

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

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DE ANTIFÚNGICOS  
AZÓLICOS EM ANIMAIS INFECTADOS POR *Cryptococcus neoformans***

**IZABEL ALMEIDA ALVES**

PORTO ALEGRE, 2017



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

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DE  
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM ANIMAIS INFECTADOS POR  
*Cryptococcus neoformans*

Tese apresentada por **Izabel Almeida  
Alves** para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre, 2017

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 23.06.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Rigon Zimmer  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Scroferneker  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Elisa Hass  
Universidade Federal do Pampa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Almeida Alves , Izabel  
MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DE  
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM ANIMAIS INFECTADOS POR  
Cryptococcus neoformans / Izabel Almeida Alves . --  
2017.  
184 f.

Orientadora: Bibiana Verlindo de Araújo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2017.

1. Cryptococcus neoformans . 2. Antifúngicos  
azólicos: fluconazol e voriconazol. 3. Microdiálise  
cerebral . 4. Modelagem PK-PD. 5. Simulações de Monte  
Carlo.. I. Verlindo de Araújo, Bibiana , orient. II.  
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405, Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) e Central Analítica de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento do CNPq/449972/2014-3



## AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo aos meus pais Maria Izabel e Cezário por prezar pela minha educação em primeiro lugar e me incentivar a buscar conhecimento perante os desafios da vida. Mãe e pai obrigada pelo apoio nas minhas escolhas e por serem meu porto seguro nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bibiana Verlindo de Araújo, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho. Agradeço também pela amizade e carinho demonstrados durante esses anos de orientação. Os ensinamentos, o incentivo e as oportunidades que me foram oferecidas me fazem admirá-la cada vez mais, tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

A todos os colegas de laboratório, os PKs, pelo ótimo acolhimento, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pelos momentos de descontração, que certamente contribuíram para a realização deste trabalho. Um ambiente agradável faz toda a diferença no desenvolvimento de um trabalho. Especialmente agradeço os colegas Fernando Carreño, Bruna Torres, Kelli Staudt, Carolina Miranda, Ricardo Lorenzoni, Graziela Lock, Daiane Lima, Victória Helfer, Andressa Braga e Juliana Costa. Tenho certeza que além de colegas fiz verdadeiros amigos. Sou grata e tenho muito orgulho de fazer parte de um forte grupo de pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresa Dalla Costa pelos ensinamentos, discussões científicas e por ser um exemplo de sucesso profissional a ser seguido.

Ao meu namorado e companheiro André Müller pela compreensão, por respeitar a minha dedicação na realização deste trabalho, por não deixar desanimar nos momentos difíceis e me incentivar a buscar meus objetivos. “Não importa a distância que nos separa, mas sim o amor que nos une”.

Ao carinho e acolhimento da minha tia Célia, vó Gemma e prima Marina. Obrigada por me receberem com tanto carinho em Porto Alegre. Durante esses 4 anos muitas vezes me senti em casa.

Aos colegas professores e alunos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões de Santo Ângelo - RS por compreenderem que minhas ausências e falta de tempo eram em virtude da complexidade que é a realização de um doutorado.

Não poderia deixar de agradecer minhas amigas que se mantiveram presentes na minha vida, mesmo eu não estando tão presente na vida delas. Quando não estamos próximo aos nossos familiares os amigos se tornam uma extensão da nossa família. Portanto, muito obrigada Tassiana Kaminski, Fernanda Pês, Maureline Petersen, Vanessa de Oliveira, Bruna Correa, Shaiane Martinelli , Lauren Berro, Marieli Astrana, Juliana dos Santos e Giselli Busatto pela força, torcida e amizade.

À todos meus familiares e amigos que mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

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

*Eis que chega a hora, e já se aproxima, em que vós sereis dispersos cada um para sua parte, e me deixareis só; mas não estou só, porque o Pai está comigo.*

*Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz; **no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo**, eu venci o mundo.*

(Jesus: João - 16:32,33)



## RESUMO

O objetivo desta tese foi desenvolver um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) aplicável a avaliação de esquemas posológicos de antifúngicos sistêmicos no tratamento de infecções cerebrais associadas ao *Cryptococcus neoformans*. Inicialmente um modelo de infecção cerebral em ratos Wistar machos imunocompetentes foi estabelecido. Os animais foram inoculados a partir da administração iv de  $1.10^6$  UFC/mL na veia lateral caudal, de uma cepa de *Cryptococcus neoformans var neoformans* (ATCC 28957). A presença da levedura em cérebro, pulmão, fígado, rins e coração foi avaliada após 7, 10 e 14 dias. Paralelamente foram investigados os parâmetros bioquímicos (contagem de leucócitos, TGO, TGP, uréia, creatinina, albumina e CK) e a permeabilidade vascular cerebral com azul de Evans. Após 10 dias de inoculação foi produzida uma infecção com características semelhantes a doença em humanos. *C. neoformans* esteve presente em todos os tecidos investigados pelas análises histológicas e microbiológicas e diferenças nos níveis de albumina, ureia, TGP e CK, alteração no número de leucócitos (monócitos e neutrófilos) e elevação da permeabilidade cerebral ao azul de Evans foram observadas nos animais infectados. Após estabelecida e caracterizada a infecção, foi avaliada a farmacocinética plasmática e tecidual cerebral através da técnica de microdiálise, do fluconazol (FLU) (20 mg/kg, i.v. *bolus*) e do voriconazol (VRC) (5 mg/kg, i.v. *bolus*) em ratos Wistar sadios ( $n = 13$ ) e infectados ( $n = 13$ ). De posse dos dados das concentrações plasmáticas e teciduais vs tempo dos grupos sadios e infectados construiu-se um modelo farmacocinético populacional (PopPK) para cada fármaco investigado. A penetração cerebral do VRC demonstrou-se elevada nos animais infectados ( $fT_{\text{sadios}} = 0,85$  vs  $fT_{\text{infectados}} = 1,86$ ). O modelo PopPK de dois compartimentos e eliminação por Michaelis Menten descreveu o perfil de concentrações *versus* tempo de VRC em plasma e tecido, simultaneamente. A covariável infecção foi incluída em  $V_2$  e  $V_M$ . Observou-se o grande potencial do VRC para tratar meningite associada a *C. neoformans*, pois os níveis alcançados em tecidos infectados foram superiores aos valores descritos para CIM de VRC contra *C. neoformans* (0,03 - 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). A farmacocinética do FLC foi descrita através de um modelo PopPK de dois compartimentos com eliminação linear incluindo dados de concentrações plasmáticas e livres cerebrais para ambos os grupos investigados. Nesse modelo a covariável infecção foi atribuída ao parâmetro  $k_{21}$  e covariável peso

foi atribuída aos parâmetros  $V_1$  e  $V_2$ . De posse desse modelo popPK, foram investigados os desfechos farmacodinâmicos considerando o nível de exposição cerebral nas doses de 125 e 250 mg/kg para ratos e 400-2000 mg para humanos observado em tecido sadio e infectado através da probabilidade de atingir o alvo terapêutico (PTA -  $f_{ASC}/CIM = 389$ ) do FLC usando simulações de Monte Carlo. Essas simulações demonstraram um uso limitado de fluconazol em monoterapia para o tratamento de meningite por *C. neoformans*. Após a etapa farmacocinética procederam-se os estudos farmacodinâmicos através da metodologia de curvas de morte em função do tempo do fluconazol e voriconazol frente a *C. neoformans*. Os dados da curva de morte foram modelados adequadamente com o modelo PK-PD de  $E_{max}$  modificado incluindo um termo de atraso de crescimento. A CIM foi determinada para ambos os fármacos por microdiluição e os valores foram de 0,03 µg/mL para voriconazol e 0,5 µg/mL para fluconazol, indicando que esta cepa ATCC 28957 é sensível a ambos os fármacos. Os valores de  $k$ ,  $EC_{50}$  e  $k_{max}$  foram determinados para vários múltiplos das CIM de cada fármaco (0,03x, 0,06x, 0,25x, 0,5x, 1x, 4x, 16x, 32x e 64x). O valor médio de  $k$  foi de  $0,38 \text{ h}^{-1}$ ,  $EC_{50}$  foi de  $1,26 \pm 0,18 \text{ µg/mL}$  e  $0,32 \pm 0,06 \text{ µg/mL}$  e  $k_{max}$  foi de  $0,95 \pm 0,21 \text{ h}^{-1}$  e  $0,64 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$  para FLC e VRC, respectivamente. Por fim, de posse dos parâmetros calculados através do modelo PK-PD foram realizadas simulações dos desfechos de tratamento para meningite criptocócica no cenário clínico para ambos os fármacos após administração das doses 200 e 400 mg de voriconazol e 800 e 2000 mg de fluconazol por dez semanas. Através das simulações conclui-se que para fluconazol há 25% de insucesso na dose de 800 mg e 10% na dose de 2000 mg com um tempo médio de 3 semanas para erradicação da levedura. Para o voriconazol, o  $EC_{50}$  teve pouco impacto sobre a erradicação do fungo e, em todos os cenários foi observada uma erradicação completa do fungo em curto espaço de tempo (1 - 2 semanas). Os resultados incentivam o uso de voriconazol nos pacientes com meningite criptocócica e uma reavaliação do uso de fluconazol.

**Palavras-chaves:** *Cryptococcus neoformans*, fluconazol, voriconazol, microdiálise, penetração cerebral, modelagem PK-PD e simulações de Monte Carlo.

## ABSTRACT

### Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of azoles antifungals in *Cryptococcus neoformans* infected animals

The aim of this thesis was to develop a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model for the evaluation of systemic antifungal dosing regimens for the treatment of brain infections associated with *Cryptococcus neoformans*. Firstly a model of brain infection in immunocompetent male Wistar rats was established. The animals were inoculated by intravenously administration of  $1 \cdot 10^6$  CFU/mL of *Cryptococcus neoformans var neoformans* (ATCC 28957) into the tail lateral vein. The presence of yeasts in the brain, lung, the liver, kidneys and the heart was evaluated after 7, 10 and 14 days. The biochemical parameters (leucocytes counting, GOT, GPT, urea, creatinine, albumin and CK) and cerebral vascular permeability with Evans blue were investigated. After 10 days post inoculation an infection with characteristics similar in humans was produced. *C. neoformans* was present in all tissues investigated by histological and microbiological analyzes and differences in albumin, urea, GPT and CK levels, alterations in the number of leukocytes (monocytes and neutrophils), and elevation of cerebral permeability to Evans blue were observed in infected animals. After establishing and characterizing the infection, the plasma and cerebral tissue pharmacokinetics were evaluated by microdialysis after administration of fluconazole (FLU) (20 mg/kg, iv bolus) and voriconazole (VRC) (5 mg/kg, iv bolus) in healthy ( $n = 13$ ) and infected Wistar rats ( $n = 13$ ). A population pharmacokinetic model (PopPK) was build for each drug, based on data from plasma and tissue concentrations vs. time of healthy and infected groups. The brain penetration of voriconazole was shown to be high in infected animals ( $fT_{\text{healthy}} = 0.85$  vs  $fT_{\text{infected}} = 1.86$ ) than in healthy ones. The two-compartment model with Michaelis Menten elimination best described the concentration of VRC in plasma and tissue. The covariate infection was included in  $V_2$  and  $V_M$ . The great potential of voriconazole to treat meningitis associated with *C. neoformans* was observed, as the levels reached in infected tissues were higher than the values described for MIC against *C. neoformans* (0.03 - 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ). The pharmacokinetics of FLC was described using a two-compartment model with linear elimination including data from plasma and brain free concentrations for both groups

investigated. In this model the covariate infection was attributed to parameter  $k_{21}$  and covariate weight was assigned to parameters  $V_1$  and  $V_2$ . With this popPK model, the pharmacodynamic outcomes were investigated considering the level of brain exposure at doses of 125 and 250 mg/kg for rats and 400 - 2000 mg for humans observed in healthy and infected tissue through the probability of attaining the target (PTA -  $fAUC/MIC = 389$ ) of fluconazole using Monte Carlo simulations. These simulations demonstrated limited use of fluconazole in monotherapy for the treatment of *C. neoformans* meningitis. After the pharmacokinetics modeling, the pharmacodynamic studies were carried out using the methodology of time-kill curves of fluconazole and voriconazole versus *C. neoformans*. The kill curves data were suitably modeled with the modified  $E_{max}$  PK-PD model including a growth delay term. MIC was determined for both drugs by microdilution and values were  $0.03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for voriconazole and  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for fluconazole, indicating that this ATCC 28957 strain is sensitive to both drugs. The values of  $k$ ,  $EC_{50}$  and  $k_{max}$  were determined for several MIC multiples of each drug (0.03 x, 0.06 x, 0.25 x, 0.5x, 1 x 4 x, 16 x, 32 x and 64 x). The mean value of  $k$  was  $0.38 \text{ h}^{-1}$ ,  $EC_{50}$  was  $1.26 \pm 0.18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $0.32 \pm 0.06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $k_{max}$  was  $0.95 \pm 0.21 \text{ h}^{-1}$  and  $0.64 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$  for FLC and VRC, respectively. Finally, the parameters obtained using the PK-PD model were used to simulate treatment outcomes for cryptococcal meningitis in the clinical setting for both drugs after administration of 200 and 400 mg of voriconazole and 800 and 2000 mg of fluconazole for 10 weeks. By the simulations it is concluded that for fluconazole there is a 25% rate of failure at the dose of 800 mg and 10% at the dose of 2000 mg with an average time of 3 weeks for eradication of the yeast. For voriconazole, the  $EC_{50}$  had little impact on fungus eradication and, in all scenarios complete eradication of the fungus was observed in a short time (1 - 2 weeks). The results encourage the use of voriconazole in patients with cryptococcal meningitis and a reassessment of fluconazole use.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, fluconazole, voriconazole, microdialysis, brain penetration, PK-PD modeling, Monte Carlo simulation.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Atividade <i>in vitro</i> do fluconazol frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	47
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros farmacocinéticos do fluconazol em diversas espécies de animais.....	48
<b>Tabela 3.</b> Atividade <i>in vitro</i> do voriconazol frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	50
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em cinco espécies de animais.....	53

### CAPÍTULO 1

<b>Table 1.</b> The total yeast count in the brains, heart, lungs, kidneys, livers evaluated 7, 10 and 14 days post infection in infected <i>Cryptococcus neoformans</i> Wistar rats.....	78
<b>Table 2.</b> Area under the curve versus time and tissue penetration factor (ft) observed after the administration of fluconazole (20 mg.kg <sup>-1</sup> ) in healthy and <i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28957) infected Wistar rats.....	80

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1.</b> Parameter estimates on the final VCZ population PK model.....	104
---	-----

### CAPÍTULO 3

<b>Table 1.</b> FLC plasma pharmacokinetic parameters calculated by non-compartmental analysis (NCA) after i.v. bolus administration of 20 mg/kg to healthy and infected animals .....	126
<b>Table 2.</b> Parameter estimates of the final FLC population PK model .....	126

### CAPÍTULO 4

<b>Table 1.</b> PK-PD Parameters of fluconazole against <i>C. neoformans</i> ATCC 28957 at different multiples of the MIC (0.5 µg/mL) .....	144
<b>Table 2.</b> PK-PD Parameters of voriconazole against <i>C. neoformans</i> ATCC 28957 at different multiples of the MIC (0.03µg/mL) .....	145



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1.</b> Incidência global de pacientes infectados pelo vírus HIV com infecções por <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	30
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do fluconazol.....	45
<b>Figura 3.</b> Atividade fungistática do fluconazol contra <i>Cryptococcus neoformans</i> por estudos de morte em função do tempo ( <i>time-kill curve</i> ).....	47
<b>Figura 4.</b> Modificação estrutural entre fluconazol e voriconazol.....	49
<b>Figura 5.</b> Perfil de concentração plasmática livre e cerebral em função do tempo em ratos Wistar sadios para a dose de 20 mg/kg.....	57
<b>Figura 6.</b> Probabilidade de atingir o alvo de $fAUC_{24}/CIM \geq 25$ por CIMs.....	68

### CAPÍTULO 1

<b>Figure 1.</b> Experimental design for the establishment of the infection and the parameters investigated on this study.....	74
<b>Figure 2.</b> Histopathological analysis of organ tissues.....	81
<b>Figure 3.</b> Results of biochemical parameters of healthy and infected by <i>C. neoformans</i> animals .....	92

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1.</b> Profile mean total plasma and free brain profiles from healthy and <i>Cryptococcus neoformans</i> infected rats .....	102
<b>Figure 2.</b> Goodness-of-fit plots for VCZ total plasma and free brain concentrations.....	106

### CAPÍTULO 3

<b>Figure 1.</b> Goodness-of-fit plots for FLC total plasma and free brain concentrations.....	122
<b>Figure 2.</b> Relative recoveries determined by dialysis and retrodialysis for fluconazole.....	124
<b>Figure 3.</b> Probability of PK-PD target attainment ( $fAUC/MIC > 389$ ) of FLC against <i>Cryptococcus neoformans</i> in rats.....	130
<b>Figure 4.</b> Probability of PK-PD target attainment ( $fAUC/MIC > 389$ ) of FLC against <i>Cryptococcus neoformans</i> in humans .....	131

### CAPÍTULO 4

<b>Figure 1.</b> <i>Cryptococcus neoformans</i> var <i>neoformans</i> ATCC 28957 growth curve <i>in vitro</i> .....	143
<b>Figure 2.</b> Fitted <i>time-kill</i> curves derived by $E_{max}$ model for changing concentrations of fluconazole.....	146
<b>Figure 3.</b> Fitted <i>time-kill</i> curves derived $E_{max}$ model for changing concentrations of voriconazole .....	146

**Figure 4.** PK-PD Monte Carlo simulations of clinical response based on time-kill curves of Fluconazole against *C. neoformans* and one compartmental PopPK model.....148

**Figure 5.** PK-PD Monte Carlo simulations of clinical response on time-kill curves of voriconazole against *C. neoformans* and one compartmental PopPK model.....148

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	211
1. Infecções fúngicas por <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	29
2. Desafios no tratamento de infecções fúngicas .....	32
2.1 Perfil de susceptibilidade do <i>Cryptococcus spp.</i> .....	34
3. Avaliação farmacodinâmica antifúngica .....	36
3.1 Modelos <i>in vitro</i> .....	36
3.2 Modelos <i>in vivo</i> .....	38
4. Índices PK-PD aplicados a antifúngicos .....	42
5. Antifúngicos azólicos .....	44
5.1 Fluconazol .....	45
5.1.1 Características químicas .....	45
5.1.2 Características farmacodinâmicas .....	46
5.1.3 Características farmacocinéticas .....	48
5.2 Voriconazol .....	49
5.2.1 Características químicas .....	49
5.2.2 Características farmacodinâmicas .....	49
5.2.3 Características farmacocinéticas .....	50
6. Microdiálise .....	54
7. Modelagem populacional .....	57
8. Modelagem PK-PD de antimicrobianos .....	61
9. Simulações de Monte Carlo .....	66
<b>CAPÍTULO 1</b> - Is meningitis by <i>Cryptococcus neoformans</i> able to change the brain distribution of antifungals? An animal model to link disease and changes in pharmacokinetics .....	70
<b>CAPÍTULO 2</b> – Influence of experimental cryptococcal meningitis in Wistar rats on voriconazole brain penetration assessed by microdialysis .....	721
<b>CAPÍTULO 3</b> - Free brain levels reached by fluconazole in healthy and <i>Cryptococcus neoformans</i> infected rats: a translational study about the doses employed clinically .....	1123
<b>CAPÍTULO 4</b> - PK-PD modeling of triazoles against <i>Cryptococcus neoformans</i> using <i>time-kill curves</i> , modeling and simulation .....	116
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	13855
<b>CONCLUSÕES</b> .....	1637







Nas últimas décadas, os avanços da medicina como os tratamentos quimioterápicos, transplantes de órgãos, agentes antibacterianos de amplo espectro e até mesmo a nutrição parenteral, trouxeram novas esperanças ao tratamento de diversas doenças. Entretanto, seja por imunossupressão do paciente ou por tratar-se de práticas de caráter invasivo, essas intervenções aumentaram o risco de infecções oportunistas, como as fúngicas. Dentre as micoses mais prevalentes, destacam-se as candidemias e as criptococoses (YAMAMOTO et al., 2013).

