

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

**Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do
Antifúngico Voriconazol**

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO

PORTO ALEGRE, 2008.

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

Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol

Tese apresentada por **Bibiana Verlindo de
Araujo** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Teresa C. T. Dalla Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.03.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

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

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sydney Hartz Alvez
Universidade Federal de Santa Maria

A663 m Araujo, Bibiana Verlindo de

Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do antifúngico voriconazol / Bibiana Verlindo de Araujo – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xx, 181 p:il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Modelagem PK-PD. 2. Candidíase disseminada. 3. Microdiálise renal. 4. Penetração tecidual de antifúngicos. 5. Voriconazol. I. Dalla Costa, Teresa C. T. II. Título

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecárias responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036
Cláudia da Silva Gonçalves, CRB 10/1012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na Cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Dedico este trabalho ao Francisco, com amor.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer a Profa. Teresa Dalla Costa por toda sua orientação durante a execução deste trabalho, o seu exemplo de profissionalismo e competência inspiraram grande parte das minhas escolhas e interesse pela vida acadêmica;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de desenvolver este trabalho de tese;

A Srta. Sandra Elisa Haas pela sua colaboração incansável no desenvolvimento da parte experimental desta tese e pelos momentos de aprendizado, discussão e divertimento nos últimos quatro anos, sem sua ajuda o caminho teria sido bem mais difícil;

Ao todos que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento das várias etapas deste trabalho na Faculdade de Farmácia da UFRGS, especialmente os amigos e os colegas que encontrei no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos.

À minha família por toda a torcida, cuidado e apoio neste período, em especial a minha sogra, que me acolheu em sua casa, dando total suporte neste período.

Ao meu marido Francisco Airton Batista por ter compreendido minhas ausências e estar sempre ao meu lado, apesar das distâncias físicas que nos separam nesses quatro anos.

Sumário

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Resumo	xvii
Abstract.....	xix
Capítulo 1: Introdução	1
Capítulo 2: Revisão	7
2.1 Problemática das infecções fúngicas associadas a leveduras do gênero <i>Candida</i>	9
2.2 Testes de suscetibilidade a agentes antifúngicos triazólicos contra leveduras	11
2.3 Modelos de Avaliação Farmacodinâmica.....	13
2.3.1 Modelos <i>in vitro</i>	13
2.3.2 Modelos <i>in vivo</i>	14
2.4 Índices Farmacocinéticos e Farmacodinâmicos (PK/PD) Aplicados a Antifúngicos....	16
2.5 Voriconazol.....	20
2.5.1 Características Químicas.....	20
2.5.2 Propriedades Farmacodinâmicas	21
2.5.3 Propriedades Farmacocinéticas.....	25
2.6 Microdiálise	31
2.6.1 Fluxo líquido zero (FLZ)	34
2.6.2 Retrodiálise	35
2.6.3 Microdiálise em tecido renal.....	37
2.7 Modelagem PK-PD.....	38

2.8 Referências.....	41
Capítulo 3: Experimental disseminated candidiasis induced by <i>albicans</i> and <i>non-albicans</i> species in Wistar rats	49
Capítulo 4: Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma	67
Capítulo 5: Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for moderate lipophilic drug	75
Capítulo 6: Modeling of voriconazole non-linear pharmacokinetics and oral bioavailability determination in Wistar rats.....	101
Capítulo 7: Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and <i>Candida sp.</i> infected Wistar rats.....	125
Capítulo 8: Modelagem PK-PD do efeito fungistático do voriconazol contra <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	155
Capítulo 9: Considerações Finais.....	171

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Efeito pós-antifúngico (PAFE) dos principais agentes antifúngicos de uso sistêmico frente a <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Candida albicans</i>	18
Tabela 2.2 Principais características farmacodinâmicas do voriconazol.....	23
Tabela 2.3 Atividade <i>in vitro</i> do VRC contra diferentes espécies de <i>Candida</i>	24
Tabela 2.4 Comparação entre a atividade <i>in vitro</i> de diferentes antifúngicos contra espécies de <i>Candida</i>	25
Tabela 2.5 Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em diversas espécies animais.....	26
Tabela 2.6 Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em humanos saudáveis.....	30
Tabela 2.7 Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos de humanos imunocomprometidos e saudáveis.....	31
Tabela 3.1 Degree of weight loss or gain observed in different experimental groups of Wistar rats infected by <i>Candida sp</i> after 2 and 7 days of infection, expressed as perceptual variation of total weight regarding to the day of inoculation.....	56
Tabela 3.2. Total yeast count in the kidney evaluated 2 and 7 days post-infection for immunocompetent and immunocompromised Wistar rats infected with <i>C. albicans</i> and <i>non-albicans</i> strains.....	58
Tabela 4.1 Calibration curve parameters and statistics for VRC in rat plasma.....	72
Tabela 4.2 Intra and interday variation of voriconazole in rat plasma.....	73
Tabela 4.3 Accuracy for the analysis of voriconazole in rat plasma	73
Tabela 5.1 Results of <i>in vitro</i> voriconazole binding experiments after perfusion of tubing with a at different perfusion rates. Three samples were	

collected from each tubing at each flow rate.....	91
Tabela 5.2 VRC pharmacokinetic parameters determined after oral administration of 40 or 60 mg/kg to Wistar rats	92
Tabela 6.1 VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a linear three-compartment open model after i.v. bolus administration of 2.5 mg/kg.....	113
Tabela 6.2 Pharmacokinetic and statistical parameters obtained by fitting VRC mean plasma profiles, obtained in anesthetized Wistar rats after i.v. bolus administration of 5 and 10 mg/kg doses, to different pharmacokinetic models.....	114
Tabela 6.3 VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a three compartment model with <i>Michaelis-Menten</i> elimination after i.v. bolus administration of 5 and 10 mg/kg doses to anesthetized rats.....	117
Tabela 6.4 VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a one compartment model with first order absorption and <i>Michaelis-Menten</i> elimination after oral administration of 40 mg/kg doses to anesthetized rats.....	119
Tabela 7.1 Voriconazole pharmacokinetic parameters determined by fitting plasma profiles of healthy and infected Wistar rats after oral administration of 40 and 60 mg/kg.....	136
Tabela 8.1. Parâmetros da modelagem PK/PD do voriconazol contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	166
Tabela 8.2. Parâmetros da modelagem PK/PD do voriconazol contra <i>C. krusei</i> ATCC 6258.....	167

Lista de Figuras

Figura 2.1. Presença de leveduras do gênero <i>Candida</i> e taxas de mortalidade associadas às infecções nosocomiais nos EUA.....	10
Figura 2.2. Índices Farmacodinâmicos/Farmacocinéticos empregados na avaliação de eficácia de antimicrobianos.....	17
Figura 2.3 Estrutura química do voriconazol, antifúngico triazólico.....	20
Figura 2.4 Modificações estruturais no fluconazol que originaram o voriconazol.....	21
Figura 2.5 Atividade fungicida e fungistática do voriconazol contra <i>Aspergillus fumigatus</i> (a) e <i>Candida albicans</i> (b) mostrada por estudos de morte em função do tempo (<i>time-kill studies</i>).....	22
Figura 2.6 Perfil de concentração plasmática de voriconazol em função do tempo em ratos machos e fêmeas para a dose de 30 mg/kg.....	27
Figura 2.7 Perfis de concentração plasmática do voriconazol para administração i.v. por infusão contínua de 1 hora, nas doses de 3, 4 e 5 mg/kg e oral em humano saudáveis.....	28
Figura 2.8 Aumento desproporcional da área sob a curva de concentração por tempo em relação à dose observado para o voriconazol após administração de dose múltipla iv e oral.....	29
Figura 2.9 Esquema de transporte na sonda de microdiálise.....	32
Figura 2.10 Esquema para determinação das taxas de recuperação <i>in vitro</i> por diálise e retrodiálise.....	33
Figura 2.11 Gráfico que permite a análise da taxa de recuperação pelo fluxo líquido zero.....	36
Figura 3.1 Histological findings in kidney tissues infected with different <i>Candida</i> strains, stained with HE.....	60
Figura 4.1 Chemical structure of voriconazole and the internal standard ketoconazole, and fragment ions formatted from protonated	

molecules.....	70
Figura 4.2 Representative total ion chromatograms in MRM-ESI ⁺ mode in rat plasma:blank plasma, plasma spiked with VRC and IS, plasma spiked with VRC and IS, plasma sample 6 h post-administration of 2.5 mg/kg i.v. VRC with IS (400 ng/mL). The following m/z ratios were monitored 351 >281.5 for VRC and 531.5 >82.5 for IS. The retention times observed were: I.S. – 2.7 min and VRC – 3.3 min.....	71
Figure 4.3 Mean plasma concentration-time of VRC after single intravenous dose of 2.5mg/kg to male Wistar rats.....	73
Figure 5.1 Concentration effect on VCR relative recovery by dialysis and retrodialysis.....	89
Figure 5.2 Recoveries determined by dialysis and retrodialysis for different flow rates.....	90
Figure 5.3 <i>In vitro</i> apparent recoveries determined experimentally, and the values modeled by eq. 5 using mean value of K_d (0.122 mm ² /min) and K_b (0.00104 mm ² /min) are described by solid line (-). Real recoveries, assuming no binding to the microdialysis device are shown by hatched line (--)......	93
Figura 5.4 Total plasma and free kidney levels of voriconazole after oral administration of 40 and 60 mg/kg to healthy Wistar male rats.....	99
Figura 6.1 Mean plasma profile after <i>i.v. bolus</i> administration of 2.5 mg/kg of VRC.....	113
Figura 6.2 Mean VRC plasma profile after <i>i.v. bolus</i> administration of 5 mg/kg to anesthetized Wistar rats modeled with equations 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) and 6 (E). See text for models explanation.....	115
Figura 6.3 Mean VRC plasma profile after <i>i.v. bolus</i> administration of 10 mg/kg to Wistar anesthetized Wistar rats modeled with equations 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) and 6 (E). See text for models explanation.....	118
Figura 6.4 Simultaneous fitting of mean plasma profiles after <i>i.v.</i> and oral administration of VRC 10 and 40 mg/kg, respectively, to anesthetized Wistar rats.....	121
Figure 7.1 Mean concentration-time profiles of voriconazole in total plasma and free kidney determined by microdialysis in healthy (panels A and D) and infected Wistar rats by <i>Candida albicans</i> (panels B and E) o.r	

Candida krusei (panels C and F) after administration of a single oral dosage of 40 mg/kg (left panels) or 60 mg/kg (right panels).....	137
Figura 8.1 Perfis de concentração livre tecidual do VRC simulados nos experimentos de infecção <i>in vitro</i> . Doses de 200 mg, 300 mg, 2 mg/kg e 4 mg/kg.....	168
Figura 8.2 Perfil de inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 induzido por voriconazol após administração das doses de 200 mg 300 mg, 2 mg/kg e 4 mg/kg.....	169
Figura 8.3 Perfil de inibição do crescimento de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 induzido por voriconazol após administração das doses de 200 mg, 300 mg, 2 mg/kg e 4 mg/kg.....	170

