

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ANFOTERICINA B DEOXICOLATO EM INFUSÃO CONTÍNUA
PARA O TRATAMENTO DA MENINGOENCEFALITE
CRIPTOCÓCICA: ANÁLISE DE SEGURANÇA E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA**

DIEGO RODRIGUES FALCI

Orientador : Prof. Luciano Zubaran Goldani

Dissertação de Mestrado

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

ANFOTERICINA B DEOXICOLATO EM INFUSÃO CONTÍNUA PARA O
TRATAMENTO DA MENINGOENCEFALITE CRIPTOCÓCICA: ANÁLISE DE
SEGURANÇA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

DIEGO RODRIGUES FALCI

Orientador : Prof. Luciano Zubaran Goldani

Dissertação de Mestrado

2009

Ficha Catalográfica

F178a Falci, Diego Rodrigues

Anfotericina B deoxicolato em infusão contínua para o tratamento da meningoencefalite criptocócica : análise de segurança e atividade antifúngica / Diego Rodrigues Falci ; orient. Luciano Zubaran Goldani. – 2009.

69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Meningite criptocócica 2. Anfotericina B 3. Criptococose
4. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida I. Goldani, Luciano Zubaran II. Título.

NLM: WL 351

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

Aos meus pais, Sergio José Mabilde Falci e Angela Maria Rodrigues, que me proporcionaram a base para que eu pudesse trilhar este caminho. Pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu avô Francisco Pereira Rodrigues pelo apoio contínuo, e pelo exemplo de dedicação a vida acadêmica.

A todos os outros de minha querida família, que tenho certeza que torceram muito por mim.

A minha amada Karina de Castilhos, pelo amor que me inspirou em todos os momentos. Pela parceria, afeto e dedicação, principalmente nessa última etapa.

Aos meus amigos que compartilharam muitos dos momentos e reforçaram o apoio da família.

Ao meu orientador Professor Luciano Goldani, pela oportunidade, exemplo de competência e dedicação. Pela compreensão e paciência em todos os momentos.

Aos médicos residentes de infectologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela contribuição direta e fundamental na realização deste trabalho.

Aos colegas infectologistas Dimas Alexandre Kliemann e Sidnei Alves dos Santos Júnior, e ao amigo e colega Alberto Cezar Moreira Mariz Pinto. Pela amizade, parceria e contribuições relevantes ao trabalho.

Aos meus colegas, amigos e pacientes do Ambulatório de Infectologia de Sapucaia do Sul. Pelo apoio e por tudo que já construímos juntos.

Aos meus colegas do Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Pela parceria e amizade que formamos nesse último ano. Pela ajuda e estímulo.

Aos pacientes que consentiram em participar dessa pesquisa e desta forma contribuíram de forma fundamental para a realização da mesma.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS. Pela formação de excelência que recebi.

Ao Professor Alessandro Pasqualotto, pelas oportunidades, orientações e estímulo incansável a pesquisa científica. Pela amizade e parceria.

Aos demais professores da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Sumário

Agradecimentos	4
Sumário	5
Lista de Abreviaturas.....	6
Lista de Figuras.....	7
Resumo da dissertação.....	8
1. Introdução	10
2. Revisão da literatura	13
2.1 Anfotericina B	13
2.2 Mecanismo de ação.....	14
2.3 Farmacocinética e farmacodinâmica	14
2.4 Toxicidade	19
2.5 Anfotericina B deoxicolato em infusão contínua	21
2.6 Tratamento da criptococose	29
2.7 Medidas de desfecho microbiológico.....	32
3. Justificativa.....	33
4. Objetivos	35
5. Referências da Revisão da Literatura	36
6. Artigo 1. (Mycoses)	Erro! Indicador não definido.
7. Artigo 2 (Clinical Infectious Diseases)	Erro! Indicador não definido.
8. Considerações gerais	64
9. Anexos	67
9.1 Instrumento de coleta de dados. (Ficha de exames)	67
9.2 Termo de consentimento informado	68

Lista de Abreviaturas

%T/MIC – porcentagem do tempo acima da concentração inibitória mínima.

5-FC – flucitosina.

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida.

Amb-D – anfotericina B deoxicolato.

AUC – área sobre a curva.

CMax – concentração máxima de pico plasmático.

EC₅₀ – concentração 50% efetiva.

GFR – grau de filtração glomerular.

HIV – vírus da imunodeficiência humana.

IDSA – sociedade de infectologia dos Estados Unidos da América.

LCR – líquido cefalorraquidiano.

Log- logaritmo de base 10.

MIC – concentração inibitória mínima.

SNC- sistema nervoso central.

TARV – terapia antirretroviral de alta potência.

UFC – unidades formadoras de colônias de *Cryptococcus*.

Lista de Figuras

Figura 1. Farmacocinética da administração de um antimicrobiano em relação a concentração inibitória mínima (MIC). (Retirado de: Andes D. Clinical pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin N Am* 2003; 17:635-49; com permissão.) – Página 17

Figura 2. Modelo da fração ligada as proteínas (sombreado) e livre (bioativa) de concentrações séricas de anfotericina B após infusão de 4 horas (A) ou infusão contínua (B). As flechas significam ligação ou equilíbrio distributivo. RES – Sistema retículo-endotelial. (Retirado de Lewis RE, Wiederhold NP. The Solubility Ceiling: A Rationale for Continuous Infusion Amphotericin B Therapy?. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 871-2; com permissão.) – Página 22

Resumo da dissertação

Introdução: O aumento do número de hospedeiros imunocomprometidos tem provocado um aumento substancial na incidência de infecções fúngicas. A criptococose é uma micose sistêmica observada frequentemente em pacientes com HIV/AIDS. O pilar fundamental do tratamento ainda é a anfotericina B deoxicolato, que está associada a nefrotoxicidade e outros efeitos adversos importantes, tais como anemia. A redução na nefrotoxicidade observada com as formulações lipídicas de anfotericina B, explicada pela distribuição mais lenta da droga nos tecidos, oferece uma boa solução para os problemas de toxicidade, entretanto seus custos são proibitivos. A infusão contínua de anfotericina B foi estudada e mostrou-se segura no tratamento da neutropenia febril associada a neoplasias hematológicas. Esta estratégia de tratamento pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de infecções fúngicas como a criptococose. Nosso objetivo neste estudo é avaliar segurança e eficácia microbiológica da infusão contínua de anfotericina B deoxicolato no tratamento da meningoencefalite criptocócica.

Métodos: Ensaio clínico aberto, prospectivo, não-comparativo, incluindo pacientes com meningoencefalite criptocócica e AIDS. Os pacientes receberam infusão contínua de anfotericina B deoxicolato (0,7 mg/kg/dia) e flucitosina por via oral (25mg/kg quatro vezes ao dia), durante 14 dias. Foi mensurada a atividade antifúngica utilizando culturas quantitativas do líquido cefalorraquidiano obtido por punção lombar no pré-tratamento, e dias 3, 7 e 14 de tratamento.

Resultados: O estudo incluiu 10 pacientes. A mortalidade geral após 2 semanas de tratamento foi de 10 %. A análise micológica demonstrou uma redução progressiva nas unidades formadoras de colônias(UFC) no líquido cefalorraquidiano. Foi calculada a atividade antifúngica inicial utilizando o grau de redução nas contagens das unidades formadoras de colônias. Esta atividade foi de $-0,37 \pm 0,05$ log UFC/mL de líquido por dia. Embora dois pacientes tenham desenvolvido hipocalcemia, a função glomerular foi preservada em todos os pacientes, com níveis de creatinina abaixo de 1,5mg/dl no fim do tratamento. Anemia ocorreu em 5 pacientes, e os níveis médios de hemoglobina decresceram de 11,49 para 7,92 g/dL.

Conclusões: Os dados indicam que a infusão contínua parece ser segura e bem tolerada, mesmo com o aparecimento de anemia e hipocalcemia em alguns pacientes. A atividade antifúngica foi comparável ao padrão de tratamento, com redução adequada da carga fúngica da doença. Nossos resultados confirmam que a infusão contínua reduz a nefrotoxicidade, mantendo a atividade antifúngica. Estudos maiores e comparativos com as formulações lipídicas de anfotericina B e até mesmo com novos antifúngicos, são necessários para avaliação mais aprofundada deste inovador regime de tratamento.

1. Introdução

O aumento expressivo no número de pacientes com condições imunossupressoras observado nas últimas décadas tem ocasionado uma elevação correspondente na frequência de infecções fúngicas. A maior sobrevivência de pacientes com neoplasias, a realização de transplantes de órgãos sólidos e células da medula, o HIV/AIDS e o uso crônico de medicamentos imunossupressores são exemplos destas condições. A importância crescente das micoses sistêmicas neste contexto atenta para a necessidade de conhecimento maior sobre o diagnóstico e tratamento destas entidades (Eriksson, Seifert *et al.*, 2001).

O difícil diagnóstico e a mortalidade elevada associados às micoses sistêmicas acarretam na grande maioria das vezes na necessidade de tratamentos empíricos ou até profiláticos. A anfotericina B deoxicolato é, ainda hoje, o pilar fundamental da terapia anti-fúngica. Entretanto, existe considerável toxicidade associada ao seu uso, especialmente a nível renal (Eriksson, Seifert *et al.*, 2001; Deray, 2002; Uehara, Sa *et al.*, 2005).

A criptococose é uma micose sistêmica frequente em hospedeiros imunocomprometidos, especialmente indivíduos vivendo com HIV/AIDS. Em situações onde não há acesso a terapia anti-retroviral (TARV), constitui causa importante de mortalidade associada à infecção pelo HIV. Em nosso meio, mesmo com a disponibilidade de TARV, ainda é prevalente em pacientes com AIDS. De acordo com dados de uma revisão recente da literatura brasileira sobre criptococose, 6% dos casos de AIDS no Brasil foram notificados com o

diagnóstico de criptococose, embora a incidência de criptococose como doença definidora de AIDS tenha decrescido gradualmente nos últimos anos. Os estudos brasileiros revisados demonstraram mortalidade de 45-65%. Em um estudo na Tailândia com pacientes com meningoencefalite criptocócica, apresentação mais comum da criptococose disseminada, 43% dos pacientes morreram em uma média de 14 dias, mesmo com tratamento com doses convencionais de anfotericina B. Dois fatores explicam a alta mortalidade: a elevação da pressão intracraniana que ocorre freqüentemente na meningoencefalite criptocócica; e também os tratamentos antifúngicos com potência apenas moderada, que podem levar até duas semanas para esterilizar o líquido cefalorraquidiano (Pappalardo e Melhem, 2003; Brouwer, Rajanuwong *et al.*, 2004).

Os estudos que avaliaram o desfecho microbiológico dos diferentes tratamentos antifúngicos utilizaram a negatização das culturas como parâmetro para aferição da eficácia micrológica. Desta maneira, obtêm-se um resultado de sim/não ao longo do tempo e diferentes coletas de líquido cefalorraquidiano. Harrison desenvolveu uma técnica mais acurada de aferição de desfecho microbiológico para comparação de diferentes tratamentos anti-fúngicos. A utilização de culturas quantitativas mostrou-se um método poderoso de avaliação da resposta micológica ao tratamento da criptococose; a redução ou resolução da infecção foi associada a sobrevida, em um estudo recente (Brouwer, Rajanuwong *et al.*, 2004; Bicanic, Muzoora *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novos agentes, como as anfotericinas de formulações lipídicas, caspofungina (não ativa contra *Cryptococcus spp.*), e voriconazol, assim como outros derivados azólicos, promoveu alternativas a

anfotericina B para o tratamento anti-fúngico. Porém o alto custo destas novas drogas torna o seu uso proibitivo em um cenário de recursos limitados. Por exemplo, uma dose diária de 5 mg/kg de anfotericina lipossomal para um paciente de 70 kg é 22 vezes mais dispendiosa do que uma dose de 1 mg/kg de anfotericina B deoxicolato. Além disso, o benefício dessas alternativas, na maioria das situações, parece ser apenas em redução de toxicidade, traduzindo-se em uma melhora relativa dos desfechos clínicos, entretanto com eficácia microbiológica provavelmente comparável a anfotericina convencional. Entretanto, em algumas situações, como em pacientes com aspergilose, o benefício clínico das novas formulações lipídicas é inequívoco (Walsh, Finberg *et al.*, 1999; Herbrecht, Denning *et al.*, 2002; Spellberg, Witt *et al.*, 2004; Kleinberg, 2006; Cornely, Maertens *et al.*, 2007).

Embora seja uma droga com ampla experiência de uso e há bastante tempo disponível no mercado, ainda não há consenso sobre a forma ideal de administração da anfotericina B. Algumas estratégias têm sido utilizadas de maneira a tornar o seu uso menos tóxico. Buscamos nesta revisão descrever o conhecimento acumulado sobre esta molécula focando no seu uso em infusão contínua, surgindo como uma alternativa para redução de toxicidade e justificando a sua experimentação no tratamento da criptococose. Abordaremos ainda, o estado de arte do tratamento da criptococose e o uso de culturas quantitativas para aferição da resposta microbiológica (Andes, 2006).

2. Revisão da literatura

2.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico polieno que foi isolado pela primeira vez em 1959 de culturas de *Streptomyces nodosus*. A cepa foi coletada em 1955 no delta do rio Orinoco, na Venezuela. Ainda hoje a substância é extraída das culturas em escala industrial. É considerado um antimicótico polieno não-aromático (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005).

Todos os polienos são caracterizados pela baixa solubilidade. Essa baixa solubilidade explica porque existe pouca ou nenhuma absorção gastrointestinal de anfotericina e portanto baixíssima biodisponibilidade quando é administrado por via oral. Logo a droga é, via de regra, administrada por via intravenosa, misturada com um agente solubilizante tal como o deoxicolato de sódio. A combinação anfotericina B + deoxicolato de sódio é a formulação mais utilizada na prática clínica, especialmente em países em desenvolvimento (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005).

A anfotericina B é geralmente utilizada para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e invasivas, tais como as causadas pelas espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, e *Cryptococcus*. Além de ser indispensável para o tratamento das infecções fúngicas, é também a droga de segunda linha mais importante para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005).

2.2 Mecanismo de ação

Esteróis são componentes essenciais das membranas biológicas e são responsáveis pela fluidez da membrana. Nas células de mamíferos, o colesterol é o esteroide predominante, enquanto que em fungos, amebas e protozoários do gênero *Leishmania*, é o ergosterol. A estrutura poliênica da anfotericina B permite a mesma formar complexos com os esteróis, causando a formação de poros na membrana celular. Nesse contexto, a anfotericina B favorece fortemente o ergosterol em relação ao colesterol. A cadeia poliênica interage através das forças de Van der Waals com a molécula de colesterol ou ergosterol e os fosfolípidos da membrana. Devido a formação de poros na membrana, o alvo perde sua integridade celular, o que pode ser monitorado pelo efluxo rápido de íons, principalmente potássio (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005).

