006; KRAUS, 2006; RODRIGUES et al., 2010).

Trata-se de um procedimento que objetiva elevar a concentração do fármaco nos diferentes tecidos, localizados distalmente ao torniquete. O método contribui para a eliminação dos microorganismos, a partir de doses menores de antimicrobiano e custo reduzido, quando comparada com a terapia sistêmica convencional. Além disso, aumenta a eficácia do fármaco e minimiza o risco de efeitos adversos (MURPHEY et al., 1999; BUTT et al., 2001; MATTSON et al., 2004; ORSINI et al., 2004; KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006; RODRIGUES et al. 2010).

A escolha correta do antimicrobiano e de sua via de administração são fundamentais para o sucesso terapêutico e devem, sempre que possível, ser baseadas nos resultados de cultura e sensibilidade (KRAMER, 2006). O antimicrobiano deve possuir indicação para administração intravenosa, ser solúvel em água e ainda ser passível de diluição em solução isotônica, como NaCl (0,9%) ou Ringer Lactato (SANTSCHI et al., 1998; KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006). No entanto, o sucesso do tratamento depende de alguns fatores, tais como: virulência do agente causador; competência dos mecanismos de defesa do hospedeiro; eficácia do antimicrobiano escolhido e principalmente, o alcance das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do fármaco no local infectado (PARRA-SANCHEZ et al., 2006).

A PRA se baseia na administração intravenosa ou intraóssea de um antimicrobiano, e esse por sua vez, devido à pressão e difusão retrógrada se perfunde e distende a vascularização venosa. Desse modo, difunde-se para os tecidos menos vascularizados. Os antimicrobianos alcançam os tecidos adjacentes (líquido sinovial, tecidos moles e ossos), incluindo tecidos pobremente vascularizados, através do aumento da pressão hidrostática nos capilares e difusão pelo do gradiente de concentração (WHITEHAIR et al., 1992a; SANTACHI et al., 1998; BUTT et al., 2001; ORSINI et al., 2004; KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

Para a realização da PRA um torniquete é posicionado proximal à área infectada. O mesmo tem como função ocluir tanto o sistema venoso, quanto arterial. A pressão exercida pelo torniquete deve ser maior que a pressão arterial sistólica. Dependendo do local da infecção, dois torniquetes podem ser utilizados, sendo que um proximal e outro distal à lesão, e a solução administrada entre eles (WHITEHAIR et al., 1992b; ORSINI et al., 2004; KRAMER, 2006; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

Diferentes tipos de torniquetes podem ser utilizados, como: torniquete de tubo latex; bandagem de Esmarch; torniquetes pneumáticos ou rolos de gaze envoltos por bandagem elástica (RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006). A eficácia de cada torniquete é determinada pela capacidade de evitar extravasamento da região perfundida para a circulação sistêmica. Os critérios que devem ser considerados para a escolha do tipo de torniquete a ser usado são: pressão e largura do mesmo; características físicas do paciente; local e via da administração; volume a ser perfundido e sangria prévia à perfusão (MURPHEY et al., 1999; BUTT et al., 2001; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

A pressão exercida por um torniquete de borracha é muito variável, sendo considerada totalmente aplicador-dependente e por isso de difícil padronização. A aplicação ideal é aquela que possui uma pressão mínima necessária para a completa obstrução do sistema venoso local, evitando o extravasamento da região perfundida para a circulação sistêmica (GAGNON et al., 1994 e SCHEUCH et al.,

2002). Os valores de pressão para torniquetes podem variar entre 100 mmHg (ADAMS, 1998) a 280 mmHg (HYDE et al., 2013).