Resumo

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD) para descrever o efeito antifúngico voriconazol (VRC) contra espécies de *Candida*. **Método:** Para alcançar este objetivo as seguintes etapas foram realizadas: i) foi adaptado e padronizado modelo de candidíase disseminada em ratos Wistar imunocompetentes e imunocomprometidos com *Candida sp.*; ii) foram validados métodos analíticos de LC-MS/MS e LC-UV para o doseamento do VRC em amostras de plasma e microdialisado de tecido; iii) foram estabelecidas as condições para microdialise do VRC e as taxas de recuperação *in vitro*, por perda e ganho, e em tecido renal *in vivo*, por retrodialise, foram determinadas; iv) foi avaliada a PK não-linear do VRC após administração i.v. *bolus* das doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg e a biodisponibilidade oral foi determinada em roedores; v) a penetração renal do VRC após administração oral das doses de 40 e 60 mg/kg foi determinada em ratos Wistar saudáveis e infectados com *C. albicans* ou *C. krusei*; e (vi) o perfil fungistático do VRC contra *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado utilizando modelo de infecção experimental *in vitro* onde foram simuladas as concentrações livres renais do VRC esperadas em humanos após administração oral e i.v. de diferentes posologias. Os dados de cinética e dinâmica obtidos foram modelados com equação de Emax modificada, com auxílio do Scientist[®]. **Resultados e Conclusões:** i) O modelo de candidíase disseminada foi adaptado com sucesso para ratos Wistar. *C. albicans* apresentou maior virulência com Log UFC/g de tecido renal de $5,51 \pm 0,56$ e $7,29 \pm 0,26$, após 2 e 7 dias de infecção em animais imunocompetentes, respectivamente. Em animais imunocomprometidos a contagem foi de $6,43 \pm 0,59$ Log UFC/g após 2 dias de infecção, com morte de todo o grupo dentro de 4 dias. As espécies não-*albicans* (*C. krusei* e *C. glabrata*) apresentaram um perfil de infecção semelhante em animais imunocompetentes (Log UFC/g = $2,98 \pm 0,27$ para *C. krusei* e $2,48 \pm 0,46$ para *C. glabrata*). Entretanto, nos animais imunocomprometidos, *C. krusei* promoveu morte de todo o grupo em até 7 dias, enquanto *C. glabrata* causou apenas um aumento no grau de infecção (Log UFC/g = $6,98 \pm 0,48$). ii) Os métodos analíticos por LC-UV e LC-MS/MS para quantificação do VRC foram validados. As curvas de calibração foram lineares na faixa de 50 a 2500 ng/mL ($r > 0,98$) para ambos os métodos. Os ensaios de precisão intra e

inter-dia foram > 94,9 e 95,8 %, para microdialisado por HPLC-UV e > 87,5 e 92,3 % para LC-MS/MS em plasma, respectivamente. A exatidão foi > 89,1 % para HPLC-UV e > 88,4 % para LC-MS/MS. iii) A avaliação do VRC por microdiálise mostrou que a recuperação é concentração independente (0,1–2,0 µg/mL). O VRC entretanto, devido a sua moderada lipofilia, liga-se às tubulações do sistema de microdiálise, gerando diferenças entre a recuperação determinada pelo método de perda (retrodiálise) e de ganho (diálise) *in vitro*, as quais puderam ser corrigidas após o cálculo do coeficiente de ligação do fármaco ao sistema. A recuperação *in vivo* após correção da ligação ao sistema foi de $24,5 \pm 2,8$ % iv) A análise dos perfis de plasmáticos do VRC obtidos em ratos Wistar após administração oral mostrou comportamento não-linear, compatível com saturação de eliminação. A avaliação compartimental dos perfis i.v. de diferentes doses, utilizando modelo de três compartimentos com eliminação de *Michaelis-Menten*, permitiu a determinação da constante de *Michaelis* (K_M) de 0,58 µg/mL e da velocidade máxima da eliminação (V_M) de 2,63 µg/h, em média. A modelagem simultânea dos dados plasmáticos (40 mg/kg) e i.v. (10 mg/kg) permitiu a determinação da biodisponibilidade oral do VRC em ratos, que foi de 82,8%. v) A fração de penetração renal do VRC, determinada por microdiálise em ratos sadios e infectados, foi de $0,34 \pm 0,01$, similar a fração livre do fármaco no plasma (0,34), indicando que as concentrações livres renais de VRC são semelhantes às concentrações livres plasmáticas e que as mesmas não se modificam devido a infecções causadas por *Candida sp.* vi) Os parâmetros da modelagem PK/PD do efeito do VRC contra espécies de *Candida* em modelo de infecção experimental *in vitro* obtidos foram: CE_{50} de 2,96 µg/mL e $K_{max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$ para *C. albicans* e CE_{50} de 3,47 µg/mL e $K_{max} = 0,51 \text{ h}^{-1}$ para *C. krusei*. Houve diferença estatística apenas no K_{max} para as duas espécies ($\alpha = 0,05$) indicando uma maior suscetibilidade da *C. krusei* ao VRC. O modelo PK/PD de E_{max} modificado utilizado foi capaz de descrever adequadamente os perfis de inibição do crescimento de *Candida sp* em função do tempo, para todos os regimes terapêuticos do VRC avaliados, podendo ser usado para otimização da terapia com esse fármaco.

Palavras-Chave: Voriconazol, Modelagem PK/PD, Candidíase disseminada, Microdiálise renal, Penetração tecidual de antifúngicos.

Abstract

Objectives: The aim of this work was the development of a pharmacokinetic-pharmacodynamic model (PK/PD) to describe the fungistatic effect of voriconazole (VRC) against *Candida* species. **Method:** To reach this objective, the following steps were done: i) a disseminated candidiasis model to immunocompetent and immunocompromised Wistar rats with *Candida sp* was adapted and standardized; ii) analytical methods of LC-MS/MS and LC-UV for measurement of VRC in plasma and microdialysate tissue samples were validated; iii) microdialysis conditions of VRC and the recoveries rate *in vitro*, by loss and gain, in renal tissue *in vivo*, by retrodialysis, were determined; iv) the non-linear PK of VRC after i.v. bolus administration of 2.5, 5 e 10 mg/kg doses were evaluated and the oral bioavailability in rodents was estimated; v) tissue penetration of VRC after oral administration of 40 and 60 mg/kg was determined in healthy and infected by *C. albicans* or *C. krusei* Wistar male rats; vi) the fungistatic profile of VRC against *C. albicans* and *C. krusei* was determined using a experimental infection model *in vitro*, where the free renal concentrations of VRC expected in humans after oral and iv administration of different dosing regimens were simulated. The kinetic and dynamic data obtained were modeled using an Emax modified model, with aid of Scientist[®]. **Results and Conclusions:** i) The disseminated candidiasis model was successfully adapted to Wistar rats. *C. albicans* showing high virulence with Log CFU/g of renal tissue of 5.51 ± 0.56 and 7.29 ± 0.26 , after 2 and 7 days of infection in immunocompetent animals, respectively. In immunocompromised animals, the counting was 6.43 ± 0.59 Log CFU/g after 2 days of infection, with whole group death within 4 days. *Non-albicans* especies (*C. krusei* e *C. glabrata*) showed a similar infection profile in immunocompetent and immunocompromised animals (Log CFU/g = 2.98 ± 0.27 to *C. krusei* e 2.48 ± 0.46 to *C. glabrata*). However, in immunocompromised animals, *C. krusei* causes death in the whole group up to 7 days, instead, *C. glabrata* causes only a low increase in the infection degree (Log CFU/g = 6.98 ± 0.48). ii) The analytical methods of HPLC-UV and LC-MS/MS to VRC quantification were validated. Linearity was between 50 - 2500 range ng/mL ($r > 0.98$) for both methods. The intra and inter-day precision assays were > 94.9 e 95.8 %, for microdialysate using LC-UV and > 87.5 e 92.3 % using LC-

MS/MS for plasma, respectively. The accuracy was $> 89.1\%$ for HPLC-UV and $> 88.4\%$ for LC-MS/MS. iii) The evaluation of VRC by microdialysis showed that recovery is concentration independent ($0.1\text{--}2\ \mu\text{g/mL}$). VRC, however, due to its moderate lipophilic characteristic, binds to the microdialysis system tubing's, generating differences between recoveries determined by loss (retrodialysis) and gain (dialysis) *in vitro* methods, which could be corrected after determination of drug's binding coefficient to the system. The *in vivo* recovery determined after correction of system binding was $24.5 \pm 2.8\%$. iv) VRC plasma profiles analysis obtained from Wistar rats after oral administration showed a non-linear behavior, compatible with saturable elimination. The compartmental evaluation of i.v. profiles in different doses, employing the a compartment model with *Michaelis-Menten elimination*, allowed to determine the *Michaelis-Menten* constant (K_M) of $0.58\ \mu\text{g/mL}$ and the maximum velocity (V_M) of $2.63\ \mu\text{g/h}$, in average. The simultaneous modeling of oral ($40\ \text{mg/kg}$) and iv ($10\ \text{mg/kg}$) plasma data allowed the determination of the oral bioavailability of VRC in rats, equal to 82.8% . v) The VRC renal penetration fraction, determined by microdialysis in healthy and infected rats, was 0.34 ± 0.01 , similar to the free unbound fraction in plasma (0.34), showing that VRC free renal concentration levels are similar to the unbound plasma concentrations and that did not change due the infection associated to *Candida sp.* vi) The parameters of PK-PD modeling of VRC effect against *Candida* species in the *in vitro* experimental infection model obtained were: EC_{50} de $2.97\ \mu\text{g/mL}$ and $K_{\max} = 0.203\ \text{h}^{-1}$ to *C. albicans* and EC_{50} of $3.47\ \mu\text{g/mL}$ and $K_{\max} = 0.51\ \text{h}^{-1}$ to *C. krusei*. There is a statistical difference only in K_{\max} value for the two species ($\alpha = 0.05$), showing a higher susceptibility of *C. krusei* to VRC. The PK/PD E_{\max} modified model employed was able to describe adequately the growth inhibition profiles of *Candida sp* in function of time, for all VRC dosing regimens evaluated, and can be used for therapy optimization with this drug.

Key-Words: Voriconazole, PK/PD Modeling, Disseminated Candidiasis, Renal Microdialysis, Tissue penetration of antifungal agents.

As intervenções farmacológicas envolvendo antifúngicos, por muitos anos, não receberam um tratamento mais criterioso como o despendido aos antimicrobianos, em virtude de sua baixa incidência e da morbi-mortalidade relacionada a essas infecções (KLEPSEK e LEWIS, 2002).

Nas duas últimas décadas, entretanto, este panorama tem se modificado e os estudos sobre as infecções fúngicas e suas possibilidades de tratamento foram alvo de inúmeras investigações, como reflexo do aumento da importância clínica destas doenças, associadas ao surgimento de fatores de risco, como o Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV), o prolongamento de tratamentos com quimioterápicos e o uso de medicamentos imunossupressores para o tratamento de doenças auto-imunes (MAHMMOUD e RICE, 1999; SOBEL, 2002).

Na revisão sobre infecções fúngicas, espécies de *Candida* têm sido apontadas como a quarta principal causa de infecções sépticas em paciente imunocomprometidos nos Estados Unidos, com uma taxa de letalidade em torno de 40 % (EDMOND *et al.*, 1999).