2.3 Farmacocinética e farmacodinâmica

Como já mencionado, a absorção gastrointestinal de anfotericina B é mínima. Dados detalhados do metabolismo da anfotericina B ainda não são totalmente conhecidos. Existe alta ligação às proteínas plasmáticas; aproximadamente 20-30% da anfotericina B é removida do sangue no fígado e excretada com a bile nas fezes. Cerca de 2-5% da anfotericina B encontrada na urina não foi metabolizada e permanece biologicamente ativa (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005). Bekersky e colaboradores constataram que até dois terços da anfotericina B deoxicolato são excretados inalterados na urina (20,6%) e fezes (42,5%), sugerindo que o metabolismo tem na maior parte do tempo um papel menos importante na eliminação da droga (Bekersky, Fielding

et al., 2002). Quando a anfotericina B deoxicolato é administrada e entra na corrente sanguínea, o deoxicolato separa-se da anfotericina B, e 95% desta última liga-se às proteínas plasmáticas. A maior parte do fármaco deixa a circulação sistêmica e é deslocada para o fígado e outros órgãos. As concentrações de anfotericina B em áreas inflamadas, tais como peritônio, pleura e articulações são aproximadamente dois terços do nível sérico de vale. A anfotericina B penetra pobremente nas meninges em seu estado normal ou com inflamação, como também no cérebro, saliva, secreções brônquicas, humor vítreo, líquido amniótico, músculo e ossos (Bindschadler e Bennett, 1969).

O objetivo farmacocinético de qualquer tratamento antifúngico é de atingir concentrações terapêuticas no sítio da infecção. Desta forma, devemos considerar além do medicamento, qual o fungo que está causando a infecção e aonde está localizada ou compartimentalizada. A maioria dos fungos patogênicos encontra-se no meio extracelular; logo a concentração sérica seria um marcador confiável para terapêutica adequada. Entretanto, em infecções compartimentalizadas como as do sistema nervoso central, tais como a meningoencefalite criptocócica, a concentração no parênquima cerebral pode ser mais importante. Estudos em animais demonstraram a penetração equiparável no parênquima cerebral de diversas formulações de anfotericina B (Groll, Giri *et al.*, 2000; Andes, 2006). De fato, os tratamentos com anfotericina B deoxicolato (1 mg/kg/dia) ou anfotericina B lipossomal (5 mg/kg/dia) proporcionaram as maiores concentrações de pico plasmático (C_{Max}) e área sobre a curva (AUC). A anfotericina B deoxicolato e a anfotericina lipossomal

apresentaram maior eficácia antifúngica. Esta atividade foi concentração e tempo dependente (Groll, Giri *et al.*, 2000).

A farmacodinâmica estabelece a relação entre farmacocinética e desfecho. No contexto de antimicrobianos, considera-se a relação entre a exposição a droga e uma medida de sua potência *in vitro* ou concentração inibitória mínima (MIC). Desta forma, temos três parâmetros de fundamental interesse para a descrição desta relação, sendo estes: a concentração sérica máxima sobre o MIC (C_{Max}/MIC), a área sobre a curva sobre o MIC - área de 24 horas sobre a curva de concentração sérica - (AUC/MIC), e o tempo em que a concentração da droga excede o MIC, expresso como uma porcentagem do tempo (%T/MIC) (Figura 1). O conhecimento de qual destes três parâmetros descreve melhor a atividade anti-fúngica de uma droga fornece a base para determinar-se a frequência na qual a mesma pode ser mais eficientemente administrada. Por exemplo, se C_{Max}/MIC correlaciona-se fortemente com a atividade da droga A, a posologia mais adequada seria doses altas e mais espaçadas (agente concentração-dependente). Por outro lado, se %T/MIC descreve mais adequadamente a atividade de uma droga, esta necessitaria de doses menores e mais freqüentes - ou até uma administração contínua - para prolongar o período de tempo em que o nível sérico da droga está acima do MIC (agente tempo-dependente) (Andes, 2006).

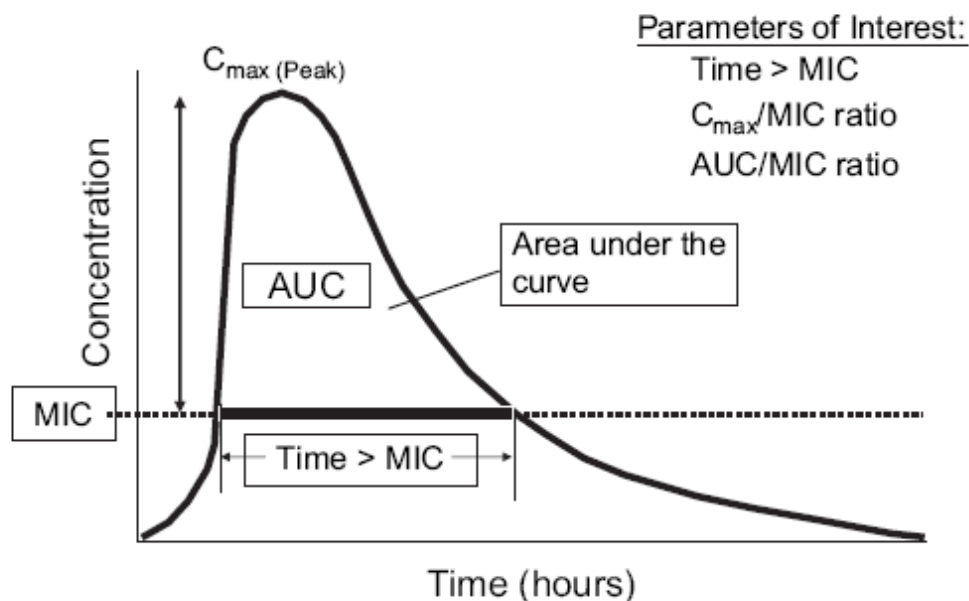


Figura 1. Farmacocinética da administração de um antimicrobiano em relação a concentração inibitória mínima (MIC). (Retirado de: Andes D. Clinical pharmacodynamics of antifungals. Infect Dis Clin N Am 2003; 17:635-49; com permissão.)

Os antifúngicos não são divididos facilmente entre agentes tempo ou concentração-dependentes. Os estudos existentes classificam os polienos – anfotericina B – como compostos concentração-dependentes. Entretanto há resultados conflitantes nestes estudos, como por exemplo a observação de ação antifúngica similar às primeiras horas e persistente após 24 horas de administração, o que pode refletir *in vivo* a difusão lenta nos tecidos destes compostos. Além disso, em um estudo recente avaliando a distribuição no SNC de anfotericina B nas suas diferentes formulações, em modelos animais, a erradicação fúngica foi associada com parâmetros concentração-dependente (CMax/MIC) como também tempo dependente(%T>MIC), e os autores concluíram que a atividade antifúngica foi tempo e concentração-dependente (Groll, Giri *et al.*, 2000; De Rosa, Bargiacchi *et al.*, 2006). Embora esteja

estabelecido que a anfotericina B claramente tem atividade concentração-dependente, existe provavelmente um efeito de teto da fração livre (bioativa) da droga, baseado na ligação às proteínas plasmáticas e solubilidade, o que poderia variar de acordo com o sítio da infecção em órgãos como os rins, pulmões, fígado e cérebro (Lewis e Wiederhold, 2003). Todas estas considerações levam em conta somente a erradicação microbiológica. Entretanto, tratando-se de uma droga como a anfotericina B, com importante toxicidade associada como revisaremos a seguir, é importante valorizarmos a importância do parâmetro %T/MIC no tratamento para sustentarmos a viabilidade da administração de anfotericina B em infusão contínua, uma estratégia que poderia reduzir efeitos adversos. Mesmo após 40 anos de uso clínico, o regime posológico da anfotericina B ainda não está completamente definido, sendo indicado pelo fabricante a infusão diária de 2 a 6 horas.

Estudos de farmacodinâmica mostraram que a anfotericina B exibe atividade espécie-específica e concentração-dependente com um efeito teto da fração bioativa da droga, com concentrações 50% efetivas (EC_{50}) variando de 0,10 a 0,12 $\mu\text{g/ml}$ para *A.fumigatus*, 0,36 a 0,53 $\mu\text{g/ml}$ para *A.terreus*, 0,27 a ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ para *F.solani*, 0,41 a 0,55 $\mu\text{g/ml}$ para *F.oxysporum*, e 0,97 e 0,65 para *S.apiospermum* e *S.prolificans*, respectivamente (Lewis, Wiederhold *et al.*, 2005; Wiederhold, Tam *et al.*, 2006). Em relação a *Candida albicans*, atividade otimizada similar de anfotericina B pode ser atingida maximizando a relação concentração de pico sobre concentração inibitória mínima ($C_{\text{Max}}/\text{MIC}$) (Burgess, Hastings *et al.*, 2000; Andes, Stamsted *et al.*, 2001).

2.4 Toxicidade

A toxicidade da anfotericina B pode ser dividida em efeitos agudos (reações agudas infusionais) e sub-agudos (nefrotoxicidade). Reações agudas infusionais são caracterizadas por sintomas como calafrios, febre, náuseas e vômitos, cefaléia, hipotensão, taquicardia e dispnéia, que ocorrem durante a administração de anfotericina B deoxicolato. Tais reações freqüentemente requerem atenção médica e uso de medicamentos, tais como dexclorfeniramina ou meperidina. Já foram descritos casos de arritmias cardíacas severas durante a administração de anfotericina B (Ellis, Al-Hokail *et al.*, 1992; Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005).

A incidência de nefrotoxicidade pode chegar a níveis entre 49% e 65%; podendo chegar a perda significativa da função renal, com necessidade de diálise. O uso de outras drogas nefrotóxicas com AmB-d e a diálise como consequência da perda de função renal foram claramente associados com mortalidade (Deray, 2002).

A fisiopatologia da nefrotoxicidade envolve dois mecanismos: vasoconstrição severa, diminuindo o fluxo sanguíneo renal e conseqüentemente o grau de filtração glomerular (GFR); e uma interação direta da Amb-D com as membranas das células epiteliais do rim, causando disfunção tubular. Esses dois mecanismos conjuntamente determinam a perda de função renal (Deray, 2002). Os dois mecanismos interagem em um *feedback* tubuloglomerular, no qual a concentração baixa de sódio na mácula densa, causada pela disfunção tubular proximal, aumenta a vasoconstrição aferente, reduzindo ainda mais o fluxo sanguíneo renal (Berdichevski, Luis *et al.*, 2006).

Fatores de risco em potencial para nefrotoxicidade da AmB-d incluem: a dose diária de AmB-d recebida pelo paciente; desidratação; dose cumulativa; função renal anormal no início do tratamento; drogas nefrotóxicas utilizadas concomitantemente; e categoria de risco do paciente. Para a detecção da nefrotoxicidade, é necessária a vigilância clínica para seus sinais, tais como a disfunção tubular e insuficiência renal. A hipocalcemia, causada por disfunção tubular direta causada pela droga, é uma complicação freqüente da terapia com anfotericina B deoxicolato, que pode levar a necessidade de suplementação diária de potássio para a manutenção dos níveis séricos deste íon. Em uma parcela significativa dos pacientes, AmB-d induzirá as seguintes alterações: hipomagnesemia, acidose tubular renal e poliúria. Na azotemia causada pela AmB-d caracteriza-se o aumento progressivo da creatinina sérica. É usualmente reversível com a suspensão da droga; no entanto, em doses cumulativas maiores (acima de 4g), podendo ser irreversível. Um aumento de mais de 25% na creatinina sérica deve ser considerado como sinal de nefrotoxicidade (Deray, 2002).

Estão descritos ainda como efeitos adversos as ocorrências de anemia, neutropenia, plaquetopenia e alterações de provas de função hepática. A anemia pode decorrer da supressão da produção de eritropoetina, e usualmente é normocítica e normocrômica. Embora esses efeitos secundários possam ser freqüentes, especialmente anemia, não costumam acarretar em morbidade ou mortalidade significativa (Lemke, Kiderlen *et al.*, 2005; Bicanic, Wood *et al.*, 2008).

2.5 Anfotericina B deoxicolato em infusão contínua

Tendo em vista o alto custo das anfotericinas lipídicas, têm-se procurado estratégias que permitam o uso da anfotericina B deoxicolato com menor toxicidade. Partindo do racional farmacocinético de que infusões de 4 horas resultam em uma ligação maior as proteínas plasmáticas, e níveis séricos mais elevados do que infusões de 24 horas, com maior e mais rápida distribuição de anfotericina B nos tecidos e conseqüentemente maior nefrotoxicidade, a infusão contínua (24 horas) de anfotericina B surge como uma estratégia promissora para tentar diminuir a nefrotoxicidade associada, como ilustrado na figura retirada do trabalho de Lewis (figura 2). Também a concepção da importância dos dois parâmetros (C_{max}/MIC e $\%T/MIC$) em conjunto, para a erradicação microbiológica, assegura a possibilidade e viabilidade do uso desta estratégia. A redução da toxicidade parece, pelo menos em parte, depender de uma liberação mais lenta de anfotericina B aos tecidos (Lewis e Wiederhold, 2003).

A infusão contínua de anfotericina B deoxicolato apresentaria algumas limitações que devem ser consideradas quando da avaliação desta estratégia. Existe a necessidade de um acesso venoso exclusivo, preferencialmente central, para a infusão da droga, através de uma bomba de infusão. Agrega-se aí o risco de complicações infecciosas e mecânicas advindas deste dispositivo. Evidentemente, o risco existente a mais, comparado à estratégia convencional é mínimo, visto que na grande maioria das vezes anfotericina B deoxicolato já é administrada por acesso venoso central. O custo baixo de uma bomba de infusão e a não-possibilidade de compartilhamento deste acesso com a administração de outras drogas, assim como a necessidade do paciente ficar

ligado a bomba durante as 24 horas do dia (lembrando que muitos pacientes apresentam doença grave e são restritos ao leito) acabam por ser as únicas limitações adicionais da infusão contínua de anfotericina B deoxicolato.