Os torniquetes pneumáticos são considerados mais seguros, pois permitem melhor controle da técnica e da pressão utilizada, diminuindo assim o risco de dano tecidual (RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006). Segundo Levine et al. (2010) o torniquete pneumático proporcionou níveis mais elevados de amicacina em doses de 2 gramas, no líquido sinovial, em relação a bandagem de Esmarch e o torniquete de tubo latex. Além disso, os mesmos autores também relataram que o torniquete de tubo latex foi incapaz de proporcionar níveis de CIM no líquido sinovial, desaconselhando o seu uso. Entretanto, o torniquete de tubo de latex foi considerado eficiente na perfusão regional intravenosa, quando corretamente aplicado na região do antebraço de equinos, obstruindo por completo o fluxo arterial e venoso, sendo esta observação comprovada através da ultrassonografia Doppler (RAFAEL, et al. 2014; RODRIGUES et al., 2014), além de atingir a CIM de 2µg/mL de gentamicina por até 48 horas, considerando os principais patógenos causadores de artrite séptica nos equinos (RODRIGUES, 2014).

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de artrites infecciosas em equinos. A gentamicina é um antimicrobiano efetivo contra aproximadamente 85% das bactérias isoladas de afecções musculoesqueléticas em equinos e permanece ativo no líquido sinovial (MOORE, et al. 1992; COOK et al., 1999).

O principal aspecto utilizado para mensurar a atividade antimicrobiana é a concentração inibitória mínima (CIM). Essa pode ser definida como a concentração mais baixa de antibiótico que inibe 50% (CIM50) ou 90% (CIM90) do crescimento de microrganismos *in vitro*. A CIM é um bom indicador da eficiência de um antimicrobiano, porém não indica o tempo que o fármaco permanece ativo (BAGGOT, 2010). A concentração inibitória mínima (CIM) de gentamicina para bactérias comumente isoladas de equinos é de 2 µg / mL (LLOYD et al., 1988).

Outro fator de extrema importância para a avaliação da eficácia dos aminoglicosídeos é o pico de concentração (Cmax) que o antimicrobiano atinge. Isso

é mais importante do que o tempo em que o mesmo permanece com concentrações acima da CIM. Quanto maior a C_{max} plasmática, maior atividade bactericida possuirá o aminoglicosídeo, aumentando também seu poder de inibição do crescimento bacteriano pós-antibiótico. Portanto, o ideal é que as concentrações dos aminoglicosídeos no plasma sejam no mínimo 10 vezes superiores a CIM (SKOPNIK et al., 1992, LACY et al., 1998).

A dose de gentamicina pode variar de 125 a 1000 mg por perfusão (WHITEHAIR et al., 1992b; WHITEHAIR et al., 1992a; KRAMER, 2006), ou pode ser calculada pelo peso corpóreo do animal utilizando a dose de 2,2 mg/kg (MATTSON et al., 2004). A dose total do medicamento a ser utilizado pode ser diluída em solução salina fisiológica (0,9%) ou em solução de Ringer Lactato para obtenção do volume desejado a ser administrado. Volumes totais de 20 a 60 mL são os mais utilizados em equinos adultos, dependendo da região a ser perfundida (BUTT et al., 2001; SCHEUCH et al., 2002; MATTSON et al., 2004; ORSINI et al., 2004; RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

O volume ideal não é conhecido, mas acredita-se que quanto mais elevado, maior será a pressão intravascular alcançada e melhor a difusão para os tecidos adjacentes. Contrariamente, quanto maior a pressão intravascular, maior o risco de extravazamento pelo torniquete para a circulação sistêmica (RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

Em estudos recentes Hyde et al. (2013), demonstraram que não houve diferença significativa na concentração de antimicrobiano no líquido sinovial, após a Perfusão Regional Intravenosa de Antimicrobianos (PRIVA) com gentamicina entre os grupos, com 10, 30 e 60 mL de volume perfundido, embora a média do grupo com menor volume tenha sido maior do que as demais, sugerindo que a difusão por um gradiente de concentração possa ser igualmente ou até mais importante do que a distensão venosa (gradiente de pressão).

Ainda não se estabeleceu um número exato de perfusões a serem realizadas. Na prática, a PRIVA é normalmente realizada a cada 24 horas ou a cada 48 ou 72 horas, dependendo da necessidade (RUBIO-MARTÍNEZ e CRUZ, 2006).