Inúmeros fatores contribuem para a dificuldade do tratamento das micoses profundas, entre eles pode-se apontar: as limitações do arsenal terapêutico, que por muitos anos contou apenas com a anfotericina B (TAVARES, 1996); as características físico-químicas das substâncias, que precisam ser altamente lipossolúveis para penetrar a parede do fungo; as propriedades farmacocinéticas, especialmente relacionadas a questões de metabolismo e toxicidade (SILVA, 2000); e as propriedades farmacodinâmicas, uma vez que as diferenças citológicas entre as células eucarióticas dos fungos e a dos hospedeiros são pequenas (TAVARES, 1996).

Algumas dessas limitações já foram superadas com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos derivados triazólicos como o voriconazol (VRC), ravuconazol e posaconazol (LUMBRERAS *et al.*, 2003) e a introdução de formas lipossomais de anfotericina B, que permitiram uma maior penetração desses agentes na parede fúngica e a redução de sua dose (CARRILO-MUNÓZ *et al.*, 2001).

Entre os novos agentes triazólicos, o VRC foi o primeiro fármaco da classe a ter seu uso aprovado em humanos no Brasil. As modificações estruturais que o geraram a partir do fluconazol, permitiram um aumento do espectro de ação e uma

melhor distribuição tecidual, especialmente importante para o tratamento de candidíase disseminada e aspergilose (LEVEQUE *et al.*, 2006).

Um dos mais surpreendentes aspectos relacionados à terapia com antifúngicos, entretanto, é a falta de consenso quanto ao estabelecimento dos parâmetros norteadores das posologias utilizadas. Um exemplo disso é a anfotericina B, para a qual não estão definidas as estratégias de otimização de dosagem, apesar dos 40 anos de uso clínico (KLEPSEK e LEWIS, 2002). Em parte, isto está relacionado ao fato de que, até 1980, a anfotericina B, era o único agente antifúngico disponível para os tratamentos de micoses sistêmicas. Desta forma, os testes de suscetibilidade a antifúngicos não eram praticados (KLEPSEK e LEWIS, 2002). Apenas no final da década de 90, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) aprovou métodos padronizados de suscetibilidade a antifúngicos.

Neste contexto, a Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica (PK/PD) surge como uma abordagem inovadora para auxiliar na determinação da posologia de antifúngicos. Estes modelos são aplicados na simulação e previsão de efeito, assim como na otimização de posologias para diversos fármacos, através da combinação de parâmetros farmacocinéticos e propriedades farmacodinâmicas (CSAIKA e VEROTTA, 2006), que permitem uma correlação matemática entre os elementos da tríade concentração efetiva do fármaco, efeito farmacológico e tempo.

Para que o modelo PK-PD seja desenvolvido, realizam-se estudos de avaliação do perfil farmacocinético (PK) do fármaco, administrando-se diferentes posologias e monitorando-se as concentrações plasmáticas obtidas e, muitas vezes, as concentrações livres no plasma ou no local de ação. Paralelamente, procede-se a avaliação farmacodinâmica em função do tempo (PD), após a utilização de diferentes posologias, em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, para determinar o efeito obtido devido à variação de concentração do fármaco em estudo na biofase. De posse dos dados de PK e PD, busca-se uma correlação matemática entre os mesmos, de modo que o modelo desenvolvido possa servir para otimizar a utilização terapêutica do fármaco.

Uma das vantagens do desenvolvimento de modelos PK/PD para antifúngicos é o fato de que o efeito a ser avaliado é a morte do microrganismo. Dessa forma, a

avaliação da eficácia pode ser realizada através da contagem de células viáveis no meio de cultura (*in vitro*) após a exposição ao fármaco em estudo.

Modelos PK/PD similares já foram desenvolvidos (NOLTING *et al.*, 1996) e empregados com sucesso na avaliação de antimicrobianos β -lactâmicos (DALLA COSTA *et al.*, 1998; ARAUJO, 2002) e quinolonas (DELACHER *et al.*, 2000; PALMA, 2003).

Considerando o exposto, este estudo pretendeu dar continuidade à linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida neste Programa de Pós-Graduação, através da investigação PK e PD do VRC em diferentes posologias, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* apropriados, e do estabelecimento de modelo PK/PD para o referido fármaco.

O objetivo geral deste trabalho de tese foi o desenvolvimento de um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) para o antifúngico voriconazol, através do estabelecimento da relação matemática entre o efeito farmacodinâmico de morte fúngica (PD) gerado pelas concentrações livres renais (biofase).

Os objetivos específicos deste trabalho de tese foram:

- Adaptar o modelo de infecção experimental *in vivo* de candidíase disseminada em camundongos à ratos Wistar;
- Adaptar e validar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), com detecção por espectrometria de massa e ultravioleta, para doseamento do voriconazol em plasma, dialisado de tecido e caldo de cultura;
- Determinar as condições experimentais e a recuperação das sondas de microdialise *in vitro* e *in vivo* para o voriconazol, em tecido renal de ratos;
- Avaliar a farmacocinética plasmática do voriconazol nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg administrado intravenosos em ratos anestesiados;
- Determinar as concentrações plasmáticas totais de voriconazol em ratos sadios e em ratos infectados com diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*) e as concentrações livres renais, através de microdialise, após a administração por via oral das doses de 40 mg/kg e 60 mg/kg do fármaco;

- Desenvolver modelo de infecção experimental *in vitro* para as espécies de *C. albicans* e *C. krusei* baseado nas normas M27-A2 previstas pelo CLSI/02, para testes de suscetibilidade de leveduras;
- Utilizar o modelo de candidíase *in vitro*, desenvolvido para avaliar o efeito das concentrações livres renais de diferentes posologias do voriconazol sobre as leveduras investigadas;
- Modelar o efeito antifúngico do voriconazol versus tempo utilizando modelo PK/PD apropriado.

Os resultados do trabalho estão apresentados nos capítulos seguintes, redigidos na forma de artigos publicados ou submetidos para publicação.

2.1 Problemática das infecções fúngicas associadas a leveduras do gênero

Candida

As infecções associadas ao gênero *Candida* envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma diversidade de fatores de risco, em especial, o uso de cateteres intravasculares, a terapia com antineoplásicos e imunossupressores e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (PASQUALOTTO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos estas infecções tem tido sua prevalência aumentada, principalmente nos ambiente hospitalar. Estudos recentes conduzidos por Colombo e Guimarães (2003) apontam que 80 % das infecções fúngicas relatadas em hospitais terciários são causadas por *Candida sp.*, o que representa um grande desafio aos clínicos, devido às dificuldades terapêuticas associadas ao tratamento com antifúngicos.

Em geral estas infecções se instalam após uma redução no mecanismo de defesa do hospedeiro, decorrentes de fatores fisiológicos (prematuidade), patológicos (imunodeficiências congênitas ou adquiridas, doenças neoplásicas) ou ainda induzidos (uso de medicamentos imunossupressores).

O comportamento patogênico da *Candida* deve-se principalmente a sua elevada biodiversidade fenotípica. Modificações ambientais mínimas podem alterar seu comportamento mediante o desenvolvimento de novas e amplificadas propriedades, como a formação de tubos germinativos, adesão e secreção de proteases e fosfolipases, entre outras. Estas novas propriedades invasivas associadas às alterações no sistema imune do hospedeiro provocam o comportamento oportunista da levedura (ROMANI *et al.*, 2003). Apesar de qualquer órgão poder ser afetado, os rins são os mais freqüentemente envolvidos (WU *et al.*, 2004). Por razões desconhecidas, a *Candida sp.* tem predileção pelos rins e este órgão pode ser severamente lesado, resultando em falência renal.

É justamente nestes casos, que ocorre o maior risco de mortalidade associado a estas infecções, quando *Candida sp.* pode comprometer as vísceras como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

Barberino e colaboradores (2006) sugerem que a candidíase hematogênica seria uma conseqüência natural do progresso médico, uma vez que estas infecções fúngicas invasivas tiveram sua prevalência aumentada com o aumento do número de pacientes de alto risco, com diferentes graus de imunossupressão, presentes no ambiente hospitalar. À medida que estes pacientes tiveram sua expectativa de vida aumentada em função das novas terapias para o câncer e tratamento do HIV, desenvolvimento de técnicas de transplante de órgãos e, ainda, o surgimento dos antibióticos de amplo espectro, houve paralelamente um crescimento no número de infecções fúngicas sistêmicas.

O principal problema do tratamento da candidíase hematogênica diz respeito ao arsenal terapêutico para o tratamento desta infecção.

Desta forma, desde 1998 o tratamento farmacológico recomendado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas para candidíase sistêmica é a anfotericina B lipossomal e o fluconazol. Estes fármacos, embora sejam eficazes para o tratamento de candidemias causadas por *C. albicans*, apresentam baixa atividade sobre espécies não-albicans, naturalmente resistentes aos azólicos, como é o caso da *C. krusei*, que começavam a aumentar de importância no começo dos anos 90 (CHANDRASEKAR, 2005). Como conseqüência houve o aumento das taxas de mortalidade associadas à candidíase disseminada, que hoje são em torno de 40 % (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003) e variam conforme a espécie, como pode ser observado na Figura 1.

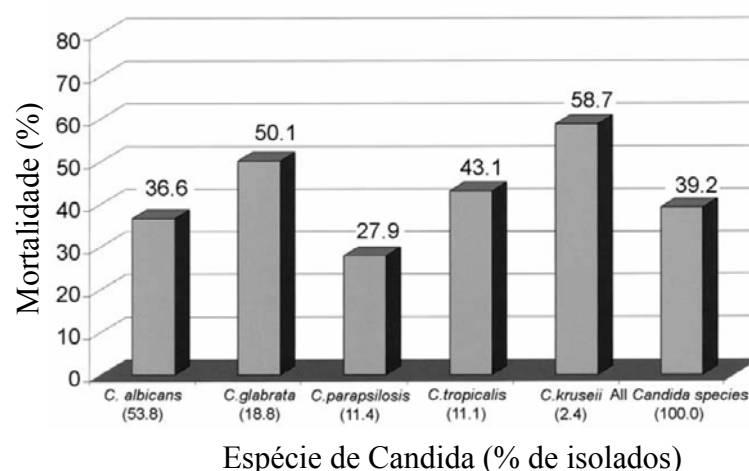


Figura 1. Presença de leveduras do gênero *Candida* e taxas de mortalidade associadas às infecções nosocomiais nos EUA (Adaptado de Wisplinghoff *et al*, 2004).

Na Figura 1 observa-se que *Candida krusei* é a espécie associada a maior taxa de mortalidade em infecções nosocomiais nos EUA, seguida de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Um panorama bem diferenciado do observado até os anos 80, quando *Candida albicans* era a espécie mais prevalente.

Essa mudança de comportamento na epidemiologia deve-se principalmente a dificuldades no tratamento, uma vez que estas espécies são frequentemente resistentes aos azólicos.

Algumas estratégias estão sendo desenvolvidas no sentido de melhorar o tratamento das micoses sistêmicas. Entre elas está o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, como o voriconazol e, ainda, a padronização dos ensaios de suscetibilidade a antifúngicos que serão discutidos a seguir.