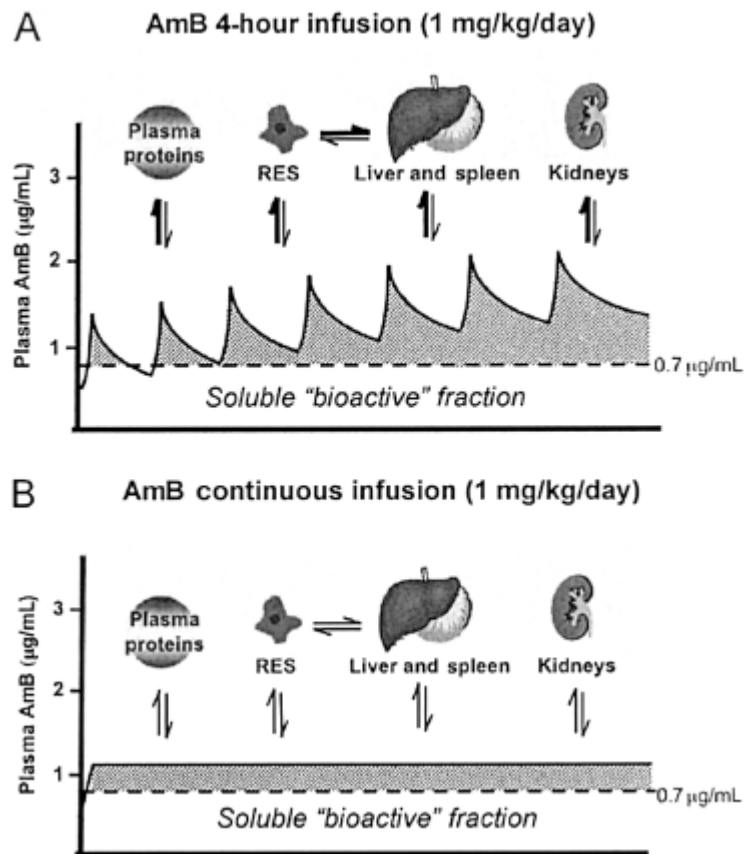


Figura 2. Modelo da fração ligada as proteínas (sombreado) e livre (bioativa) de concentrações séricas de anfotericina B após infusão de 4 horas (A) ou infusão contínua (B). As flechas significam ligação ou equilíbrio distributivo. RES – Sistema retículo-endotelial.

Chabot e colaboradores avaliaram o uso de infusão contínua de anfotericina B deoxicolato na modulação bioquímica de agentes antineoplásicos em pacientes com carcinomas avançados. Níveis terapêuticos de anfotericina foram rapidamente alcançados e mantidos durante a infusão, com redução de toxicidade aguda relacionada a infusão mais rápida. Entretanto, a modulação dos agentes antineoplásicos pela infusão contínua de

anfotericina B deoxicolato não foi demonstrada clinicamente(Chabot, Pazdur *et al.*, 1989).

Eriksson e colaboradores desenvolveram um ensaio clínico randomizado comparando a infusão de anfotericina B deoxicolato de 4 horas (convencional) *versus* a infusão de 24 horas (infusão contínua). Foram arrolados 86 pacientes com indicação de uso de anfotericina B, a maioria deles neutropênicos com neoplasias hematológicas. O estudo incluiu e definiu pacientes com febre persistente, infecção fúngica possível, infecção fúngica provável e infecção fúngica comprovada; estes foram distribuídos igualmente conforme esta classificação nos dois grupos de tratamento. Entre os pacientes com infecção fúngica comprovada, incluíram-se pacientes com criptococose (1), aspergilose (4), *Rhizopus* pulmonar, e aspergilose pulmonar angioinvasiva (3) (Eriksson, Seifert *et al.*, 2001).

Encontrou-se diferença significativa em relação as reações agudas infusionais, tendo estas ocorrido em maior número nos pacientes que receberam a infusão de 4 horas. Os pacientes que receberam infusão contínua necessitaram menor número de medicações contra essas reações, tais como febre ou calafrios. Em relação a nefrotoxicidade, observou-se maior aumento significativo na concentração de creatinina sérica no grupo que recebeu a infusão de 4 horas. Não houve diferenças em relação a hipocalemia ou hipomagnesemia (Eriksson, Seifert *et al.*, 2001).

A mortalidade foi maior no grupo que recebeu a infusão de 4 horas, tendo todas as sete mortes reportadas ocorrido neste grupo. Embora um número maior de pacientes com infecção fúngica comprovada tenha sido

incluído no grupo que recebeu infusão contínua, ocorreram três mortes por infecções fúngicas detectadas na necropsia no grupo com infusão rápida e nenhuma no grupo com infusão contínua. Fungemia de escape não ocorreu em nenhum dos grupos. Os dados relativos a eficácia neste trabalho suportam a noção de que uma infusão contínua de anfotericina B seja pelo menos tão efetiva, em pacientes com neutropenia febril, quanto as infusões diárias de 4 horas. A redução nas reações agudas infusionais pôde ser explicada pela indução ou liberação mais demorada dos mediadores inflamatórios, tais como proteína C reativa, quando da infusão contínua de anfotericina B, tendo sido comparável à redução observada nos ensaios com as formulações lipídicas. Comparando a razão de creatinina de pico sobre a creatinina na visita de início de estudo, durante e ao final do tratamento, os autores observaram uma razão maior no grupo da infusão rápida. Esta redução marcada na nefrotoxicidade observada também é comparável a observada nos pacientes tratados com anfotericina B lipossomal. Como não foi observada diferença na hipocalcemia, também de maneira semelhante aos estudos com *Ambisome* (formulação lipossomal de anfotericina B), a infusão contínua de anfotericina B parece reduzir principalmente a toxicidade renal pré-tubular (Eriksson, Seifert *et al.*, 2001).

Em um estudo observacional, realizado na Faculdade de Medicina do ABC – São Paulo, analisaram-se retrospectivamente dados de 12 pacientes com neutropenia febril necessitando terapêutica antifúngica e que receberam infusão contínua de anfotericina B deoxicolato. Somente três desses pacientes apresentaram infecção fúngica comprovada. Não houve nenhuma morte no período de 7 dias analisado a partir do início da administração de anfotericina

B. A redução na nefrotoxicidade foi semelhante a observada nos estudos de Eriksson, tendo 30,76% dos pacientes apresentado aumento de creatinina 1.5 vezes superior ao da visita do início do estudo – também comparável ao estudo de Walsh com anfotericina lipossomal (29,40%). A hipocalcemia e hepatotoxicidade foram eventos adversos freqüentes como também era esperado e relatado nos outros estudos (Walsh, Finberg *et al.*, 1999). Todos os pacientes sobreviveram por pelo menos sete dias após início do tratamento com infusão contínua de anfotericina B deoxicolato, e resolução clínica ocorreu em 76% dos pacientes. Os autores concluíram que a anfotericina B em infusão contínua foi efetiva nestes pacientes com neutropenia febril; embora as limitações do estudo sejam evidentes (retrospectivo, pequeno número de pacientes) , os resultados são interessantes e encorajadores para a realização de novos ensaios clínicos (Uehara, Sa *et al.*, 2005).

Em pacientes submetidos a transplante pulmonar, Speich e colaboradores desenvolveram um estudo piloto, utilizando anfotericina B deoxicolato em infusão contínua. Foram arrolados neste pequeno trabalho seis pacientes, com infecção fúngica comprovada; novamente os resultados foram satisfatórios, tendo sido erradicada a infecção fúngica em 5 dos 6 pacientes, e a droga foi bem tolerada com ocorrência de nefrotoxicidade em 1 paciente (16%). Esses resultados também indicam que a infusão contínua oferece uma possibilidade real de reduzir a nefrotoxicidade associada a anfotericina B, com custos adicionais mínimos, especialmente no contexto de uso concomitante de drogas nefrotóxicas, já que todos os pacientes do estudo utilizavam agentes imunossupressores comprovadamente nefrotóxicos como a ciclosporina A (Fluckiger, 2002; Furrer, Schaffner *et al.*, 2002; Speich, Dutly *et al.*, 2002).

No estudo de Peleg e colaboradores, analisaram-se os dados de uma coorte retrospectiva comparando-se a infusão de anfotericina B em 4 horas com a infusão contínua de 24 horas. Os pacientes eram portadores de neoplasias hematológicas com necessidade de terapia anti-fúngica; foram divididos em pacientes com infecção fúngica possível, provável ou comprovada. Foi utilizada a dose de 0,6mg/kg nos pacientes com neutropenia febril e 1mg/kg nos pacientes com suspeita de ou aspergilose confirmada. Foi realizada troca para anfotericina lipossomal em pacientes que dobraram a creatinina durante o tratamento ou quando a creatinina na visita de início do estudo era superior a 1,4 mg/dL (Peleg e Woods, 2004).

O desfecho primário deste trabalho era a nefrotoxicidade, que foi definida também como a ocorrência de um aumento de 2 vezes a creatinina da visita de início do estudo. Foram também analisados como desfechos secundários a mortalidade em 14 dias, ausência de infecções fúngicas de escape durante o tratamento, como também a resolução de infecções fúngicas comprovadas. Um total de 77 pacientes foram incluídos para análise. A média de aumento na creatinina, a média da fração pico de creatinina durante o tratamento sobre creatinina na visita de início de estudo, como também a redução da depuração da creatinina, foram significativamente menores no grupo que utilizou anfotericina B em infusão contínua de 24 horas. O comprometimento da função renal foi significativamente menor no grupo que recebeu infusão contínua de anfotericina B deoxicolato comparado ao grupo que recebeu infusão em 4 horas (10% versus 45%, respectivamente, razão de chances 0,14 – intervalo de confiança de 95% 0,04 a 0,5 valor $p < 0,001$). Os autores identificaram uma velocidade de infusão alvo ideal, associada com

menor nefrotoxicidade, menor do que 0,08 mg/kg/h. A análise dos subgrupos de pacientes que foram submetidos a transplantes de medula, assim como nos que utilizaram concomitantemente drogas nefrotóxicas, também demonstrou uma redução na toxicidade renal com a infusão contínua, mantendo a significância estatística observada na análise global. A mortalidade também foi significativamente diferente nos dois grupos (sobrevivência em 14 dias: 95% - infusão contínua e 79% na infusão de 4h, $p=0,03$), embora não esteja diretamente relacionada a infecção fúngica. Não houve diferença na fungemia de escape entre os dois grupos (Peleg e Woods, 2004).

O estudo de Peleg traz evidência suficiente para dar suporte a conclusão de que a administração de anfotericina B em infusão contínua é menos nefrotóxica do que a infusão convencional em 4 horas, em pacientes hematológicos. Foi o primeiro estudo a analisar dados de pacientes submetidos a transplantes de medula, que freqüentemente fazem uso de outras drogas nefrotóxicas e toleram mal o acometimento da função renal. A redução na nefrotoxicidade é clinicamente relevante, já que a nefrotoxicidade traduz-se em aumento na mortalidade, no tempo de hospitalização e nos custos hospitalares, como já documentado na literatura. Os dados deste trabalho demonstraram que pacientes que utilizaram a infusão contínua apresentaram uma chance 6 vezes menor de desenvolver nefrotoxicidade. Esses dados, juntamente com o custo reduzido da anfotericina B deoxicolato, sugerem um potencial farmacoeconômico relevante, considerando a infusão contínua como uma alternativa viável e de benefício comparável às formulações lipídicas de anfotericina de elevado custo. A análise secundária de eficácia também como no estudo de Eriksson revelou uma mortalidade menor no grupo da infusão

contínua, embora o estudo não tenha sido delineado para este tipo de conclusão (Peleg e Woods, 2004).

Avaliou-se o uso de anfotericina B em infusão contínua em conjunto com ciclosporina A, em pacientes submetidos a transplante alogênico de células da medula, em um estudo retrospectivo conduzido por Furrer e colaboradores (Furrer, Schaffner *et al.*, 2002). Os autores concluíram que o uso de anfotericina B em infusão contínua foi seguro, em pacientes recebendo outras drogas nefrotóxicas, assim como em outros estudos (Ellis, Al-Hokail *et al.*, 1992; Barrett, Vardulaki *et al.*, 2003). Destaca-se as limitações do estudo, retrospectivo e com número reduzido de pacientes analisados.

Um contraponto às evidências de benefício da infusão contínua de anfotericina B é o trabalho de Altmannsberger. Os autores descrevem a experiência com anfotericina B, analisando retrospectivamente duas coortes de pacientes, uma utilizando a infusão em 6 horas e outra com a infusão contínua de 24 horas. Não foram observadas diferenças em relação a nefrotoxicidade entre os grupos. A mortalidade em 4 semanas também foi similar entre os dois braços de tratamento. Concluiu-se neste trabalho que, embora seja factível a administração de anfotericina B em infusão contínua, esta não apresentou vantagens ou benefícios em comparação a infusão convencional, sugerindo-se que este benefício somente seria alcançado com o uso das formulações lipídicas de anfotericina B (Altmannsberger, Holler *et al.*, 2007).

Schulenburg *et al.* publicaram um relato de um estudo aberto, prospectivo de 17 pacientes com neutropenia febril, com neoplasias hematológicas. Utilizou-se anfotericina B em infusão contínua, e foram

comparados os dados com um grupo de controles históricos de 10 pacientes. A infusão contínua de anfotericina B resultou em menos reações agudas infusionais, menos hipocalcemia e menor nefrotoxicidade do que os controles com infusão rápida de anfotericina. Não houve diferença na análise de eficácia (mortalidade e resolução da febre). Novamente, a conclusão foi de que a infusão contínua de anfotericina B é segura, praticável, e efetiva nesta população de pacientes (Schulenburg, Sperr *et al.*, 2005).

2.6 Tratamento da criptococose

O tratamento da criptococose ainda hoje representa um desafio para os especialistas em doenças infecciosas. O balanço entre eficácia e segurança é fundamental, visto que o tratamento de escolha está associado a toxicidade importante, e a eficácia microbiológica é crucial para o controle da infecção e desfecho clínico favorável.

Ainda antes do advento da pandemia de HIV/AIDS, o *Mycoses Study Group* já havia estudado a criptococose e avaliado a possibilidade de uso de doses menores de anfotericina B para tratamento. Os estudos iniciais que apresentavam relevantes limitações, estabeleceram doses reduzidas de anfotericina B combinado com flucitosina para o tratamento da criptococose. Entretanto, após o início da criptococose relacionada a AIDS, logo observou-se que essas doses reduzidas eram inapropriadas para o tratamento da criptococose disseminada associada a imunodepressão (Powderly, 2008).

A terapia para criptococose, conforme preconizado pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) ainda inclui a anfotericina B deoxicolato (AmB-d), tradicionalmente administrada em infusões intravenosas diárias de 4 horas (0,7 mg/kg/dia) como pilar fundamental do tratamento

antifúngico. Deve ser associada a flucitosina(5-FC) por via oral, e após a indução do tratamento (fase inicial) que deve durar pelo menos 14 dias, pode-se passar para terapia de manutenção com fluconazol isoladamente (Saag, Graybill *et al.*, 2000). Essas recomendações são embasadas principalmente por um ensaio clínico que envolveu 381 pacientes que utilizaram a dose acima mencionada de anfotericina, associado ao uso oral de flucitosina (Van Der Horst, Saag *et al.*, 1997). O conceito de indução com anfotericina B deoxicolato mais flucitosina por 14 dias, com posterior conversão para fluconazol para manutenção tem sido o padrão ouro de tratamento.