Finsterbusch & Weinberg, (1972) observaram melhora nas feridas crônicas purulentas em humanos depois de 4 a 6 sessões de PRIVA. Porém, o número de perfusões necessárias para eliminar por completo uma infecção articular e óssea em equinos é desconhecida, sendo dependente da evolução do caso (BUTT et al., 2001).

A utilização da PRIVA em equinos possui alguns efeitos indesejáveis, como: leve inflamação dos tecidos moles no local da administração; trombose venosa parcial, principalmente quando ocorrem punções repetidas e, raramente irritação tecidual severa (KRAMER, 2006). Não há estudos que avaliaram com critério as alterações locais da perfusão (BUTT et al., 2001; SCHEUCH et al., 2002), embora Rafael et al. 2014, utilizando torniquete tubular para PRIVA, não observou a formação de trombose na veia cefálica de equinos, administrando gentamicina em dose única de 2,2mg/kg.

1.3. Resistência adaptativa aos aminoglicosídeos

A resistência adaptativa é um termo que descreve uma refratariedade reversível para a ação bactericida de um agente antibacteriano, frente aos microorganismos originalmente susceptíveis (DAIKOS et al., 1990; BARCLAY et al., 1992; KARLOWSKY, et al., 1997; BARCLAY & BEGG, 2001). Tem sido principalmente caracterizada para a ação dos aminoglicosídeos contra bacilos Gram-negativos e, em particular, *Pseudomonas aeruginosa*. A resistência adaptativa também foi registrada para quinolonas contra *P. aeruginosa*, cocos Grampositivos e algumas Enterobacterias. Entretanto, as quinolonas induzem com mais frequência resistência verdadeira (DAIKOS et al., 1990). Essa alteração bacteriana não parece ser causada por uma alteração mutacional genética, mas sim por uma alteração fenotípica de proteção, nas características bacterianas. Isso inclui regulação negativa reversível, durante o período de transporte ativo de aminoglicosídeos em bactérias Gram-negativas (DAIKOS et al., 1990; BARCLAY & BEGG, 2001).

Existem várias características farmacodinâmicas dos aminoglicosídeos que contribuem para o estabelecimento de regimes posológicos, com intervalos de 24 horas. Dentre elas, a capacidade de induzir resistência adaptativa é a menos compreendida e discutida, apesar dessa poder ser a característica mais importante para conferir maior eficácia, com intervalos de doses prolongados (BARCLAY & BEGG, 2001).

A resistência adaptativa não é detectada utilizando-se métodos laboratoriais comuns. As cepas com resistência adaptativa, quando em meio isento do antimicrobiano expressam o fenótipo sensível, e a mensuração da CIM *in vitro* reflete a primeira exposição, consequentemente, sensível aos fármacos (DAIKOS et al., 1990). A falta de alteração da CIM é compatível com a ideia de que a resistência adaptativa se deve a uma alteração reversível das características bacterianas, em vez do surgimento de bactérias resistentes, geneticamente diferentes, e posteriormente novo crescimento da estirpe parental susceptível (BARCLAY et al., 1992).

O fenômeno de resistência adaptativa sugere pouca importância na manutenção de níveis contínuos do antimicrobiano, e até mesmo um potencial efeito prejudicial na manutenção prolongada de níveis de concentrações sub-inibitórias. Sendo assim, a administração com dosagens maiores e intervalos mais longos, talvez sejam mais efetivos (DAIKOS et al., 1990). A indução de resistência adaptativa por aminoglicosídeos fornece uma explicação satisfatória para a observação de que os regimes, com intervalos de administração mais longos parecem melhorar a eficácia clínica do antimicrobiano (DAIKOS et al., 1990; BARCLAY & BEGG, 2001).

Segundo Daikos et al, (1990) os bons resultados obtidos durante anos de uso clínico de aminoglicosídeos, sem atenção a resistência adaptativa, pode ser atribuído a utilização rotineira desses em associação com outros antimicrobianos. Essa prática pode ser mais eficiente em suprimir a manifestação de resistência adaptativa do que o surgimento de bactérias mutantes resistentes. Outro fato importante é que as condições de testes *in vitro* não detectam resistência instável.