2.2 Testes de suscetibilidade a agentes antifúngicos triazólicos contra leveduras

Nas duas últimas décadas, o aumento de infecções fúngicas oportunistas acompanhadas por crescentes relatos de resistência a antifúngicos, tornou necessário o desenvolvimento de um teste de suscetibilidade que fosse reprodutível, permitisse correlações com a clínica e identificasse cepas resistentes (PFALLER *et al.*, 1996).

Desta forma, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicou em 1997, um método referência para testes *in vitro* de 5 agentes antifúngicos sistêmicos, voltados para *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans*. O CLSI publicou esta metodologia sob a forma de um documento, o M27-A, o qual descreve os métodos de macro e microdiluição, utilizando um meio de cultura definido. Para antifúngicos azólicos foi preconizado o uso da técnica de microdiluição com o caldo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), tamponados com MOPS (Ácido 2-(N-morfolino)-propanossulfônico), pH 7,0. Este método tem demonstrado boa reprodutibilidade, possibilitado uma correlação entre resultados *in vitro* e a resposta clínica para alguns antifúngicos (ALLER *et al.*, 2000).

Recentemente, esta norma foi atualizada, recebendo a denominação M27-A2 (CLSI, 2002), e incluiu os novos triazólicos (ravuconazol, voriconazol e posaconazol) no grupo de fármacos para teste.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para testes realizados com antifúngicos azólicos, no entanto, pode se tornar problemática, devido ao fenômeno denominado *trailing*. Este termo é empregado para descrever o tênue crescimento persistente que alguns isolados de *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans* exibem acima da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O fenômeno é resultado do crescimento celular que ocorre em um período anterior à ação do fármaco (ESPINEL-INGROFF, 2000). A redução do pH do meio de cultura RPMI-1640 de 7,0 para 5,0 resolve o problema do *trailing* sem alterar os valores das CIMs para o fluconazol (MARR *et al.*, 1999).

Outra limitação do método proposto pelo CLSI é a sua inadequação aos testes de suscetibilidade à anfotericina B, pois os resultados tendem a ficar muito próximos, dificultando a definição dos *breakpoints*. Isso pode dificultar a detecção de mecanismo de resistência do *C. neoformans* a este antibiótico poliênico (PFALLER *et al.*, 1996).

Como alternativa para solucionar estes problemas alguns estudos demonstram que a substituição do meio RPMI-1640 pelo *Antibiotic Medium 3* (AM 3) aumentou a sensibilidade do teste para identificar cepas resistentes a anfotericina B (REX *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 1995).

Outra possibilidade sugerida na literatura é a utilização de E-test com RPMI-1640 suplementado com glicose ou E-test em AM 3, igualmente suplementado com glicose. Entretanto, o AM 3 pode apresentar variabilidade em estudos interlaboratoriais, uma vez que seus componentes não são bem definidos e diferenças significativas entre lotes podem ser observadas (NGUYEN *et al.*, 1998).

Outras modificações para o método de referência M27-A2 têm sido sugeridas para facilitar e aumentar a precisão na determinação das CIMs dos agentes antifúngicos, tais como a incorporação de painéis para testes antifúngicos *in vitro* com indicadores colorimétricos, a determinação de CIM através de espectrofotômetros, métodos alternativos utilizando ágar, métodos de disco-difusão e o E-test (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2000).

Desta forma, observa-se que apesar da tentativa do CLSI em padronizar os métodos empregados para testes de suscetibilidade à antifúngico em leveduras, ainda

não foi encontrado um método que pode ser considerado padrão ouro para a execução destes ensaios.

2.3 Modelos de Avaliação Farmacodinâmica

2.3.1 Modelos *in vitro*

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

Estes modelos são limitados pela impossibilidade de considerarem as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da relação hospedeiro/microrganismo/fármaco, especialmente no que se refere a incapacidade de avaliar concentrações disponíveis *in vivo* para exercer o efeito (DODDS *et al.*, 2000).

Um dos modelos *in vitro* empregados na caracterização da farmacodinâmica antifúngica consiste na análise de curvas de morte em função do tempo, conhecidas como *time-kill curve*, cuja padronização foi sugerida na literatura em 1998 (KLEPSER, 1998).

O modelo consiste em vários frascos, onde estão presentes o inóculo padronizado do microrganismo teste e diferentes concentrações do fármaco em estudo, as quais variam em função da Concentração Inibitória Mínima. O sistema é mantido em agitação e temperatura controlada de 35°C e, em tempos pré-determinados, são retiradas alíquotas do meio de cultura, as quais são diluídas em série e posteriormente plaqueadas e incubadas. De posse dos dados da contagem de microrganismos presentes, são plotadas curvas de razão da CIM *versus* LOG UFC/mL.

Klepser e colaboradores (2002) avaliaram a farmacodinâmica do voriconazol e do fluconazol contra *Candida sp.* e *C. neoformans* empregando esta metodologia. As concentrações avaliadas variaram na faixa de 0,0625 a 16 vezes o valor de CIM encontrado para o fármaco. Este estudo permitiu concluir que estes antifúngicos apresentam atividade fungistática para as espécies estudadas, tendo uma farmacodinâmica concentração- independente.

Mais recentemente, Li e colaboradores (2006) realizaram uma avaliação farmacodinâmica do voriconazol também por esta metodologia, frente a isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* e ainda cepas ATCC 90029 e SC 5314. Neste estudo, as concentrações avaliadas foram de 0,25 a 16 vezes o valor da CIM, a qual foi determinada por E-test®. Para todas as cepas testadas foi observada uma inibição do crescimento em valores de concentração menores do que 1 vez a CIM, indicando a potente atividade inibitória do voriconazol sobre as leveduras.

Uma desvantagem deste modelo se deve ao fato de que as concentrações as quais a levedura é exposta, não variam em função do tempo, sendo mantida uma concentração fixa do começo ao fim do experimento, o que não reflete a condição real que ocorre *in vivo*, onde o microrganismo é exposto a concentrações plasmáticas/teciduais flutuantes, devido ao processo de eliminação do fármaco (POLAK, 1998).

Um segundo modelo de infecção *in vitro* empregado na análise farmacodinâmica pode oferecer uma caracterização mais realista da cinética em humanos. Este mimetiza um sistema de cinética de um compartimento. O compartimento central contém o inóculo e uma quantidade do fármaco é adicionada ao sistema, gerando concentrações que simulam as presentes no plasma em humanos. Durante um período de 24/48 horas de coleta, o fármaco livre no meio é removido gradativamente do compartimento central em velocidade similar ao tempo de meia-vida do fármaco em humanos (RUSSEL *et al.*, 1998), sendo que este processo pode se dar através de diluições sucessivas ou bomba peristáltica (LEWIS *et al.*, 1998; AVILES *et al.*; 2001).

Esta dinâmica permite uma comparação mais verdadeira das características farmacodinâmicas nos pacientes (DODDS *et al.*, 2000).

2.3.2 Modelos *in vivo*

Modelos animais para caracterizar a farmacocinética e as propriedades farmacológicas dos agentes antifúngicos historicamente resultam em melhores previsões da eficácia antifúngica quando comparadas àquelas observadas nos testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro*. Isto se deve ao fato de que os fungos comportam-

se de forma diferente *in vivo* e *in vitro*, modificando sua morfologia, fisiologia e algumas vezes a própria resposta ao antifúngico (GRAYBILL, 1995).

A demonstração de eficácia antifúngica através destes modelos, entretanto, é muito dependente das condições experimentais, sendo influenciada por fatores farmacocinéticos como a absorção, distribuição e depuração do fármaco, assim como por fatores farmacodinâmicos como o tamanho do inóculo e a rota de infecção, a condição imunológica do hospedeiro e a duração do tratamento (GRAYBILL, 2000). Nestes modelos, os parâmetros mais comuns empregados para a avaliação farmacodinâmica são o tempo de sobrevivência dos animais, a redução do dano tecidual, e a contagem do número de células fúngicas no tecido, sendo que o tecido avaliado depende do agente etiológico empregado no modelo.

Um modelo *in vivo* empregado com frequência nas investigações farmacodinâmicas de antifúngicos é o modelo de candidíase sistêmica em murino neutropênico (ANDES *et al.*, 2003), que apresenta várias modificações na literatura. Este modelo consiste na infecção de animais imunocomprometidos pela via intravenosa, utilizando a veia caudal, com um inóculo na ordem 10^4 UFC/mL de levedura e na remoção dos rins após um período de tratamento pré-determinado. O tecido renal é homogeneizado, diluído e plaqueado e o efeito farmacodinâmico é expresso pelo número de UFC/mL, obtidos após o tratamento antifúngico em comparação com o controle não-tratado.

A *Candida albicans* é uma espécie de fungo altamente patogênica em murinos, ocasionado a morte em um período de 1-2 semanas após a inoculação por via intravenosa de 10^6 UFC em animais imunocompetentes (GRAYBILL *et al.*, 1995), sendo ainda necessários 1 a 2 dias para o microrganismo germinar e a infecção se estabelecer, antes de iniciar o tratamento com o antifúngico.

Uma vez que as candidemias geralmente acometem indivíduos imunocomprometidos, a eficácia de agentes antifúngicos sobre este microrganismo envolve também a utilização de animais imunocomprometidos.

O processo de indução do imunocomprometimento é realizado através da administração de ciclofosfamida (150 - 100 mg/kg) ou 5-fluorouracil (75 - 125 mg/kg) o que reduz a contagem de leucócitos para valores inferiores a 100 células/mL.

Neste grupo de animais a dose letal de inoculação com *C. albicans* é na ordem de 10^4 UFC e pode-se observar morte em apenas 1 dia, se esta exceder 10^7 UFC.

Para as espécies de *Candida não-albicans*, como a virulência é menor, a neutropenia é uma condição primária para a indução do processo infeccioso. *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* podem ser estudadas em camundongos neutropênicos, sendo que para *C. glabrata* o inóculo deve ser maior do que 10^7 UFC para ocorrência da infecção. As taxas de mortalidade são frequentemente menores do que 100% nos casos de infecção experimental por esta espécie de *Candida*, de forma que as contagens do número de células no tecido são mais indicadas para a avaliação de eficácia.

Modelos animais para avaliação farmacocinética e farmacodinâmica de antifúngicos, embora extensamente descritos na literatura, apresentam limitações que não podem ser negligenciadas no momento da sua escolha. Uma delas se refere à natureza aguda da doença resultante (DODDS *et al.*, 2000) e a própria etiologia da mesma. Roedores não são colonizados naturalmente por espécies de *Candida*, de modo que a infecção experimental no animal não reproduz uma condição de doença existente naturalmente na espécie. Além disso, a resposta do hospedeiro e as diferenças farmacocinéticas, principalmente relacionadas ao metabolismo, devem ser consideradas antes de tentar extrapolar os resultados para humanos (POLAK *et al.*, 1998). Aspectos éticos como o sofrimento e o grande número de animais envolvidos nestes estudos também devem ser considerados na escolha de um modelo *in vivo*.