Dados *in vivo* e *in vitro* sugerem que a flucitosina tem um efeito pelo menos aditivo, se não sinérgico, quando associada a anfotericina B. A adição de flucitosina em dose reduzida (100 mg por kg por dia) à anfotericina B no tratamento inicial da criptococose, nos primeiros 14 dias, foi associada com melhor desfecho clínico e negatização mais precoce das culturas de líquido cefalorraquidiano, quando comparada ao tratamento com somente anfotericina B (Van Der Horst, Saag *et al.*, 1997).

Outras modalidades de tratamento, incluindo combinações de anfotericina B, flucitosina e fluconazol(ou itraconazol), ou anfotericina e rifampicina, não demonstraram benefício maior do que o padrão estabelecido de tratamento. Tratamentos com somente azólicos e flucitosina demonstraram eficácia inferior (Chotmongkol e Jitpimolmard, 1995; Saag, Graybill *et al.*, 2000; Chotmongkol e Methawasin, 2001; Brouwer, Rajanuwong *et al.*, 2004; Chotmongkol, Arayawichanont *et al.*, 2005).

Estudo recente avaliou a possibilidade de utilização de doses maiores de anfotericina B, associado a flucitosina na dose convencional. Partindo do

pressuposto que uma dose de 1 mg/kg/dia de anfotericina poderia proporcionar uma atividade antifúngica mais potente e uma resolução mais rápida da infecção (Brouwer, Rajanuwong *et al.*, 2004). Bicanic e colaboradores avaliaram o uso desta dose (1 mg/kg/dia), comparada a dose usual de 0,7 mg/kg/dia, em 64 pacientes na África do Sul. Foi demonstrada, através de culturas quantitativas, uma melhor resposta micológica do tratamento com a dose mais elevada (Bicanic, Wood *et al.*, 2008). Observou-se como esperado um aumento na toxicidade, o que é ressaltado em um comentário sobre esse artigo, que destacou a nefrotoxicidade e a anemia como efeitos adversos importantes acentuados pelo aumento da dose (Pasqualotto, 2008).

Desta forma, permanece em aberto a possibilidade de novas estratégias de tratamento da criptococose, considerando a mortalidade ainda relativamente alta com o padrão de tratamento atual, assim como a eficácia microbiológica moderada e elevada toxicidade associada. O progresso nesta área têm sido de certa forma aquém do esperado, pela diminuição expressiva dos casos de criptococose associado a AIDS (conseqüência da ampliação do acesso a terapia antirretroviral), assim como pela dificuldade de se conduzir um ensaio clínico em locais onde a criptococose ainda é muito prevalente. Por exemplo, a situação vivenciada na África, onde a dificuldade de acesso a terapia antirretroviral ocasiona uma elevada incidência de doenças oportunistas, incluindo criptococose; nesses locais a realização de pesquisa clínica e até mesmo o acesso de pacientes ao sistema de saúde é muito difícil.

2.7 Medidas de desfecho microbiológico

Como já mencionado previamente, os estudos que avaliaram o desfecho microbiológico dos diferentes tratamentos antifúngicos, utilizaram a negatização das culturas como parâmetro para aferição da eficácia micológica. A simples dualidade (sim/não) é um parâmetro insuficiente para avaliação da resposta ao longo do tempo. O grupo de Harrison e demais colaboradores desenvolveu uma técnica mais acurada de aferição de desfecho microbiológico para comparação de diferentes tratamentos anti-fúngicos. Em um trabalho desenvolvido com pacientes arrolados na Tailândia, comparou-se o efeito microbiológico de tratamentos com anfotericina B deoxicolato isolada, associada a flucitosina, associada a fluconazol ou ainda associada a fluconazol e flucitosina, em pacientes com meningoencefalite criptocócica e AIDS (Brouwer, Rajanuwong *et al.*, 2004).

O LCR obtido dos pacientes com meningoencefalite criptocócica foi diluído progressivamente, e em cada diluição semeado em placas de ágar de *Sabouraud*. Através da contagem das colônias nas placas, pode-se obter o número de unidades formadoras de colônias de *Cryptococcus*(UFC). Valor inicial elevado de UFC (em log) foi associado independentemente com mortalidade. Com a obtenção de líquido e contagem de UFC nos diferentes dias de tratamento, obtém-se uma curva de redução das UFC em cada grupo de tratamento. A curva de redução de UFC(log) mais expressiva foi observada com o tratamento com AmB-d associado a flucitosina. A quantificação do efeito micológico das drogas anti-fúngicas através da mensuração da UFC permite uma comparação acurada da atividade de regimes de tratamento diferentes,

especialmente em subgrupos de pacientes, como pacientes com HIV/AIDS (Brouwer, Rajanu Wong *et al.*, 2004).

Outros trabalhos, já mencionados, também utilizaram a contagem de UFC como medida de desfecho microbiológico. A contagem de UFC foi correlacionada com o título de antígeno criptocócico na avaliação inicial (pré-tratamento), mas esta correlação se perde ao longo dos dias de terapia (Brouwer, Teparrukkul *et al.*, 2005). Em um estudo de coorte que envolveu 272 pacientes, evidenciou-se a importância das culturas quantitativas como aferição da resposta microbiológica. Valores mais elevados de UFC e uma redução menor de UFC por dia de tratamento foram associados independentemente com mortalidade (Bicanic, Muzoora *et al.*, 2009).

3. Justificativa

Os dados existentes até o momento apontam que uso o da anfotericina B deoxicolato em infusão contínua é seguro e efetivo no contexto de pacientes hematológicos com neutropenia febril. De um modo geral os estudos retrospectivos, e os resultados dos ensaios clínicos disponíveis sugerem uma efetividade clínica e microbiológica similar ao padrão de tratamento com anfotericina B deoxicolato. O benefício alcançado na redução da nefrotoxicidade é claro e comparável ao relatado com o uso de formulações lipídicas de anfotericina B. Entretanto, um grande número de pacientes arrolados nos estudos não apresentou comprovação da infecção fúngica, pela dificuldade diagnóstica inerente a estas condições. Além disso, a efetividade do tratamento pode variar com diferentes etiologias, sendo necessários mais estudos para avaliar-se a resposta clínica e microbiológica contra os diversos patógenos fúngicos.

A segurança e praticabilidade foram demonstradas de maneira evidente e como observamos na grande maioria dos trabalhos, com redução nos efeitos adversos, inclusive nefrotoxicidade. O baixo custo associado torna esta estratégia uma alternativa importante, principalmente em centros com recursos limitados, podendo-se obter as vantagens de redução na toxicidade características das formulações lipídicas de uma maneira muito mais econômica. Mais estudos são necessários, prospectivos e especialmente em pacientes com infecção fúngica comprovada, para a adoção em larga escala, na rotina da prescrição de anfotericina B, desta modalidade inovadora de tratamento.

Não existem estudos prévios com pacientes com infecção fúngica comprovada comparando AmB-d em infusão convencional e infusão contínua. A infusão contínua de anfotericina B em pacientes com AIDS e criptococose poderia diminuir a morbidade relacionada ao tratamento, ao mesmo tempo mantendo-se a eficácia clínica e reduzindo a nefrotoxicidade. Pode-se validar uma estratégia importante, onde o ganho principal em relação as formulações lipídicas é o custo, visto que diminuindo-se a nefrotoxicidade os desfechos clínicos parecem ser os mesmos. Como já observamos, o impacto do custo das anfotericinas com formulação lipídica pode ser significativo para o sistema público de saúde. A utilização de culturas quantitativas é um diferencial importante que procura documentar a resposta antifúngica, e acrescenta bastante em uma avaliação de uma nova estratégia de tratamento.

Desta forma, propomos um ensaio clínico aberto, não-controlado, avaliando o uso de AmB-d em infusão contínua (24 horas), em pacientes com AIDS e criptococose, avaliando a segurança e eficácia clínica e microbiológica.

Inicialmente, esse delineamento seria o mais adequado para um estudo piloto, concentrando as análises em dados de segurança e eficácia microbiológica, e substanciando o cálculo de tamanho da amostra para um estudo maior, comparativo entre a modalidade padrão de tratamento (infusão de 6 horas) e a infusão contínua de anfotericina B. O protocolo ainda prevê para mensuração da eficácia microbiológica das diferentes posologias de tratamento a utilização de culturas quantitativas (contagem de UFC de *Cryptococcus neoformans*).

4. Objetivos

Avaliar a resposta microbiológica, utilizando a contagem de unidades formadoras de *Cryptococcus* no líquido antes, durante e após o tratamento da meningoencefalite criptocócica com anfotericina B deoxicolato em infusão contínua, em pacientes com AIDS.

Avaliar a toxicidade renal e hematológica, utilizando mensurações de creatinina sérica, eletrólitos (potássio e magnésio) e hemoglobina, antes, durante e após tratamento da meningoencefalite criptocócica com anfotericina B deoxicolato em infusão contínua, em pacientes com AIDS.

Avaliar a resposta clínica, aferindo a mortalidade geral dos pacientes após 14 dias e após 12 semanas do tratamento da meningoencefalite criptocócica com anfotericina B deoxicolato em infusão contínua, em pacientes com AIDS.

5. Referências da Revisão da Literatura

Altmannsberger, P., E. Holler, *et al.* Amphotericin B deoxycholate: no significant advantage of a 24 h over a 6 h infusion schedule. J Antimicrob Chemother, v.60, n.1, Jul, p.180-2. 2007.

Andes, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. Infect Dis Clin North Am, v.20, n.3, Sep, p.679-97. 2006.

Andes, D., T. Stamsted, *et al.* Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.3, Mar, p.922-6. 2001.

Barrett, J. P., K. A. Vardulaki, *et al.* A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. Clin Ther, v.25, n.5, May, p.1295-320. 2003.

Bekersky, I., R. M. Fielding, *et al.* Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. Antimicrob Agents Chemother, v.46, n.3, Mar, p.828-33. 2002.

Berdichevski, R. H., L. B. Luis, *et al.* Amphotericin B-related nephrotoxicity in low-risk patients. Braz J Infect Dis, v.10, n.2, Apr, p.94-9. 2006.

Bicanic, T., C. Muzoora, *et al.* Independent association between rate of clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients. Clin Infect Dis, v.49, n.5, Sep 1, p.702-9. 2009.

Bicanic, T., R. Wood, *et al.* High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. Clin Infect Dis, v.47, n.1, Jul 1, p.123-30. 2008.

Bindschadler, D. D. e J. E. Bennett. A pharmacologic guide to the clinical use of amphotericin B. J Infect Dis, v.120, n.4, Oct, p.427-36. 1969.

Brouwer, A. E., A. Rajanuwong, *et al.* Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. Lancet, v.363, n.9423, May 29, p.1764-7. 2004.

Brouwer, A. E., P. Teparrukkul, *et al.* Baseline correlation and comparative kinetics of cerebrospinal fluid colony-forming unit counts and antigen titers in cryptococcal meningitis. J Infect Dis, v.192, n.4, Aug 15, p.681-4. 2005.

Burgess, D. S., R. W. Hastings, *et al.* Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis, v.36, n.1, Jan, p.13-8. 2000.

Chabot, G. G., R. Pazdur, *et al.* Pharmacokinetics and toxicity of continuous infusion amphotericin B in cancer patients. J Pharm Sci, v.78, n.4, Apr, p.307-10. 1989.

Chotmongkol, V., A. Arayawichanont, *et al.* Initial treatment of cryptococcal meningitis in AIDS. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.36, n.1, Jan, p.170-3. 2005.

Chotmongkol, V. e S. Jitpimolmard. Treatment of cryptococcal meningitis with triple combination of amphotericin B, flucytosine and itraconazole. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.26, n.2, Jun, p.381-3. 1995.

Chotmongkol, V. e K. Methawasin. Initial treatment with amphotericin B plus rifampin in the acute treatment of cryptococcal meningitis in aids. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.32, n.4, Dec, p.776-8. 2001.

Cornely, O. A., J. Maertens, *et al.* Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). Clin Infect Dis, v.44, n.10, May 15, p.1289-97. 2007.

De Rosa, F. G., O. Bargiacchi, *et al.* Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate: does decreased nephrotoxicity couple with time-dependent pharmacodynamics? Leuk Lymphoma, v.47, n.9, Sep, p.1964-6. 2006.

Deray, G. Amphotericin B nephrotoxicity. J Antimicrob Chemother, v.49 Suppl 1, Feb, p.37-41. 2002.

Ellis, M. E., A. A. Al-Hokail, *et al.* Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother, v.36, n.1, Jan, p.172-9. 1992.

Eriksson, U., B. Seifert, *et al.* Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. Bmj, v.322, n.7286, Mar 10, p.579-82. 2001.

Fluckiger, U. Is 24 hours infusion of amphotericin B deoxycholate as good as liposomal amphotericin B? Swiss Med Wkly, v.132, n.31-32, Aug 10, p.431-2. 2002.

Furrer, K., A. Schaffner, *et al.* Nephrotoxicity of cyclosporine A and amphotericin B-deoxycholate as continuous infusion in allogenic stem cell transplantation. Swiss Med Wkly, v.132, n.23-24, Jun 15, p.316-20. 2002.

Groll, A. H., N. Giri, *et al.* Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. J Infect Dis, v.182, n.1, Jul, p.274-82. 2000.

Herbrecht, R., D. W. Denning, *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med, v.347, n.6, Aug 8, p.408-15. 2002.

Kleinberg, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? Int J Antimicrob Agents, v.27 Suppl 1, Jun, p.12-6. 2006.

Lemke, A., A. F. Kiderlen, *et al.* Amphotericin B. Appl Microbiol Biotechnol, v.68, n.2, Aug, p.151-62. 2005.

Lewis, R. E. e N. P. Wiederhold. The solubility ceiling: a rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? Clin Infect Dis, v.37, n.6, Sep 15, p.871-2. 2003.

Lewis, R. E., N. P. Wiederhold, *et al.* In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. Antimicrob Agents Chemother, v.49, n.3, Mar, p.945-51. 2005.

Pappalardo, M. C. e M. S. Melhem. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.45, n.6, Nov-Dec, p.299-305. 2003.

Pasqualotto, A. C. Amphotericin B: the higher the dose, the higher the toxicity. Clin Infect Dis, v.47, n.8, Oct 15, p.1110; author reply 1110-1. 2008.