Essa falta de compreensão do comportamento das bactérias, frente aos aminoglicosídeos, pode ter culminado com toxicidade desnecessária para o paciente, devido à tentativa de manutenção de níveis plasmáticos, durante os períodos de refratariedade bacteriana.

O não reconhecimento da resistência reversível também pode explicar algumas observações clínicas em que resultados laboratoriais são paradoxais. Dentre esses, aqueles decepcionantes onde se fez o uso somente de aminoglicosídeos, sem outro antimicrobiano. O avanço de bactérias susceptíveis, durante o tratamento é outra expressão clínica de resistência adaptativa que pode ser percebida (DAIKOS et al., 1990).

A extensão do intervalo de dose permite tempo para resolver a resistência adaptativa, pelo menos em parte, antes da segunda e subsequente exposição ao fármaco. Intervalos de dose mais curtos, com administrações múltiplas ou diárias, são susceptíveis a induzir resistência adaptativa persistente (DAIKOS et al., 1991; BARCLAY & BEGG, 2001). O curso de tempo de resistência adaptativa parece estar diretamente relacionado com o perfil de tempo de concentração do aminoglicosídeo (meia vida). É provável que o perfil de concentração-tempo em tecidos mais profundos seja diferente do encontrado no plasma ou no modelo dinâmico *in vitro* (BARCLAY & BEGG, 2001).

A meia vida desses fármacos nesses tecidos pode ser muito prolongada e a resistência adaptativa induzida nesses locais pode durar por períodos ainda mais longos do que o observado nos estudos disponíveis (BARCLAY & BEGG, 2001). Isso reforça ainda mais o argumento de prorrogação dose-intervalo (DAIKOS et al., 1990; BARCLAY & BEGG, 2001).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a resistência adaptável de bactérias Gram-negativas para aminoglicosídeos ocorre no prazo de 1 a 2 horas após a primeira dose (BARCLAY et al., 1992; BARCLAY & BEGG, 2001).

Em experimento utilizando gentamicina com meia-vida de 2,5 horas, o grau de resistência adaptativa e sua duração foram maiores à medida que as

concentrações iniciais (primeira exposição) foram mais elevadas. A resistência adaptativa máxima ocorreu entre 2 e 10 h após 8 µg/mL e entre 2 e 16 h após a 25 µg/mL de gentamicina. A recuperação total de susceptibilidade ocorreu em cerca de 36, 39, e 43 horas, após a utilização de 2,5, 8 e 25 µg/mL, respectivamente. Isso representa 14 a 18 vezes a $t^{1/2}$ (BARCLAY et al. 1992). Outros autores encontraram resistência adaptativa variando entre 16 vezes (KARLOWSKY et al., 1997) e 20 vezes (DAIKOS et al., 1991) a $t^{1/2}$, utilizando outros aminoglicosídeos.

Estudos realizados por Gilleland et al., 1989, mostraram que *P. Aeruginosa* quando exposta continuamente a gentamicina, desenvolveu resistência adaptativa e sobreviveu à exposição de concentrações crescentes de gentamicina até 128 vezes a CIM. Outro fato importante é que bactérias com resistência adaptativa induzida por um aminoglicosídeo também apresentaram resistência cruzada a outros aminoglicosídeos (GILLELAND et al., 1989; DAIKOS et al., 1990; BARCLAY & BEGG, 2001).

Após a exposição inicial ao antimicrobiano em concentrações sub-inibitórias e inibitórias, ambas produziram resistência em bactérias sobreviventes aos efeitos de ligação iônica inicial. O desenvolvimento de refratariedade necessita de um período de crescimento, e foi aumentada pela presença continuada da droga e, depois, revertida após várias horas de crescimento em meio livre do antimicrobiano (DAIKOS et al., 1990).

1.4. Ultrassografia Doppler

Recentemente a ultrassonografia Doppler tem sido utilizada como um método não invasivo de quantificar o fluxo sanguíneo em veias periféricas de equinos (RAISIS et al., 2000; HOFFMANN et al., 2001). Esta técnica é suficientemente sensível para detectar mudanças no fluxo sanguíneo clinicamente significativas durante estados fisiológicos, patológicos ou seguidos de intervenção farmacológica (GUDMUNDSSON et al., 1990; MENZIES-GOW & MARR, 2007).