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica causada pelas leveduras do gênero *Cryptococcus*. A meningoencefalite por *Cryptococcus spp.* apresenta mortalidade variando entre 30 e 90% quando associada a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e tem como principal agente causador a espécie *C. neoformans*, responsável por 99% dos casos (MAY et al., 2016; SABIITI; MAY, 2012).

Mundialmente, a meningite criptocócica afeta 1 milhão de pessoas anualmente, resultando na morte de 400 mil pessoas ainda no primeiro trimestre da infecção. Na América Latina, a criptococose é a principal causa das meningites oportunistas, com uma taxa de mortalidade que alcança os 55%, colocando o continente como terceiro no ranking mundial, com aproximadamente 55 mil casos/ano (MAY et al., 2016; VIDAL et al., 2013).

Para o tratamento dessa infecção o Consenso Brasileiro em Criptococose (2008), a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2011) e a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (2010) sugerem como terapia o uso da anfotericina B, anfotericina B complexo lipídico ou lipossomal, fluconazol, voriconazol, itraconazol e flucitosina em diferentes combinações (GRUMACH et al., 2008; PERFECT et al., 2010; PERFECT; BICANIC, 2015)

A anfotericina B é um agente fungicida bastante eficaz frente ao *C. neoformans* apresentando poucos relatos relacionados à resistência. Entretanto, sua nefrotoxicidade e elevado custo representam um risco e uma limitação de seu uso. Os azóis, portanto, por apresentarem menor toxicidade, vantagem da administração oral e boa biodisponibilidade, ganharam espaço no tratamento da meningite criptocócica (CATALÁN; MONTEJO, 2006; DOLTON; MCLACHLAN, 2014; COELHO; CASADEVALL, 2016;).

O primeiro azólico a demonstrar atividade frente ao *C. neoformans* foi o fluconazol. Seu subsequente uso abusivo levou ao desenvolvimento de resistência

antifúngica, surgindo então a necessidade de novos representantes mais eficazes, com menor potencial de desenvolvimento de resistência, como o voriconazol (ARAÚJO, 2008; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2012).

As características farmacocinéticas e físico-químicas dos azólicos lhes conferem uma boa capacidade de penetração tecidual, principalmente em tecidos de difícil penetração como o cérebro. Sendo assim, apresentam-se como uma boa alternativa terapêutica para o tratamento de meningite fúngica como a criptococose (GRUMACH *et al.*, 2008; ZONIOS; BENNETT, 2008)

O fluconazol, além de apresentar boa biodisponibilidade, 90% possui coeficiente de partição (log P) de 0,58. O log P é um parâmetro frequentemente usado como medida quantitativa da lipofilia de compostos bioativos. Um log P de 0,58 indica que a molécula apresenta baixa lipofilia (AVDEEF, 2001; CLEMENTE, 2015). Além disso, o fluconazol apresenta uma baixa ligação a proteínas plasmáticas ( $f_u = 90\%$ ) e sua principal via de eliminação é a renal (MOMPER *et al.*, 2016; RICHARDSON *et al.*, 1990). Já o voriconazol apresenta uma moderada lipofilia com log P de 1,82, intermediária ligação a proteínas plasmáticas ( $f_u = 36\%$ ) e sua eliminação se dá prioritariamente pela via metabólica, por meio das isoformas do CYP450 (CATALÁN; MONTEJO, 2006; DOLTON; MCLACHLAN, 2014).

Compreender a penetração tecidual dos antifúngicos é fundamental para a devida apreciação da sua eficácia no tratamento de meningites, pois as concentrações cerebrais alcançadas por esses fármacos pode diferir significativamente das observadas na corrente sanguínea (MOUTON *et al.*, 2008).

Existem algumas dificuldades para estimar as concentrações teciduais de agentes antifúngicos. Inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas no estudo do transporte cerebral de fármacos. A extração e homogeneização do cérebro é um método tradicionalmente utilizado para determinar a distribuição cerebral de fármacos. Entretanto, quando esta técnica é realizada apenas uma concentração por tempo, por animal, pode ser definida. (MALHOTRA, 1994). Outro fato importante a ser levado em consideração são as diferenças das características físico químicas e farmacocinéticas entre os antifúngicos, que pode gerar distribuições teciduais diferentes entre eles. Além do mais, é importante considerar as situações especiais, como quando o fármaco apresenta elevada ligação a proteínas plasmáticas, penetração em tecidos de difícil acesso como o tecido cerebral ou processos

infeciosos/inflamatórios, pois podem implicar em diferenças importantes nas concentrações plasmáticas e teciduais alcançadas pelos antifúngicos (DERENDORF; HOCHHAUS, 1995; LEVÊQUE et al., 2006).

As falhas terapêuticas de antifúngicos podem estar relacionadas aos elementos da tríade hospedeiro, fármaco e microrganismo. Os pacientes acometidos pelo *C. neoformans*, em geral, apresentam severo imunocomprometimento que reduz sua capacidade de combater a infecção; os microrganismos junto a esse cenário tem melhorado suas estratégias de colonização e mecanismos de resistência, o que associado a ausência de estratégias de otimização do tratamento tem potencializado os desafios no combate dessas infecções. Além disso mudanças no tecido, ocasionadas pelo processo infeccioso, podem limitar a penetração de antimicrobianos e impedir assim a erradicação do patógeno e eficácia do agente antifúngico (LEVISON; LEVISON, 2009; LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011).

Os perfis de concentrações teciduais *versus* tempo de antimicrobianos podem ser determinados empregando-se uma técnica bastante difundida em nosso grupo de pesquisa que é a microdiálise (ARAÚJO, 2008a; AZEREDO et al., 2012; PIGATTO et al., 2016; ZIMMERMANN; TORRES; DALLA COSTA, 2016). Esta apresenta como vantagem a possibilidade de aferição apenas da fração livre do fármaco no fluido intersticial, que é o local de ação de muitos antimicrobianos. Com a microdiálise é possível comparar os perfis de concentração/tempo de fármacos em tecidos infectados e sadios e, assim, verificar se a infecção produz ou não alterações na distribuição tecidual do fármaco (MÜLLER, 2000; NOTKINA; DAHYOT-FIZELIER; GUPTA, 2012).

O conhecimento do impacto do proceso infeccioso na penetração de antifúngicos no tecido cerebral associado ao tratamento matemático apropriado desses dados, utilizando modelagens e simulações, permitirá uma melhor compreensão sobre o tratamento da meningite criptocócica (ARAÚJO, 2008a; AZEREDO et al., 2015). Neste contexto, a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) surge como ferramenta inovadora para definir o melhor esquema posológico nesse cenário. (ANDES, 2006; CSAJKA; VEROTTA, 2006; JACOBS et al., 2016).

Diante do exposto, e devido a escassez de dados relativos ao perfil de penetração cerebral dos azólicos mais empregados para o tratamento de criptococose, como o fluconazol e voriconazol e sua importância para o desfecho dos

tratamentos, a presente tese tem como objetivo geral desenvolver um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) aplicável a avaliação do uso desses antifúngicos sistêmicos no tratamento de infecções fúngicas cerebrais associadas ao *Cryptococcus neoformans*.

Para alcançar esse objetivo geral, os objetivos específicos deste trabalho são:

– Desenvolver um modelo de infecção experimental de meningite por *C. neoformans* em ratos Wistar;

- Avaliar os níveis de fluconazol e voriconazol por microdiálise cerebral em ratos Wistar machos saudáveis e infectados e verificar se há influência da meningite experimental causada por *C. neoformans* na penetração cerebral do fluconazol e do voriconazol;

– Simular os desfechos esperados após o tratamento com dose padrão de fluconazol, considerando a exposição cerebral observada em animais saudáveis e infectados, através da análise de probabilidade de alcance do alvo (PTA) com simulação de Monte Carlo.

- Fazer uma abordagem translacional dos dados do fluconazol de roedores para humanos, avaliando o impacto da meningite criptocócica sobre o desfecho de tratamentos em humanos e, com base em parâmetros farmacocinéticos populacionais descritos na literatura para pacientes e fazer análise de PTA utilizando simulação de Monte Carlo.

– Avaliar, através das curvas de morte fúngica em função do tempo, o efeito das concentrações múltiplas a CIM do fluconazol e do voriconazol frente a *C. neoformans* ATCC 28957.

– Desenvolver um modelo PK-PD para descrever o efeito de morte fúngica em função do tempo obtido para fluconazol e voriconazol e, de posse dos parâmetros calculados, simular desfechos de tratamento para meningite com esses antifúngicos no cenário clínico através de Monte Carlo.





## 1. Infecções fúngicas por *Cryptococcus neoformans*

A frequência de infecções fúngicas invasivas causadas por fungos oportunistas tem aumentado substancialmente nas últimas três décadas (COELHO; CASADEVALL, 2016; MAY et al., 2016). A pandemia global do vírus da imunodeficiência humana (HIV) levou à um número sem precedentes de infecções fúngicas oportunistas nesta população (VALLABHANENI et al., 2016; VIDAL et al., 2013). Além disso, os avanços da medicina como os tratamentos quimioterápicos, transplantes de órgãos, novos agentes antibacterianos e até mesmo a nutrição parenteral, seja por imunossupressão ou por tratar-se de uma prática invasiva, corroboraram para o aumento do risco de desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas (YAMAMOTO et al., 2013).

Dentre as infecções fúngicas invasivas pode-se destacar candidíase, aspergilose, histoplasmose, penicillinose e criptococose. A meningite criptocócica é uma das mais importantes infecções oportunistas relacionadas ao imunocomprometimento ocasionado pelo HIV, especialmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (ANDRADE-SILVA et al., 2013; LONGLEY et al., 2008; PARK et al., 2009).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) anualmente cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica ocorrem mundialmente, de acordo com dados epidemiológicos disponíveis entre os anos de 1996 a 2009, entre as pessoas infectadas pelo vírus HIV (PARK et al., 2009; COELHO; CASADEVALL, 2016).

Sabe-se que as doenças fúngicas tem seus registros negligenciados, seja pela falta de iniciativas por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) ou pela escassez de programas nacionais de vigilância para contabilizar os casos. No estudo do CDC foi observado que a região com o maior número de casos de criptococose é a Sub-saariana, com 720.000 casos por ano, já a Europa e Ásia Central e Oceania tiveram o menor número de casos estimados (Figura 1) (BROWN et al., 2012; PARK et al., 2009). Sabe-se que o efeito da terapia antirretroviral altamente ativa (TAA) baseada em inibidores de protease e inibidores de transcriptase reversa, tem um papel importante no controle das infecções fúngicas oportunistas nos países

desenvolvidos, pois indiretamente demonstra que a população possui mais acesso ao cuidados de saúde (MCCARTHY et al., 2006; COSTA, 2010).



**Figura 1.** Incidência global de pacientes infectados pelo vírus HIV com infecções por *Cryptococcus neoformans*. Fonte: CDC, [s.d.]; PARK et al., 2009.

Um aspecto a ser destacado são as elevadas taxas de mortalidade apresentadas pela criptococose, que variam entre 15 a 20% nos Estados Unidos e 55 a 70% na América Latina e região Sub-Saariana, com estimativa de 625.000 mortes mundialmente (PARK et al., 2009; BROWN et al., 2012). Dados do sistema único de saúde (SUS) revelam que no Brasil, a criptococose é a principal causa de meningite em pacientes acometidos pelo vírus HIV (AGUIAR et al., 2017). Em um hospital do estado de Goiás, durante os anos de 2009 e 2010 foram observados 62 casos de criptococose, e a taxa de mortalidade nestes pacientes foi de 48,4% (SOUZA et al., 2013).

Atualmente, na prática clínica, as infecções criptocócicas continuam sendo frequentes em pacientes que ainda não receberam a TAA, nos que não aderem ao tratamento ou quando há falência do esquema antiretroviral (RICARDO NEGRONI, 2012; LEVINSON, 2016).

A criptococose é causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus*. Este gênero compreende duas espécies, *C. neoformans*, que está presente na natureza colonizando intestino de pombas e *C. gattii*, presente principalmente em ocos de árvores. A espécie *C. neoformans* é subdividida em duas

variedades: *grubii* e *neoformans*, apresentando os sorotipos A, D e um híbrido, AD. Destes, o sorotipo A é o principal responsável pelos casos de criptococose associados à SIDA na América do Sul e o sorotipo D na Europa (RICARDO NEGRONI, 2012).

A porta de entrada para este patógeno exógeno costuma ser a via respiratória, pois a propagação desta levedura através do ar é elevada, visto que possuem tamanho menor que 2 µm. Uma vez inalado alcança os alvéolos pulmonares, podendo permanecer nas vias respiratórias e tornar-se uma infecção assintomática, ou disseminar-se por todo o organismo (REZENDE *et al.*, 2008; MATSUMOTO, 2006; NEGRONI, 2012).

A forma pela qual esta levedura é capaz de migrar do foco inicial para outros tecidos, incluindo o cérebro, tem sido relacionada ao mecanismo denominado “cavalo de Tróia”. Esse mecanismo é explicado pelo fato de que inicialmente a resposta imunológica celular contra o *Cryptococcus* é mediada pelos macrófagos, e assim quando o patógeno é fagocitado pode trafegar para os outros tecidos no interior desta célula, pois é uma levedura intracelular facultativa, e através deste processo não se expõe ao sistema imune do paciente. Existem algumas explicações para a ocorrência deste mecanismo, o mais aceito é em decorrência da exposição de um fator de virulência essencial, a produção de uma cápsula polissacarídea, que recobre a levedura e impede a ação fagolítica dos macrófagos. Um fator que favorece a penetração e instalação do *Cryptococcus* no tecido cerebral se dá pelo fato dos polissacarídeos da cápsula induzirem a dessensibilização cruzada de receptores de quimiotaxia e assim ocasionando uma redução na adesão e migração leucocitária através do endotélio (CHANG *et al.*, 2004; CÓRDOBA; AFELTRA; VITALE, 2011; PESSOA; SILVA; GOMES, 2012; GRACIA, 2014).

A meningoencefalite é a principal manifestação clínica da criptococose por *C. neoformans*, e possui evolução grave e fatal. E explicação para esse tropismo neurológico se dá pela produção de melanina que se deposita na parede do fungo é proveniente de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas catalizadoras como a fenoloxidase. O cérebro é rico em substratos para a fenoloxidase tais como a dopamina e poderia ser responsável pela propensão desta levedura infectar o tecido cerebral. Na grande parte dos pacientes essa forma clínica se manifesta de maneira subaguda, com sintomas que vão de cefaléia e febre à alteração do nível de

consciência (COELHO; CASADEVALL, 2016; PERFECT et al., 2010; SABIITI; MAY, 2012).

Em pacientes gravemente imunossuprimidos a meningoencefalite pode ser acompanhada de fungemia disseminativa com focos secundários em pulmão, pele, ossos, rins, supra-renal, fígado, entre outros. A forma pulmonar é a segunda mais frequente, e sua manifestação muitas vezes é semelhante ao quadro de pneumonia, podendo evoluir para insuficiência respiratória aguda (GRUMACH et al., 2008). O *C. neoformans* também tem sido frequentemente relacionado com lesão hepática em pacientes infectados pelo HIV (LANJEWAR et al., 2004). Em um estudo que avaliou cortes histológicos de pacientes internados em um hospital no estado de São Paulo-BR em 2010, observou que o *Cryptococcus* foi o principal fungo oportunista presente nas lesões hepáticas de pacientes imunocomprometidos (PEREIRA; YAMAGUTTI; MENDONÇA, 2010) .

O pior prognóstico na meningite criptocócica está relacionado com a ausência de resposta inflamatória, com contagem de leucócitos abaixo de 20 células/mL no líquido; alteração no estado mental; hipertensão craniana; elevada carga fúngica comprovada pela alta titulação em látex no líquido; disseminação em outros órgãos e imunossupressão avançada com linfócitos T CD4 menores que 50 cels/mm<sup>3</sup> (DELGADO et al., 2005; GRUMACH et al., 2008).

## **2. Desafios no tratamento de infecções fúngicas**

Frequentemente o tratamento das infecções fúngicas invasivas inicia-se empiricamente, uma vez que o diagnóstico pode ser difícil e habitualmente é obtido tardiamente, pois esses fungos na maioria dos casos apresentam crescimento lento (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008). Melhorias no diagnóstico de tais infecções, que propiciem maior rapidez no início da terapia e a escolha apropriada do antifúngico, além de profilaxia eficaz e desenvolvimento de medicamentos que aumentem a capacidade de resposta dos organismos imunocomprometidos ainda são necessários (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PAPPAS et al., 2004).

Embora o número de antifúngicos tenha aumentado nos últimos anos, o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas é ainda limitado a apenas três classes

de antifúngicos, os azólicos, as equinocandinas e os poliênicos. Atualmente existem 15 agentes aprovados para uso sistêmico, entretanto com mecanismos de ação ainda restritos. Dessa maneira, a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos é evidente (DELGADO et al., 2005; (PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015).

Do ponto de vista farmacodinâmico, as semelhanças entre as células fúngicas e as células de mamíferos tem tornado o desenvolvimento da antifungoterapia mais difícil, pois ambas são eucarióticas e possuem organelas muito semelhantes, incluindo-se também a replicação do DNA e a síntese protéica (PAPPAS et al., 2009).

Outras limitações são as propriedades farmacocinéticas dos antifúngicos já existentes, tais como interações medicamentosas importantes, metabolismo variável e não-linear e as reações adversas hepatotóxicas e nefrotóxicas que são relativamente comuns (DOLTON; MCLACHLAN, 2014).

A resistência aos antifúngicos, também representa um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento das infecções fúngicas oportunistas (GALLE; GIANINNI, 2004). Esse aumento da resistência pode ter sido impulsionado pelo uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente desses fármacos na profilaxia de infecções fúngicas (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010). Determinadas leveduras, além de desenvolver resistência a um agente antifúngico, podem apresentar resistência cruzada entre agentes da mesma classe farmacológica ou até mesmo de classes diferentes (NUNES et al., 2011).

Contudo, o tratamento bem sucedido não depende apenas da suscetibilidade do organismo ao antifúngico, como também é dependente do bom funcionamento do sistema imune do hospedeiro, da penetração e distribuição do fármaco no tecido infectado, e do foco infeccioso estar ou não protegido (AMI; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2008).

Em relação a penetração de fármacos no SNC as concentrações dos fármacos na ausência de inflamação meníngea podem representar concentrações encontradas no início de uma infecção ou durante a sua resolução. Sendo assim, é desejável que o fármaco antimicrobiano alcance concentrações eficazes no cérebro não apenas com inflamações. Em caso de meningites, a barreira hematoencefálica torna-se mais permeável pois há abertura das junções intercelulares das paredes dos vasos. Além

disso, a atividade de bombas de efluxo podem ser inibidas por citocinas pró-inflamatórias (NAU; SÖRGEL; EIFFERT, 2010).

### 2.1 Perfil de susceptibilidade do *Cryptococcus spp*

Devido ao aumento da incidência das infecções fúngicas sistêmicas graves oportunistas, e o surgimento de novos agentes antifúngicos, houve um interesse em desenvolver métodos que auxiliem na padronização das metodologias capazes de avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos patógenos fúngicos (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010). Comitês formados por especialistas de diversas localidades tiveram como objetivo estudar o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, e caracterizar peculiaridades dos testes tais como: preparação do inóculo, os meios de cultura a serem utilizados, padrões de qualidade, bem como as faixas de concentrações inibitória mínima (CIM) específicas para cada espécie de levedura (CLSI, 2008)

Os principais comitês são o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dos Estados Unidos, e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test* (EUCAST) da Europa. Ambos comitês estabeleceram a padronização para determinação da susceptibilidade *in vitro* de isolados fúngicos leveduriformes em meio de diluição líquida (macrodiluição e microdiluição). Os métodos são equivalentes: o protocolo M27-S4 do CLSI (2012) e o 7.3 do EUCAST (2015), e os valores de CIM são correspondentes. O que os difere nos métodos são algumas peculiaridades em relação a meio de cultura, temperatura de incubação e concentração do inóculo (CLSI, 2012; EUCAST, 2015)

Estudos *in vitro* demonstram que os isolados de *Cryptococcus* são em sua grande maioria, sensíveis aos antifúngicos poliênicos (anfotericina B), 5-fluocitosina, e aos azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010; ESPINEL-INGROFF et al., 2012; PFALLER et al., 2015). Embora os *breakpoints* da CIM para *Cryptococcus* ainda não estão definidos pelo CLSI, para nenhum dos antifúngicos, atualmente não há estudos que mostrem a relação entre a CIM para *Cryptococcus* e o desfecho clínico da infecção em humanos (GRUMACH et al., 2008); (SMITH et al., 2015).