Peleg, A. Y. e M. L. Woods. Continuous and 4 h infusion of amphotericin B: a comparative study involving high-risk haematology patients. J Antimicrob Chemother, v.54, n.4, Oct, p.803-8. 2004.

Powderly, W. G. Editorial commentary: dosing amphotericin B in cryptococcal meningitis. Clin Infect Dis, v.47, n.1, Jul 1, p.131-2. 2008.

Saag, M. S., R. J. Graybill, *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, v.30, n.4, Apr, p.710-8. 2000.

Schulenburg, A., W. Sperr, *et al.* Brief report: practicability and safety of amphotericin B deoxycholate as continuous infusion in neutropenic patients with hematological malignancies. Leuk Lymphoma, v.46, n.8, Aug, p.1163-7. 2005.

Speich, R., A. Dutly, *et al.* Tolerability, safety and efficacy of conventional amphotericin B administered by 24-hour infusion to lung transplant recipients. Swiss Med Wkly, v.132, n.31-32, Aug 10, p.455-8. 2002.

Spellberg, B., M. D. Witt, *et al.* Amphotericin B: is a lipid-formulation gold standard feasible? Clin Infect Dis, v.38, n.2, Jan 15, p.304-5; author reply 306-7. 2004.

Uehara, R. P., V. H. Sa, *et al.* Continuous infusion of amphotericin B: preliminary experience at Faculdade de Medicina da Fundacao ABC. Sao Paulo Med J, v.123, n.5, Sep 1, p.219-22. 2005.

Van Der Horst, C. M., M. S. Saag, *et al.* Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. N Engl J Med, v.337, n.1, Jul 3, p.15-21. 1997.

Walsh, T. J., R. W. Finberg, *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. N Engl J Med, v.340, n.10, Mar 11, p.764-71. 1999.

Wiederhold, N. P., V. H. Tam, *et al.* Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother, v.50, n.2, Feb, p.469-73. 2006.

6. Artigo 1 (Mycoses)

Review article

Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate: an innovative, low-cost strategy in antifungal treatment

Diego R. Falci, Rodrigo P. dos Santos, Fernanda Wirth and Luciano Z. Goldani
Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Summary

The combination of amphotericin B and sodium deoxycholate is the formulation most used in clinical practice. The development of new agents such as amphotericin with lipid formulations, caspofungin, voriconazole and other azolic derivatives, promoted alternatives to amphotericin B deoxycholate. However, because of the high cost of these new drugs, their use is difficult in a scenario of limited resources. A few strategies have been devised to make the use of amphotericin B deoxycholate less toxic. In this review, we seek to describe the accumulated knowledge about this molecule, with focus on its use in continuous infusion, which appears to be an alternative to reduce toxicity, while maintaining its clinical efficacy.

Keywords: Amphotericin B deoxycholate, continuous infusion, low cost, toxicity, nephrotoxicity, efficacy.

Introduction

The significant increase in the number of patients with immunosuppressive conditions in the last few decades has resulted in a corresponding increase in the frequency of fungal infections. The prolonged survival of patients with neoplasms, transplants of solid organs and bone marrow cells, HIV/AIDS and chronic use of immunosuppressive medications are examples of these conditions. The growing importance of systemic mycoses in this context shows the need to learn more about the diagnosis and treatment of these conditions.

The difficulty to diagnose and the high mortality associated with systemic mycoses make empirical or even prophylactic treatments necessary.

Amphotericin B deoxycholate is presently the most important of antifungal agents especially in institutions of healthcare settings with limited resources. However, considerable toxicity is frequently associated with its use, especially in the kidneys.¹⁻³

The development of new agents such as amphotericin with lipid formulations, echinocandins, voriconazole and other azolic derivatives promoted alternatives to amphotericin B deoxycholate. However, because of

the high cost of these new drugs, their use is difficult in a scenario of limited resources. For instance, a daily dose of 5 mg kg⁻¹ of liposomal amphotericin B for a patient of 70 kg body weight is 22 times more expensive than a daily dose of 1 mg kg⁻¹ of amphotericin B. Furthermore, the benefit of these alternatives in most situations appears to be the decrease in toxicity and improved clinical response, but probably comparable with amphotericin B deoxycholate in terms of microbiological efficacy.⁴⁻⁶ Although there is much experience in using this drug and it has been available on the market for a long time, there is as yet no consensus on the ideal way of administering amphotericin B deoxycholate. A few strategies have been devised to make its use less toxic, such as sodium loading and use of premedications to avoid infusion-related toxicities. In this review, we seek to describe the accumulated knowledge about this molecule, with focus on its use in continuous infusion, which appears to be an alternative to reduce toxicity.⁷

Amphotericin B deoxycholate

Amphotericin B is a polyene antibiotic, which was isolated for the first time in 1959 from *Streptomyces*

Correspondence: Luciano Z. Goldani, MD, Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55 51 3359 8152. Fax: +55 51 3359 8152.
E-mail: lgoldani@ufrgs.br Accepted for publication 14 September 2009

nodosus cultures. The strain was collected in 1944 in the Orinoco Delta, in Venezuela. The substance is still being extracted from cultures on an industrial scale. It is considered a non-aromatic polyene antimycotic.

All polyenes are characterised by low solubility. This low solubility explains why little or no gastrointestinal absorption of amphotericin occurs, and hence there is very low bioavailability when administered orally. Therefore, the drug is usually administered intra-venously, mixed with a solubilising agent such as sodium deoxycholate.⁸ The combination of amphotericin B and sodium deoxycholate is the formulation most used in clinical practice worldwide, especially in under-developed countries.

Amphotericin deoxycholate B is generally used to treat systemic and invasive fungal infections such as those caused by species of *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes*, *Trichosporon* and *Cryptococcus*. Besides being essential for the treatment of fungal infections, it is also the most important second-line drug to treat visceral and cutaneous leishmaniasis.⁸

Mechanism of action

Sterols are essential components of biological membranes and are responsible for the fluidity of the membrane. In mammalian cells, cholesterol is the predominant sterol, while in fungi, amoebas and protozoans of genus *Leishmania*, ergosterol is the major membrane component. The polyenic structure of amphotericin B allows it to form pores in the cellular membrane. In this context, amphotericin B strongly favours ergosterol compared with cholesterol. The polyenic chain interacts with the cholesterol or ergosterol molecule and the membrane phospholipids through the Van der Waals forces. The affinity of amphotericin B for cholesterol results in the potential toxicity against mammalian cells. Because of pore formation in the membrane, there is a loss in cellular integrity, resulting in rapid efflux of ions, especially potassium.⁸

Pharmacokinetics and pharmacodynamics

Gastrointestinal absorption of amphotericin B deoxycholate is minimal and detailed data remain fully unknown. Approximately 20-30% of amphotericin B is removed from the blood in the liver and excreted with bile in the faeces, and 2-5% of the amphotericin B deoxycholate found in the urine has not been metabolised and remains biologically active.⁸ Bekersky et al. [9] found that two-thirds of the amphotericin B

deoxycholate was excreted unchanged in the urine (20.6%) and faeces (42.5%) with >90% accounted for in mass balance calculations at 1 week, suggesting that metabolism plays at most a minor role in amphotericin elimination. When colloidal amphotericin B is admixed in serum, deoxycholate separates from amphotericin B and more than 95% of the latter binds to serum proteins. Most of the drug leaves the circulation and is stored in the liver and other organs. The concentration of amphotericin B in inflamed areas such as the peritoneum, pleura and joint is approximately two-thirds of the through serum level. Amphotericin B penetrates poorly into either normal and inflamed meninges, brain, saliva, bronchial secretions, vitreous humour, amniotic fluid, muscle and bone.¹⁰

The pharmacokinetic aim of any anti-fungal treatment is to reach therapeutic concentrations at the infection site. Thus, we must consider, besides medication, the causative fungus of the infection and its location or compartmentalisation. Most of the pathogenic fungi are present extracellularly, and therefore the serum concentration would be a reliable marker for appropriate therapy. However, in compartmentalised infections such as those of the central nervous system, like cryptococcal meningitis, the concentration in the brain parenchyma may be more important. In fact, animal studies have shown comparable and adequate penetration of different formulations of amphotericin B in the brain parenchyma.^{7,11} In fact, treatment with amphotericin B deoxycholate (1 mg kg⁻¹ day⁻¹) or liposomal amphotericin B (AmB) (5 mg kg⁻¹ day⁻¹) yielded the highest peak plasma concentration [C(max)] and area under concentration. Amphotericin B deoxycholate and liposomal AmB had the greatest antifungal efficacy. This activity was concentration and time dependent.⁹

Pharmacodynamics establishes the relationship between pharmacokinetics and outcome. In the context of antimicrobials, the relationship between exposure to the drug and fungicidal activity or minimum inhibitory concentration (MIC) is considered. Thus, we have three parameters that are very useful to describe this relation, which are: (i) maximum serum concentration over the MIC (C_{max}/MIC), (ii) the 24 h area under the curve divided by MIC (AUC/MIC), and (iii) the time during which the drug concentration is greater than MIC over a period of time, which is expressed as %/time/MIC (Fig. 1). Knowledge regarding which of these three parameters best describes the antifungal activity of a drug provides the basis to determine the frequency at which it can be most effectively administered. For instance, if C_{max}/MIC is strongly correlated with the

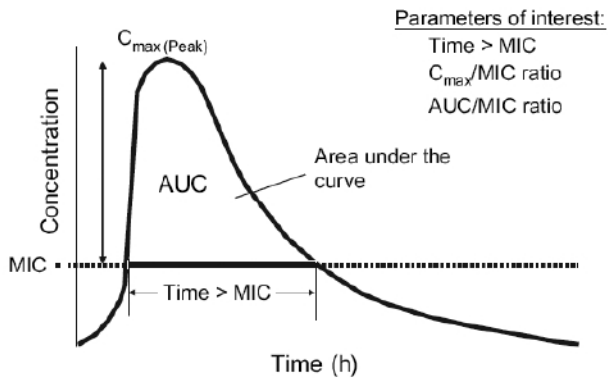


Figure 1 Pharmacokinetics of antimicrobial dosing relative to organism MIC. (From Andes D. Clinical pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin N Am* 2003; 17: 635-49; with permission).

activity of drug A, the most appropriate therapeutic regimen would be high doses at prolonged intervals (concentration-dependent agent). On the other hand, if %T/MIC describes drug activity most adequately, lower and more frequent doses or even continuous administration would be required to prolong the period during which the serum level of the drug is above MIC (time-dependent agent).⁷

Antifungals are not easily divided among time or concentration-dependent agents. Existing studies classify the polyenes such as amphotericin B deoxycholate as concentration-dependent compounds. However, there are conflicting results in these studies, as for instance, the antifungal action similar to that during

the first few hours is persistent even after 24 h of administration, which may reflect in vivo the slow diffusion of these compounds into the tissues. Moreover, in a recent study evaluating the distribution of amphotericin B deoxycholate in its different formulations in the CNS of animal models, fungal eradication was associated with concentration-dependent parameters (C_{max}/MIC), and the authors concluded that the antifungal activity was time and concentration dependent.^{11,12} Although amphotericin B clearly has concentration-dependent activity, there is probably a ceiling effect of the free (bioactive) drug based on protein binding and drug solubility, which varies according to the site of infection such as in the kidney, lung, liver and brain. These considerations take into account only the microbiological eradication. However, in the case of a drug such as amphotericin B deoxycholate, which has major toxicity associated with it, as we will review below, it is important to value the importance of parameter %T/MIC in the treatment to sustain the feasibility of administering amphotericin B deoxycholate in a continuous infusion, a strategy that can reduce adverse effects. Even after 40 years of clinical use, the appropriate regime of amphotericin B deoxycholate has not yet been fully defined, and the manufacturer indicates a daily infusion of 2-6 h.

In vitro pharmacodynamics has shown that amphotericin B exhibited species-specific concentration-dependent activity with a ceiling effect of the bioactive drug, with 50% effective concentrations (EC_{50} s) ranging from 0.10 to 0.12 mg ml⁻¹ for *Aspergillus fumigatus*, 0.36 to

Table 1 Reported studies describing the efficacy and decreased toxicity of continuous 24-h infusion of amphotericin B deoxycholate

Reference	Study design	Infusion type compared	Number of patients	Diminished toxicity	Microbiological efficacy	Decreased mortality
Eriksson et al.	Prospective, randomised, comparative febrile neutropenia; haematological malignancy	4h	86	Renal, infusional	Not shown	Yes
Uehara et al.	Retrospective, non-comparative; febrile, neutropenia; haematological malignancy	None	12	Renal	Not shown	yes
Speich et al.	Prospective, non-comparative; lung transplant Candida Pneumonia	None	6	Renal	Yes	yes
Peleg et al.	Prospective, comparative; febrile neutropenia haematological malignancy	4h	77	Renal	Not shown	Yes
Furrer et al.	Retrospective; non-comparative febrile neutropenia; HSCT ¹	None	22	Renal	Not shown	Not shown
Altmannsberger et al.	Retrospective, comparative; febrile neutropenia, HSCT	6h	7	Not shown	Not shown	Not shown
Schulenburg et al.	Prospective, comparative; febrile, neutropenic, haematological malignancy	26h	17	Renal infusional	Not shown	Not shown
Falci et al.	Pilot, prospective, Non-comparative cryptococcosis and HIV	None	6	Renal, infusional	Yes	Not shown

¹Haematological stem cell transplant.