2.4 Índices Farmacocinéticos e Farmacodinâmicos (PK/PD) Aplicados a Antifúngicos

Os índices PK/PD empregados para antifúngicos em parte se assemelham aos aplicados na análise de antibacterianos. O principal parâmetro farmacodinâmico utilizado é a concentração inibitória mínima, que reflete a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico visível. Os métodos para determinação da CIM em antifúngicos, no entanto, são diferentes daqueles empregados para a

maioria dos agentes antimicrobianos, sendo que as técnicas variam entre os grupos de antifúngicos (DODDS *et al.*, 2000), conforme descrito anteriormente.

Quando a morte do microrganismo é aumentada pelo aumento da dose, o antifúngico é considerado concentração dependente e neste grupo de fármacos estão incluídos os antifúngicos poliênicos e as equinocandinas (ANDES *et al.*, 2004).

Com outros grupos de fármacos a atividade antifúngica é aumentada não em função do aumento das concentrações plasmáticas totais, mas sim pelo aumento do tempo de exposição ao fármaco, sendo estão definidos como tempo-dependentes, ou concentração-independentes, estando incluídos neste grupo os antifúngicos triazólicos e a flucitocina (ANDES *et al.*, 2004).

Os índices PK/PD utilizados na avaliação de antifúngicos são: ASC/CIM , $C_{m\acute{a}x}/CIM$ e $Tempo > CIM$ (Figura 2). O $Tempo > CIM$ avalia o percentual de tempo em que os níveis plasmáticos estão acima da CIM, a $C_{m\acute{a}x}/CIM$ expressa a razão entre a Concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) e a CIM e finalmente a ASC/CIM , expressa a razão entre a Área Sob a Curva e a CIM.

Estes três parâmetros têm sido tradicionalmente empregados para descrever a relação entre a exposição do fármaco e o efeito do tratamento.

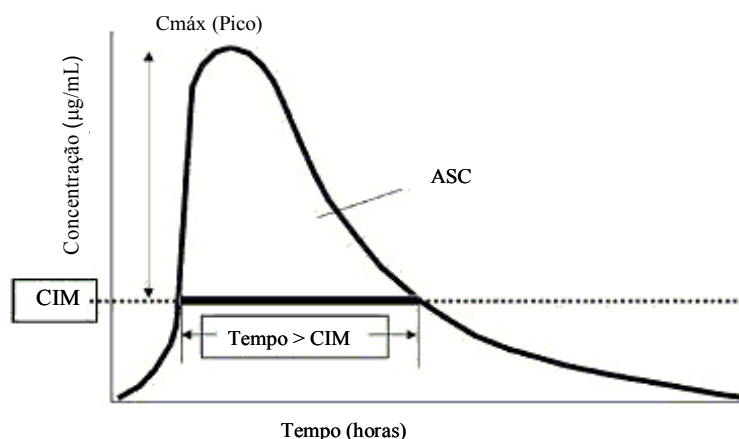


Figura 2. Índices Farmacodinâmicos/Farmacocinéticos empregados na avaliação de eficácia de antimicrobianos (Adaptado de ANDES, 2004).

O efeito pós-antifúngico (PAFE), caracterizado pela persistência da atividade do fármaco após atingir-se concentração abaixo da CIM, é outro parâmetro

farmacodinâmico empregado. Estas concentrações são chamadas de sub-inibitórias, não sendo passíveis de doseamento.

Experimentos realizados em animais e *in vitro* foram utilizados para descrever o PAFE para a maioria dos antifúngicos. Estudos *in vivo* com poliênicos, equinocandinas e triazólicos têm demonstrado uma supressão prolongada no crescimento fúngico (ANDES, 2004), caracterizando um PAFE importante.

O PAFE do voriconazol foi estudado por Manavathu e colaboradores (1998), e comparado ao da anfotericina B, da caspofungina, da micafungina e outros azólicos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito pós-antifúngico (PAFE) dos principais agentes antifúngicos de uso sistêmico frente a *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*.

Antifúngico	PAFE (h*)	
	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
Anfotericina B	7,50	5,30
Itraconazol	0,50	≤ 0,50
Voriconazol	0,50	≤ 0,50
Posaconazol	0,75	≤ 0,50
Ravuconazol	0,40	≤ 0,50
Caspofungina	≤ 0,50	5,60
Micafungina	≤ 0,50	5,00

*Tempo necessário para a célula fúngica se recuperar após breve exposição ao antifúngico teste.

Os resultados apontaram que o VRC apresenta baixa atividade pós-antifúngica frente a *Aspergillus fumigatus* em comparação a anfotericina B. Não foi observado efeito PAFE frente a *Candida albicans*.

Em relação aos estudos de PAFE em modelos animais, observa-se uma aplicação clínica limitada, uma vez que a sua determinação é frequentemente baseada na correlação entre as concentrações séricas e a atividade antifúngica correspondente no sítio infeccioso (ANDES *et al.*, 2003). A dificuldade está relacionada à disparidade

das concentrações no plasma e as concentrações observadas nos rins, sítio mais comumente utilizado em modelos animais para avaliar atividade antifúngica. As concentrações de ANF B observadas nos rins, por exemplo, podem ser 4 vezes maiores que aquelas observadas no plasma. Esse resultado pode indicar um efeito antifúngico persistente, o que na realidade não é, pois as concentrações do fármaco no sítio de infecção permanecem significativamente superiores a CIM e continuam a prover a atividade antifúngica enquanto as concentrações no plasma são subinibitórias (TURNIDGE *et al.*, 1994).

O significado clínico do PAFE está indefinido e não tem sido testado no tratamento de infecções em humanos, porque os estudos *in vivo* são ainda incapazes de dosar as concentrações do fármaco livre no local de ação (DODDS *et al.*, 2000).

A falta de correlação entre o resultado clínico e os obtidos nos testes de suscetibilidade ocasiona muitas dificuldades no tratamento de infecções fúngicas invasivas, envolvendo tratamentos imprecisos e muitas vezes controversos (DODDS *et al.*, 2000).

Para fármacos que apresentam perfil de atividade tempo-dependente e efeito pós-antifúngico (PAFE) curto ou inexistente, a dosagem é otimizada pelo prolongamento da duração das interações entre o fármaco e o organismo. O parâmetro que considera esta exposição é o $T > CIM$. Para os fármacos que apresentam morte concentração-dependente e PAFE prolongado, a eficácia é prolongada pela administração de doses maiores menos frequentemente, e os parâmetros preditivos de eficácia neste caso são $C_{m\acute{a}x}/CIM$ e ASC/CIM .

ANDES e colaboradores (2003) utilizaram o modelo de $E_{m\acute{a}x}$ sigmoidal para a análise da curva dose-efeito do voriconazol em camundongos neutropênicos. Neste estudo foram avaliados 24 regimes posológicos, para as doses de 0,078, 0,3125, 1,25, 5, 20 e 80 mg/kg/24h (q3, q6, q12 e q 24), empregando um $n = 2$ por tempo de coleta. Através do modelo foi gerada a curva dose-efeito do fármaco, e posteriormente foram analisadas as correlações entre os parâmetros E_{max} e DE_{50} e outros índices PK/PD como área sob a curva (ASC) e concentração inibitória mínima (CIM), avaliando o valor preditivo de eficácia destes parâmetros. O estudo demonstrou uma grande correlação entre os valores de CE_{50} encontrados, para cada um dos quatro intervalos

de doses, e a relação ASC_{24}/CIM , indicando que este é o índice farmacocinético/farmacodinâmico mais preditivo para a eficácia do voriconazol.

2.5 Voriconazol

2.5.1 Características Químicas

O voriconazol (VRC) (Figura 3) é um novo agente antifúngico triazólico, cujo nome químico é (2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoro-4-pirimidinil)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-butano (Figura 3), com peso molecular de 349,3 kD e fórmula empírica $C_{16}H_{14}F_3N_5O$. Possui grau intermediário de lipofilicidade ($\text{Log}_{7,4} D = 1,8$) e um valor de $pK_a = 1,63$ (ROFFEY *et al.*, 2003).

Seu uso foi aprovado nos Estados Unidos em maio de 2002 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e no Brasil em julho do mesmo ano (ANVISA, 2002).

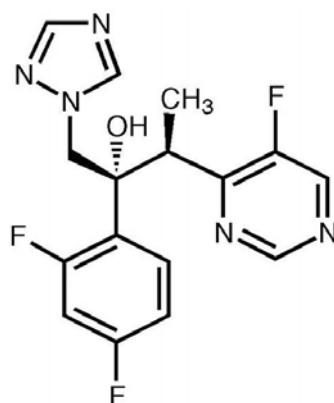


Figura 3. Estrutura química do voriconazol, antifúngico triazólico.

Este antifúngico pertence ao grupo dos azólicos e foi desenvolvido pelos Laboratórios Pfizer[®] com o objetivo de ampliar o espectro de ação e a potência do fluconazol. O espectro antifúngico foi ampliado pela introdução de um grupo α -metila na estrutura principal propila do fluconazol (GIRMENIA *et al.*, 1998) e a substituição de um anel triazol por uma estrutura 4-fluoropirimidina, a qual promoveu o aumento da potência antifúngica (SABO e ABDEL-RAHMAN, 2000) (Figura 4).

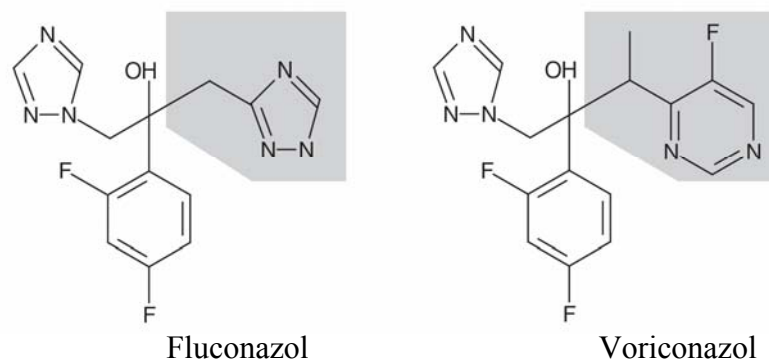


Figura 4. Modificações estruturais no fluconazol que originaram o voriconazol.

2.5.2 Propriedades Farmacodinâmicas

Assim como outros antifúngicos azólicos, o VRC exerce seu efeito primariamente através da inibição da 14- α -esterol desmetilase (P-450_{DM}), uma enzima dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em 14- α -desmetil-lanosterol em uma das etapas de biossíntese do ergosterol. O ergosterol é um componente essencial da membrana do fungo, regulando a fluidez, a permeabilidade e a atividade das enzimas associadas à membrana (SANATI *et al.*, 1997).

Em leveduras, o ergosterol também compõe majoritariamente as vesículas secretórias e realiza um papel importante nas reações de fosforilação oxidativa (BAMMERT e FOSTEL, 2000), sendo que a eficácia dos azóis está relacionada a maior afinidade pela P-450_{DM} da célula fúngica do que pela P-450_{DM} de mamíferos (BODEY, 1992).

A inibição da P-450_{DM} causa não somente a depleção do ergosterol e, conseqüentemente, a perda da integridade e funcionalidade da membrana celular fúngica, como também desencadeia o acúmulo de precursores de ergosterol tóxicos, incluindo o esqualeno, o zimosterol, o lanosterol, o 4,14-dimetilzimosterol e o 2-4 metilenodihidrolanosterol (SANATI, 1997). O efeito global consiste em inibição da replicação. Uma outra conseqüência é a inibição da transformação das células de levedura da *Candida* em hifas, a forma invasiva e patogênica do microrganismo (RANGE *et al.*, 2001).