Desde 1997, o CSLI recomenda o uso da interpretação para *breakpoint* da CIM para fluconazol frente a isolados de *Candida spp* seja o mesmo para *Cryptococcus*

spp. Entretanto, os pontos de corte para *Candida* foram alterados na última atualização do CLSI e não está claro se esses novos pontos de corte são apropriados para *Cryptococcus*. Os novos dados contidos no documento M27-S4 (2012) para interpretação para fluconazol são os seguintes: CIM < 2 µg/mL para a categoria sensível, CIM igual a 4 µg/mL para classe de cepas com sensibilidade dependente da dose (SDS) e CIM ≥ 8 µg/mL para o grupo de resistentes (CLSI, 2012).

Para fins de detecção de resistência de *Cryptococcus*, o Consenso em Criptococose Brasileiro (GRUMACH et al., 2008) recomenda que o primeiro isolado seja armazenado até um ano após o diagnóstico para que, em casos de recaída, a CIM possa ser comparada com a inicial. A detecção de aumento, nos valores da CIM, quatro vezes acima dos isolados subsequentes quando comparado ao inicial, sugere que a falha clínica e terapêutica pode ter sido pelo componente de resistência ao antifúngico, recomendando-se a troca do tratamento. Para *Cryptococcus* com CIM ≥ 16 µg/mL frente a fluconazol, pode estar relacionada com falha terapêutica. Sabe-se que o uso de fluconazol prolongado durante a terapia de manutenção nos casos de meningite criptocócica nos pacientes com AIDS, pode ter levado a emergência da resistência do *Cryptococcus* aos azólicos (GRUMACH et al., 2008; NASRI et al., 2016; PFALLER et al., 2014).

Para os demais fármacos os valores empregados por alguns autores que utilizam o método do CLSI são os seguintes: para definir resistência à anfotericina B CIM > 2 µg/mL; cetoconazol CIM > 2 µg/mL; itraconazol CIM > 1 µg/mL; e voriconazol CIM > 4,0 µg/mL (ANDRADE-SILVA et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2015).

Uma das desvantagens da técnica de determinação da CIM em caldo é a dificuldade de implementação na rotina de laboratórios clínicos, pois estes testes necessitam de um ambiente individualizado e especializado para sua realização. Além disso, essa técnica é laboriosa e dispendiosa, sendo assim fica inviável a realização do teste para um único isolado clínico. Atualmente existem alternativas para a sua realização como as fitas para ágar impregnadas com gradiente de concentrações de antifúngicos (Etest, AB - BioDisk, Suécia) que são utilizadas para a determinação da CIM, dos quais os resultados são comparáveis aos testes de microdiluição dos comitês CLSI e EUCAST, e são mais simples de realizar na rotina de laboratórios clínicos (CAMPANA et al., 2011; JÚNIOR et al., 2012; OZCAN et al., 2010)

A determinação da atividade dos antifúngicos possibilita realizar uma correlação entre atividade *in vitro* e resposta clínica, sendo possível desta forma, monitorar a resistência aos antifúngicos no curso do tratamento clínico (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011). Entretanto, observa-se que apesar da tentativa dos comitês em padronizar os métodos empregados e os pontos de corte para CIM dos antifúngicos frente a leveduras, ainda não existem pontos de corte que definam a sensibilidade e resistência as espécies de *Cryptococcus* spp. para os antifúngicos.

### **3. Avaliação farmacodinâmica antifúngica**

#### **3.1 Modelos *in vitro***

A terapêutica antimicrobiana tem como objetivo a erradicação efetiva de microrganismos patogênicos, com menor dose possível, em curto período de tempo e com menos efeitos colaterais. A determinação de esquemas posológicos apropriados depende do conhecimento e integração das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antimicrobiano (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

Através de uma compreensão de propriedades farmacodinâmicas dos antifúngicos e a aplicação clínica desses princípios, pode-se identificar estratégias de dosagem que resultarão na maximização do efeito terapêutico e minimização de efeitos adversos relacionados com aos fármacos (KLEPSEK; WOLFE; PFALLER, 1998; LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011).

Os parâmetros farmacodinâmicos mais frequentemente utilizados para caracterizar a atividade antimicrobiana são a determinação da CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) (EBERT; CRAIG, 1990; HOPE; DRUSANO, 2009; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016). No entanto, estes parâmetros apresentam uma série de limitações. Entre eles, o ensaio da determinação da CIM não permite que se observe o comportamento do microrganismo em concentrações flutuantes, o que é mais próximo da realidade *in vivo*; a leitura é realizada em tempos pré-determinados (24 ou 48 h), de forma que o efeito do tempo de exposição ao antibiótico não pode ser avaliado; finalmente, não são obtidos dados sobre a taxa de crescimento microbiano ao longo do período de exposição ao fármaco (ESPINEL-INGROFF, 2003; LEVÊQUE et al., 2006).

Uma alternativa para superar algumas dessas limitações é a utilização de curvas de morte em função do tempo (*Time-kill curve*), na qual o efeito é avaliado em diferentes momentos. Os dados recolhidos a partir desses estudos, fornecem informações importantes sobre a taxa e a extensão da atividade fungicida, características farmacodinâmicas (isto é, a relação entre concentração e efeito e o efeito pós-antibiótico), e potencial de antagonismo ou sinergismo entre agentes antibacterianos administrados concomitantemente (KLEPSEK et al., 1998; MOUTON et al., 2005; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

O teste de *time-kill curve* tornou-se uma ferramenta indispensável para a avaliação da atividade dos agentes antimicrobianos frente aos patógenos (KLEPSEK et al., 1998; MOUTON et al., 2005; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016). O modelo de curva de morte consiste na utilização de vários frascos com meio de cultura contendo um inóculo de concentração padronizada do microrganismo a ser testado em diferentes concentrações do fármaco em estudo, múltiplos ou frações da CIM. O sistema é mantido sob temperatura controlada, em tempos pré-determinados, são retiradas alíquotas do meio de cultura, as quais são diluídas em série e posteriormente plaqueadas e incubadas. De posse dos dados da contagem de microrganismos presentes nas placas são plotadas curvas Log UFC/mL *versus* o tempo (KLEPSEK et al., 2000).

Na literatura atual há escassos trabalhos com *time-kill curves* de azólicos frente a *Cryptococcus*. Um deles foi realizado por Klepser e colaboradores em 2000, e neste estudo foi avaliada a farmacodinâmica do voriconazol e do fluconazol frente a *Candida* spp. e *C. neoformans* utilizando a metodologia de *time-kill curve*. As concentrações testadas variaram na faixa de 0,0625 a 16 vezes o valor de CIM encontrado para o cada azólico. Os autores do estudo concluíram que esses antifúngicos apresentam atividade fungistática para as leveduras estudadas e sugerem que a atividade fungistática é maximizada uma vez que as concentrações no local da infecção excedam a CIM para o patógeno infectante.

O modelo de curva de morte mimetiza uma condição de equilíbrio do fármaco no organismo. Esse fato representa uma desvantagem desta técnica, pois as concentrações as quais as levedura são expostas não variam em função do tempo, sendo mantidas sob uma concentração fixa do começo ao fim do experimento, o que não reflete a condição real que ocorre *in vivo*, onde o microrganismo é exposto a

concentrações plasmáticas/teciduais flutuantes, devido aos processos de eliminação do fármaco (SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016)

Um segundo modelo de infecção *in vitro* empregado na análise farmacodinâmica pode oferecer uma caracterização mais real da farmacocinética em humanos, que pode ser denominado como curva de morte dinâmica (*dynamic time-kill curve*). O mesmo mimetiza um modelo de um compartimento farmacocinético, onde o compartimento central contém o inóculo e uma quantidade do fármaco que gera concentrações que simulam as livres no plasma ou livres teciduais em humanos (NIELSEN; CARS; FRIBERG, 2011a). Durante um período, que poderá ser de até 24/48 horas de coleta, o fármaco livre é removido gradativamente do compartimento central em velocidade semelhante ao tempo de meia-vida do fármaco em humanos sendo que este processo pode se dar através de diluições sucessivas (LI et al., 2009) ou bomba peristáltica (LIGNELL et al., 2008). Além de permitir uma boa descrição dos dados, esta abordagem possibilita a realizações de previsões e simulações de cenários não testados, o que é útil para a concepção de novos estudos, bem como na busca de esquema de administração otimizados.

Atualmente na literatura não há relatos de curva de morte dinâmica para os azólicos, fluconazol e voriconazol, frente à *Cryptococcus neoformans*. O relato existente, utiliza voriconazol frente a leveduras, e foi realizado por Li et al, (2009). Neste estudo, através de experimentos de curva de morte dinâmicas com diferentes concentrações de voriconazol, os autores demonstraram que a *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* foram significativamente inibidas por concentrações a partir de 4 vezes e 16 vezes a CIM respectivamente, mas não por concentração igual a CIM. Esses resultados indicaram que, para o tratamento adequado de pacientes com candidemias, a concentração plasmática apenas acima da CIM não é eficaz, sendo assim necessário um ajuste de dose para que as concentrações sistêmicas do voriconazol sejam ajustadas para 4 vezes o valor da CIM.

### 3.2 Modelos *in vivo*

Os testes de atividade de agentes antifúngicos incluem o uso de modelos *in vitro* e *in vivo*, sendo que os primeiros constituem a primeira etapa na avaliação da atividade farmacológica destes agentes. Entretanto, estes modelos são limitados pela

impossibilidade de considerarem as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da relação entre hospedeiro, microrganismo e fármaco, especialmente no que se refere a incapacidade de avaliar concentrações disponíveis *in vivo* para exercer o efeito (SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

Em adição aos seus efeitos inibitórios e fungicidas *in vitro*, os agentes antifúngicos necessitam da interação das funções imunológicas do hospedeiro envolvida na defesa contra os agentes patogênicos fúngicos para erradicação dos patógenos (AMI; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2008). A partir desses fatos, inúmeros estudos *in vivo* têm sido realizados a fim de um melhor entendimento da farmacocinética e farmacodinâmica desses fármacos.

Os parâmetros mais comumente empregados para a avaliação farmacodinâmica no modelo *in vivo* são o tempo de sobrevivência dos animais, a redução do dano tecidual e a contagem do número de células fúngicas no tecido, sendo que o tecido avaliado é dependente do patógeno utilizado para construção do modelo (ANDES; CRAIG, 2002; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

Para avaliação farmacodinâmica ou farmacocinética *in vivo*, inicialmente é necessária a construção e validação de um modelo animal. Os mesmos podem ser avaliados de acordo com alguns critérios, como a validade de face, validade preditiva e validade de construto. A validade de face baseia-se na semelhanças biológicas e sintomas entre o modelo animal e doença humana. A validade preditiva é fundamentada na demonstração da similaridade clínica nas intervenções, e validade de construto, em demonstrar que os alvos sob investigação tem um papel semelhante no modelo de doença, como na situação clínica (DENAYER; STÖHR; VAN ROY, 2014).

Os modelos de infecção animal são ferramentas adequadas para oferecer informações sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processos infecciosos. Os mesmos permitem uma análise precisa de causa e efeito nas interações entre o hospedeiro e o patógeno (OTO ZAK, 1986; SLOAN; PARRIS, 2014). Ao projetar a construção de um modelo animal, pode concentrar-se na semelhança entre o modelo animal e as doenças humanas. No entanto, é preciso também estar ciente das diferenças inerentes entre os modelos animais e as manifestações e sintomatologias clínicas em humanos (ROUSE, 1986).

Modelos animais de criptococose tem sido extensivamente estudada em camundongos, pelo fato desta espécie ser mais suscetível as espécies de *Cryptococcus* spp. A infecção já foi estabelecida por algumas vias, tais como, a intranasal, intratraqueal (CAULEY; MURPHY, 1979; MOVAHED et al., 2015), intravenosa (MOVAHED et al., 2015), intraperitoneal (CAULEY; MURPHY, 1979), intracerebral (BLASI et al., 1992) e intradérmica (IROKANULO; AKUESHI, 1995). Comparativamente a roedores os coelhos mostram-se naturalmente mais resistentes a criptococose, nos sítios usuais de inoculação, subcutâneos (STRIPPOLI; SIMONETTI; CASSONE, 1978), fluído cerebroaquidiano (PERFECT et al., 1996) e, desta forma, a imunossupressão dos animais, com o uso de corticosteróides, é necessária para reproduzir a doença.

O primeiro modelo de criptococose disseminativa em ratos Wistar machos foi descrito por Negroni et al. (1991). A infecção foi realizada a partir da inoculação de 0,1 mL de um inóculo contendo  $2 \times 10^5$  UFC de *Cryptococcus neoformans* através de uma administração intracardíaca nos animais anestesiados. Os órgãos dos ratos foram analisados, através de contagem de colônias e histologia, no período de 7 e 45 dias após a inoculação. Os resultados demonstraram que os órgãos como pulmões, cérebro e timo apresentaram lesões desde o sétimo dia de infecção e, em menor frequência, foram observadas lesões no fígado, baço, rins e coração neste mesmo período. Já com 45 dias de infecção todos os animais foram infectados e houve lesão em todos os órgãos avaliados (NEGRONI et al., 1991; NEGRONI; FINQUELIEVICH, 1987).

Os modelos de infecção com ratos Wistar por *Cryptococcus neoformans* tem sido estudados em diversas vias de infecção, tais como pulmonar (GOLDMAN et al., 1996), intravenosa (YAMAOKA et al., 1996) intraperitoneal (BARONETTI et al., 2006), intracardíaca (CHIAPELLO et al., 2004) e intracerebral (HIMMELREICH et al., 2001), sendo que as variações observadas nas infecções induzidas nessas diferentes vias são relacionados o período necessário para estabelecimento da infecção, que varia de 3 a 60 dias.

A via preferida para indução de infecção por *C. neoformans* é a via pulmonar, pois mimetiza a patogenia que ocorre em humanos. Contudo, a inoculação pela via intravenosa possui como vantagens a facilidade, pois não há necessidade de

anestesiarem os animais, além de estabelecer a meningite criptocócica em menor período do tempo (YAMAOKA et al., 1996).

No tratamento das infecções fúngicas, os fármacos são frequentemente monitorados clinicamente com base nos critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos, ou seja, conforme as concentrações plasmáticas que sejam capazes de erradicar o patógeno no sítio infeccioso (PAIVA, 2011).

Entretanto, sabe-se que a penetração inadequada de antimicrobianos nos tecidos pode levar a falha terapêutica e resistência microbiana. Partindo da premissa que apenas a fração livre do fármaco no local alvo é a responsável pela eficácia dos antimicrobianos, o conhecimento das concentrações livres teciduais pode ser mais relevante para prever a eficácia terapêutica do que as concentrações no plasma (PAIVA, 2011).

No tecido cerebral a penetração de fármacos é limitada pela barreira hematoencefálica (BHE) e pode ocorrer através de transporte passivo ou através de transportes ativos de influxo, mediado por polipeptídios transportadores de ânions orgânicos e proteínas transportadoras de ânions e cátions orgânicos; ou limitados por transportadores de efluxo, tais como a P-glicoproteína (EYAL; HSIAO; UNADKAT, 2009). A função destes transportes também podem ser alterados pela presença de inflamação ou lesão cerebral aguda, o que pode modificar a permeabilidade da BHE (NOTKINA; DAHYOT-FIZELIER; GUPTA, 2012).

Relatos na literatura já demonstraram que infecções cerebrais induzidas por *C. neoformans* provocam lesão nos vasos da BHE, e algumas modificações teciduais que podem ocasionar mudanças na penetração tecidual de fármacos (CHEN et al., 2003; CHANG et al., 2004)

Um das modificações geradas nos tecidos pela infecção por *C. neoformans* é a mudança de pH tecidual, e isto se deve ao fato da sua capacidade de sobreviver no interior dos macrófagos. Após a fagocitose do patógeno os macrófagos produzem mecanismo capazes de reduzir o pH, abaixo de 5,5, para erradicação do mesmo. No entanto, *C. neoformans* pode sobreviver em tais condições de pH baixo. O macrófago por sua vez, na tentativa de erradicar o *C. neoformans*, eleva a concentração de CO<sub>2</sub> livre na célula e quando se rompe ocasiona uma elevação da acidez cerebral (VOELZ; MAY, 2010).

Chang et al. (2004), ao estudarem a patogenese do *C. neoformans* através de um modelo de infecção em camundongos, evidenciou que o crescimento fúngico do *C. neoformans* ocasiona uma lesão perivascular a partir de 10 dias de infecção, levando a uma lesão na BHE dos animais. Este fato se dá pois o *C. neoformans* requer aeração, quando há uma tensão de oxigênio elevada ou seja próximo aos capilares sanguíneos, para um melhor desenvolvimento e multiplicação (CHANG et al., 2004).

Além disso, um dos fatores de virulência do *C. neoformans* é a sua capacidade de produzir enzimas fosfolíticas e proteolíticas, que estão envolvidas no processo de lesão na vasculatura do sistema nervoso central (SNC) de animais infectados por esse fungo (XU et al., 2014).

#### **4. Índices PK-PD aplicados a antifúngicos**

Com frequência têm sido utilizados os parâmetros PK e PD para comparar antimicrobianos, uma vez que essas medidas são características específicas dos fármacos e podem ser utilizadas para escolha do melhor agente a ser utilizado, bem como nas definições de melhores regimes de dosagens. Em parte, os índices PK-PD empregados para antifúngicos se assemelham aos aplicados na análise de antibacterianos (ANDES, 2006; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016)

Os índices PK-PD são estabelecidos através da relação de uma medida de potência do fármaco *in vitro*, a CIM, com uma medida de exposição do organismo ao fármaco, empregando-se os parâmetros farmacocinéticos área sob a curva de concentração plasmática versus o tempo (ASC), pico de concentração plasmática ( $C_{máx}$ ) e tempo. De tal forma que os que utilizam os índices ASC/CIM e  $C_{máx}$ /CIM apresentam efeito concentração dependente, e os que empregam %T>CIM apresentam efeito tempo dependente. O conhecimento de qual dos três índices PK-PD descreve a atividade antifúngica fornece a base para determinar a frequência posológica com que um fármaco é mais eficaz (ANDES et al., 2003; SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

O efeito pós-antifúngico (PAFE), caracterizado pela persistência da atividade do fármaco após atingir-se concentração abaixo da CIM, é outro parâmetro farmacodinâmico empregado (SY; ZHUANG; DERENDORF, 2016).

Para antifúngicos que causam a morte fúngica dependente do tempo de exposição ao fármaco e de curta ou nenhum efeito pós-antibiótico, o regime de dosagem é otimizado através do prolongamento da duração da interação fármaco-microrganismo. Esses antifúngicos são frequentemente administrados em doses mais baixas, mas em maior frequência. Dentro desta classificação encontra-se a flucitosina que apresenta como o melhor índice PK-PD o  $T > CIM$  (ANDES; OG TROP, 2000).

Outros antifúngicos que causam a erradicação fúngica dependente da concentração do fármaco e longo efeitos pós-antibióticos, e o efeito é otimizado pela administração de elevadas doses em períodos esporádicos. Os índices que caracterizam este tipo de estratégia de dosagem incluem o  $C_{max}/CIM$  e a  $ASC/CIM$ . O índice  $C_{max}/CIM$  melhor descreve a atividade dos poliênicos e equinocandinas (ANDES, 2006).