0.53 mg ml⁻¹ for *Aspergillus terreus*, 0.27 to 0.32 mg ml⁻¹ for *Fusarium solani*, 0.41 to 0.55 mg ml⁻¹ for *Fusarium oxysporum*, and 0.97 and 0.65 mg ml⁻¹ for *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, respectively.⁴ With regard to *Candida albicans*, similar optimal activity of amphotericin B may be achieved by maximising the peak drug concentration/MIC ratio.^{15,16}

Toxicity

The toxicity of amphotericin B can be divided into acute (acute reactions to the infusion) and subacute effects (nephrotoxicity). Acute infusional reactions are characterised by symptoms such as chills, fever, nausea and vomiting, headache, hypotension, tachycardia and dyspnoea that occur during the administration of amphotericin B deoxycholate. These reactions often require medical attention and the use of medications such as dexchlorpheniramine or meperidine. Cases of severe cardiac arrhythmias have been already described during the administration of amphotericin B deoxycholate.^{8,17}

The incidence of nephrotoxicity may reach levels between 49% and 65%; it may result in the significant loss of renal function and require dialysis. The use of other nephrotoxic drugs along with amphotericin B deoxycholate, and consequently, dialysis as a result of the loss of renal function were clearly associated with mortality.³

The pathophysiology of nephrotoxicity involves two mechanisms: severe vasoconstriction resulting in reduced renal blood flow and, consequently, the glomerular filtration rate (GFR); and direct interaction between amphotericin B deoxycholate and the membranes of the renal epithelial cells causing tubular dysfunction. These two mechanisms collectively determine the loss of renal function.³ The two mechanisms interact in a tubuloglomerular feedback in which the low sodium concentration in the dense macula caused by proximal tubular dysfunction increases afferent vasoconstriction, further reducing renal blood flow.¹⁸

Potential risk factors for nephrotoxicity include the daily dose of amphotericin B deoxycholate received by the patient, dehydration, cumulative dose, duration of therapy over 2 weeks, abnormal baseline renal function and nephrotoxic drugs used concomitantly.³ To detect nephrotoxicity, it is necessary to maintain clinical surveillance for the symptoms such as tubular dysfunction and renal failure. Hypokalaemia is a frequent complication of amphotericin B deoxycholate therapy, which requires potassium supplementation to maintain

normal potassium levels. In a significant number of patients, amphotericin B deoxycholate will induce the changes including hypokalaemia, hypomagnesaemia, renal tubular acidosis and polyuria. There is a progressive increase in serum creatinine, and is usually reversible with the suspension of the drug; however, in cases of larger cumulative doses (above 4 g), it may be irreversible. Twenty-five per cent increase in serum creatinine should be considered as an evidence of a clinically significant decrease in the GFR.³ Before and during treatment, hydration and increased urinary output are essential to prevent nephrotoxicity. In addition, sodium loading has been shown to prevent amphotericin B deoxycholate-induced nephrotoxicity.

Other adverse effects described include anaemia, neutropenia, thrombocytopenia and changes in the liver function tests. However, these side effects, especially anaemia, do not usually cause significant morbidity or mortality.⁸

Amphotericin B deoxycholate in a continuous infusion

Clinical studies

Considering the high cost of lipid amphotericin, strategies have been sought that allow the use of amphotericin B deoxycholate with a lower level of toxicity.¹⁹ Based on the pharmacokinetic rationale that 4-h infusions will result in greater binding of plasma proteins, and higher serum levels than the 24-h infusions, with greater and faster distribution of amphotericin B deoxycholate in the tissues and

consequently greater nephrotoxicity, studies with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate for 24 h appears to be a promising strategy to diminish the associated nephrotoxicity, as shown in the Table 1. Moreover, the concept of the importance of the two parameters (C_{max}/MIC and %T/MIC) together, for microbiological eradication, ensures the possibility and feasibility of using this strategy. In this way, the reduction of toxicity appears, at least partly, to depend on a lower release of amphotericin B deoxycholate into the tissues.²⁰ For instance, Chabot et al. [21] evaluated the role of continuous infusion of AmB over a period of 52-120 h in the biochemical modulation of antineoplastic agents administered in patients with advanced carcinomas. Therapeutic plasma levels of amphotericin B were rapidly reached and maintained for the duration of infusion, with a reduction in acute toxicities associated with shorter infusions. Biochemical modulation of antineoplastic

agents by continuous amphotericin B deoxycholate infusion was not demonstrated clinically.

Eriksson et al. [1] developed a randomised clinical trial comparing the 4-h infusion of amphotericin B deoxycholate (conventional) vs. 24-h infusion (continuous infusion). Eighty-six patients were enrolled with an indication to use amphotericin B, most of them febrile neutropenic with haematological malignancies. The study included and defined some patients with persistent fever and proven fungal infection, which included cryptococcosis (1), aspergillosis (4) and pulmonary *Rhizopus* infection (1) in the rapid infusion group and proved angioinvasive mould pulmonary infection (3) in the 24-h infusion group. A significant difference was found with respect to an increase in acute infusional reactions such as fever and chills in the patients who received a 4-h infusion. The patients who received a continuous infusion required lesser medications against infusional reactions. In addition, higher levels of serum creatinine were seen in the group that received the 4-h infusion. There were no differences in relation to hypokalaemia or hypomagnesaemia. The highest mortality rate (total of seven deaths in the study) was seen in the group that received the 4-h infusion. Despite a higher number of proved or probable fungal infections, there was no death in the continuous infusion group, whereas three patients died with proved fungal infections at necropsy in the rapid infusion group. Break-through fungaemia did not occur in any of the groups. The data on the efficacy in this study support the notion that continuous infusion of amphotericin B deoxycholate is at least as effective as the daily 4-h infusions. The reduction of acute infusional reactions in this study can be explained by the induction or slower release of inflammatory mediators such as C reactive protein during the continuous infusion of amphotericin B deoxycholate, which was comparable with the reduction observed in trials with lipid formulations. Comparing the ratio of peak serum creatinine with baseline creatinine concentrations during and at the end of treatment, the authors found a significantly higher ratio in the rapid infusion group. This marked reduction of nephrotoxicity observed in continuous infusion group is comparable with that observed in patients treated with liposomal amphotericin B. As no difference was observed in hypokalaemia, similarly to the studies with liposomal amphotericin B, the continuous infusion of amphotericin B deoxycholate appears to reduce mainly pretubular renal toxicity.^{1,22}

A retrospective study analysed data from 12 patients with febrile neutropenia requiring antifungal therapy, who were treated with a 24-h continuous infusion of

amphotericin B deoxycholate.² Only three of these patients presented proven fungal infection. No death occurred during the 7-day period analysed from the beginning of the administration of amphotericin B deoxycholate. The reduction in nephrotoxicity was similar to that observed in the study by Eriksson. Only four patients (30%) presented 1.5 times higher creatinine levels than the baseline. These findings were similar to the study by Walsh with liposomal amphotericin, where 29.40% of the patients were found to develop nephrotoxicity. Hypokalaemia and hepatotoxicity were frequent adverse effects as was expected, and as was also reported in other studies.⁴ All patients survived for at least 7 days after starting continuous infusion of AmB-D, and clinical resolution occurred in 76% of the cycles. The authors concluded that amphotericin B deoxycholate was effective in continuous infusion; although there are limitations in the study (retrospective, small number of patients), the results were interesting and encouraged new clinical trials.

In patients who underwent lung transplant, Speich et al. [23] developed a pilot study using amphotericin B deoxycholate in continuous infusion. Six patients with semi-invasive bronchopulmonary azole-resistant candidal infections were enrolled in this small study. Once again, the results were satisfactory and the fungal infection was eradicated in five of the six patients, and the drug was well tolerated with the occurrence of nephrotoxicity in one patient (16%). These results also indicate that continuous infusion offers a real possibility of reducing the nephrotoxicity associated with amphotericin B deoxycholate without additional costs, especially in the context of the concomitant use of nephrotoxic drugs, as all the patients were using immunosuppressive agents that had proven nephrotoxicity, such as cyclosporine A.

The use of amphotericin B deoxycholate in a continuous infusion together with cyclosporine A was evaluated in patients submitted to allogeneic transplant of bone marrow cells in a retrospective study conducted by Furrer et al. [24] As shown in previous studies, the authors concluded that the use of amphotericin B deoxycholate in continuous infusion was safe in patients who were receiving other nephrotoxic drugs.^{17,19} The limitations of the retrospective study included a small number of patients analysed.

A retrospective cohort was analysed by Peleg et al. [25] which compared the infusion of amphotericin B in 4 h vs. continuous 24-h infusion. The patients had haematological malignancies, and required antifungal therapy. A dose of 0.6 mg kg⁻¹ was used in patients

with febrile neutropenia and 1.0 mg kg^{-1} in patients with suspected or confirmed aspergillosis. A switch to liposomal amphotericin was performed in patients whose creatinine levels doubled during the treatment, or when the baseline creatinine was higher than 1.4 mg dl^{-1} . The primary outcome of this study was nephrotoxicity, which was also defined as the occurrence of twofold increase in baseline creatinine. Mortality within 14 days, absence of fungal breakthrough infections during treatment and the resolution of proven fungal infections were also analysed as secondary outcomes. A total of 77 patients were included for analysis. The mean increase in creatinine, the mean peak fraction of creatinine during treatment and the reduction of creatinine clearance were significantly lower in patients treated with a continuous 24-h infusion of amphotericin B deoxycholate. Renal impairment occurred significantly less frequently with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate compared with 4 h infusion of amphotericin B [10% vs. 45%, respectively, odds ratio (OR) 0.14; 95% confidence interval (CI) 0.04-0.5, $P < 0.001$]. The authors identified a target infusion rates associated with less nephrotoxicity $<0.08 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The analysis of the subgroups of patients who were submitted to bone marrow transplants and of those who used nephrotoxic drugs concurrently showed a reduction in renal toxicity with continuous infusion, maintaining the statistical significance seen in the overall analysis. Mortality was significantly different in the two groups (14-day survival: 95% in continuous infusion vs. 79% in 4-h infusion, $P = 0.03$), and it was not directly related to fungal infection. There was no difference in the breakthrough fungaemia between the two groups.

A counterpoint to the evidence of the benefit of continuous amphotericin B deoxycholate infusion was a study performed by Altmannsberger et al. [26] The authors describe the experience with amphotericin B deoxycholate by retrospectively analysing two cohorts of patients, one with a 6-h infusion and the other with a continuous 24-h infusion. No differences were observed in relation to nephrotoxicity among the groups. The 4-week mortality was also similar among the two treatment arms. In this study, it was concluded that although it is feasible to administer amphotericin B deoxycholate in a continuous infusion, it did not present advantages or benefits compared with conventional 6-h infusion, suggesting that this benefit would be achieved only using the lipid formulations of amphotericin B. The study was funded by the pharmaceutical industry, which developed Ambisome (liposomal formulation of amphotericin B.)

Schulenburg et al. [27] published a report on an open, prospective study of 17 patients with febrile neutropenia and haematological malignancies. Amphotericin B deoxycholate was used in a continuous infusion and the data were compared with a control group consisting of 10 patients. The continuous infusion of amphotericin B deoxycholate resulted in no acute infusional reactions, hypokalaemia, and severe nephrotoxicity than controls treated 2-6 h infusions. There was no difference in the analysis of efficacy (mortality and resolution of the fever). Once again, it was concluded that the continuous infusion of amphotericin B deoxycholate is safe, practicable and effective in this patient population.

A recent prospective study included patients with disseminated cryptococcosis and AIDS who received continuous 24-h infusion of amphotericin B deoxycholate (0.7 mg kg^{-1} daily) and oral 5 α -flucytosine (25 mg kg^{-1} four times a day) during an induction phase of 14 days.²⁸ We measured fungicidal activity using serial quantitative cultures of cerebrospinal fluid (CSF) obtained from lumbar punctures on days 3, 7 and 14 of treatment. At this time, six patients have been included in the study. The analysis has shown that all six patients included presented a progressive reduction in CSF cryptococcal colony-forming units (CFU) and CSF was sterile at 2 weeks of treatment. Although two patients developed severe hypokalaemia, glomerular renal function was well preserved in all patients with creatinine serum levels below 1.5 mg dl^{-1} at the end of 14 days of antifungal therapy. The authors observed the occurrence of anaemia (decrease in haemoglobin at least of 3 g dl^{-1}) in three patients.

Considering possible interactions with other medications, which might compromise its stability, continuous infusion of amphotericin B deoxycholate should be carried out through a specific and unique central venous line.

Conclusions

The data so far reviewed suggest that the use of amphotericin B deoxycholate in a continuous 24-h infusion seems to be safe and effective in the context of haematological malignancy, haematopoietic stem cell transplant with febrile neutropenia and HIV-infected patients with cryptococcosis. In general, the retrospective and prospective studies and the results of the clinical trials available suggest a clinical and microbiological effectiveness similar to the standard of treatment with amphotericin B deoxycholate. The nephrotoxicity benefit achieved is clear and comparable with that reported with the use of

lipid formulations of amphotericin B. However, a large number of patients enrolled in the studies did not present a proof of fungal infection, because of the inherent difficulty in diagnosing these conditions. Furthermore, treatment efficacy may vary with different aetiologies, and further investigations are necessary to evaluate the clinical and microbiological response against the different fungal pathogens.

The low cost associated with this type of treatment makes this strategy an important alternative, especially at centres with limited resources, and one may obtain the advantages of toxicity reduction characteristics of lipid formulations much more economically. However, the studies published so far included a too small number of patients to evaluate the effectiveness. Further prospective randomised studies are needed, especially in patients with proven fungal infection, for the large-scale adoption of this innovative mode of treatment in the routine use of amphotericin B deoxycholate.

References

- Eriksson U, Seifert B, Schaffner A. Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. *BMJ* 2001; 322: 579-82.
- Uehara RP, Sa VH, Koshimura ET et al. Continuous infusion of amphotericin B: preliminary experience at Faculdade de Medicina da Fundacao ABC. *Sao Paulo Med J* 2005; 123: 219-22.
- Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(Suppl 1): 37-41.
- Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C et al. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 764-71.
- Spellberg B, Witt MD, Beck CK. Amphotericin B: is a lipid-formulation gold standard feasible? *Clin Infect Dis* 2004; 38:304-5; author reply 6-7.
- Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(Suppl 1): 12-6.
- Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 679-97.
- Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 151-62.
- Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 828-33.
- Bindschadler DD, Bennett JE, Abernathy RS. A pharmacologic guide to clinical use of amphotericin B. *J Infect Dis* 1969; 20: 427-36.
- Groll AH, Giri N, Petraitis V et al. Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. *J Infect Dis* 2000; 182: 274-82.
- de Rosa FG, Bargiacchi O, Audagnotto S, Garazzino S, Ranieri VM, di Perri G. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate: does decreased nephrotoxicity couple with time-dependent pharmacodynamics? *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1964-6.
- Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 469-73.
- Lewis RE, Wiederhold WP, Klepser ME. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium* and *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 945-51.
- Burgess DS, Hastings RW, Summers KK, Harding TC, Rinaldi MG. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36: 13-18.
- Andes D, Stamsted T, Conklin R. Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 922-6.
- Ellis ME, al-Hokail AA, Clink HM et al. Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 172-9.
- Berdichevski RH, Luis LB, Crestana L, Manfro RC. Amphotericin B-related nephrotoxicity in low-risk patients. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 94-9.
- Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C et al. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther* 2003; 25: 1295-320.
- Lewis RE, Wiederhold NP. The solubility ceiling: a rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? *Clin Infect Dis* 2003; 37: 871-2.
- Chabot GG, Pazdur R, Valeriote FA, Baker LH. Pharmacokinetics and toxicity of continuous infusion amphotericin B in cancer patients. *J Pharm Sci* 1989; 78: 307-10.
- Johansen HK, Gotzsche PC. Amphotericin B Lipid Soluble Formulations Versus Amphotericin B in Cancer Patients With Neutropenia (Cochrane Review), 1st edn. Oxford: Update Software, 2007.
- Speich R, Dutly A, Naef R, Russi EW, Weder W, Boehler A. Tolerability, safety and efficacy of conventional amphotericin B administered by 24-hour infusion to lung transplant recipients. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 455-8.
- Furrer K, Schaffner A, Vavricka SR, Halter J, Imhof A, Schanz U. Nephrotoxicity of cyclosporine A and amphotericin B-deoxycholate as continuous infusion in

- allogenic stem cell transplantation. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 316-20.
- 25 Peleg AY, Woods ML. Continuous and 4 h infusion of amphotericin B: a comparative study involving high-risk haematology patients. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 803-8.
- 26 Altmannsberger P, Holler E, Andreesen R, Krause SW. Amphotericin B deoxycholate: no significant advantage of a 24 h over a 6 h infusion schedule. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 180-2.
- 27 Schulenburg A, Sperr W, Rabitsch W, Knobl P, Thalhammer F. Brief report: practicability and safety of amphotericin B deoxycholate as continuous infusion in neutropenic patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 1163-7.
- 28 Falci DR, Ramos CG, Aquino VR, Goldani LZ. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of safety and fungicidal activity. *Int J Infect Dis* 2008; 12: E282-3.