Estudos de avaliação da morte fúngica em função do tempo foram conduzidos para o VRC com o objetivo de caracterizar seus efeitos como fungicida ou fungistático (JEU *et al.*, 2003).

Manavathu e colaboradores (1998) verificaram, empregando o método de *time-kill curves*, que o fármaco possui atividade fungistática para *Candida sp.* e fungicida para *Aspergillus fumigatus*, conforme pode ser observado na Figura 5.

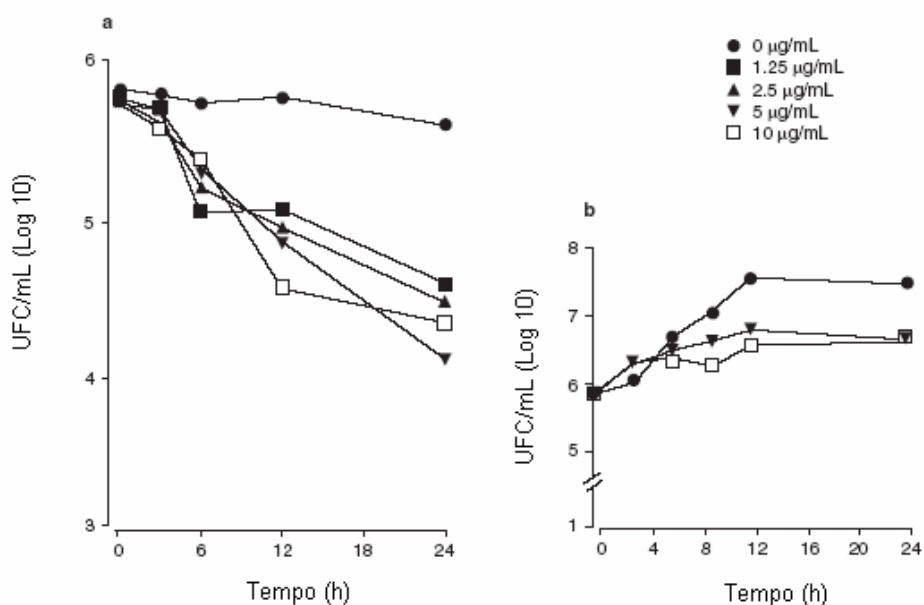


Figura 5. Atividade fungicida e fungistática do voriconazol contra *Aspergillus fumigatus* (a) e *Candida albicans* (b) mostrada por estudos de morte em função do tempo (*time-kill studies*). (Adaptado de MANAVATHU *et al.*, 1998)

Semelhante aos demais antifúngicos azólicos, a atividade fungistática do VRC foi também confirmada através dos estudos *in vitro* conduzidos por KLEPSEK e colaboradores (1998), nos quais o fármaco foi testado contra espécies de *Candida* e não causou morte fúngica após 24 h, com 80 a 85 % do crescimento inibido. Além disso, as concentrações de VRC de 5 a 10 µg/mL não causaram morte concentração-dependente, sendo que os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ em 24 h não mostraram diferença. A CE₅₀ (concentração necessária para obter 50 % do efeito máximo de morte fúngica), foi da ordem de 0,8 vezes a CIM enquanto o CE₉₀ apresentou valores aproximados de 3 vezes a CIM.

Em contraste, o VRC, apresentou atividade fungicida contra espécies de *Aspergillus*, *Furasium* e *Scedosporium*. Estes dados permitiram caracterizar sua farmacodinâmica como espécie-específica (JEU *et al.*, 2003).

As principais características farmacodinâmicas do fármaco são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais características farmacodinâmicas do voriconazol (Adaptado de THEURETZBACHER *et al.*, 2006).

Parâmetro	Característica
Atividade	<i>Candida sp</i> : fungistático <i>Aspergillus sp</i> : fungicida
Relação Tempo-Efeito	<i>Candida sp</i> : tempo-dependente fungistático <i>Aspergillus sp</i> : tempo-dependente fungicida lento
PAFE <i>in vitro</i>	<i>Candida sp</i> : Não apresenta <i>Aspergillus sp</i> : Curto efeito
Índice PK/PD	ASC_{f0-24} / CIM

ASC_{f0-24} =área sobre a curva de 24 h da fração livre no plasma; PAFE= efeito pós-antifúngico;

Para o tratamento de candidose oral, a eficácia do VRC situa-se na faixa de 80 a 100 %, o que é explicado pela inibição do ergosterol dose-dependente que o VRC apresenta sobre espécies de *Candida*, quando comparado a grupos não-tratados (SANATI, 1997).

Inúmeros estudos estão publicados na literatura envolvendo testes de suscetibilidade de *Candida sp.* ao VRC. Os resultados de alguns destes ensaios estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade *in vitro* do VRC contra diferentes espécies de *Candida* (Adaptado de JEU e colaboradores, 2003).

Espécies de Candida	N° de isolados clínicos testados	CIM₉₀ (µg/mL)	Faixa da CIM (µg/mL)	Referências
<i>C. albicans</i>	5616	0,015	0,008 - 0,5	PFALLER <i>et al.</i> ,1998. PFALLER <i>et al.</i> ,2002. CHAVEZ <i>et al.</i> ,1999. MARCO <i>et al.</i> , 1998.
<i>C. glabrata</i>	939	0,250	0,030 - 8,0	PFALLER <i>et al.</i> ,1998. PFALLER <i>et al.</i> ,2002. CHAVEZ <i>et al.</i> ,1999. MARCO <i>et al.</i> , 1998.
<i>C. krusei</i>	234	0,500	0,060 - 4,0	PFALLER <i>et al.</i> ,1998. PFALLER <i>et al.</i> ,2002. CHAVEZ <i>et al.</i> ,1999.

CIM₉₀ = Concentração Inibitória Mínima para inibição do crescimento em 90% das amostras testadas.

Em geral, os testes de suscetibilidade de espécies de *Candida* ao VRC têm apresentado um valor de CIM₉₀ entre 0,015 e 0,5 µg/mL, e uma ampla faixa de CIMs, que varia de 0,008 a > 8 µg/mL.

Em estudos comparativos realizados por Pfaller e colaboradores (1998), sobre a suscetibilidade de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* aos azólicos fluconazol, itraconazol e voriconazol, este demonstrou espectro de atividade similar ao do fluconazol e superior ao do itraconazol. Os resultados também indicaram que o voriconazol apresenta maior potência que o fluconazol (em 89% dos testes), com valores de CIM₉₀ < 8µg/mL para o fluconazol *versus* CIM₉₀ ≤ 0,25 µg/mL para o VRC.

Espinel-Ingroff (1998) realizou estudos comparativos quanto aos valores das CIMs obtidos para diferentes antifúngicos contra espécies de *Candida* (Tabela 4) e os resultados encontrados indicam valores de CIM para o voriconazol sempre menores ou iguais ao do antifúngico mais potente para cada espécie, o que caracteriza uma de suas principais vantagens farmacodinâmicas.

Tabela 4. Comparação entre a atividade *in vitro* de diferentes antifúngicos contra espécies de *Candida* (adaptado de ESPINEL-INGROFF, 1998).

Levedura	Agentes Testados	CIM ₉₀ (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> (n = 32)	Voriconazol	0,5
	Anfotericina B	2
	Itraconazol	0,5
	Fluconazol	32
<i>Candida glabrata</i> (n = 14)	Voriconazol	4
	Anfotericina B	2
	Itraconazol	2
	Fluconazol	64
<i>Candida parapsilosis</i> (n = 18)	Voriconazol	0,25
	Anfotericina B	1
	Itraconazol	0,25
	Fluconazol	2
<i>Candida krusei</i> (n = 12)	Voriconazol	0,5
	Anfotericina B	1
	Itraconazol	1
	Fluconazol	16
<i>Candida lusitaniae</i> (n = 17)	Voriconazol	0,06
	Anfotericina B	2
	Itraconazol	0,25
	Fluconazol	2

O VRC foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da aspergilose invasiva, de infecções invasivas graves por *Candida* resistentes ao fluconazol (incluindo *C. krusei*), infecções fúngicas graves causada por *Scedosporium spp.* e *Fusarium sp.*

2.5.3 Propriedades Farmacocinéticas

A farmacocinética do VRC é descrita na literatura tanto para animais (ROFFEY *et al.*, 2003) quanto para seres humanos (LEVÊQUE *et al.*, 2006). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral e intravenosa de fármaco a cinco espécies animais são mostrados na Tabela 5.

Em ratos, o estudo conduzido por Roffey e colaboradores (2003) com um pequeno número amostral (n = 2), a farmacocinética mostrou-se não-linear e gênero-

dependente, com uma menor distribuição em ratos machos do que em fêmeas (ROFFEY *et al.*, 2003) (Figura 6). A análise não-compartimental dos dados é mostrada na Tabela 5.

O modelo farmacocinético que melhor descreveu os dados do VRC para estudos em animais foi o modelo de 1 compartimento com eliminação baseada na equação de Michaelis-Menten. Através deste modelo, se pode obter parâmetros como Vmax (velocidade máxima), Km (constante de *Michaelis-Menten*) e C (concentração no tempo zero) e calcular o valor aparente de depuração (Vmax/Km) e o valor do volume de distribuição (Dose/Cp) (ROFFEY *et al.*, 2003).

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em diversas espécies animais.

Parâmetros	Camundongo	Rato		Coelho	Cobaio	Cão
	Macho (n = 3)	Macho (n = 2)	Fêmea (n = 2)	Fêmea (n = 3)	Fêmea (n = 1)	Macho/ Fêmea (n = 4)
LPP* (%)	67	66	66	60	45	51

Administração iv

Dose (mg/kg)	10	10	10	3	10	3
ASC0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ^u	41,7	18,6	81,6	1,1	38,5	32,1
ASC0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ^m	8	6,7	13,9	1,6	22	17,9

Administração oral

Dose (mg/kg)	30	30	30	10	10	6
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	12,4	9,5	16,7	1	4,1	6,5
tmax (h)	2	6	1	1	8	3
ASC0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ^u	98,8	90	215,6	3,2	29	88,8
ASC0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ^m	35,3	32,3	57,4	4,4	32,3	52,2
f	81	159	88	87	75	138

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

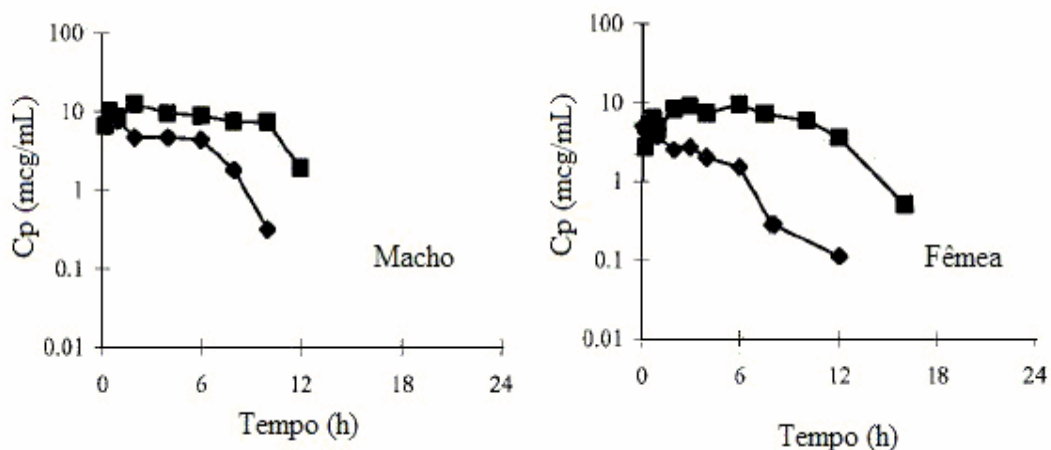


Figura 6. Perfil de concentração plasmática de voriconazol (administração oral (■) e intravenosa (●) em função do tempo em ratos machos e fêmeas para a dose de 30 mg/kg (Adaptado de ROFFEY e colaboradores, 2003).