Os prolongados efeitos pós-antifúngicos aumentam a importância da concentração ou da quantidade total de fármaco que deve ser administrada. Observações *in vivo* com o fluconazol demonstraram que o índice  $ASC_{0-24h}/CIM$  está mais fortemente associada à sua eficácia. Estudos com modelos animais com voriconazol, ravuconazol e posaconazol demonstraram também a importância do índice  $ASC/CIM$  para esses fármacos (ANDES, 2006).

Sudan e colaboradores (2013) estimaram o índice PK-PD do fluconazol para meningoencefalite criptocócica. Nesse estudo foi empregado um modelo de meningoencefalite criptocócica em camundongos com 4 isolados clínicos de *C. neoformans*. Neste estudo foram utilizados dois diferentes regimes posológicos, 125 e 250 mg/kg uma vez ao dia durante 9 dias. Este estudo revelou que a CIM foi importante para a compreensão das relações exposição-resposta, pois para redução da concentração fúngica a razão  $ASC/CIM$  igual a 389 foi o índice mais preditivo para a eficácia do fluconazol.

Um estudo revelou que a relação de área sob a curva do voriconazol livre ao longo de 24 horas e a CIM ( $fASC_{24h}/CIM$ ) acima de 25 descreve a eficácia do voriconazol frente a candidíase em camundongos. Esse estudo também determinou que uma  $fASC_{24h}/CIM$  de 25 é comparável a uma relação da concentração livre plasmática ( $fC/CIM$ ) de 1,12. No entanto, não há estudos que avaliaram a confiabilidade dos dois parâmetros de PK-PD no contexto clínico (ANDES et al., 2003).

Wang et al. (2015) avaliaram as propriedades PK e PD do voriconazol e a eficácia de um regime oral de dose fixa no tratamento de infecções fúngicas invasivas por *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. Foi realizado um estudo prospectivo em 15 pacientes tratados com voriconazol. Verificou-se uma grande variabilidade nas propriedades PK e PD em pacientes com infecções fúngicas invasivas após um regime de dosagem oral fixa, o que demonstra a necessidade da individualização do voriconazol para melhorar a sua eficácia. Os regimes de dosagem ajustada de acordo com  $fAUC_{24h}/CIM$  e  $fC_{min}/CIM$  superior a 25 e superior a 1, respectivamente, poderia ser uma estratégia útil para aumentar as taxas de resposta clínica, particularmente entre pacientes com resposta clínica ineficaz com a terapia padrão atual (WANG et al., 2015).

Até o momento não foi estabelecido um valor de índice PK-PD para voriconazol frente a *Cryptococcus neoformans*.

## **5. Antifúngicos azólicos**

Os azólicos constituem-se num grupo de fármacos sintéticos fungistáticos, caracterizadas por apresentarem um anel imidazólico ligados por ligação entre um carbono e um nitrogênio (C-N) com outros anéis aromáticos. A função desses anéis aromáticos é de modificar as propriedades físico-químicas, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade. Esses agentes antifúngicos classificam-se em imidazólicos (miconazol, cetoconazol) quando houver apenas um átomo de nitrogênio, e triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol), quando a molécula apresentar 3 átomos de nitrogênio no anel azólico (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Os azólicos exercem atividade sobre a membrana celular dos fungos. Essa classe apresenta atividade antifúngica através da inibição da biossíntese do ergosterol, determinando alteração da permeabilidade de membrana. O efeito antifúngico ocorre pela inibição da enzima fúngica lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (ou CYP51A1, P45014DM), que é uma enzima do citocromo P-450 (família 51, subfamília A, polipeptídio 1) envolvida na síntese do ergosterol a partir do lanosterol, esterol mais importante na membrana celular fúngica, (ANDES, 2006; CHEN; SORRELL, 2007; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016)

Os triazólicos, representam os antifúngicos com maior eficiência e reduzida toxicidade entre os azólicos. Diferentemente dos imidazóis, os triazóis tem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico, não apresentando afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos. Em geral, os triazólicos demonstraram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016). Além disso, os triazólicos apresentam menor toxicidade quando comparados com os poliênicos (FLORES et al., 2012; WHO, 2011).

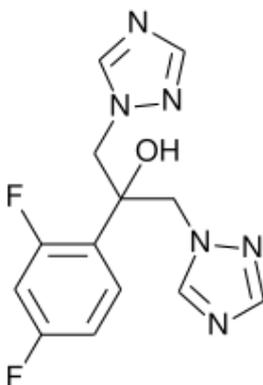
A seguir serão detalhadas algumas características físico-químicas e farmacológicas dos fármacos avaliados nesse trabalho.

## 5.1 Fluconazol

### 5.1.1 Características químicas

O fluconazol (Figura 2), cujo nome químico é 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-propanol, foi desenvolvido por Richardson e colaboradores nos laboratórios da indústria Pfizer®. Caracterizou-se como o primeiro triazólico, o que revolucionou o tratamento das infecções fúngicas invasivas, que anteriormente contavam apenas com a anfotericina B como fármaco disponível (RICHARDSON et al., 1990)

A sua fórmula empírica é  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ , apresenta boa solubilidade aquosa (1 mg/L), baixo grau de lipofilicidade ( $\text{Log } P_{\text{octanol}} = 0,58$ ), baixo peso molecular ( $\text{PM} = 306,27 \text{ g/mol}$ ) e possui três valores de pKa diferentes iguais a  $11,01 + 0,29$ ;  $2,94 + 0,10$ ;  $2,56 + 0,12$  (COMO; DISMUKES, 1994; JEZEQUEL, 1994; MATHY et al., 2005; PEREIRA, 2007).



**Figura 2.** Estrutura química do fluconazol

### 5.1.2 Características farmacodinâmicas

Como os demais triazólicos, o fluconazol exerce seu efeito primariamente através da inibição da 14- $\alpha$ -esterol desmetilase (P-450DM) (CHEN; SORRELL, 2007).

Os testes de susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* frente a fluconazol utilizando a metodologia preconizada no documento M27-A3 e sua atulização M27-S4 não apresentam uma classificação quanto a susceptibilidade e resistência. Os relatos na literatura tem associado o sucesso terapêutico quando isolados de *C. neoformans* apresentam CIM de 4 a 8  $\mu\text{g/mL}$  e falha terapêutica quando a CIM é superior a 16  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). Sendo assim, recentemente foi proposto por (PFALLER et al., 2014) a classificação dos isolados como sensíveis com CIM < 16  $\mu\text{g/mL}$  e resistentes com CIM  $\geq$  16  $\mu\text{g/mL}$ .

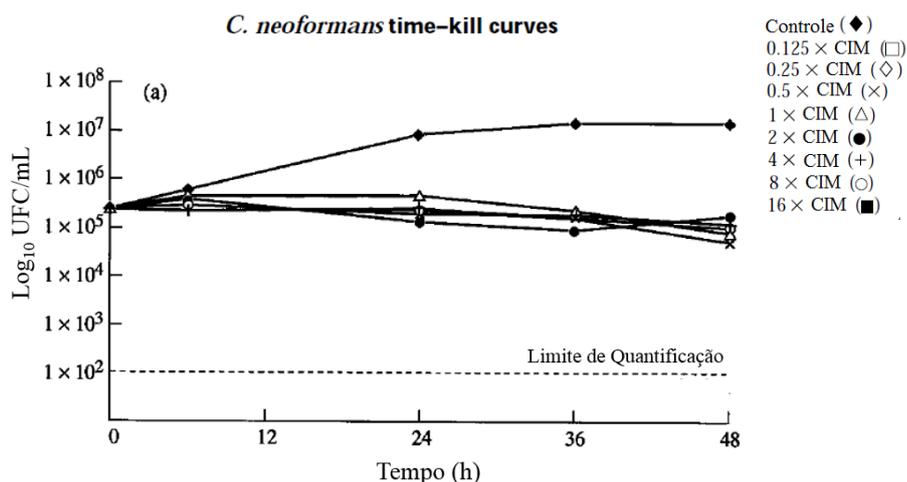
Nas orientações da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), a resistência primária de *C. neoformans* ao fluconazol não é um grande problema clínico significativo, pois sua frequência é baixa, como pode-se observar na Tabela 1, onde um resumo dos resultados observados na literatura é descrito. No entanto, o desenvolvimento de resistência microbiana é dinâmico. Um fato importante a ser levado em consideração é que os pacientes infectados pelo vírus HIV fazem uso profilático de fluconazol contra infecções oportunistas, e este fato tem favorecido o surgimento de isolados de *C. neoformans* com CIM superiores (CHEONG; MCCORMACK, 2013). Um estudo realizado entre 2001 e 2010 evidenciou que a CIM<sub>90</sub> de fluconazol contra *C. neoformans* aumentou de 4 a 16  $\mu\text{g/mL}$  em isolados de líquido cefalorraquidiano (LCR) (LEE et al., 2012). Assim, a não-susceptibilidade ao fluconazol tornou-se um problema crescente, especialmente entre os isolados da Ásia-Pacífico, África, Oriente Médio e América Latina, comparativamente com os isolados da Europa ou América do Norte (CHEN et al., 2015).

**Tabela 1.** Atividade *in vitro* do fluconazol frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*

Nº isolados testados	Faixa de CIM (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	Resistência (%)	Referências
16	0,25 - 4	4	0	MORALES et al., 2014
4446	0,12 - 64	4	5,7	ESPINEL-INGROFF et al., 2012
32	0,5 - 256	64	29	TRPKOVIĆ et al., 2012
487	0,25 - 16	4	0,6	GOVENDER et al., 2011
70	0,12 - 16	8	4	HSUEH et al., 2005
268	0,5 - 256	96	14,3	SAR et al., 2004

CIM<sub>90</sub> = Concentração Inibitória Mínima para inibição do crescimento em 90% das amostras testadas

Estudos de avaliação da morte fúngica em função do tempo demonstram que o fluconazol apresenta efeito fungistático frente a leveduras. Klepser e colaboradores (1998) avaliaram a farmacodinâmica do fluconazol contra *Candida* spp. e *C. neoformans* empregando a metodologia de curva de morte. Nesse estudo o fluconazol exibiu atividade fungistática em cada um dos múltiplos da CIM testado, sendo que a atividade máxima foi verificada com 0,5 vezes a CIM e o aumento na concentração de fluconazol em solução não resultou em aumento na taxa de morte (Figura 3). Portanto, a atividade de fluconazol contra *C. neoformans* parece ser relativamente independente da concentração de fármaco na solução.



**Figura 3.** Atividade fungistática do fluconazol contra *Cryptococcus neoformans* evidenciado por estudos de morte em função do tempo (*time-kill curve*). (Adaptado de KLEPSEK; WOLFE; PFALLER, 1998).

### 5.1.3 Características farmacocinéticas

Fluconazol é bem absorvido a partir do trato gastrintestinal, com biodisponibilidade oral superior a 80% em humanos. Diferente dos imidazólicos, sua absorção não é afetada por alimentos ou o pH gástrico. Na corrente sanguínea apresenta uma ligação a proteínas plasmáticas de 12%. Sua eliminação é predominantemente pela via renal, sendo 80% da dose excretada inalterada na urina. A enzima CYP2C9 desempenha um papel menor em seu metabolismo hepático. Fluconazol difunde facilmente em fluídos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano (LCR). Em humanos a meia vida é de aproximadamente 30 horas (ZONIOS; BENNETT, 2008).

Estudos farmacocinéticos envolvendo animais tem sido bem descritos na literatura. Em diferentes espécies de animais a farmacocinética do fluconazol demonstra-se linear entre as doses de 1 a 40 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos através da administração oral e intravenosa do fluconazol a cinco espécies animais e humanos são demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros farmacocinéticos do fluconazol em diversas espécies animais.

Parâmetros	Camundongo n = 5	Rato n = 5	Coelho n = 5	Cobaio n = 1	Cão n = 2	Humanos n = 27
Dose (mg/kg)	1	10	25	1	20	1
Via de administração	oral	i.v.	i.v.	oral	oral	oral
t <sub>1/2</sub> (h)	5	4	10,4	5,2	15	22
CL <sub>T</sub> (L/h)	2	2,2	3,0	0,64	0,6	0,94
Vd (L/kg)	0,9	0,8	0,9	0,5	0,8	0,7
ASC <sub>0-t</sub> (µg.h/mL)	8,5	152	223	9,4	268	43
F (%)	100	80	--	--	100	60

Adaptado de HUMPHREY; JEVONS; TARBIT, 1985; JEZEQUEL, 1994.

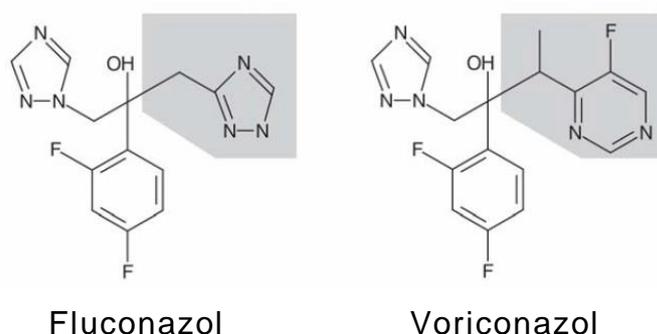
Os parâmetros descritos na Tabela 2 foram modelados pelo modelo farmacocinético de um compartimento. Entretanto, recentemente foi descrito na literatura que o modelo que descreve melhor a farmacocinética plasmática do fluconazol em ratos Wistar é o modelo de 2 compartimentos (AZEREDO et al., 2015).

## 5.2 Voriconazol

### 5.2.1 Características químicas

O voriconazol foi aprovado para uso em 2002. O mesmo foi desenvolvido pelos laboratórios Pfizer® com intuito de elevar a eficácia do fluconazol (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O voriconazol (peso molecular 349,3 g/mol) é um derivado de fluconazol, diferindo pela adição de um grupamento metila na estrutura principal propila e pela substituição de uma porção de um anel triazole por fluoropirimidina (Figura 4) (LEVÊQUE et al., 2006; PEMÁN et al., 2006).



**Figura 4.** Modificação estrutural entre fluconazol e voriconazol.  
Adaptado de PEMÁN et al., 2006.

É conhecido quimicamente como (2R, 3S)-2-(2,4-fluorofenil)-3(5-fluoropiridin-4-il)-1H-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol, e  $C_{16}H_{14}F_3N_5O$  através da sua fórmula empírica. Apresenta baixa solubilidade em água (0,098 mg/mL) e uma moderada lipofilicidade, com valor de  $\text{Log } P_{\text{octanol}}$  de 1,82 (SPRIET et al., 2009). Possui constante de dissociação de pKa de 2,72 e 11,54 (ADAMS et al., 2008).

### 5.2.2 Características farmacodinâmicas

Voriconazol exibe 160 vezes maior inibição da enzima 14 $\alpha$ -desmetilase em *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*, em comparação com o fluconazol. Estudos com *C. albicans* e *C. krusei* demonstraram que o voriconazol inibe a síntese de ergosterol de uma forma dependente da dose e é mais eficaz do que o fluconazol a este respeito (SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999).

Em um estudo de sensibilidade, utilizando o método de microdiluição do CLSI (M27-A2), observou-se que o voriconazol e o posaconazol são altamente ativos contra *C. neoformans*, mesmo quando o isolado clínico possui sensibilidade reduzida ao

fluconazol. Nestes estudos foram testados 237 isolados clínicos de *C. neoformans* frente a fluconazol, posaconazol e voriconazol. O fluconazol apresentou CIMs de 8 µg/mL para 98% dos isolados de *C. neoformans* testados, 16 a 32 µg/mL para 1% e 64 µg/mL para 1% dos isolados. Em contrapartida, o posaconazol e o voriconazol foram capazes de inibir a 100% dos isolados com CIM de 0,25 e 0,50 µg/mL, respectivamente. Este fato indica que não houve resistência cruzada entre o fluconazol, voriconazol e posaconazol e que os novos triazólicos são mais efetivos contra espécies de *Cryptococcus* quando comparado ao fluconazol (PFALLER et al., 2004). Na Tabela 3 um resumo dos principais achados de CIM, CIM<sub>90</sub> e resistência para o voriconazol, presentes na literatura, são apresentados.

**Tabela 3.** Atividade *in vitro* do voriconazol frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*.

Nº isolados testados	Faixa de CIM (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	Resistência (%)	Referências
4693	0,008 - 4	0,06	0,13	ESPINEL-INGROFF et al., 2012
95	0,06 – 0,25	0,25	0	ANDRADE-SILVA et al., 2013
514	0,015 - 4	0,13	0	CÓRDOBA et al., 2016
52	0,015 - 2	0,12	0	CASTANHEIRA et al., 2014
285	0,008 – 0,5	0,25	0	PFALLER et al., 2011

CIM<sub>90</sub> = Concentração Inibitória Mínima para inibição do crescimento em 90% das amostras testadas

### 5.2.3 Características farmacocinéticas

A farmacocinética do voriconazol em humanos já foi estudada tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes. Sua absorção é relativamente rápida, sendo que após administração por via oral o tempo para concentração máxima plasmática ( $t_{max}$ ) é de 2 h. Após a administração oral, como comprimido ou solução, a sua biodisponibilidade é de 96%. Entretanto, a absorção pode ser prejudicada quando administrado juntamente com alimentos, reduzindo em 22% (HYLAND; JONES; SMITH, 2003).

Voriconazol apresenta ligação às proteínas plasmáticas de 56%, sendo a albumina a principal proteína de ligação. O volume de distribuição é moderado (4,6 L/kg) em humanos e a meia-vida é de cerca de 6 h (THEURETZBACHER; IHLE; DERENDORF, 2006).

O voriconazol apresenta metabolismo preferencialmente hepático, pelo conjunto de isoenzimas CYP2C19 e CYP3A4 e, em menor proporção, pela CYP2C9. O principal metabólito sérico é o N-óxido que é inativo. Apenas 2% do fármaco ativo pode ser encontrado na urina. Em decorrência do seu processo de eliminação hepático, o voriconazol exibe uma farmacocinética não-linear devido à saturação do metabolismo (DOTE et al., 2016; HOHMANN et al., 2016; LI et al., 2016, p. 450).

A farmacocinética do voriconazol pode ser afetada pela variabilidade genética dos genes que codificam a enzima CYP2C19. Dezenove por cento da população da Ásia e 2% da população caucasiana são metabolizadores pobres em termos de atividade da CYP2C19 (homozigotos para o alelo CYP2C19), resultando em níveis sanguíneos elevados de voriconazol. Percentuais mais elevadas de pacientes são heterozigotos para o alelo CYP2C19, que conduz a um fenótipo metabolizador intermediário com moderado aumento dos níveis sanguíneos do voriconazol (DOTE et al., 2016; HOHMANN et al., 2016; LI et al., 2016, p. 450).

Para os pacientes com doença hepática leve a moderada (Escala de Child-Pugh A e B) é indicada administração de 50% da dose de manutenção habitual. A segurança de voriconazol não foi estabelecida para a cirrose hepática e não deve ser usado nestas situações (ZONIOS; BENNETT, 2008).

A farmacocinética do voriconazol tanto por via oral quanto intravenosa já foi estudado por Roffey e colaboradores (2003) em camundongos, ratos, coelhos, cobaias e cães (Tabela 5). Nesse estudo o modelo farmacocinético que melhor descreveu os dados do foi o modelo de 1 compartimento com eliminação baseada na equação de Michaelis-Menten. Através deste modelo, se pode obter parâmetros como  $V_{max}$  (velocidade máxima),  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $C_0$  (concentração no tempo zero) e calcular o valor aparente de depuração ( $V_{max}/K_m$ ) e o valor do volume de distribuição (Dose/ $C_p$ ) (ROFFEY et al., 2003).

Araújo e colaboradores ao propor uma metodologia para determinar a biodisponibilidade do voriconazol em ratos Wistars, observaram que nas doses de 5 e 10 mg/kg administrado pela via intravenosa e 40 mg/kg pela via oral a farmacocinética do voriconazol passa para a ser não-linear. Neste estudo a farmacocinética plasmática do voriconazol na dose de 2,5 mg/kg i.v. foi bem descrita com o modelo de 3 compartimentos com eliminação pseudo-linear, já nas doses de 5 e 10 mg/kg um modelo de 3 compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten foi o que melhor

descreveu os dados Nesse estudo a biodisponibilidade foi determinada a partir do ajuste simultâneo dos perfis plasmáticos médios do voriconazol de 10 mg/kg i.v. e 40 mg/kg p.o. A biodisponibilidade oral de voriconazol em ratos anestesiados foi de 82,8%, semelhante à biodisponibilidade de 96% relatada para humanos e, por sua vez, mais realista do que os 159% relatados anteriormente por Roffey et al. (2003) para ratos (ARAUJO et al., 2010).