Esta ferramenta não é utilizada somente para determinar a presença do trombo, mas também para delimitá-lo, determinar o tipo de adesão à parede do vaso (completamente aderido, parcialmente ou livre) e idade do trombo. A técnica evidencia também a ausência de fluxo espontâneo ou induzido, aumento do diâmetro da veia, imobilidade da parede da veia e aumento do fluxo sanguíneo nas veias colaterais, sendo bastante importante também em casos não sintomáticos (ZWIEBEL, 1996; DAUZAT et al., 1997).

A ultrassonografia com Doppler não é invasiva e fornece uma medida quantitativa do fluxo sanguíneo da artéria sob investigação e, portanto, permite a investigação do fluxo de sangue periférico. Os parâmetros obtidos com a ultrassonografia Doppler são chamados de índices hemodinâmicos, e são utilizados para auxiliar na avaliação de estenose, trombose, ou, mais comumente, dos vasos periféricos com fluxo de resistência aumentada. Dentre os mais utilizados estão o índice de resistividade (IR) e o índice de pulsatilidade (IP). Baixos índices de resistividade sugerem alto metabolismo e altos índices de resistividade sugerem baixo metabolismo (CARVALHO et al., 2008).

Em equinos esta técnica já foi estudada na avaliação de cavalos tratados com Isoxsuprine e Pentoxifilina (INGLE-FEHR e BAXTER, 1999), em avaliação do fluxo sanguíneo em diferentes artérias do membro torácico de cavalos normais (COCHARD et al., 2000), no estudo da repetibilidade do fluxo arterial com o membro em apoio e sem apoio (HOFFMANN, et al., 2001) e em cavalos acometidos por laminite ou pododermatite séptica (WONGAUMNUAYKUL, et al., 2006), bem como na avaliação de mudanças na dinâmica vascular de cavalos acometidos por síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e laminite (AGUIRRE, et al., 2013).

1.5. Referências

ADAMS, S.B. Tourniquets. In: WHITE, N.A.; MOORE, J.N. **Current techniques in equine surgery and lameness**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1998. p.385–389.

AGUIRRE, C. N.; TALAVERA, J.; DEL PALACIO, M. J. F. Usefulness of Doppler ultrasonography to assess digital vascular dynamics in horses with systemic inflammatory response syndrome or laminitis. **Journal American Veterinary Medical Association**., v.243, p. 1756–1761, 2013.

BAGGOT, J.D. Princípios de biodisponibilidade e disposição (distribuição e excreção) de medicamentos antimicrobianos. In: GIGUÉRE, S. et al. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2010. p.51

BARCLAY, M. L.; BEGG, E. J. Aminoglycoside adaptive resistance importance for effective dosage regimens. **Drugs**, v. 61, n. 6, p. 713-721, 2001.

BARCLAY, M. L.; BEGG, E. J.; CHAMBERS, S. T. Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic *in vitro* model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 36, n. 9, p. 1951-1957, 1992.

BUTT, T. D.; BAILEY, J. V.; DOWLING, P. M.; et al. Comparison of 2 techniques for regional antibiotic delivery to the equine forelimb: intraosseous perfusion vs. intravenous perfusion. **Canadian Veterinary Journal**. v. 42, p. 617-622, 2001.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Cienc.Rural**.v.38, n.3, p.872-79, 2008.

COOK, V. L.; BERTONE, A. L., KOWALSKI, J. J.; et al. Biodegradable drug delivery systems for gentamicin release and treatment of synovial membrane infection. **Veterinary Surgery**. v. 28, p. 233-241, 1999.

DAIKOS, G. L.; JACKSON, G.G.; LOLANS, V.T.; LIVERMORE, D.M. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 162, p. 414-420, 1990.

DAIKOS, G. L.; LOLANS, V. T.; JACKSON, G. G. First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, n. 1, p. 117-123, 1991.