Estudos do VRC marcado com ^{14}C em ratos avaliaram a distribuição tecidual da dose de 10 mg/kg (JEU *et al.*, 2003). Após 5 minutos da administração intravenosa por infusão contínua, o fármaco apresentou maiores concentrações no fígado ($21 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$) e córtex da adrenal ($10,4 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$). Concentrações significantes também foram detectadas no sangue ($4,3 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$), cérebro ($8,1 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$), retina ($13 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$) e pulmões ($5,8 \mu\text{g}\cdot\text{Eq/g}$).

Em humanos, o voriconazol é rápida e completamente absorvido após administração oral, com t_{max} menor do que 2 horas (PURKINS *et al.*, 2002), apresentando alta biodisponibilidade oral, com perfis muito similares aos obtidos para administração intravenosa, conforme pode ser observado na Figura 7.

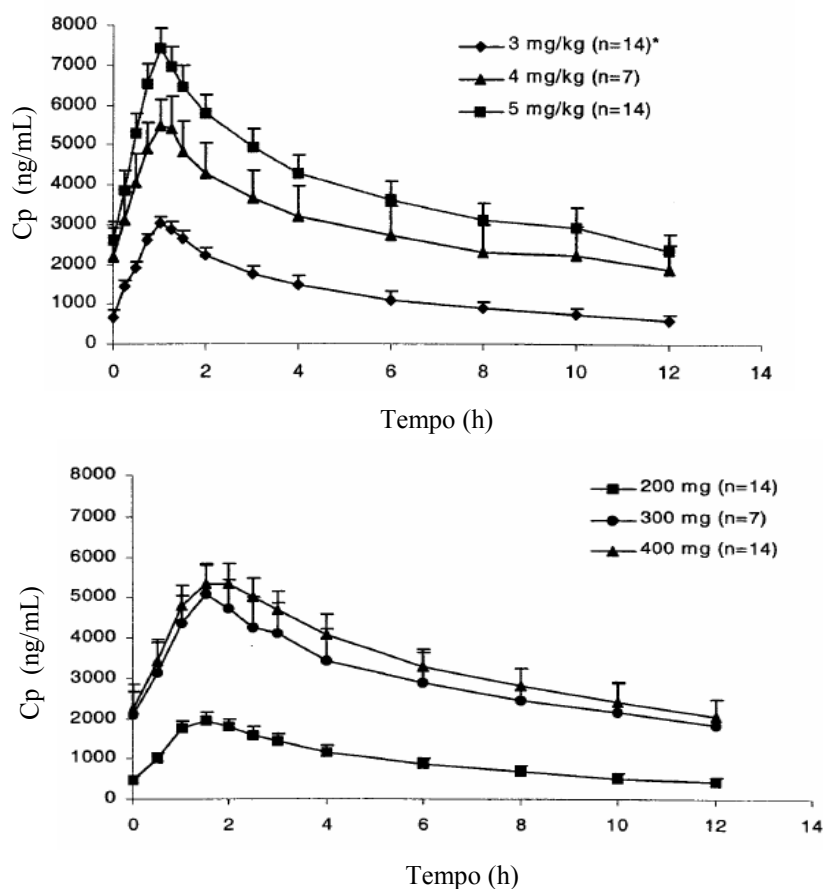


Figura 7. Perfis de concentração plasmática do Voriconazol para administração i.v. por infusão contínua de 1 hora, nas doses de 3, 4 e 5 mg/kg (a) e oral (b) em humano saudáveis (Adaptado de PURKINS e colaboradores, 2002).

O tempo de meia-vida do VRC em humanos é de aproximadamente 6-9 horas para a dose de 200 mg v.o. ou 3 mg/kg i.v., com taxa de ligação às proteínas plasmáticas em torno de 58 %, a qual mostrou-se não concentração-dependente na faixa terapêutica utilizada (THEURETZBACHER *et al.*, 2006).

Este moderado percentual de ligação a proteínas difere do perfil observado para os demais triazólicos (ravuconazol e posaconazol) os quais possuem altas taxas de ligação (em torno de 95%) (LEVEQUE *et al.*, 2006). A principal consequência deste aumento na fração livre é o elevado volume de distribuição, 2 a 4,6 L/kg, em uma administração de 3 mg/kg/h em infusão contínua, observado para o VRC em

comparação com os demais antifúngicos, o que sugere uma extensa distribuição nos compartimentos intra e extra-celular (THEURETZBACHER *et al.*, 2006).

Há poucos dados na literatura sobre a distribuição tecidual do VRC em humanos. Lutsar e colaboradores, em 2003, avaliaram concentração de voriconazol em fluido cérebro espinhal (FCE) de pacientes imunocomprometidos que faziam uso do fármaco em ambiente hospitalar. Os resultados apontaram uma relação linear entre as concentrações de voriconazol no plasma e no líquido, com uma razão de proporção entre as concentrações em torno de 0,46, indicando uma excelente taxa de penetração do fármaco no sistema nervoso central.

O estado de equilíbrio do VRC é alcançado após 5 ou 7 dias de tratamento (THEURETZBACHER *et al.*, 2006) mas esta dificuldade pode ser superada com a administração de duas doses de ataque de 6 mg/kg, a cada 12 horas, o que reduz este período para um dia (PURKINS *et al.*, 2002).

O voriconazol apresenta farmacocinética não-linear em humanos, comprovada em estudos de dose-múltipla nos quais observou-se que os valores de ASC_{0-t} aumentaram desproporcionalmente com a dose, tanto para administração oral, quanto para intravenosa.

Os gráficos do valor ASC_{0-t} vs dose para as duas vias de administração testadas, são mostrados na Figura 8 (PURKINS *et al.*, 2002).

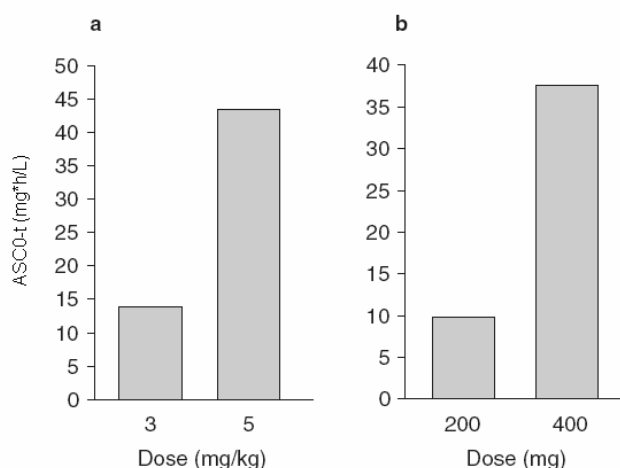


Figura 8. Aumento desproporcional da área sob a curva de concentração por tempo no *steady-state* (ASC_{ss0-t}) em relação à dose observado para o voriconazol após administração de dose múltipla iv (a) e oral (b) (Adaptado de THEURETZBACHER *et al.*, 2006)

Muitos autores associam a não-linearidade da farmacocinética do VRC à saturação do metabolismo (PURKINS *et al.*, 2002), uma vez que o fármaco é eliminado primariamente pela via hepática, sendo aproximadamente 80 % da dose eliminada na urina (2 % na forma inalterada) e 20 % nas fezes (FDA, 2001).

O VRC é metabolizado no fígado através de enzimas do citocromo P₄₅₀, sendo que seus metabólitos apresentam atividade antifúngica negligenciável (LUMBRERAS *et al.*, 2003). Oito metabólitos foram identificados, sendo a via primária de metabolização a N-oxidação do grupamento fluorpirimidina (72 % da metabolização ocorre dessa forma) (FDA, 2001). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para humanos sadios podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos do voriconazol em humanos sadios.

Parâmetros	Humanos sadios
Fração Biodisponível (jejum) (%)	96
Ligação às proteínas plasmáticas (%)	58
Vd (L/kg)	4,6
t _{1/2} (h)	6
Depuração (L/kg/h)	33,7
C_{max} (µg/mL)	
iv	3,01
Oral	1,89
t_{max} (h)	
iv (infusão contínua)	1
Oral	1,5-3,0
ASC_{plasma 0-t} (µg*h/mL)	
Iv (infusão contínua)	13,9
Oral	9,8

Dose iv = 3mg/kg ; Dose oral = 200mg/12h // adaptado de PURKINS *et al.*, 2002)

LAZARUS e colaboradores (2002) avaliaram a farmacocinética do voriconazol em indivíduos com alto risco de adquirir infecções fúngicas sistêmicas, caracterizada pela imunodepressão, com contagem de neutrófilos totais ≤ 500 células/mL. Os resultados estão dispostos na Tabela 7, ao lado dos dados obtidos para indivíduos sadios.

Tabela 7. Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos de humanos imunocomprometidos e sadios.

Parâmetros Farmacocinéticos	Indivíduos sadios Dose de 200mg/12h (V.O.) ¹	Indivíduos imunocomprometidos Dose de 200 mg/12h (V.O.) ²	Indivíduos imunocomprometidos Dose de 300 mg/12h (V.O.) ²
ASC _{0-t} (µg*h/mL)	9,8	20,31	36,50
C _{max} (µg/mL)	1,89	3,0	4,66
t _{max} (h)	1,5-3,0	1,7	3

1. Purkins *et al.*, 2002 // 2.Lazarus *et al.*, 2002

A comparação entre as duas doses de voriconazol testadas para os indivíduos imunocomprometidos demonstra que a sua farmacocinética permanece não-linear neste grupo. O estado de equilíbrio nestes pacientes também foi atingido entre 4-7 dias, e a ASC_{0-t} para os pacientes que receberam 300 mg v.o. a cada 12 h foi 1,8 vezes maior do que a obtida para aqueles que receberam a dose de 200 mg, no mesmo intervalo de tempo (LAZARUS *et al.*, 2002).

Observa-se uma diferença na extensão da absorção nos indivíduos sadios e imunocomprometidos, com um aumento da absorção no grupo imunocomprometido, que tiveram valores de ASC_{0-t} muito superiores aos obtidos para os indivíduos sadios (Tabela 6).