Na Tabela 4 observa-se que a Roffey et al. (2003) descreveu a biodisponibilidade do voriconazol de 159% para ratos e 138% para cães utilizando um modelo de 1 compartimento com eliminação de Michales Menten (farmacocinética não-linear). Porém, o uso da abordagem independente do modelo para determinar a biodisponibilidade do fármaco ( $ASC_{0-\infty}$  p.o./ $ASC_{0-\infty}$  i.v.) requer que a depuração seja constante durante a fase de eliminação. Para fármacos que seguem a eliminação de Michales Menten, a depuração é dependente da concentração, produzindo um erro na estimativa da biodisponibilidade (ARAUJO; FARIAS DA SILVA; DALLA COSTA, 2010).

**Tabela 4.** Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em cinco espécies de animais

<b>Parâmetros</b>	<b>Camundongos</b>	<b>Ratos</b>		<b>Coelhos</b>	<b>Cobaias</b>	<b>Cães</b>
<b>Gênero (n)</b>	Machos (n = 3)	Machos (n = 2)	Fêmeas (n = 2)	Fêmeas (n = 3)	Fêmeas (n = 1)	Machos/Fêmeas (n = 4)
<b>LPP (%)</b>	67	66	66	60	45	51
<b>Administração intravenosa</b>						
<b>Dose (mg/kg)</b>	10	10	10	3	10	3
<b>ASC (µg/mL.h) <sup>u</sup></b>	41,7	18,6	81,6	1,1	38,5	32,1
<b>ASC (µg/mL.h) <sup>m</sup></b>	8,0	6,7	13,9	1,6	22,0	17,9
<b>Administração oral</b>						
<b>Dose (mg/kg)</b>	30	30	30	10	10	6
<b>C<sub>máx</sub> (µg/mL) <sup>u</sup></b>	12,4	9,5	16,7	1,0	4,1	6,5
<b>T<sub>máx</sub> (h) <sup>u</sup></b>	2	6	1	1	8	3
<b>ASC (µg/mL.h) <sup>u</sup></b>	98,8	90	215,6	3,2	29,0	88,8
<b>ASC (µg/mL.h) <sup>m</sup></b>	35,3	32,3	57,4	4,4	32,3	52,2
<b>F (%)</b>	81	159	88	87	75	138

LLP=Ligação as Proteínas Plasmáticas; F= Biodisponibilidade absoluta; u = dose única; m = dose múltipla (uma vez aodia por 10 dias), exceto para cobaia (3 vezes ao dia). (Adaptado de ROFFEY et al., 2003).

Apesar da farmacocinética do fluconazol e voriconazol estarem descritas na literatura para algumas espécies de animais, os estudos de PK-PD cada vez mais reforçam a importância de avaliar as concentrações livres no local de ação disponíveis para exercer efeito farmacológico. Nesse sentido, a técnica de microdiálise (MD) vem sendo utilizada pelo nosso grupo de pesquisa como ferramenta para investigação da penetração tecidual de antimicrobianos e o papel das alterações no microambiente tecidual geradas pelas infecções, através de modelos animais. A seguir serão descritos alguns detalhes sobre a técnica e discutidos os trabalhos do nosso grupo de pesquisa já publicados com esses fármacos quando avaliados em tecido renal sadio e infectado por espécies de *Candida*.

## 6. Microdiálise

Inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas no estudo da distribuição teciduais de fármacos. A extração e homogeneização do tecido é um método tradicionalmente utilizado para avaliar essa propriedade de distribuição dos fármacos. Entretanto, quando esta técnica é realizada apenas uma concentração por tempo, por animal, pode ser determinada. Determinações das concentrações cerebrais dos fármacos também são realizadas através de coletas de líquido cefalorraquidiano, homogeneizado de tecido e dosagens sanguíneas, porém utilizando estas técnicas não é possível definir exatamente os dados de transporte através da BHE (SCHADDELEE et al., 2004); (NOTKINA; DAHYOT-FIZELIER; GUPTA, 2012).

Uma das técnicas empregadas para determinação das concentrações cerebrais de fármacos é a microdiálise, a qual possui vantagem de seletivamente medir a fração livre do fármaco no fluido intersticial local, que cerca as estruturas alvo do fármaco e, em alguns casos, pode ser considerado o sítio de ação dos mesmos (MÜLLER, 2000; NOTKINA; DAHYOT-FIZELIER; GUPTA, 2012).

A técnica de MD consiste, basicamente, na implantação de uma sonda na região no tecido a ser estudado, sendo esta continuamente irrigada com líquido de perfusão. Na porção terminal da sonda, que fica em contato direto com o órgão, situa-se uma membrana semi-permeável, que possui a função de filtro, permitindo apenas a passagens de moléculas menores que seu *cut off*. A passagem das moléculas obedecem aos princípios da difusão passiva e, devido à contínua irrigação da sonda

com o líquido de perfusão, sem o analito, o equilíbrio entre os dois meios nunca irá se estabelecer, sendo assim é mantida constantemente em condição *sink*. O fluido de perfusão, passa pela sonda a um fluxo baixo e constante, que pode variar de 1 a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  (SCHMIDT et al., 2008). Conseqüentemente, devido à diferença de gradientes de concentração, apenas substâncias com baixo peso molecular atravessam a membrana, sendo recolhidas pelo líquido de perfusão e coletadas na outra extremidade da sonda (JOHANSEN, NEWMAN & MADDEN, 1997; BRUNNER et al., 2002).

Devido a condição *sink*, durante a microdiálise apenas uma fração do fármaco pode ser capturada do tecido para o microdialisado. O tamanho dessa fração depende do fluxo no qual o líquido de perfusão passa pela sonda (quanto menor o fluxo maior a fração recuperada), do comprimento da membrana semi-permeável da sonda (quanto maior a membrana maior a recuperação), das propriedades de distribuição do fármaco no tecido de interesse e da temperatura. Por isso, se fazem necessários estudos para determinar a capacidade de recuperação da sonda para possibilitar a determinação da verdadeira concentração tecidual livre de um determinado fármaco no tecido sob investigação (KHO et al., 2016).

Com frequência assume-se que as concentrações livres do fármaco são as mesmas em todo o organismo quando o *steady-state* é atingido, ou seja, as concentrações plasmáticas livres são semelhantes as concentrações teciduais livres. Entretanto, estudos de microdiálise demonstraram que essa premissa nem sempre é verdadeira e divergências podem ocorrer em tecidos que possuam alta densidade de transportadores de influxo e efluxo e zonas de oclusão, como o tecido cerebral. Além disso, a MD também permite comparar a penetração de antimicrobianos em tecidos infectados e sadios, possibilitando investigar se o processo inflamatório ocasionada pela infecção altera a distribuição tecidual do fármaco (MÜLLER, 2000; NOTKINA; DAHYOT-FIZELIER; GUPTA, 2012).

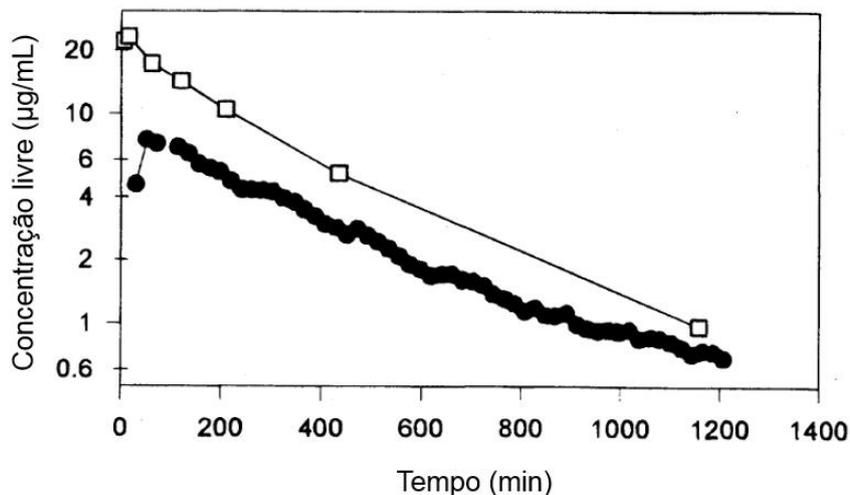
Em nosso grupo pesquisa a MD é uma técnica que vem sendo rotineiramente utilizada para estudar a penetração de antibacterianos e antifúngicos em diversos órgãos (ARAUJO et al., 2007; AZEREDO et al., 2012; HURTADO et al., 2014; TASSO; DE ANDRADE; DALLA COSTA, 2011; TORRES et al., 2017; ZIMMERMANN; TORRES; DALLA COSTA, 2016).

Os azólicos fluconazol e voriconazol já foram estudados quanto a sua penetração em tecido renal de ratos saudáveis e infectados por *Candida* spp. Ambos estudos demonstraram que a penetração desses antifúngicos não se alteram pelo processo infeccioso no tecido renal, demonstrando que as concentrações plasmáticas livres são semelhantes às concentrações livres renais (ARAUJO et al., 2009; AZEREDO et al., 2012).

A fração de penetração (fT) renal do voriconazol determinada por Araújo et al. (2009) utilizando a técnica de microdiálise em ratos Wistar saudáveis e infectados por *Candida albicans* e *Candida krusey*, foi de  $0,34 \pm 0,01$ , a qual demonstrou-se similar a fração livre do fármaco no plasma ( $f_u = 0,34$ ) em ambas as situações, indicando que as concentrações livres renais de voriconazol são semelhantes às concentrações livres plasmáticas e que as mesmas não se modificam devido a infecções causadas por *Candida* spp (ARAUJO et al., 2009).

Usando como fármaco de estudo outro azólico, o fluconazol, Azeredo et al. (2012) observaram uma situação semelhante ao determinar o fT renal deste fármaco através da técnica de microdiálise em ratos Wistar saudáveis e infectados por *Candida albicans*. Nesse estudo observou-se que não houveram diferenças estatísticas entre o plasma e tecido renal, sendo que a fração livre no plasma foi de 0,92 e os valores de fT encontrados nos animais foram de 0,87 e 0,89 em saudáveis e infectados, respectivamente (AZEREDO et al., 2012).

Até o momento existe apenas um trabalho descrito na literatura que investigou a penetração do fluconazol em tecido cerebral de ratos Wistar saudáveis por MD. Neste estudo foram utilizadas as doses de 10 e 20 mg/kg administradas através da via intravenosa *in bolus*. Os pesquisadores observaram que o fluconazol apresenta uma rápida penetração no tecido cerebral e uma cinética linear. Entretanto a concentração no cérebro é menor do que a encontrada no plasma, com fT médio de  $0,60 \pm 0,18$  (Figura 5), independente da dose. Esta baixa penetração foi atribuída a hipótese do fluconazol apresentar afinidade por bombas de efluxo que estão presentes na BHE, como a glicoproteína-P, e sendo assim poderia reduzir a concentração no tecido cerebral dos animais (YANG; WANG; ELMQUIST, 1996).



**Figura 5** Perfil de concentração plasmática livre (□) e cerebral (●) em função do tempo em ratos Wistar saudáveis para a dose de 20 mg/kg (Adaptado de YANG; WANG; ELMQUIST, 1996).

Até o momento, não há relatos na literatura sobre penetração do voriconazol utilizando a técnica de MD em tecido cerebral.

## 7. Modelagem populacional

Os tradicionais estudos farmacocinéticos possuem rigorosos critérios de inclusão, em que os indivíduos são selecionados de modo a formar um grupo homogêneo de pacientes, uma vez que, as metodologias de análise envolvidas não permitem caracterizar a variabilidade interindividual, sendo esta considerada uma fonte de viés que deve ser eliminado. Dessa forma os estes estudos são conduzidos de forma a não traduzir a utilização dos fármacos na prática clínica. Além disso os métodos de análise farmacocinética compartimental e não-compartimental, exigem um elevado número de observações por indivíduo para descrever corretamente o perfil da curva concentração-tempo (ETTE; WILLIAMS, 2004).

A análise de dados farmacocinéticos usando uma abordagem populacional (PopPK), possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais. Uma delas é a possibilidade de utilização de dados provenientes de contextos clínicos reais, ou seja, dados esparsos, escassos e fragmentados de um grande número de indivíduos. Além desta um dos objetivos mais importantes da modelagem populacional é o

estabelecimento de relações entre os parâmetros e covariáveis (ou seja, variáveis específicas do paciente) para explicar a variabilidade de parâmetros e facilitar as decisões de ajuste de dose (OWEN J. S.; JILL FIEDLER-KELLY, 2014; WÄHLBY; JONSSON; KARLSSON, 2002).

A modelagem populacional tem capacidade de ampliar modelos estruturais tradicionais, através da adição de modelos estatísticos e de erro capazes de representar a magnitude de variabilidade nos parâmetros do modelo entre os indivíduos. A inclusão e a quantificação de covariáveis específicas individuais facilita a compreensão da relação global entre dose-exposição-resposta. A determinação da individualização da dose à base de covariável é necessária para normalizar a exposição e minimizar a variabilidade nos resultados terapêuticos ou efeitos adversos entre os subgrupos populacionais (JOERGER, 2012).

Sendo assim a PopPK pode ser aplicada em estudos farmacocinéticos realizados em uma população de indivíduos que recebe o mesmo fármaco de interesse em dose e regime de dosagem idênticos, com o objetivo principal de entender as relações entre as características específicas dos sujeitos e as modificações nos parâmetros farmacocinéticos, e assim identificar fontes de variabilidade em toda a população. As modelagens PopPK podem ser útil tanto em estudos pré-clínicos, clínicos ou estudos de fase de pós-comercialização (JOERGER, 2012; SIME; ROBERTS; ROBERTS, 2015).

A variabilidade farmacocinética é devida a diversos fatores, tais como dados demográficos; sexo, peso corporal ou área da superfície corporal, idade e raça; fatores ambientais que incluem tabagismo, dieta e exposição a poluentes, entre outros; fenótipo genético que afeta a depuração de fármacos através do metabolismo hepático por isoformas do citocromo P450; interações medicamentosas; fatores fisiológicos e fisiopatológicos tais como a gravidez, doença renal, hepática, cardíaca ou severidade da doença de base e outros fatores como ritmo circadiano, alimentação, atividade física e postura (ETTE; WILLIAMS, 2004).

A modelagem não-linear de efeitos mistos é o método mais utilizado para a análise de dados de estudos PopPK-PD. Modelos não-lineares de efeitos mistos para medidas repetidas podem ser considerados como um modelo hierárquico que envolve ambos os efeitos fixos associados com os parâmetros populacionais, e os efeitos aleatórios, representando a variabilidade inter e intra-individual. O conjunto de

características da população é composta de valores populacionais médios (derivados de parâmetros de efeitos fixos) e sua variabilidade dentro da população (geralmente os valores de variância-covariância derivados de parâmetros de efeitos aleatórios). Assim sendo, usa uma análise de estágio que estima simultaneamente todos os parâmetros (por exemplo, média dos parâmetros, parâmetros de efeitos fixos, a variabilidade inter-individual, erro aleatório residual) (LAVIELLE; AARONS, 2016; TORNØE et al., 2004).

A variabilidade interindividual entre os pacientes, ocasionais ou residuais podem ser quantificados em um modelo PopPK ou PopPK-PD. Por exemplo, a variabilidade pode frequentemente ser consideravelmente mais elevada nos pacientes do que nos voluntários saudáveis. O erro residual inclui erro de quantificações, variabilidade intraindividual dentro de uma ocasião e especificação do modelo. As variabilidades interindividuais são mais frequentemente assumidos como derivados de uma distribuição paramétrica log-normal, com a diferença no valor individual do parâmetro ( $P_i$ ) e o valor do parâmetro de população ( $P$ ) descrito por  $\eta$  (equação 1).

$$P_i = P \cdot e^\eta \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $P$  representa um parâmetro farmacocinético tal como Clearance, Volume de distribuição ou  $EC_{50}$  (concentração para atingir 50% do efeito);  $\eta$  é geralmente assumido como decorrente de uma distribuição normal com uma média de zero e uma variância estimada (NIELSEN; CARS; FRIBERG, 2011a; NIELSEN; FRIBERG, 2013).

Um dos softwares mais populares para realização da modelagem não-lineares de efeitos mistos é NONMEM (*Nonlinear Mixed Effects Modelling*). No entanto, existem outras ferramentas de software, tais como Phoenix® NLME™, Monolix – Lixoft, PKBUGS e SAS® (BONATE et al., 2012; JOERGER, 2012).

Recentemente foi publicado um estudo que utilizou a abordagem PopPK com objetivo de caracterizar a farmacocinética populacional e otimizar a dosagem do fluconazol em neonatos com baixo peso. Como parte de um ensaio clínico randomizado, os recém-nascidos com 750 g de peso ao nascer que receberam 6 mg/kg de fluconazol, pela via intravenosa ou oral duas vezes por semana foram incluídos no estudo. As concentrações plasmáticas de fluconazol foram usadas para

construção do modelos e os parâmetros bioquímicos como creatinina e transaminases foram usados como covariáveis. A análise farmacocinética populacional foi realizada utilizando NONMEM® 7.2 e os parâmetros farmacocinéticos populacionais foram escalonados pelo peso corporal. A farmacocinética plasmática do fluconazol foi melhor descrita por um modelo de um compartimento com a eliminação de primeira ordem, e apenas creatinina sérica foi um preditor independente para a *Clearance* no modelo final. Sendo assim concluiu-se que as mudanças na depuração do fluconazol são melhor previstas por creatinina sérica nesta população (MOMPER et al., 2016).

Devido ao seu extenso metabolismo hepático o uso de voriconazol é limitado pela sua variabilidade inter-paciente significativa. Sendo assim, Lamoureux et al. (2016) utilizou a modelagem PopPK para avaliar o impacto do genótipo da CYP2C19 na exposição a voriconazol e por fim investigar as doses necessárias para atingir a faixa terapêutica em pacientes adultos com infecções fúngicas invasivas. Foram incluídos neste estudo os dois tipos de polimorfismos comuns em caucasianos (CYP2C19\*2 e \*17), os quais estão associados à diminuição ou aumento da atividade de CYP2C19. Nesse estudo observou-se que as doses médias de voriconazol necessárias para atingir as concentrações alvo foram significativamente maiores em portadores de CYP2C19\*17 em comparação com indivíduos com CYP2C19\*2, bem como na probabilidade de atingir o alvo terapêutico. Sendo assim a genotipagem CYP2C19 mostra-se útil para orientar a dose inicial de voriconazol quando associada com monitoramento terapêutico e para explicar as concentrações subterapêuticas freqüentemente observadas na prática clínica (LAMOUREUX et al., 2016).

Um modelo PopPK-PD foi descrito recentemente, o qual relaciona a farmacocinética do voriconazol com a leitura de galactomananas (marcador de infecção invasiva por *Aspergillus* spp.) em crianças de até 2 anos de idade. Doze crianças que receberam voriconazol para o tratamento de infecções fúngicas invasivas foram estudadas. O modelo PopPK-PD foi usado para estimar a média da área sob a curva de concentração (ASC) para cada paciente e o perfil de tempo de galactomananas resultante. O ajuste do modelo PopPK-PD permitiu estabelecer as metas da concentração do voriconazol individualizada para atingir supressão dos níveis de galactomananas em tempo hábil e de forma otimizada e precisa propiciou maximizar a resposta clínica e sobrevivência dos pacientes (HUURNEMAN et al., 2016).