DAUZAT, M.; LAROCHE, J. P.; DEKLUNDER, G.; et al. Diagnosis of Acute Lower Limb Deep Venous Thrombosis with Ultrasound: Trends and Controversies. **Journal Clinical Ultrasound**. v. 25, p. 343–358, 1997.

FINSTERBUSCH, A.; WEINBERG, H. Venous perfusion of the limb with antibiotics for osteomyelitis and other chronic infections. **J. Bone Jt. Surg**. v.54, p.1227-1233, 1972.

GAGNON, H.; FERGUSON, I.G.; PAPICH, M.G.; BAILEY, I. V. Single-dose pharmacokinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. **J. Vet. Pharmacol. Ther**. 17, 31–37,1994.

GILLELAND, L.B.; GILLELAND, H.E.; GIBSON, J.A.; CHAMPLIN, F.R. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Med. Microbiol**. 29, 41-50, 1989.

GUDMUNDSSON, S.; FAIRLIE, F.; LINGMAN, G.; et al. Recording of blood flow velocity waveforms in the uteroplacental and umbilical circulation: reproducibility

study and comparison of pulsed and continuous wave Doppler ultrasonography. **Journal Clinical Ultrasound**. v. 18, p. 97–101, 1990.

HOFFMANN, K. L.; WOOD, A. K.; GRIFFITHS, K. A.; et al. Doppler sonographic measurements of arterial blood flow and their repeatability in the equine foot during weight bearing and non-weight bearing. **Research Veterinary Science**. v. 70, p.199–203, 2001.

HYDE, R.M.; LYNCH, T.M.; CLARK, C.K.; SLONE, D.E.; HUGHES, F.E. The influence of perfusate volume on antimicrobial concentration in synovial fluid following intravenous regional limb perfusion in the standing horse. **CVJ**. v. 54, p. 363-367, 2013.

KARLOWSKY, J. A.; ZELENITSKY, S. A.; ZHANEL, G. G. Aminoglycoside adaptive resistance. **Pharmacotherapy**. v. 17, n. 3, p. 549-555, 1997.

KRAMER, J. Distal limb perfusion. In: WILSON, D. A. et al. **Manual of equine field surgery**. Philadelphia: Saunders, cap. 8, p. 55-59, 2006.

KRAUS, B. M. Lacerations involving synovial structures: Initial treatment and novel therapy for infectious arthritis/tenosynovitis. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 5, p. 82-92, 2006.

LACY, M.K.; NICOLAU, D.P.; Nightingale C.H. and Quintiliani, R. The pharmacodynamics of aminoglycosides. **Clin. Infect. Dis.** 27, 23–27, 1998.

LEVINE, G.; EPSTEIN, K.; AHERN, B.J.; RICHARDSON, D. W. Efficacy of three tourniquet types for intravenous antimicrobial regional limb perfusion in standing horses. **Veterinary Surgery**. v. 39, p. 1021–1024, 2010.

LLOYD, K.C.; STOVER, S.M.; PASCOE, J.R.; et al. Effect of gentamicin sulfate and sodium bicarbonate on the synovium of clinically normal equine antebrachiocarpal joints. **Am J Vet Res.**, v.49, p.650–657, 1988.

MATTSON, S.; BOURÉ, L.; PEARCE, S.; et al. Intraosseous gentamicin perfusion of the distal metacarpus in standing horses. **Veterinary Surgery**. v. 33, p. 180-186, 2004.

MENZIES-GOW, N. J.; MARR, C. M. Repeatability of Doppler ultrasonographic measurement of equine digital blood flow. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. v. 48, n. 3, p. 281–285, 2007

MOORE, R.M.; SCHNEIDER, R.K.; KOWALSKI, J.; et al. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979–1989. **Equine Veterinary Journal**., v.24, p.450– 456, 1992.

MURPHEY, E. D.; SANTACHI, E. M.; PAPICH, M. G. Regional intravenous perfusion of the distal limb of horses with amikacin sulfate. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, p. 68-71, 1999.