7. Artigo 2 (Clinical Infectious Diseases)

Original Article

Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of safety and fungicidal activity

Diego Rodrigues Falci; Luciano Weber Lunardi; Carina Guedes Ramos; Mônica Baumgardt Bay; Valério Rodrigues Aquino; Luciano Zubaran Goldani.

Infectious Diseases Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running title: Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in cryptococcosis

Keywords: Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate, cryptococcal meningoencephalitis, cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, fungicidal activity, toxicity, side effects

Address correspondence to:

Dr. Luciano Goldani
Section of Infectious Diseases
Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS Brazil 90640-002
Email:lgoldani@ufrgs.br

Alternate corresponding author:

Dr. Diego R. Falci
Section of Infectious Diseases
Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS Brazil 90640-002
Email: diego.falci@gmail.com

Abstract

Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate for the treatment of fungal infections like cryptococcosis could reveal a promising strategy. Our objective in this study is to evaluate safety and mycological efficacy of continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in treatment of cryptococcal meningoencephalitis. Patients received continuous infusion of amphotericin B deoxycholate and oral flucytosine during induction phase of 14 days. We measured fungicidal activity using quantitative cultures of cerebrospinal fluid (CSF) obtained from lumbar punctures at baseline, days 3, 7 and 14 of treatment. Our study included 10 patients. Overall mortality after 2 weeks of treatment was 10%. Mycological analysis has shown a progressive reduction in CSF cryptococcal colony-forming units (CFU). We calculated EFA (early fungicidal activity) using the slope of reduction in CFU counts. Mean EFA was -0.37 ± 0.05 log CFU/mL of CSF per day. Although two patients developed hypokalemia and hypomagnesemia, glomerular renal function was preserved in all patients with creatinine serum levels below 1.5 mg/dl at end of study. Our data suggest that continuous infusion of amphotericin B seems to be safe and well tolerated, despite the development of anemia, and hypokalemia in some patients. Mycological efficacy was comparable to standard 4-hours infusion of amphotericin B, with adequate reduction rate of fungal burden.

Introduction

The mainstay of treatment of cryptococcosis in HIV-infected patients keeps still amphotericin B deoxycholate, according to current antifungal treatment guidelines.

The administration of intravenous amphotericin B is associated with nephrotoxicity and electrolyte abnormalities, along with other side effects like anemia.

An innovative form of administration of amphotericin B deoxycholate, continuously, was proposed to achieve the same benefits while keeping its good antifungal efficacy. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate has been studied for the empirical treatment of neutropenic fever in patients with hematological malignancies. Indeed it reduced the toxicity associated with this treatment. However, all trials in this scenario had included patients with probable or unproven fungal infection, keeping the doubt on efficacy concerns.[1, 3-6]

We report our experience in a pilot, non-comparative clinical trial with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate, plus oral 5-flucytosine, in the treatment of HIV-associated cryptococcal meningoencephalitis.

Patients and Methods

The study was conducted from Set 2007 to May 2009 at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, a 600-bed university hospital in southern Brazil. The study was approved by the hospital research ethics committee, recognized by the Brazilian national ethics committee(CONEP) and by the office for human research protections (OHRP/USDHHS) as an institutional review board (IRB0000921).

We considered as eligible for the study all consecutive patients with a positive India ink in direct examination of cerebrospinal fluid (CSF), or a positive CSF cryptococcal antigen test, plus a positive serology for HIV. Inclusion of the patient was further confirmed by growth of *Cryptococcus neoformans* in media culture of CSF samples. Exclusion criteria were baseline serum creatinine concentration >3.00 mg/dL, an absolute neutrophil count <500 X 10⁶ cells/L, platelet count <50,000 X 10⁶ cells/L, aminotransferases levels >5 times the upper limit of normal values (>200 IU/L), pregnancy or breastfeeding, previous severe reactions to amphotericin or 5-flucytosine use, or any amphotericin use during the past 30 days.

All patients in this pilot single-arm study received amphotericin B deoxycholate (generic formulation) and 5-flucytosine (generic formulation). After 2 weeks of therapy, patients changed to fluconazole (generic formulation). Subjects received continuous (24 hours) infusion of amphotericin B deoxycholate (0.7 mg/kg/daily), given in 500 ml of 5% glucose. The drug was delivered by an infusion-pump. Use of a central venous line was encouraged. Patients also received oral flucytosine (25mg/kg four times a day). Both drugs were maintained during induction phase of 14 days. Unless contraindicated, patients received 1 L of normal saline 0.9% solution daily. Potassium and magnesium supplementation were provided as necessary, and the use of pre-medication was permitted by the protocol. Lumbar punctures were performed on baseline, days 3, 7, and 14 of treatment. Patients with CSF opening pressure > 35 cm H₂O or symptoms attributable to elevated intracranial pressure underwent additional lumbar punctures. The use of antiretroviral therapy could be appropriated if indicated by the assistant physician.

We evaluated prospectively patients for side effects, clinical and microbiological efficacy during 14 days. Renal function, blood cell count and electrolytes were

checked at baseline and every 3 days. Fungicidal activity was measured using serial quantitative cultures of cerebrospinal fluid (CSF) obtained from lumbar punctures. Quantitative fungal culture was made as described elsewhere, obtaining the number of cryptococcal colony-forming units (CFU) in each time of treatment[7]. Clearance of *Cryptococcus* was further calculated, with the slope of linear regression of log CFU counts against time for each patient, giving the rate of decrease in log CFU/mL of CSF per day. Negative cultures were assigned a value of 1 CFU/mL (log 0)[7]. We also performed polysaccharide capsular cryptococcal antigen test in serum and CSF samples.

Azotemia was defined as an increase in serum creatinine concentration to 2,5 mg/dL; in this case the switch of therapy to fluconazole or another formulation of amphotericin B could be done by the assistant physician, and the patient considered as failure by toxicity. We defined hypokalemia as a value < 2.5 mEq/L and hypomagnesemia < 1,5 mEq/L. We also evaluated mortality, measuring subject survival at 14 days, and after 12 weeks of enrollment.

Statistics. Results were presented as medians (range), or otherwise specified. A linear regression model was made for each patient to calculate decline of CFU counts. Continuous variables between before and after treatment were compared using a two-tailed paired-samples T test. Statistical analysis was made using SPSS For Windows version 16.0 (SPSS Inc, 2007).

Results

Study population. During the study period, 12 consecutive patients with HIV disease and cryptococcal meningoencephalitis were considered eligible for the study. Two patients did not give their consent. We enrolled therefore 10 patients in the study.

One patient has died during the study. This patient presented untreatable intracranial hypertension and severe cerebral edema, which most probably caused death. He received only 3 days of amphotericin B plus 5-flucytosine treatment, and had not developed any adverse events of these drugs that could be linked to fatal outcome. An autopsy was not performed.

The mean age of this sample was 37 years. There were 9 male patients and 1 female in this sample. All of patients were severely immunocompromised with advanced stage HIV disease. Baseline characteristics and clinical outcome of patients are described in table 1.

Mycological analysis. At baseline, we had CSF high fungal burden, expressed in the elevated counts of cryptococcal colony-forming (CFU) units. Four patients present baseline CSF counts above 100,000 CFU. The range of baseline counts was 15,000 – 80,000 CFU in other patients. In all patients that entered the mycological analysis we observed a progressive reduction in CSF cryptococcal colony-forming units (CFU) with sterilization of CSF at 14 days of treatment. An exponential reduction in CFU counts was observed, as seen in figure 1.

Early fungicidal activity (EFA) or fungal clearance was calculated for each patient as mentioned above. The mean EFA (\pm SD) was -0.37 ± 0.05 log CFU/mL of CSF per day. Cryptococcal latex agglutination tests were positive in all patients but titers did not correlate with reduction in CFU counts (data not shown).

Mortality. Mortality rate during the study was 10% (1 of 10 patients) at 2 weeks, and also 10% (1 of 10 patients) at 12 weeks.

Safety. As shown in table 2, glomerular function was well preserved in all patients, with creatinine serum levels below 1.5 mg/dL at the end of 14 days of amphotericin B deoxycholate. The mean serum creatinine level increased from 0.70 (range 0.40-

1.16) to 0.86 mg/dL (range 0.49-1.12). However, we observed a mean increase of 50% in creatinine concentrations during treatment. Indeed, 3 patients had increases above 50% at the end of treatment and one patient had a maximum increase of 150%, partially reversed after cessation of amphotericin B therapy. Comparison between baseline and after 14 days of treatment demonstrated that the change observed in mean creatinine was not significant. No patient required dialysis. Every patient but one (death) received 14 days of amphotericin B deoxycholate plus 5-flucytosine as planned in the protocol. No severe infusion-related side effects were observed. The treatment was not changed to fluconazole or another formulation of amphotericin B during the first 14 days of induction phase. Hypokalemia was observed in 2 patients. Mean serum potassium concentrations decreased from 3.88 to 3.63 mEq/L. We observed no signs of cardiac arrhythmia. Hypomagnesemia was observed in 2 patients. Mean magnesium serum levels decreased from 1.93 to 1.7 mEq/L. Differences in potassium and magnesium concentrations before and after treatment were not significant. Anemia was a common observation. Mean hemoglobin levels decreased from 11.49 to 7.92 g/dL; five patients had decreases of at least 3 g/dL. In one patient, blood transfusion was required. Comparison of mean hemoglobin concentrations before and after 14 days of treatment demonstrated a statistically significant decrease ($p=0.001$).

Discussion

Our study confirms the fungicidal activity of amphotericin B deoxycholate plus 5-flucytosine, even with continuous infusion. The mycological response observed

was remarkable. We have demonstrated microbiological efficacy with this regimen, using an established method to assess the rate of reduction in the fungal burden of disease. [7] Regarding to sterilization of CSF, all patients have achieved with 14 days of treatment, as expected in a regimen with conventional amphotericin B plus 5-flucytosine. [11] The clearance of infection, measured as EFA, was similar as other studies using the same technique.[12]. This endpoint is suitable for evaluation of new treatment regimens for this disease, as recently reported[13], and our results suggest that this new form of administration can be an effective alternative to clinicians in settings where lipid formulations of amphotericin B are unavailable or unaffordable.

Decreased renal blood flow and increased tubular membrane permeability are the believed causes of amphotericin B deoxycholate nephrotoxicity with incidence rates that may be up to 50%.[9]. Dose –dependent alterations in protein binding and distribution of amphotericin B deoxycholate may explain why nephrotoxicity has been less frequently observed among patients who received amphotericin B by continuous infusion.[4, 6] In our study, the rates of nephrotoxicity was comparable to those reported by previous studies with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate, and also similar to lipid formulations trials (table 2); these rates are far lower from the trials evaluating conventional administration of amphotericin B deoxycholate, demonstrating the potential advantage with this regimen.[9, 14] Hypokalemia and hypomagnesemia was frequently observed, as we expected. Continuous infusion can protect glomerular function, but seems to have little effect in tubular damage. Anemia was a very common phenomenon, attributed to suppression of erythropoietin production by amphotericin B. As this suppression apparently is not dependent by the distribution of the drug, even with continuous

infusion it will remain an important problem, particularly in HIV/AIDS patients who often receive myelotoxic drugs.

The rescue of amphotericin B deoxycholate as a safe drug, with continuous infusion, can reveal a new and promising strategy to treat systemic mycoses. Our results suggest that continuous infusion could reduce nephrotoxicity while keeping fungicidal activity against *Cryptococcus neoformans*. The efficacy of continuous infusion in this high-mortality condition could ensure additional studies and its use in other settings. Larger and comparative trials, against new lipid formulations and even novel antifungal agents, are necessary to further evaluate this treatment regimen.

Acknowledgements:

We would like to thank FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre for partial support of this study.

Potential conflict of interests: All authors : no conflicts

References

1. Jarvis, J.N. and T.S. Harrison, *HIV-associated cryptococcal meningitis*. *Aids*, 2007. **21**: 2119-29.
2. Pappalardo, M.C. and M.S. Melhem, *Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2003. **45**: 299-305.
3. Peleg, A.Y. and M.L. Woods, *Continuous and 4 h infusion of amphotericin B: a comparative study involving high-risk haematology patients*. *J Antimicrob Chemother*, 2004. **54**: 803-8.
4. Eriksson, U., B. Seifert, and A. Schaffner, *Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial*. *Bmj*, 2001. **322**: 579-82.
5. Imhof, A., R.B. Walter, and A. Schaffner, *Continuous infusion of escalated doses of amphotericin B deoxycholate: an open-label observational study*. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**:943-51.
6. Lewis, R.E. and N.P. Wiederhold, *The solubility ceiling: a rationale for continuous infusion amphotericin B therapy?* *Clin Infect Dis*, 2003. **37**:871-2.
7. Brouwer, A.E., et al., *Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial*. *Lancet*, 2004. **363**:1764-7.
8. Uehara, R.P., et al., *Continuous infusion of amphotericin B: preliminary experience at Faculdade de Medicina da Fundacao ABC*. *Sao Paulo Med J*, 2005. **123**:219-22.
9. Walsh, T.J., et al., *Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia*. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*. *N Engl J Med*, 1999. **340**:764-71.
10. Furrer, K., et al., *Nephrotoxicity of cyclosporine A and amphotericin B-deoxycholate as continuous infusion in allogeneic stem cell transplantation*. *Swiss Med Wkly*, 2002. **132**:316-20.
11. van der Horst, C.M., et al., *Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome*. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group*. *N Engl J Med*, 1997. **337**:15-21.
12. Brouwer, A.E., et al., *Baseline correlation and comparative kinetics of cerebrospinal fluid colony-forming unit counts and antigen titers in cryptococcal meningitis*. *J Infect Dis*, 2005. **192**:681-4.
13. Bicanic, T., et al., *Independent association between rate of clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients*. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**:702-9.
14. Deray, G., *Amphotericin B nephrotoxicity*. *J Antimicrob Chemother*, 2002. **49 Suppl 1**:37-41.