Já em relação á estudos pré-clínicos, utilizando ratos Wistar, em nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido uma pesquisa usando a modelagem PopPK para avaliar o impacto da anestesia induzida por uretano na farmacocinética do fluconazol e voriconazol. A PK do fluconazol e do voriconazol foram investigadas após a administração de 10 mg/kg i.v. e 5 mg/kg i.v., respectivamente para os grupos sem anestesia e com anestesia (uretano). As concentrações plasmáticas dos antifúngicos foram utilizadas para construção do modelo e o uso de anestésico como usado como uma covariável. A análise dos dados foi realizada utilizando o software MONOLIX v. 4.2.2. A farmacocinética plasmática do fluconazol foi bem descrita por um modelo de dois compartimentos e do voriconazol por um de três compartimentos. Como conclusão obteve-se que não houve diferenças estatísticas entre os parâmetros farmacocinéticos dos antifúngicos em ambas as condições estudadas.

## **8. Modelagem PK-PD de antimicrobianos**

A modelagem PK-PD é uma abordagem inovadora que auxilia na tomada de decisões importantes, incluindo o delineamento do regime de dosagem ideal (SCHMIDT et al., 2008). Tradicionalmente, os modelos farmacodinâmicos relacionam as concentrações no sítio de efeito com a resposta farmacológica. Já os modelos farmacocinéticos permitem prever a concentração de medicamentos em diferentes tecidos do organismo humano em função do tempo. Sendo assim, os modelos PK-PD relacionam estas duas áreas, podendo ser definida como a descrição matemática que correlaciona efeito e tempo, ou seja, permite descrever e prever variação do efeito de uma fármaco relacionado com a variação da concentração do mesmo, em função do tempo (DERENDORF; HOCHHAUS, 1995).

Modelos PK-PD podem correlacionar experimentos *in vitro* e *in vivo* para definir uma relação entre a exposição (PK) e o efeito (PD) de um fármaco. Os modelos de PK-PD são particularmente importantes quando uma situação não pode ser alcançada. Por exemplo, as curvas de morte *in vitro* têm a capacidade de exibir a farmacodinâmica de um antibiótico sem a necessidade de proceder um estudo *in vivo* em humanos. Sendo assim, uma vez que o PD esteja estabelecida, ela pode ser combinada com PK para determinar o resultado clínico esperado (SCHMIDT et al., 2008); (HOPE; DRUSANO, 2009).

Os modelos farmacodinâmicos mais empregados para descrever a relação concentração versus efeito do fármaco são os modelos  $E_{\max}$  e  $E_{\max}$ -Sigmoidal. O modelo  $E_{\max}$  descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração através de uma relação hiperbólica. Já o modelo  $E_{\max}$ -Sigmoidal é uma variação do  $E_{\max}$ , e é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples, sendo necessária a adição de um fator sigmoidal que é denominado fator de Hill. Os modelos  $E_{\max}$  e  $E_{\max}$ -sigmoidal são descritos pelas seguintes equações:

$$E = \frac{Emax \cdot C}{EC_{50} + C}$$

Eq. 2

$$E = \frac{Emax \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$$

Eq. 3

onde E representa o efeito do fármaco;  $E_{\max}$  é o efeito máximo observado em um determinado tratamento com o fármaco; C é a concentração do fármaco;  $EC_{50}$  é a concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo;  $\gamma$  representa o fator sigmoidal que define o formato da curvatura da curva efeito-concentração, também denominado de fator de Hill. A potência do fármaco em um sistema pode ser caracterizada pelo  $EC_{50}$  enquanto a eficácia, ou seja a resposta máxima, é representada por  $E_{\max}$ .

Nolting e colaboradores (1996) modificaram o tradicional modelo  $E_{\max}$  com intuito de avaliar o efeito bactericida da piperacilina em um modelo de infecção experimental *in vitro* frente a *Escherichia coli*, usando simulações do perfil de concentração livre tecidual esperado em músculo de humanos após a administração i.v. *bolus* de piperacilina.

A equação 4 descreve o crescimento microbiano, na ausência de um fármaco. A mesma pode ser expressa pela variação do número de colônias em função do tempo ( $dN/dt$ ), que é a função direta da constante de geração microbiana (k) e do número de unidades formadoras de colônias no tempo zero (N) ou inóculo.

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot N$$

Eq. 4

Porém, sempre que um antimicrobiano é inserido no sistema, sua concentração passa a interferir negativamente na constante de geração microbiana, sendo que o efeito do antimicrobiano pode ser determinado através da Equação 5 (NOLTING et al., 1996):

$$\frac{dN}{dt} = \left( k - \frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N$$

Eq. 5

onde  $dN/dt$  é a variação do número de microrganismos em função do tempo;  $k$  é a constante de geração microbiana na ausência do antimicrobiano;  $k_{max}$  é a constante de morte microbiana máxima na presença do antimicrobiano;  $C$  é a concentração livre do fármaco no tecido infectado;  $EC_{50}$  é a concentração que produz 50% do efeito máximo e  $N$  é o número de microrganismos no inóculo inicial. Nesta equação,  $C$  é substituído pela equação que descreve o perfil de concentração livre do fármaco no tecido infectado. Deste modo, a variação de tempo leva à variação tanto na concentração de fármaco na biofase quanto no número colônias presentes no local de infecção, que determinam o efeito.

Mouton et al. (1997) estabeleceram modificações para o modelo de  $E_{max}$ -sigmoidal, fundamentadas nas limitações de crescimento microbiano dos modelos *in vitro* tais como, nutrientes e espaço. Além disso, após a etapa de crescimento exponencial, uma cultura microbiana atinge um platô em que a velocidade de multiplicação diminui. Desse modo, foi proposto a incorporação do termo  $N_{max}$  na equação  $E_{max}$ -sigmoidal, que indica o maior número de microrganismos que uma cultura *in vitro* suporta (Equação 6):

$$\frac{dN}{dt} = \left\{ \left[ k \cdot \left( 1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \right] - \frac{k_{max} \cdot C_t^Y}{EC_{50}^Y + C_t^Y} \right\} \cdot N$$

Eq. 6

onde,  $N_{max}$  é o número máximo de bactérias que o sistema permite crescer sem limitação; e  $\gamma$  é o coeficiente de Hill, que age como um fator de ajuste das curvas concentração-efeito em modelos PK-PD.

Utilizando o modelo descrito acima, Araújo e colaboradores (2008) realizaram uma modelagem PK-PD com intuito de investigar o efeito do voriconazol contra *Candida krusei* e *Candida albicans* utilizando um modelo de infecção *in vitro*. O modelo de um compartimento foi utilizado para simular os níveis livres do voriconazol nos tecidos esperados após administrações orais de 200 e 300 mg de doses *in bolus* (q8h, q12h e q24h) e de infusão contínua (2 e 4 mg/kg por 24 h). O voriconazol demonstrou efeito fungistático contra *C. albicans* e *C. krusei*, e os parâmetros de PK-PD obtidos pela modelagem foram:  $EC_{50}$  de  $2,96 \pm 2,11 \mu\text{g/mL}$  e  $k_{max}$  de  $0,26 \pm 0,18 \text{ h}^{-1}$  contra *C. albicans* e  $EC_{50}$  de  $3,47 \pm 1,18 \mu\text{g/mL}$  e  $k_{max}$  de  $0,51 \pm 0,33 \text{ h}^{-1}$  para *C. krusei*. Uma diferença significativa de efeito máximo foi observada neste estudo, demonstrando assim que a *C. krusei* é mais susceptível ao voriconazol quando comparada com *C. albicans*. (ARAÚJO, 2008b)

$$\frac{dN}{dt} = \left\{ \left[ k_s \cdot \left( 1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t}) \right] - \left[ \left( \frac{k_{max} \cdot C_t^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_t^\gamma} \right) \cdot (1 - e^{-\beta \cdot t}) \right] \right\} \cdot N$$

Eq. 7

onde  $dN/dt$  é a alteração no número de *Candida* em função do tempo;  $N$  é o número de *Candida* viável;  $K_s$ , constante de taxa de crescimento de fungos na ausência de voriconazol;  $K_{max}$ , constante de velocidade de morte máxima (efeito máximo);  $EC_{50}$ , concentração de voriconazol necessária para produzir 50% do efeito máximo;  $\alpha$ , constante usada para ajustar a fase de atraso inicial para o crescimento;  $\beta$ , constante utilizada para ajustar a fase de atraso inicial para a inibição ou morte;  $N_{max}$ , número máximo de unidades formadoras de colônias de *Candida*;  $\gamma$ , fator de Hill.

O modelo PKPD descrito acima (Eq. 7) foi utilizado por Li et al. (2009) para descrever a atividade anti-*Candida* do voriconazol. O modelo foi construído a partir de dados de *time-kill curve* e os dados de PK referentes a humanos que receberam voriconazol por via intravenosa de 3 mg/kg 2 vezes ao dia ou oral de 200 mg 1 vez ao dia. As curvas de morte demonstraram que isolados clínicos de *C. albicans*, *C.*

*glabrata* e *C. parapsilosis* foram significativamente inibidos pelas concentrações de 4 x e 16 x a CIM, porém não 1 x CIM. Os dados da curva de morte foram ajustados com precisão a um modelo  $E_{\max}$  sigmoidal (Equação 7). Os parâmetros farmacocinéticos dos dados de humanos foram utilizados no modelo para simular curvas de morte para regimes de tratamento típicos. Curvas simuladas predisseram que o voriconazol exerce atividade fungistática prolongada contra todas 4 espécies estudadas. Concluindo que a combinação de dados *in vitro* de morte por tempo com dados de PK *in vivo* existentes pode servir como uma alternativa a estudos animais na otimização de regimes de antifúngicos (LI et al., 2009).

Um outro modelo PK-PD que está descrito na literatura tem sido empregado para descrever o efeito de antifúngicos frente a infecções *in vivo* por leveduras (HOPE et al., 2008; SUDAN et al., 2013). Este modelo também utiliza o modelo estrutural básico de  $E_{\max}$ -sigmoidal com efeito basal. Neste modelo o parâmetro PD utilizado é o declínio das unidades formadoras de colônias no tecido infectado, e como parâmetro PK utiliza-se a ASC do fármaco em determinado regime posológico. A equação para este modelo está descrita abaixo:

$$Efeito \left( \text{Log} \frac{UFC}{g} \right) = E_0 - \frac{E_{\max} \cdot \text{exposição ao fármaco}^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + \text{exposição ao fármaco}^{\gamma}}$$

Eq. 8

onde  $E_0$  é a densidade tecidal fúngica na ausência de terapia;  $E_{\max}$  é o declínio na carga fúngica induzida por tratamento com fármaco;  $\gamma$  é o coeficiente de Hill, para o valor de exposição ao fármaco substitui-se pelo valor ASC, e  $EC_{50}$  é a magnitude da exposição ao fármaco em que o declínio na concentração fúngica é metade do máximo.

Este modelo foi utilizado por Hope et al. (2008) para avaliar o efeito da micafungina em um modelo de meningite por *Candida albicans* em coelhos, e com os resultados foi possível realizar simulações para ajuste de doses em neonatos utilizando abordagens farmacocinética populacional. Este estudo demonstrou que a micafungina em doses > 2 mg/kg penetra nos compartimentos do SNC tanto em coelhos sadios e infectados. O efeito máximo foi atingido com a dose de 8 mg/kg. As simulações de Monte Carlo revelaram que o efeito máximo do antifúngico em neonatos pode ser alcançado com dosagens entre 12-15 mg/kg (HOPE et al., 2008).

Sudan et al. (2013) também utilizaram o modelo PK-PD descrito pela Equação 6 objetivando compreender melhor as relações farmacocinéticas e farmacodinâmicas para o fluconazol e auxiliar no estabelecimento de limites de susceptibilidade *in vitro* para *Cryptococcus neoformans*. Foi utilizado um modelo murino não-imunossuprimido de meningite criptocócica. As doses utilizadas foram 125 e 250 mg/kg/dia por via oral durante 9 dias. Os resultados experimentais foram extrapolados para os humanos. Foi observada uma diminuição dependente da dose na carga fúngica e a atividade máxima foi obtida com 250 mg/kg/dia. A CIM foi importante para a compreensão das relações exposição-resposta. A razão média ASC/CIM associada a estase era de 389. Os resultados do estudo de extrapolação para humanos sugeriu que apenas 66,7 % dos pacientes que recebem 1.200 mg/kg alcançam a relação ASC/CIM de 389. Além disso este estudo aponta que os potenciais pontos de corte para susceptibilidade para fluconazol contra o *Cryptococcus neoformans* são: sensível < 2 µg/mL e resistente > 2 µg/mL (SUDAN et al., 2013).

## 9. Simulações de Monte Carlo

No âmbito farmacêutico as simulações computacionais vem sendo aplicadas na descoberta de novos fármacos, otimização de processos químicos e, mais recentemente, na concepção de estudos clínicos, bem como é utilizada para tomar decisões, compreender sistemas biológicos e fisiológicos complexos (BONATE, 2001; KRAUSE; LOWE, 2014).

A estatística clássica associa probabilidades apenas a variáveis aleatórias, enquanto a bayesiana permite a associação de probabilidade a qualquer grau de crença ou incerteza sobre uma quantidade aleatória, evento ou hipótese. A adoção de um modelo bayesiano para a caracterização de riscos permite a integração perfeita de diferentes tipos de informações disponíveis, a fim de escolher e parametrizar modelos de risco (BOIS, 1999).

Para modelos bayesianos que requerem avaliação de integrais multidimensionais complexas a inferência na maioria dos algoritmos é resolvida usando aproximações. As aproximações analíticas, como a aproximação de Laplace, variacionais e Monte Carlo têm sido amplamente usados para modelos bayesianos (BRADLEY; DUDLEY; DRUSANO, 2003).

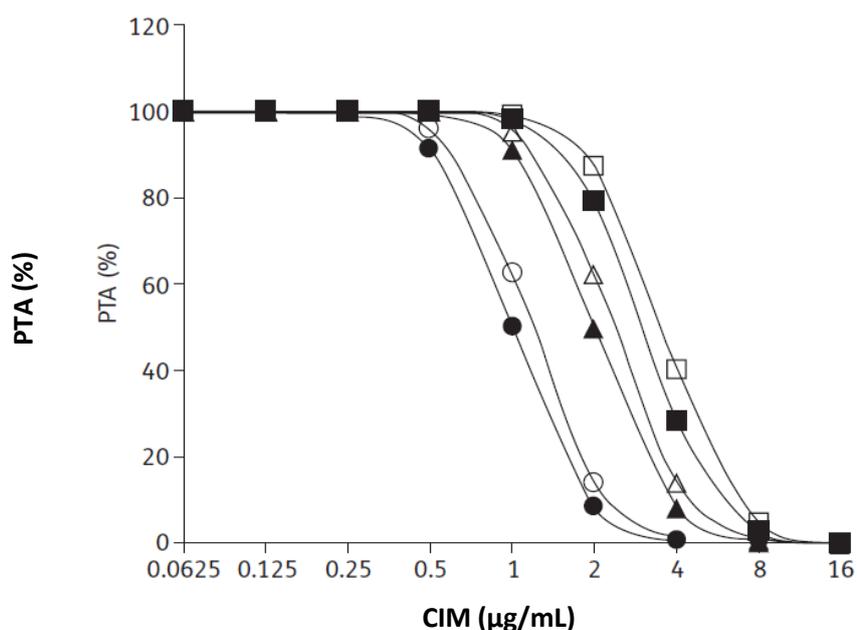
Simulações de Monte Carlo sendo utilizada na previsão de doses de antimicrobianos que efetivamente erradicam os microrganismos, incorporando algumas das variáveis importantes que influenciam neste resultado. Essas construções matemáticas podem ser usadas para ajudar a entender quais fatores são mais importantes no sucesso do tratamento e dar uma racionalidade de uma certa dose de um antimicrobiano pode funcionar contra um determinado patógeno em uma situação, mas não em outra. O conhecimento dos fatores que são fundamentais para o cálculo de probabilidades na simulação de Monte Carlo permite tanto antecipar quando as falhas podem ocorrer como oferecer novas recomendações para terapia bem-sucedida. Sendo assim, estas simulação podem determinar a probabilidade de ocorrer um resultado bem-sucedido no tratamento de uma infecção, usando informações sobre uma dose específica de um antimicrobianos, bem como tratar um patógeno específico em um local de tecido específico (VERHAEGEN; SEUNTJENS, 2003).

Para cada fator avaliado em uma simulação de Monte Carlo, a variação biológica e fisiológica inerente podem ser definidas. Esta variação resulta numa distribuição de valores. Os fatores avaliados incluem as concentrações de antimicrobianos séricos ou tecidos infectados e a susceptibilidade aos antimicrobianos. A distribuição de valores é então colocada num modelo matemático de eficácia clínica e microbiológica para produzir uma estatística de "probabilidade de atingir alvo" (MUR NIGHTINGALE, 2007; VERHAEGEN; SEUNTJENS, 2003).

Os índices de PK-PD são frequentemente utilizados como alvos no processo de seleção de dose de antimicrobianos. Nas simulações de Monte Carlo, considera-se a variabilidade entre os pacientes nos parâmetros PK, bem como na PD (em termos da CIM), e a probabilidade de atingir a meta (PTA) é determinada com base nessas simulações estocásticas do modelo. No entanto, esses índices PK-PD são pontos finais resumidos e, no processo de criação desses pontos finais, informações detalhadas sobre o curso do tempo dos processos PK e PD individuais são perdidas. Modelos que caracterizam o curso em tempo integral de PK assim como PD fornecem uma descrição mais precisa do efeito de antimicrobianos para diferentes tratamentos e subpopulações (NIELSEN; CARS; FRIBERG, 2011b).

Wang et al. (2015) utilizaram a ferramenta de simulações de Monte Carlo juntamente com um modelo PopPK para otimizar um regime oral de dose do

voriconazol em pacientes com infecções fúngicas invasivas. Nesse estudo as doses para realização das simulações de Monte Carlo foram de 100, 200 e 300 mg intravenosas e orais duas vezes por dia e os valores de CIM (0,0625 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para cada regime de dosagem, usando como alvo o valor de  $f\text{ASC}_{24}/\text{CIM} \geq 25$ . Para uma CIM de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , as PTAs para 200 mg duas vezes por dia i.v. e oral foram 95,6% e 91,2%, respectivamente, demonstrando que o regime de dosagem é eficaz para pacientes individuais com uma baixa CIM. Já para maiores CIM ( $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), as PTAs para o regime de dosagem foram  $< 90\%$ , sugerindo que são necessárias doses aumentadas para pacientes individuais com valores de MIC mais elevados (Figura 6). Como conclusão esse estudo determinou que o modelo PopPK-PD preciso e estável combinado com um índice PKPD baseado em simulações de Monte Carlo parece ser racional para identificar regimes de dosagem em pacientes com infecções fúngicas invasivas (WANG et al., 2015).



**Figura 6.** Probabilidade de atingir o alvo de  $f\text{ASC}_{24}/\text{CIM} \geq 25$  por CIMs. Círculos abertos, 100 mg duas vezes por dia por via intravenosa; Triângulos abertos, 200 mg duas vezes por dia por via intravenosa; Quadrados abertos, 300 mg duas vezes por dia por via intravenosa; Círculos cheios, 100 mg duas vezes ao dia por via oral; Triângulos cheios, 200 mg por ano diariamente; Quadrados cheios, 300 mg por semana diariamente. Adaptado de WANG et al. (2015).

**CAPÍTULO 1** - Is meningitis by *Cryptococcus neoformans* able to change the brain distribution of antifungals? An animal model to link disease and changes in pharmacokinetics

---

IS MENINGITIS BY *Cryptococcus neoformans* ABLE TO CHANGE THE BRAIN  
DISTRIBUTION OF ANTIFUNGALS? AN ANIMAL MODEL TO LINK DISEASE AND  
CHANGES IN PHARMACOKINETICS

**Running title:** Cryptococcal meningitis impact on antifungals

**Key-words:** *Cryptococcus neoformans*, disseminated meningitis, models of infections, cryptococcosis, microdialysis

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 71 – 90, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. O presente estudo padronizou um modelo animal em ratos Wistar de meningite disseminada por *Cryptococcus neoformans* para ser usado como ferramenta para avaliar as mudanças e seu impacto na distribuição de antifúngicos por meio da microdiálise (MD).