ORSINI, J. A.; ELCE, Y.; KRAUS, B. Management of severely infected wounds in the equine patient. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 3, p. 225-236, 2004.

PARRA-SANCHEZ, A.; LUGO, J.; BOOTHE, D.M.; et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enrofloxacin and a low dose of amikacin administered via regional intravenous limb perfusion in standing horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.67, p.1687–1695, 2006.

RAFAEL, L.A.; RODRIGUES, C.A.; EVANGELISTA, F.C.; RAMIRES NETO, C.; RODRIGUES, M.; PIZZIGATTI, D.; PERRI, S.H.V.; HUSSNI, C.A. Avaliação do efeito trombogênico da perfusão regional intravenosa com gentamicina em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.5, p.1449-1456, 2014.

RAISIS, A. L.; YOUNG, L. E.; MEIRE, H.; et al. Repeatability of Doppler ultrasound measurements of hindlimb blood flow in halothane anaesthetised horses. **Equine Veterinary Journal**. v. 32, p. 239–246, 2000.

RODRIGUES, C.A.; HUSSNI, C.A.; NASCIMENTO E.S., ESTEBAN, C.; PERRI, S.H.V. Pharmacokinetics of tetracycline in plasma, synovial fluid and milk using single intravenous and single intravenous regional doses in dairy cattle with papillomatous digital dermatitis. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 33, n. 4, jul. 2010.

RODRIGUES, K. A. **Farmacocinética da gentamicina administrada pela via intravenosa regional em equinos com a utilização de modelos de torniquetes**. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

RODRIGUES, K.A.; RAFAEL, L.A.; ALVAREZ, L.E.C.; RODRIGUES, M.; MERENDA, V.R.; BERNADINO, P.N.; MODESTO, R.R.; RODRIGUES, C.A. Utilização da ultrassonografia Doppler na avaliação da eficácia de dois tipos de torniquetes utilizados para a perfusão regional intravenosa em equinos. In: XV Conferência Anual ABRAVEQ, 2014, Campos do Jordão. **Anais Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, v.29, n.1, p.176, 2014.

RUBIO-MARTÍNEZ, L. M.; CRUZ, A. M. Antimicrobial regional limb perfusion in horses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v. 228, n. 5, p. 706-712, 2006.

SANTSCHI, E. M.; ADAMS, S. B.; MURPHEY, E. D. How to perform equine intravenous digital perfusion. In: Proceedings Annual Convention of the AAEP. v. 44. p. 198-201, 1998.

SANTSCHI, E. M.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of gentamicin in mares in late pregnancy and early lactation. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic**. v. 23, p. 359-363, 2000.

SCHEUCH, B. C.; VAN HOOGLMOED, L. M., WILSON, W. D.; et al. Comparison of intraosseous or intravenous infusion for delivery of amikacin sulfate to the tibiotarsal joint of horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 63, n. 3, p. 374-380, 2002.

SKOPNIK, H.; WALLRAF, R.; NIES, B.; et al. Pharmacokinetics and antibacterial activity of daily gentamicin. **Arch Dis Child**., n. 67, p. 57-61, 1992.

WHITEHAIR, K. J.; BLEVINS, W. E.; FESSLER, J. F.; et al. Regional perfusion of the equine carpus for antibiotic delivery. **Veterinary Surgery**. v. 21, n. 4, p. 279-285, 1992a.

WHITEHAIR, K. J.; BOWERSOCK, T. L.; BLEVINS, W. E.; et al. Regional limb perfusion for antibiotic treatment of experimentally induced septic arthritis. **Veterinary Surgery**. v. 21, n. 5, p. 367-373, 1992b.

WONGAUMNUAYKUL, S.; SIEDLER, C.; SCHOBESBERGER, H.; STANEK, C. Doppler sonographic evaluation of the digital blood flow in horses with laminitis or septic pododermatitis. **Veterinary Radiology and Ultrasound**., v. 47, n. 2, p. 199–205, 2006.

ZWIEBEL, W. J. **Introdução à ultra-sonografia vascular**. 3 ed., Revinter, Rio de Janeiro, 1996. p. 414.