Table 1. Baseline characteristics and clinical outcome of patients with cryptococcal meningoencephalitis treated with continuous amphotericin B deoxycholate infusion

Age, median years (range)	37.5 (20-52)
Female sex, no.(%) of patients	1 (10%)
Baseline laboratory parameters, median value (range)	
ANC*, neutrophils/mm³	3095 (1420-5580)
Hemoglobin, g/dL	11.35 (8.7-14.4)
Platelet count, platelets x 10⁶/L	173,500(97,000-216,000)
Creatinine, mg/dL	0.61 (0.40-1.16)
Potassium, mEq/dL	3.75(3.20-4.60)
Sodium, mEq/dL	134(129-144)
Magnesium, mEq/dL	1.80(1.5-2.3)
CD4 count, CD4+/μL	41 (10-255)
Death, no. (%) of patients	
By week 2	1 (10%)
By week 12	1 (10%)

*ANC=Absolute neutrophil count.

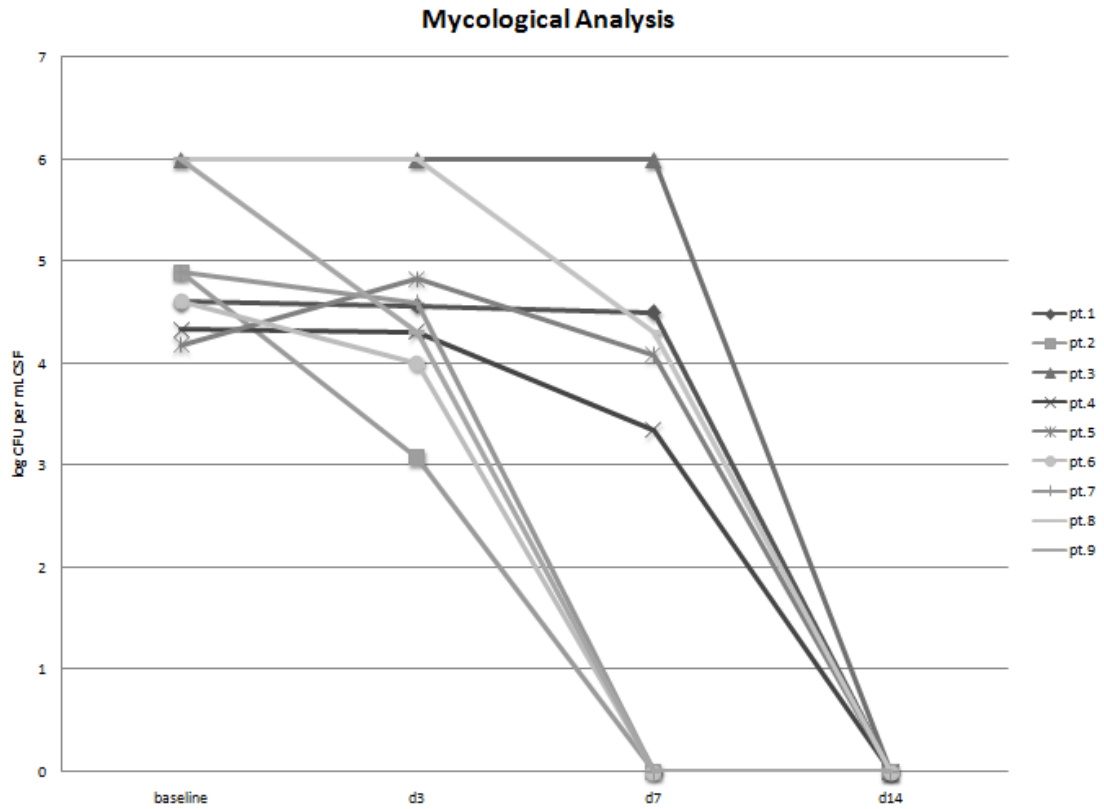


Figure 1. Cryptococcal colony-forming units (CFU) in cerebrospinal fluid, at baseline and days 3,7 and 14 of treatment with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate plus 5-flucytosine. Patient 10 was excluded from mycological analysis. EFA (early fungicidal activity) was -0.37 ± 0.05 log CFU/mL of CSF per day.

Table 2. Laboratory findings of patients with cryptococcal meningoencephalitis treated with continuous infusion of amphotericin B deoxycholate plus 5'flucytosine.

Time of treatment	Baseline	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15
Creatinine (mg/dL)	0.70±0.09	0.92±0.11	0.99±0.11	0.98±0.10	0.87±0.07	0.86±0.08
Potassium (mEq/L)	3.88±0.14	3.66±0.26	4.14±0.36	3.72±0.30	3.82±0.25	3.63±0.22
Magnesium (mEq/L)	1.94±0.12	1.9±0.09	1.9±0.11	1.86±0.11	1.64±0.09	1.7±0.06
Hemoglobin (g/dL)	11.49±0.6	10.29±0.62	8.69±0.49			7.92±0.41

Note. Data are mean ±standard error.

8. Considerações gerais

Este trabalho é a primeira experiência, a nível mundial, utilizando anfotericina B deoxicolato em infusão contínua como tratamento da criptococose. Utilizamos um modelo de doença altamente letal, e um acurado método de aferição de resposta microbiológica, o que pode permitir e incentivar o uso desta estratégia de tratamento em outros cenários. Tentamos promover um resgate da anfotericina B convencional que proporcione os mesmos benefícios das dispendiosas formulações lipídicas. Este é um estudo piloto e evidentemente o pequeno número de pacientes arrolados traduz-se em limitações, mas os resultados estão indicando que a infusão contínua parece ser segura e bem tolerada, como já foi reportado em outros estudos, no contexto de neutropenia febril e neoplasias hematológicas. Alguns diferenciais em nosso projeto são: todos pacientes com doença fúngica comprovada por cultura, imunidade celular severamente diminuída e ausência de drogas nefrotóxicas concomitantes. Como já mencionado acima, também a aferição da resposta microbiológica é um aspecto a ser destacado, já que permite uma avaliação mais objetiva da velocidade de resolução da infecção no sistema nervoso central.

O trabalho confirma a atividade antifúngica da anfotericina B deoxicolato por infusão contínua mais flucitosina. A resposta micológica observada foi notável. Foi demonstrada eficácia microbiológica com este regime de tratamento, utilizando-se um método estabelecido para aferir a redução da carga fúngica. Em relação a esterilização do líquido cefalorraquidiano, todos os pacientes atingiram-na em 14 dias de tratamento, como esperado em um regime convencional de anfotericina B mais deoxicolato. A resolução da infecção,

mensurado pela EFA (*Early Fungicidal Acitivity* ou atividade fungicida inicial) foi similar a outros estudos utilizando a mesma técnica. Esse desfecho é adequado para avaliação de novos tratamentos para esta doença, como relatado recentemente, e nossos resultados sugerem que esta nova forma de administração pode ser uma alternativa efetiva em locais onde as formulações lipídicas de anfotericina B estão indisponíveis. Entretanto, estudos maiores e comparativos, como planejamos conduzir em breve, são necessários para confirmar estes achados.

A diminuição do fluxo sanguíneo renal e a permeabilidade aumentada da membrana tubular são as causas estabelecidas atualmente para a nefrotoxicidade da anfotericina B deoxicolato. Embora definições de comprometimento renal podem variar bastante, a incidência pode chegar até 50%. Alterações dose-dependente na ligação às proteínas plasmáticas e na distribuição da anfotericina B deoxicolato podem explicar porque a nefrotoxicidade foi menor em pacientes que receberam anfotericina B deoxicolato em infusão contínua. Em nosso trabalho, a nefrotoxicidade observada foi comparável a estudos anteriores com infusão contínua de anfotericina B deoxicolato, e de certa forma similar ao observado nos ensaios clínicos com as formulações lipídicas de anfotericina B. Essa incidência de nefrotoxicidade é bem menor do que a observada nos trabalhos avaliando a administração convencional de anfotericina B deoxicolato, demonstrando vantagem em potencial com este regime (infusão contínua). A hipocalcemia e hipomagnesemia foram frequentemente observadas, como esperado. A infusão contínua pode proteger a função glomerular, mas parece ter pouco efeito no dano tubular. Anemia foi um fenômeno muito comum, atribuída a supressão da

produção de eritropoetina. Como esta supressão aparentemente não é dependente da distribuição da droga, mesmo com a infusão contínua continuará sendo um problema importante, particularmente em pacientes com HIV/AIDS que frequentemente recebem drogas mielotóxicas.

A alta mortalidade associada a esta condição e a toxicidade advinda do tratamento tornam a criptococose disseminada um desafio para o especialista em doenças infecciosas. Novos compostos têm o custo como um obstáculo importante para seu uso, especialmente nos locais onde esta doença fúngica é mais prevalente. O resgate da anfotericina B como uma droga segura, com a infusão contínua, pode revelar uma estratégia promissora para tratar outras micoses sistêmicas. Nossos resultados sugerem que a infusão contínua pode reduzir a nefrotoxicidade mantendo a eficácia microbiológica contra *Cryptococcus neoformans*. A efetividade da infusão contínua nessa entidade de alta mortalidade deve encorajar novos estudos e usos em outras situações. Estudos maiores e comparativos com as formulações lipídicas de anfotericina B, e até mesmo com novos agentes antifúngicos, são necessários para avaliar mais profundamente este regime inovador de tratamento.

9. Anexos

9.1 Instrumento de coleta de dados. (Ficha de exames)

Nome paciente/prontuário/hospital:

Idade:

Peso:

Data da inclusão do paciente(dia 0):

	Basal Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Leveduras no LCR																
Antígeno cripto LCR																
Antígeno cripto sérico																
Celularidade LCR																
Diferencial LCR																
Glicose LCR																
Proteínas LCR																
Hemoglobina																
Neutrófilos																
Plaquetas																
Sódio																
Potássio																
Magnésio																
Bicarbonato																
Creatinina																
Uréia																
DCE																
Imagem (CT/MRI)																
Cefaléia																
Alterações focais																
Glasgow																
Punção lombar alívio																
Febre																
Calafrios																
Flebite																

9.2 Termo de consentimento informado

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar da pesquisa sobre tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B contínua

Responsáveis: Dr. Luciano Z. Goldani (Fones: 32228910 - 21018152)

Dr. Diego Falci (Fones 33572348 - 34511773).

O senhor (ou seu familiar próximo) está com uma infecção que deve ser tratada com um medicamento chamado anfotericina B, que tem diversos efeitos colaterais. Entre os principais efeitos adversos da anfotericina B está a nefrotoxicidade – danos ao rim do paciente- que pode resultar em insuficiência renal. Além disso, durante a infusão do medicamento pode ocorrer uma reação aguda com febre, calafrios e tremores intensos. Esses e outros efeitos colaterais são frequentes em todos os pacientes que recebem a anfotericina B. Este medicamento tradicionalmente é administrada uma vez ao dia, em uma infusão que dura aproximadamente seis horas.

Várias pesquisas tem procurado descobrir uma maneira mais efetiva de tratamento desta doença, e diminuir a sua mortalidade. A anfotericina B ainda hoje parece ser o medicamento mais potente para o tratamento da criptococose. Foi pesquisada em pacientes a utilização da anfotericina B em infusão contínua – onde o paciente recebe ininterruptamente o medicamento na corrente sanguínea até completar a fase inicial do tratamento – e os resultados foram satisfatórios quanto a segurança deste método; não ocorreu aumento nos efeitos adversos relacionados ao tratamento com a anfotericina B. O tratamento com infusão contínua parece causar, por estas pesquisas preliminares, menos lesões no rim dos pacientes em terapia.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o uso da anfotericina B em infusão contínua em pacientes com criptococose em que esteja indicado o uso da anfotericina B. Serão verificados parâmetros de segurança como por exemplo a ocorrência de insuficiência renal e será medida diretamente e comparada a eficácia do tratamento, em relação ao uso convencional de anfotericina B. O presente consentimento foi oferecido a você por que existe esta indicação terapêutica para o seu tratamento (ou de seu familiar próximo), feita pela equipe médica que o está assistindo.

Concordando em participar do estudo, você será sorteado para realizar o tratamento da forma tradicional (infusão de 6 horas) ou para realizar o tratamento com infusão contínua (24 horas). No grupo que realizará o tratamento da maneira tradicional, serão realizadas infusões de 6 horas como usualmente é empregado no tratamento desta doença e você terá apenas o seu acompanhamento e exames registrados com os dados do estudo. No grupo do tratamento com infusão contínua, o medicamento será infundido de maneira contínua durante as 24 horas do dia, estratégia que estamos pesquisando no momento. Ambos os grupos serão monitorados através de exames laboratoriais e com a realização de punções lombares (para obtenção do líquido cefalorraquidiano) de controle, como está recomendado na rotina do manejo desta doença. Caso aceite participar, você será submetido ao mesmo acompanhamento médico e laboratorial normal de todos os pacientes. Seus dados de

exames serão incluídos anonimamente na pesquisa. Os riscos inerentes a pesquisa são os mesmos associados ao uso da anfotericina B; em quaisquer dos grupos, você estará sujeito a ocorrência dos efeitos adversos relacionados, tais como danos para o rim e reações agudas a infusão do medicamento. Mesmo aceitando participar do estudo, você poderá sair do mesmo a qualquer momento se desejar.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e/ou coerção, a respeito dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido. Também fui informado dos riscos, desconfortos e benefícios da minha participação, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber respostas ou esclarecimento sobre qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros detalhes relacionados com a pesquisa;

- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;

- da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;

- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade em continuar participando;

- de que o estudo presta-se a testar uma nova forma de administração do medicamento e não um novo medicamento.

- de que todos os medicamentos utilizados já foram liberados para uso em pacientes pelas autoridades competentes;

- de que se existirem gastos adicionais, relacionados a pesquisa, estes serão absorvidos pelo orçamento da mesma.

O pesquisador responsável por este Projeto de Pesquisa é o Dr. Luciano Goldani; em caso de dúvidas o senhor poderá entrar em contato com o Dr. Diego Falci (fone 3451-1773, cel. 9299-2946). Tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 04/04/2007.

Data ___/___/_____

nome

nome

assinatura do paciente

assinatura do responsável pela
obtenção do consentimento

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou seu Responsável Legal e outra com o Pesquisador Responsável.