**CAPÍTULO 2 – Influence of experimental cryptococcal meningitis in Wistar rats on voriconazole brain penetration assessed by microdialysis**

---

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL CRYPTOCOCCAL MENINGITIS IN WISTAR  
RATS ON VORICONAZOLE BRAIN PENETRATION ASSESSED BY

**Running title:** VRC brain penetration assessed by  $\mu$ D

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, voriconazole, microdialysis, populational pharmacokinetics analysis, meningitis

O capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 93 – 111.

Alves IA, Staudt KJ, Silva C de M, Lock G de A, Dalla Costa T, de Araujo BV. Influence of Experimental Cryptococcal Meningitis in Wistar Rats on Voriconazole Brain Penetration Assessed by Microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jul;61(7).

**CAPÍTULO 3** - Free brain levels reached by fluconazole in healthy and *Cryptococcus neoformans* infected rats: a translational study about the doses employed clinically

---

FREE BRAIN LEVELS REACHED BY FLUCONAZOLE IN HEALTHY AND  
*Cryptococcus neoformans* INFECTED RATS: A TRANSLATIONAL STUDY ABOUT  
THE DOSES EMPLOYED CLINICALLY

**Running title:** FLC brain penetration in healthy and infected rats

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 115 – 134, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da meningite disseminada experimental causada por *C. neoformans* no plasma total e concentrações cerebrais livres de fluconazol em ratos Wistar e seu impacto nas doses atuais empregadas no tratamento da criptococose.

**CAPÍTULO 4** - PK-PD modeling of triazoles against *Cryptococcus neoformans* using time-kill curves, modeling and simulation

---

PK-PD MODELING AND SIMULATION OF TRIAZOLES EFFECT AGAINST  
*Cryptococcus neoformans* USING TIME-KILL CURVES

**Running title:** PK-PD modeling of triazoles

**Key-words:** PK-PD modeling, antifungals azoles, time-kill curves, *Cryptococcus neoformans*, Monte Carlo simulations.

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 137 – 154, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. No presente estudo, avaliamos o efeito do fluconazol e do voriconazol contra *Cryptococcus neoformans* usando curvas de morte em função do tempo. Um modelo Emax foi usado para modelar as curvas (Scientist®). Os valores de k, EC50 e kmax foram determinados para vários múltiplos de MIC. Estes parâmetros PK/PD foram utilizados em simulações de Monte Carlo para prever o efeito dos regimes de dosagem recomendados para cada medicamento após dez semanas de tratamento.



A proposta desta tese foi desenvolver um modelo PK-PD que descreva o impacto da infecção por *Cryptococcus neoformans* nos desfechos de tratamento com antifúngicos azólicos. Para cumprir essa proposta foi avaliada a influência da infecção por *C. neoformans* sobre a penetração cerebral do principal azólico utilizado na clínica, o fluconazol, e de outro fármaco que tem ganhado espaço como alternativa no tratamento dessa micose sistêmica, o voriconazol. Utilizou-se um modelo de infecção experimental em ratos Wistar para a avaliação do impacto da infecção sobre a exposição e distribuição tecidual desses dois fármacos através da técnica de microdiálise.

Para obtenção do sucesso terapêutico no tratamento de micoses sistêmicas as concentrações dos antifúngicos atingidas no tecido infectado são de suma importância, uma vez que se esses microrganismos forem expostos a concentrações sub-inibitórias, poderá haver o surgimento de resistência aos fármacos utilizados e ineficácia do tratamento.

Na clínica usualmente utilizam-se as concentrações plasmáticas livres para o ajuste de doses dos antifúngicos, porém essas podem não ser representativas das concentrações teciduais alcançadas pelos fármacos, uma vez que em tecidos infectados essa distribuição pode ser modificada devido às alterações resultantes do processo infeccioso e inflamatório como variações de pH, temperatura, permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo e presença de células imunes.

Neste sentido, para a construção de um modelo PK-PD com boa capacidade de predição, o conhecimento das concentrações de antifúngicos atingidas no tecido infectado é fundamental. Para tanto, inicialmente foi necessário estabelecer um modelo animal de infecção cerebral por *Cryptococcus neoformans* em ratos Wistar, cuja descrição e validação encontram-se descritas no Capítulo 1. No modelo a infecção foi induzida através de administração de 100 µL de inóculo ( $1 \cdot 10^6$  UFC/mL) pela via intravenosa caudal. Com objetivo de avaliar se houve a disseminação para outros órgãos, além do cérebro, foi investigada a presença de *C. neoformans* nos pulmões, fígado, rins e coração, por meio de ensaios histológicos e microbiológicos. Além disso, para avaliação da função hepática, renal, cardíaca, bem como as concentrações de proteínas circulantes, foram analisados os parâmetros bioquímicos como ureia, TGO, TGP, creatinina e creatinina cinase. Foram também realizadas contagens hematológicas de leucócitos com intuito de avaliar a progressão da

infecção por 14 dias e resposta inflamatória através da contagem de leucócitos e avaliada a permeabilidade vascular cerebral dos animais através do teste de Azul de Evans em grupos saudáveis e infectados. Através deste estudo obteve-se um modelo de infecção cerebral por *C. neoformans* robusto e disseminado em dez dias. Durante as análises histológicas e contagem fúngica foi observada a presença de *C. neoformans* em todos os tecidos investigados dos animais infectados, com infiltração leucocitária em todos os órgãos exceto no cérebro. Os dados bioquímicos demonstraram que houve um acometimento hepático devido as alterações na albumina, ureia, TGP e alteração na musculatura dos animais, pois houve mudanças na creatinina cinase entre saudáveis e infectados. Observou-se aumento da permeabilidade vascular, pois a concentração média de azul de Evans no cérebro de indivíduos saudáveis e infectados foi de 0,51 e 1,50 µg/g, respectivamente. Ainda, observou-se alterações na quantidade total de leucócitos durante a infecção, com aumento de monócitos e neutrófilos. Essas características do modelo animal apresentam semelhanças importantes com a doença em humanos e corroboram o seu potencial para ser aplicado em estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

Dando sequência no desenvolvimento dessa tese, foi investigada a penetração cerebral do voriconazol, descrito no Capítulo 2. Os resultados demonstraram que a infecção promoveu maior exposição cerebral nos animais, indicando que a meningite altera a permeabilidade do tecido cerebral. As concentrações cerebrais nos animais saudáveis foram semelhante às concentrações no plasma ( $f_T = 0,85$ ) e, nos animais infectados, 1,8 vezes superior. O modelo PK estrutural com dois compartimentos e eliminação por Michaelis Menten descreveu o perfil de concentração *versus* tempo do voriconazol no plasma e tecido simultaneamente. A covariável infecção foi incluída no volume de distribuição periférico ( $V_2$ ) e taxa máxima de metabolismo ( $V_M$ ). A inclusão da covariável infecção nos parâmetros permitiu uma melhor descrição da variabilidade entre os dois grupos saudáveis e infectados por *C. neoformans*. O aumento na penetração do voriconazol pode ser relacionado ao menor  $V_2$  nos animais infectados, e este fato pode ser explicado pela patogênese de *C. neoformans* no cérebro. Dado que o voriconazol apresenta extensa eliminação (98%) pela via metabólica, a lesão hepática ocasionada pela disseminação do *C. neoformans*, pode reduzir o seu metabolismo, reduzindo o valor de  $V_M$  em animais infectados. A dose estudada corresponde a 1,2 mg/kg em seres humanos (por alometria) gerando

concentrações cerebrais superiores a CIM (0,03 µg/mL), sugerindo uma reanálise dessas doses devido às limitações do uso de voriconazol associadas ao seu potencial de interação por metabolismo em pacientes gravemente doentes.

A avaliação da farmacocinética plasmática e tecidual do fluconazol em ratos Wistar sadios e infectados por *C. neoformans* foi realizada utilizando a técnica de microdiálise, conforme descrito no Capítulo 3. Nos dois grupos foi administrada uma dose de 20 mg/kg do fármaco por via intravenosa e as concentrações plasmáticas e cerebrais livres foram quantificadas por métodos LC-MS/MS e LC-UV validados previamente. Os perfis de concentração-tempo foram analisados por abordagem não-compartimental e compartimental populacional (popPK), usando WinNonlin® e MONOLIX®, respectivamente. Para comparar os resultados obtidos após o tratamento com fluconazol, partindo das níveis atingidos no cérebro infectado e não-infectado foram realizadas simulações de Monte Carlo usando o software Berkeley Madonna®. Como alvo terapêutico utilizou-se a  $fASC/CIM > 389$ . Com base nos resultados observados na análise não-compartimental observou-se que o fator de penetração cerebral foi aumentado de 0,69 no grupo saudável para 1,04 nos infectados e este fato foi atribuído à lesão vascular e patogenia ocasionada pela infecção por *C. neoformans*. Um modelo popPK de dois compartimentos foi construído e este descreveu simultaneamente as concentrações plasmáticas e cerebrais de fármaco livre em ambos os grupos investigados. A infecção foi utilizada como covariável categórica para melhor descrever as diferenças na constante de transferência do compartimento periférico para o central ( $k_{21}$ ) e o peso foi utilizado como covariável contínua associada ao volume de distribuição do compartimento central ( $V_1$ ) e periférico ( $V_2$ ). Assumindo uma farmacocinética linear para o fluconazol em roedores, os valores de área sob a curva de plasma livre ( $fASC$ ), área sob a curva livre no tecido sadio ( $fT_{sadio}ASC$ ) e área sob a curva livre no tecido infectado ( $fT_{infectado}ASC$ ) foram estimados para doses efetivas descritas na literatura para roedores (125 e 250 mg/kg) e esses valores foram empregados em uma simulação de Monte Carlo. O resultado das simulações demonstrou que a probabilidade de atingir o alvo  $fASC/CIM > 389$  (PTA) foi dependente da CIM e que para o valor mais frequente de CIM (4 µg/mL) não há diferença no PTA empregando os valores de fração livre no plasma ou fração tecidual em animais infectados e em ambos os cenários os percentuais estimados de sucesso são na ordem de 80-100. Dando

continuidade a investigação do impacto da infecção nos desfechos de tratamento com fluconazol, uma abordagem transacional desses dados foi proposta, através da integração desses dados pré-clínicos com um modelo popPK de fluconazol em pacientes HIV positivos que receberam 800 mg, do fármaco previamente descrito na literatura. De posse dos parâmetros CL ( $0.80 \pm 0.17$  L/h), V ( $44.8 \pm 3.6$  L), ka ( $3.05 \pm 1.25$  h), fator de biodisponibilidade (0.93) e fração livre (0.9) e assumindo um impacto da infecção equivalente ao observado em ratos sobre o cérebro desses pacientes, os valores de  $f_{ASC}$ ,  $fT_{sadioASC}$  e  $fT_{infectadoASC}$  foram estimados por simulação, assumindo uma farmacocinética linear na faixa de doses de 800-2000 mg. Novos PTAs foram simulados por Monte Carlo para 1000 cenários. Os dados de PTA estimados com base no alvo foram muito semelhantes às taxas de sucesso obtidas em pacientes HIV positivos que receberam fluconazole em monoterapia nas doses de 800 a 2000 mg demonstrando o potencial dessa ferramenta. Novamente, as doses necessárias para atingir o alvo foram dependentes da MIC o que reforça a necessidade de determinação desse parâmetro antes do planejamento dos regimes de dosagens.

Sabendo que há inúmeras limitações na utilização de dados estáticos como a CIM para definição de suscetibilidade a antifúngicos e do potencial de utilização de modelagem PK-PD para uma melhor compreensão da relação entre PK e PD viabilizado através da definição de parâmetros como  $EC_{50}$ , k,  $k_{max}$ , N,  $N_{max}$  a quarta etapa dessa tese inclui a construção de *time-kill curves in vitro* para avaliação do efeito do fluconazol e voriconazol contra *C. neoformans*, empregando concentrações múltipla de valores da CIM. Inicialmente foram definidos os valores da CIM para fluconazole ( $0.5 \mu\text{g/mL}$ ) e voriconazol ( $0.03 \mu\text{g/mL}$ ) através do protocolo M-27-S4 do CLSI. A levedura foi exposta a concentrações equivalente a  $0,06 - 64 \times$  CIM para o fluconazol e  $0,03 - 64 \times$  CIM para o voriconazol. Um inóculo padronizado de  $1 - 5 \cdot 10^6$  UFC/mL de *C. neoformans* foi adicionado a frasco de cultura contendo meio RPMI tamponado com MOPS e foram avaliadas as curvas de inibição do crescimento até 24 h para ambos os fármacos (n = 3 / ponto). O modelo de  $E_{max}$  modificado com atraso no crescimento foi capaz de descrever a inibição do crescimento fúngico para ambos os fármacos. O crescimento microbiano na ausência do fármaco foi semelhante em todas as curvas e o valor de k foi fixado em  $0.371 \text{ h}^{-1}$ , assim como o valor do atraso de crescimento (x), igual a  $0.798 \text{ h}^{-1}$ . Os demais parâmetros  $EC_{50}$ ,  $k_{max}$  e coeficiente de

Hill (h) foram definidos para todas as *time-kill curves* e a média desses parâmetros para o fluconazol e voriconazol foi de  $1.26 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$  e  $0.32 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ;  $0.64 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$  e  $0.95 \pm 0.20$ ; e  $1.15 \pm 0.37 \text{ h}^{-1}$  e  $1.08 \pm 0.23 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Os dados indicam uma maior suscetibilidade do fungo ao voriconazol em relação ao fluconazol, associado aos menores valores de  $\text{EC}_{50}$ . De posse dos parâmetros PK-PD foram realizados simulações de Monte Carlo para avaliar o potencial de erradicação do fungo após o tratamento com os antifúngicos num segmento de 10 semanas, nas doses indicadas na clínica (800 e 2000 mg para fluconazol e 200 ou 400 mg para voriconazol), empregando-se parâmetros farmacocinéticos populacionais descritos na literatura para pacientes que utilizam esses fármacos. Nessas simulações foram empregados os valores reais de  $\text{EC}_{50}$  definidos experimentalmente para os fármacos ( $0.5 \mu\text{g/mL}$  para fluconazol e  $0.03 \mu\text{g/mL}$  para voriconazol) e valores estimados de  $\text{EC}_{50}$  para o valor de MIC mais frequente em ambos os fármacos ( $4 \mu\text{g/mL}$  para fluconazol e  $0.06 \mu\text{g/mL}$  para voriconazol) empregando-se uma equação apropriada que relaciona essas variáveis. Assim os valores de  $\text{EC}_{50}$  de  $1.26 \mu\text{g/mL}$  e  $11.20 \mu\text{g/mL}$  foram empregados na simulação do fluconazol e de  $0.32 \mu\text{g/mL}$  e  $0.45 \mu\text{g/mL}$  para o voriconazol. O fluconazol apresentou, para todas as doses simuladas, um percentual de pacientes não responsivo ao tratamento na ordem de 10% e um sucesso em 1 semana de tratamento para o menor  $\text{EC}_{50}$ . Para o maior  $\text{EC}_{50}$  o cenário foi distinto e semelhante aos dados da literatura, em que há 90% de insucesso na menor dose, 25% de insucesso na dose intermediária e 10% de insucesso na maior dose testada com um tempo médio de 3 semanas para erradicação da levedura, expressa por uma redução de  $-3 \text{ Log}$  no inóculo inicial. Para o voriconazol, o  $\text{EC}_{50}$  teve pouco impacto sobre a erradicação do fungo e em todos os cenários foi observada uma erradicação completa do fungo em curto espaço de tempo (1-2 semanas). Esses dados sugerem um melhor perfil de eficácia do voriconazol contra *C. neoformans* em comparação ao fluconazol.

Com essa tese foi possível desenvolver aplicar um modelo PK-PD capaz de avaliar diferentes doses e regimes terapêuticos e comparar o sucesso na terapêutica para dois antifúngicos azólicos, indicando um melhor potencial de efeito para o voriconazol.



**CONCLUSÕES**

---



- Foi possível estabelecer uma infecção experimental cerebral disseminada por *Cryptococcus neoformans* em ratos Wistar machos 10 dias após a inoculação intravenosa, com características semelhantes às observadas em humanos, podendo ser empregado para avaliar a influência da infecção na penetração cerebral de antifúngicos;
- A determinação por microdiálise *in vivo* das concentrações livres do fluconazol e voriconazol no cérebro demonstraram que a meningite por *C. neoformans* alterou a exposição cerebral destes antifúngicos;
- O modelo farmacocinético populacional desenvolvido para o voriconazol permitiu modelar simultaneamente as concentrações plasmáticas e cerebrais em função do tempo e permitiu a inclusão de variabilidade e covariável infecção nos parâmetros farmacocinéticos entre os grupos sadios e infectados, podendo este modelo ser empregado para a simulação de perfis concentração por tempo em ambas as situações;
- O modelo farmacocinético populacional desenvolvido para o fluconazol foi capaz de, simultaneamente, descrever as concentrações plasmáticas e cerebrais em função do tempo do fármaco além de incluir as covariáveis infecção e peso, podendo ser empregado para a simulação de perfis concentração por tempo tanto em animais sadios quanto infectados;
- As simulações de Monte Carlo demonstraram que a probabilidade de sucesso do tratamento é diferente se for utilizado os níveis atingidos em tecidos saudáveis ou infectados, enfatizando a ideia de que é crucial determinar os níveis de fármacos nos tecidos alvos e a influência da doença sobre a farmacocinética do fármaco;
- O modelo PK-PD de  $E_{max}$  modificado foi capaz de avaliar diferentes doses e regimes terapêuticos e prever o desfecho de tratamento para dois antifúngicos azólicos testados, indicando um melhor potencial de efeito para o voriconazol frente as infecções cerebrais associadas ao *C. neoformans*.



## REFERÊNCIAS GERAIS

---



ADAMS, A. I. H. et al. Treatment of invasive fungal infections: stability of voriconazole infusion solutions in PVC bags. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 400–404, out. 2008.

AGUIAR, P. A. D. F. DE et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 59, p. e13, 13 abr. 2017.

ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P. DE; GOULART, L. S. Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575–579, out. 2010.

AMI, R. B.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunopharmacology of Modern Antifungals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 226–235, 15 jul. 2008.

ANDES, D. et al. *In vivo* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a New Triazole, Voriconazole, in a Murine Candidiasis Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3165–3169, out. 2003.

ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 679–697, set. 2006.

ANDES, D.; CRAIG, W. A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, n. 4, p. 261–268, abr. 2002.

ANDES, D.; OGTROP, M. VAN. *In vivo* Characterization of the Pharmacodynamics of Flucytosine in a Neutropenic Murine Disseminated Candidiasis Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 938–942, 1 abr. 2000.

ANDRADE-SILVA, L. et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 635–640, ago. 2013.

ARAUJO, B. V. et al. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 4, p. 985–990, 15 ago. 2007.

ARAUJO, B. V. DE et al. Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 154–159, 1 fev. 2009.

AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 277–351, set. 2001.

AZEREDO, F. J. et al. Comparison of fluconazole renal penetration levels in healthy and *Candida albicans*-infected Wistar rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5852–5857, nov. 2012.

AZEREDO, F. J. et al. Does the Anesthetic Urethane Influence the Pharmacokinetics of Antifungal Drugs? A Population Pharmacokinetic Investigation in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3314–3318, out. 2015.

BARONETTI, J. L. et al. Heat killed cells of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* induces protective immunity in rats: immunological and histopathological parameters. **Medical Mycology**, v. 44, n. 6, p. 493–504, set. 2006.

BIBIANA VERLINDO DE ARAÚJO. **Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol**. Porto Alegre: Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2008a.

BIBIANA VERLINDO DE ARAÚJO. **Araújo, Bibiana Verlindo de - Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do antifúngico voriconazol**. Disponível em: <<http://biblioteca.versila.com/>>. Acesso em: 19 maio. 2016b.

BLASI, E. et al. Experimental model of intracerebral infection with *Cryptococcus neoformans*: roles of phagocytes and opsonization. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3682–3688, 1 set. 1992.

BOIS, F. Y. Analysis of PBPK Models for Risk Characterization. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 895, n. 1, p. 317–337, 1 dez. 1999.

BONATE, P. L. A brief introduction to Monte Carlo simulation. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 1, p. 15–22, jan. 2001.

BONATE, P. L. et al. Guidelines for the quality control of population pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses: an industry perspective. **The AAPS journal**, v. 14, n. 4, p. 749–758, dez. 2012.

BRADLEY, J. S.; DUDLEY, M. N.; DRUSANO, G. L. Predicting efficacy of antiinfectives with pharmacodynamics and Monte Carlo simulation. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, n. 11, p. 982-992-995, nov. 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Anvisa - Resolução - RE nº 1185, de 09 julho de 2002**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2002/1185\\_02re.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2002/1185_02re.htm)>. Acesso em: 9 maio. 2016.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.

BRUNNER, M. et al. Target Site Concentrations of Ciprofloxacin after Single Intravenous and Oral Doses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3724–3730, dez. 2002.

CAMPANA, E. H. et al. Evaluation of M.I.C.E.TM, Etest® and CLSI broth microdilution methods for antimicrobial susceptibility testing of nosocomial bacterial isolates. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 157–164, abr. 2011.

CASTANHEIRA, M. et al. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 320–326, out. 2014.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 39–49, mar. 2006.

CÁTIA REZENDE; CLÁUDIA JAQUELINE MARTINEZ MUNHÓZ; GLÁUCIA GOMES DE ALMEIDA. Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga - São Paulo. **NewsLab**, n. 86, p. 88–93, 2008.

CAULEY, L. K.; MURPHY, J. W. Response of congenitally athymic (nude) and phenotypically normal mice to *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and Immunity**, v. 23, n. 3, p. 644–651, mar. 1979.

CDC. **C. neoformans Infection Statistics | Fungal Diseases | CDC**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, set. 2004.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The Medical Journal of Australia**, v. 187, n. 7, p. 404–409, 1 out. 2007.

CHEN, Y.-C. et al. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, 22 jul. 2015.

CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261–269, abr. 2013.

CHIAPELLO, L. S. et al. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 392–400, nov. 2004.

CLEMENTE, G. Estudo comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para cálculo da lipofilia molecular. **Saúde & Tecnologia**, v. 0, n. 5, p. 29–34, 19 nov. 2015.

CLSI. **M27-S4: Method Broth Dilution Antifungal ST of Yeasts Supplement**. Disponível em: <<http://shop.clsi.org/M27S.html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

CLSI, C. **M27-A3: Reference Method for Broth Dilution AST of Yeasts**. Disponível em: <<http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M27.html>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, 15 mar. 2016.

COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 4, p. 263–272, 27 jan. 1994.

CÓRDOBA, S. et al. Susceptibility profile and epidemiological cut-off values of *Cryptococcus neoformans* species complex from Argentina. **Mycoses**, v. 59, n. 6, p. 351–356, jun. 2016.

COSTA, C. H. DA. Infecções pulmonares na AIDS. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 2, 2010.

CSAJKA, C.; VEROTTA, D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: history and perspectives. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 33, n. 3, p. 227–279, jun. 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1782–1786, maio 2010.

DELGADO, A. C. N. et al. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, n. 1, p. 7–11, jan. 2005.

DENAYER, T.; STÖHR, T.; VAN ROY, M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5–11, set. 2014.

DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G. **Handbook of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Correlation**. [s.l.] CRC Press, 1995.

DOLTON, M. J.; MCLACHLAN, A. J. Optimizing azole antifungal therapy in the prophylaxis and treatment of fungal infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 493–500, dez. 2014.

NOTE, S. et al. A retrospective analysis of patient-specific factors on voriconazole clearance. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, v. 2, p. 10, 2016.

EBERT, S. C.; CRAIG, W. A. Pharmacodynamic properties of antibiotics: application to drug monitoring and dosage regimen design. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 11, n. 6, p. 319–326, jun. 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. **Revista Iberoamericana De Micología**, v. 20, n. 4, p. 121–136, dez. 2003.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, nov. 2012a.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, nov. 2012b.

ETTE, E. I.; WILLIAMS, P. J. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 10, p. 1702–1706, out. 2004.

EUCAST, E. **EUCAST: Susceptibility testing of yeasts**. Disponível em: <[http://www.eucast.org/ast\\_of\\_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility\\_testing\\_of\\_yeasts/](http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/)>. Acesso em: 20 abr. 2016.

EYAL, S.; HSIAO, P.; UNADKAT, J. D. Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 123, n. 1, p. 80–104, jul. 2009.

FLORES, V. G. et al. Meningitis due to *Cryptococcus neoformans*: treatment with posaconazole. **Current HIV research**, v. 10, n. 7, p. 620–623, out. 2012.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229–236, ago. 2004.

GOLDMAN, D. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. **The American Journal of Pathology**, v. 148, n. 4, p. 1275–1282, abr. 1996.

GOVENDER, N. P. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2606–2611, jun. 2011.

GRACIA, E. D. C. G. D. Meningitis por *Cryptococcus neoformans*: Experiencia clínica y consideraciones terapéuticas en el Hospital Santo Tomás desde el 1 de enero de 2007 al 31 de diciembre de 2011. **Revista Médica de Panamá - ISSN 2412-642X**, v. 32, n. 3, p. 3–7, 17 mar. 2014.

GRUMACH, A. S. et al. Consenso em criptococose – 2008. 2008.

HIMMELREICH, U. et al. Cryptococcomas Distinguished from Gliomas with MR Spectroscopy: An Experimental Rat and Cell Culture Study. **Radiology**, v. 220, n. 1, p. 122–128, 1 jul. 2001.

HOHMANN, N. et al. Dose-Dependent Bioavailability and CYP3A Inhibition Contribute to Non-Linear Pharmacokinetics of Voriconazole. **Clinical Pharmacokinetics**, 28 maio 2016.

HOPE, W. W. et al. The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin in Experimental Hematogenous *Candida* Meningoencephalitis. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 1, p. 163–171, 1 jan. 2008.

HOPE, W. W.; DRUSANO, G. L. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: bridging from the bench to bedside. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 602–612, jul. 2009.

HSUEH, P.-R. et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 512–517, fev. 2005.

HUMPHREY, M. J.; JEVONS, S.; TARBIT, M. H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 5, p. 648–653, nov. 1985.

HURTADO, F. K. et al. Population Pharmacokinetic Modeling of the Unbound Levofloxacin Concentrations in Rat Plasma and Prostate Tissue Measured by Microdialysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 678–686, fev. 2014.

HUURNEMAN, L. J. et al. Pharmacodynamics of Voriconazole in Children: Further Steps along the Path to True Individualized Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2336–2342, abr. 2016.

HYLAND, R.; JONES, B. C.; SMITH, D. A. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 31, n. 5, p. 540–547, maio 2003.

IROKANULO, E. A.; AKUESHI, C. O. Virulence of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, B, C and D for four mouse strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 289–293, out. 1995.

JACOBS, M. et al. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 3, p. e1004782, mar. 2016.

JEZEQUEL, S. G. Fluconazole: interspecies scaling and allometric relationships of pharmacokinetic properties. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 196–199, mar. 1994.

JOERGER, M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 119–132, mar. 2012.

JÚNIOR, A. A. DE V. et al. Comparação entre microdiluição e disco difusão para o teste de susceptibilidade aos antifúngicos contra *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 135–142, 30 jul. 2012.

KHO, C. M. et al. A Review on Microdialysis Calibration Methods: the Theory and Current Related Efforts. **Molecular Neurobiology**, 17 maio 2016.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, maio 1998.

KLEPSEK, M. E. et al. Evaluation of Voriconazole Pharmacodynamics Using Time-Kill Methodology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1917–1920, jul. 2000.

KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 397–401, mar. 1998.

KRAUSE, A.; LOWE, P. J. Visualization and Communication of Pharmacometric Models With Berkeley Madonna. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 3, n. 5, p. e116, maio 2014.

LAMOUREUX, F. et al. Impact of CYP2C19 genetic polymorphisms on voriconazole dosing and exposure in adult patients with invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 2, p. 124–131, fev. 2016.

LANJEWAR, D. N. et al. Hepatic pathology in AIDS: a pathological study from Mumbai, India. **HIV medicine**, v. 5, n. 4, p. 253–257, jul. 2004.

LAVIELLE, M.; AARONS, L. What do we mean by identifiability in mixed effects models? **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 43, n. 1, p. 111–122, fev. 2016.

LEE, C.-H. et al. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 361, 2012.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156–167, fev. 2011.

LEVÊQUE, D. et al. Clinical pharmacokinetics of voriconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 274–284, abr. 2006.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia - 13ed.** [s.l.] McGraw Hill Brasil, 2016.

LEVISON, M. E.; LEVISON, J. H. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 791–vii, dez. 2009.

LI, X. et al. Effect of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on the clinical outcomes of voriconazole: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 8 jul. 2016.

LI, Y. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and *in vitro* simulation of dynamic voriconazole–*Candida* interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 240–245, set. 2009.

LIGNELL, A. et al. Characterization of the inhibitory effect of voriconazole on the fungicidal activity of amphotericin B against *Candida albicans* in an *in vitro* kinetic model. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 142–148, jul. 2008.

LONGLEY, N. et al. Dose response effect of high-dose fluconazole for HIV-associated cryptococcal meningitis in southwestern Uganda. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 12, p. 1556–1561, 15 dez. 2008.

MAGALHÃES, Y. C. et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 117–123, 31 mar. 2015.

MARCELO TERUYUKI MATSUMOTO. **Tipagem Molecular, perfis de Sensibilidade e Caracterização de Transcritos Diferencialmente Expressos Durante a Infecção de “*Cryptococcus neoformans*”**. Dissertação de Mestrado—Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006.

MASAKI YAMAMOTO et al. Clinical Characteristics and Risk Factors of non-*Candida* Fungaemia. **BMC Infectious Diseases**, v. 247, n. 13, 2013.

MATHY, F.-X. et al. Fluconazole distribution in rat dermis following intravenous and topical application: a microdialysis study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 4, p. 770–780, abr. 2005.

MAY, R. C. et al. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, fev. 2016.

MCCARTHY, K. M. et al. Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naive South African province with a high HIV seroprevalence. **AIDS (London, England)**, v. 20, n. 17, p. 2199–2206, 14 nov. 2006.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, fev. 2011.

MOMPER, J. D. et al. Population Pharmacokinetics of Fluconazole in Premature Infants Less than 750 Grams Birth Weight. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.00963-16, 11 jul. 2016.

MORALES, B. P. et al. Determination of the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by flow cytometry. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 90–98, jan. 2014.

MOUTON, J. W. et al. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK-PD) terminology for anti-infective drugs: an update. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 601–607, maio 2005.

MOUTON, J. W. et al. Tissue concentrations: do we ever learn? **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 235–237, fev. 2008.

MOUTON, J. W.; VINKS, A. A.; PUNT, N. C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 733–738, abr. 1997.

MOVAHED, E. et al. Genome-Wide Transcription Study of *Cryptococcus neoformans* H99 Clinical Strain versus Environmental Strains. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0137457, 2015.

MÜLLER, M. Microdialysis in clinical drug delivery studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 2–3, p. 255–269, 15 dez. 2000.

MUR NIGHTINGALE. **Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice, Second Edition (Infectious Disease and Therapy)**. Disponível em: <<https://www.abebooks.com/9780824729257/Antimicrobial-Pharmacodynamics-Theory-Clinical-Practice-0824729250/plp>>. Acesso em: 25 maio. 2017.

NASRI, H. et al. Retrospective Study of Cryptococcal Meningitis With Elevated Minimum Inhibitory Concentration to Fluconazole in Immunocompromised Patients. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, 7 abr. 2016.

NAU, R.; SÖRGE, F.; EIFFERT, H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 858–883, out. 2010.

NEGRONI, R. et al. Treatment of experimental cryptococcosis with SCH 39304 and fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1460–1463, jul. 1991.

NEGRONI, R.; FINQUELIEVICH, J. L. Experimental subacute cryptococcosis in Wistar rats. **Medicina**, v. 47, n. 2, p. 133–138, 1987.

NIELSEN, E. I.; CARS, O.; FRIBERG, L. E. Predicting *In vitro* Antibacterial Efficacy across Experimental Designs with a Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1571–1579, 1 abr. 2011a.

NIELSEN, E. I.; CARS, O.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK-PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4619–4630, out. 2011b.

NIELSEN, E. I.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 1053–1090, jul. 2013.

NOLTING, A. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 91–96, jan. 1996.

NOTKINA, N.; DAHYOT-FIZELIER, C.; GUPTA, A. K. *In vivo* microdialysis in pharmacological studies of antibacterial agents in the brain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 109, n. 2, p. 155–160, ago. 2012.

NUNES, E. B. et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23–30, dez. 2011.

OTO ZAK, O. Z. **HANDBOOK OF ANIMAL MODELS OF INFECTION**. Disponível em: <[http://samples.sainsburysebooks.co.uk/9780080533551\\_sample\\_732782.pdf](http://samples.sainsburysebooks.co.uk/9780080533551_sample_732782.pdf)>. Acesso em: 16 mar. 2016.

OWEN J. S.,; JILL FIEDLER-KELLY. **Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models - Joel S. Owen, Jill Fiedler-Kelly**. Disponível em: <<http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470582294.html>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

OZCAN, S. K. et al. [Comparison of broth microdilution and E-test methods for the antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. strains isolated from blood cultures]. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 44, n. 2, p. 263–271, abr. 2010.

PAIVA M. G. A. Modelo PK-PD de Antimicrobianos: uma Revisão Conceitual. v. 193, 2011.

PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for Treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161–189, 15 jan. 2004.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 1 mar. 2009.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 20 fev. 2009.

PEMÁN, J. et al. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 2, p. 129–158, jun. 2006.

PEREIRA, D. G. The importance of metabolism in drug design. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, fev. 2007.

PEREIRA, G. H.; YAMAGUTTI, D. C. C.; MENDONÇA, J. S. DE. Evaluation of the histopathological hepatic lesions and opportunistic agents in Brazilian HIV patients. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 1–3, fev. 2010.

PERFECT, J. R. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1910–1913, ago. 1996.

PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 1 fev. 2010.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, *Cryptococcus*: model basidiomycetes and deadly pathogens. v. 78, p. 49–54, maio 2015.

PESSOA, C. C. B.; SILVA, S. H. M. DA; GOMES, F. S. Produção de fatores de virulência *in vitro* por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59–65, jun. 2012.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 51, n. 12, p. 705–718, dez. 2015.

PFALLER, M. A. et al. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, n. 3, p. 201–205, mar. 2004.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 252–259, nov. 2011.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter Evaluation of the New Vitek 2 Yeast Susceptibility Test Using New CLSI Clinical Breakpoints for Fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2126–2130, 1 jun. 2014.

PFALLER, M. A. et al. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 303–313, ago. 2015.

PIGATTO, M. C. et al. Population Pharmacokinetic Modeling of Etoposide Free Concentrations in Solid Tumor. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 7, p. 1657–1670, jul. 2016.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 892, p. 327–349, 2016.

RICARDO NEGRONI. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology, Systemic Mycoses**. v. 30, p. 599–609, dez. 2012.

RICHARDSON, K. et al. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12 Suppl 3, p. S267-271, abr. 1990.

RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, Supplement 4, p. 5–24, maio 2008.

ROUSE, W. **General Methodologies for Animal Models**. Disponível em: <<https://www.mysciencework.com/publication/show/general-methodologies-for-animal-models-chapter-2>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, nov. 2012.

SAR, B. et al. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 563–565, ago. 2004.

SCHADDELEE, M. P. et al. Population pharmacokinetic modeling of blood-brain barrier transport of synthetic adenosine A1 receptor agonists. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 3, p. 1138–1146, dez. 2004.

SCHMIDT, S. et al. PK-PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 549–556, out. 2008.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40–79, jan. 1999.

SIME, F. B.; ROBERTS, M. S.; ROBERTS, J. A. Optimization of dosing regimens and dosing in special populations. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 886–893, out. 2015.

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 169–182, 2014.

SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, dez. 2015.

SPRIET, I. et al. Pharmacokinetics of caspofungin and voriconazole in critically ill patients during extracorporeal membrane oxygenation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 767–770, 1 abr. 2009.

STRIPPOLI, V.; SIMONETTI, N.; CASSONE, A. Effect of a tetracycline antibiotic on the experimental pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 290–296, 1978.

SUDAN, A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluconazole for cryptococcal meningoencephalitis: implications for antifungal therapy and *in vitro* susceptibility breakpoints. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2793–2800, jun. 2013.

SY, S. K. B.; ZHUANG, L.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 93–114, 2016.

TASSO, L.; DE ANDRADE, C.; DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of the bactericidal activity of free lung concentrations of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 4, p. 307–313, out. 2011.

THEURETZBACHER, U.; IHLE, F.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 7, p. 649–663, 2006.

TORNØE, C. W. et al. Non-linear mixed-effects pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling in NLME using differential equations. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 76, n. 1, p. 31–40, 1 out. 2004.

TORRES, B. G. S. et al. Population Pharmacokinetic Modeling as a Tool to Characterize the Decrease in Ciprofloxacin free Interstitial Levels Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Wistar Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 maio 2017.

TRPKOVIĆ, A. et al. *In vitro* antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 3, p. 243–248, set. 2012.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1–11, mar. 2016.

VERHAEGEN, F.; SEUNTJENS, J. Monte Carlo modelling of external radiotherapy photon beams. **Physics in Medicine and Biology**, v. 48, n. 21, p. R107, 2003.

VERLINDO DE ARAUJO, B.; FARIAS DA SILVA, C.; COSTA, T. D. An alternative approach to determine oral bioavailability of drugs that follow Michaelis-Menten elimination: a case study with voriconazole. **Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 163–167, 2010.

VIDAL, J. E. et al. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–362, jun. 2013.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 835–846, jun. 2010.

WÄHLBY, U.; JONSSON, E. N.; KARLSSON, M. O. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 4, p. 68–79, 7 out. 2002.

WANG, T. et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Oral Voriconazole in Patients with Invasive Fungal Infections. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 9, p. 797–804, set. 2015.

WHO. **Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children**. Geneva: [s.n.].

XU, C.-Y. et al. Increased permeability of blood-brain barrier is mediated by serine protease during *Cryptococcus meningitis*. **The Journal of International Medical Research**, v. 42, n. 1, p. 85–92, fev. 2014.

YAMAMOTO, M. et al. Clinical characteristics and risk factors of non-*Candida* fungaemia. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 247, 2013.

YAMAOKA, H. et al. Intravascular granuloma induced by intravenous inoculation of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 133, n. 3, p. 149–158, 1996.

YANG, H.; WANG, Q.; ELMQUIST, W. F. Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using *in vivo* microdialysis. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 10, p. 1570–1575, out. 1996.

ZIMMERMANN, E. S.; TORRES, B. G. S.; DALLA COSTA, T. Validation of a sensitive HPLC/fluorescence method for assessment of ciprofloxacin levels in plasma and prostate microdialysate samples from rats. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 3, p. 330–336, 1 mar. 2016.

ZONIOS, D. I.; BENNETT, J. E. Update on azole antifungals. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 198–210, abr. 2008.



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 26605

**Título:**

Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica e avaliação da penetração cerebral de antifúngicos azólicos em animais sadios e com meningite induzida por *Cryptococcus neoformans*

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 24/03/2014

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - pesquisador desde 24/03/2014

GRAZIELA DE ARAÚJO LOCK - desde 24/03/2014

Izabel Almeida Alves - Aluno de Doutorado desde 24/03/2014

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 106 ratos Wistar machos adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Julho de 2014.

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO**

**Processo Nº: 26605**

**TÍTULO: - MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA E AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CEREBRAL DE ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM ANIMAIS SADIOS E COM MENINGITE INDUZIDA POR CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS**

**Pesquisador Responsável: BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO**

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto “**Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica e avaliação da penetração cerebral de antifúngicos azólicos em animais sadios e com meningite induzida por Cryptococcus neoformans**”, em reunião realizada em 15/08/2016 - Sala 330 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, autoriza para a utilização de 36 ratos Wistar, machos, pesando entre 150-250g, provenientes do CREAL – UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

**Porto Alegre, 29 de Agosto de 2016**

**Marcelo Meller Alievi**  
**Coordenadora da CEUA/UFRGS**