A não-linearidade da farmacocinética do VRC leva à necessidade da avaliação do perfil farmacocinético de todas as doses a serem empregadas na modelagem PK-PD, para possibilitar um ajuste mais preciso do modelo proposto.

2.6 Microdiálise

As concentrações livres de fármacos no fluido intersticial são as responsáveis pela resposta farmacológica do mesmo no organismo. Visando a determinação do perfil de concentração livre intersticial de fármacos, a microdiálise (MD) *in vivo* tem encontrado importantes aplicações no campo da farmacocinética, especialmente na investigação dos processos de distribuição tecidual e metabolismo (BRUNNER *et al.*, 2005).

Através desta técnica, originada na década de 60 para a avaliação de neurotransmissores, pode-se acessar a fração livre do fármaco, através do implante de uma sonda de diálise no tecido ou órgão de interesse, a qual é constantemente irrigada com um líquido de perfusão compatível, com fluxo constante e controlado, mimetizando a função de um capilar sanguíneo.

Na porção terminal da sonda (Figura 9) situa-se uma membrana semipermeável, que obedece aos princípios da difusão passiva, que é mantida constantemente sob condição *sink*. Como somente substâncias de baixo peso molecular são difundidas através da membrana, esta técnica permite determinar as concentrações livres da substância em estudo uma vez que apenas a fração não ligada a proteínas presentes no líquido intersticial sofrerá o processo de difusão através da membrana. As substâncias difundidas são coletadas na outra extremidade da sonda, para posterior análise.

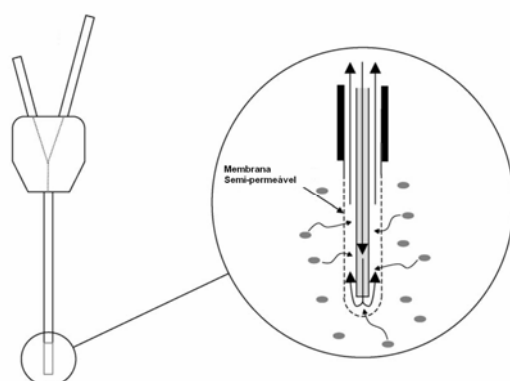


Figura 9. Esquema de transporte na sonda de microdiálise (Adaptado de PLOCK e KLOFT, 2005).

Estas concentrações coletadas no dialisado, no entanto, não são iguais às concentrações livres no tecido, em virtude da condição *sink* estabelecida. Como a sonda é constantemente perfundida por uma solução sem o analito, o equilíbrio entre os dois meios nunca irá se estabelecer e desta forma, a concentração no dialisado representa uma fração da concentração livre no tecido tecidual.

Para possibilitar a determinação da fração livre tecidual, a razão entre a concentração no dialisado e no tecido pode ser calculada e recebe o nome de recuperação relativa (RR), que pode ser determinada por técnica de retrodiálise (perda) ou diálise (ganho). Um esquema destes processos é mostrado na Figura 10 (PLOCK e KLOFT, 2005).

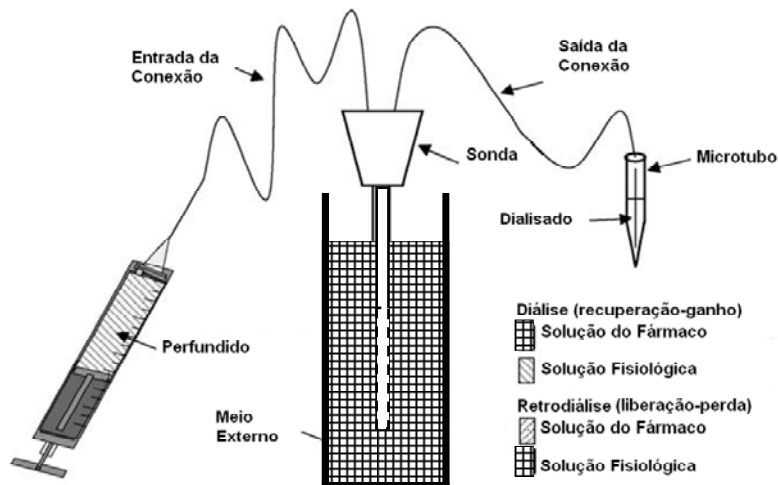


Figura 10. Esquema para determinação das taxas de recuperação *in vitro* por diálise e retrodiálise (Adaptado de PLOCK e KLOFT, 2005).

Para a determinação das taxas de recuperação relativa *in vitro* por diálise (recuperação por ganho) a sonda é inserida em uma solução contendo o fármaco (meio externo), e um líquido calibrador (que mimetiza o fluido intersticial) é perfundido através da sonda, promovendo a retirada do analito do meio. Como a concentração de fármaco no meio externo é conhecida, a taxa de recuperação é determinada pela relação (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997):

$$RR (\%) = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde RR é a taxa de recuperação relativa, C_{ext} é a concentração conhecida do meio externo e C_{dial} é a concentração do soluto no dialisado.

Quando a taxa de recuperação é determinada por retrodiálise, a ordem dos componentes no sistema é invertida, ou seja, uma solução com concentração conhecida do fármaco é infundida através da sonda de MD que inserida em recipiente que contém a solução que mimetiza o líquido intersticial sem o fármaco. Neste caso, a equação que descreve a taxa de recuperação relativa é (PLOCK e KLOFT, 2005):

$$RR (\%) = 100 - \left(\frac{C_{dial}}{C_{perf}} \times 100 \right) \quad (2)$$

onde RR é a taxa de recuperação relativa, C_{ext} é a concentração conhecida do meio externo e C_{dial} é a concentração do soluto no dialisado.

Diversos fatores determinam a taxa de recuperação das sondas de MD. Entre estes fatores pode-se citar a taxa de perfusão, a área superficial da membrana, o peso molecular máximo difundido através da mesma, a temperatura, o tipo de soluto a ser analisado e as propriedades do meio externo (MENACHERRY *et al.*, 1992).

Os testes para determinação da recuperação *in vivo* são mais complexos, uma vez que a determinação da concentração no meio externo é o objetivo final do estudo. A determinação da recuperação *in vivo*, no entanto, é imprescindível pois as diferenças nas características do meio externo observada *in vitro* e *in vivo* podem determinar diferenças nas taxas de recuperação obtidas (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

Dentre as técnicas para a determinação da recuperação *in vivo* pode-se citar duas de maior aceitação: o método do fluxo líquido zero e a retrodiálise (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

2.6.1 Fluxo líquido zero (FLZ)

LÖNNROT e colaboradores, em 1987, desenvolveram esta técnica que está baseada na determinação do transporte de massa do soluto através da membrana como função da concentração do mesmo no líquido de perfusão (perfundido).

Para a realização deste experimento, é necessário que o fármaco a ser avaliado esteja em concentração de *steady state* no animal em estudo, o que é obtido pela administração do mesmo por infusão contínua. A sonda de MD é irrigada com solução contendo diferentes concentrações do fármaco sob investigação. Quando a concentração do fármaco é menor no perfundido que no meio externo, a difusão ocorre do meio externo para a sonda de MD. A situação é inversa quando a concentração do fármaco é maior no perfundido, direcionando a difusão da sonda para o meio externo. O ponto onde não há transporte líquido do soluto (fluxo zero) é a condição na qual os meios interno e externo possuem igual concentração. Este ponto pode ser obtido por regressão linear da concentração líquida transportada em função da concentração do perfundido. A concentração líquida transportada é determinada

pela subtração da concentração da substância recuperada no dialisado da concentração original da solução perfundida (Figura 11).

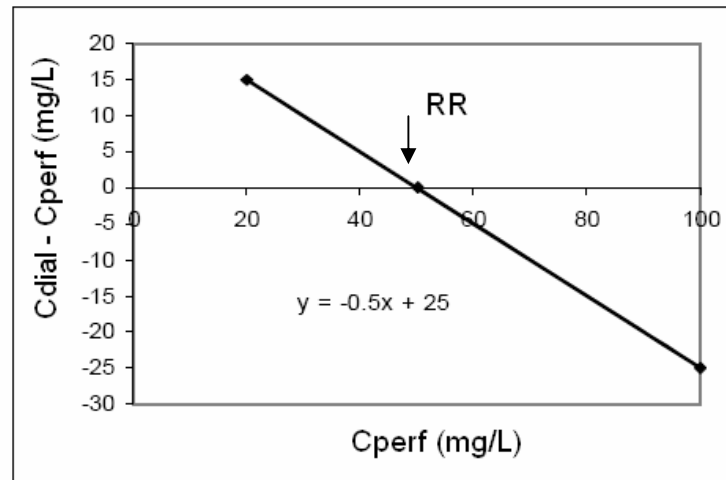


Figura 11. Gráfico que permite a análise da taxa de recuperação pelo fluxo líquido zero.

A equação que descreve a relação entre fluxo líquido e concentração do perfundido tem como inclinação a recuperação relativa (RR) da sonda de MD (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997):

$$RR = \frac{C_{perfl} - C_{dial}}{C_{perl}} \quad (4)$$

onde C_{dial} é a concentração no dialisado, C_{perf} é a concentração no perfundido, RR é a taxa de recuperação relativa.

2.6.2 Retrodiálise

Esta técnica pode ser considerada um caso especial do fluxo líquido zero, onde um análogo do fármaco de interesse (calibrador) ou o próprio fármaco é adicionado ao perfundido. A concentração do calibrador, que deve possuir difusibilidade semelhante à do fármaco de interesse, caso não seja o próprio fármaco, é zero na região externa da sonda.

Por isso, o fluxo líquido é sempre negativo (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997) e a recuperação pode ser calculada do mesmo modo que *in vitro* (equação 2).

A retrodiálise tem a vantagem de permitir um monitoramento contínuo da recuperação *in vivo* durante o experimento propriamente dito, quando se usa um calibrador, sendo amplamente utilizado nos estudos de microdiálise em humanos, em virtude da maior conveniência para os voluntários (DE LANGE *et al.*, 2000).

A determinação da recuperação das sondas por retrodiálise está baseada no conceito de que o transporte da substância do interior da sonda para o meio externo (perda) e deste para o interior da sonda (ganho) é idêntico nos dois sentidos. Esta premissa, no entanto, não é válida para todos os tipos de fármacos, como mostrou o trabalho de GROTH e JØRGENSEN (1997), através do estudo comparativo destas relações para fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Os resultados obtidos por estes autores indicaram que a medida que aumentam as características lipofílicas do fármaco, esta relação vai se deslocando cada vez mais no sentido da perda, ou seja, o transporte do fármaco para o meio externo aumenta, mas sua entrada para o interior da sonda é reduzida. O mesmo, no entanto, não ocorre com fármacos hidrofílicos, que mantém a relação entre suas taxas de perda e ganho iguais a 1.

Essa diferença no transporte das substâncias lipofílicas de um meio para o outro é explicada por uma possível adesão do fármaco ao material que é utilizado para a fabricação das sondas.

Para que se possa avaliar a recuperação das sondas quando se trabalha com fármacos lipofílicos, que apresentam diferença entre perda e ganho, uma alternativa é a determinação da recuperação em relação a perda e ao ganho de maneira distinta, e o cálculo de um fator de correção, pelo qual as recuperações serão corrigidas (GROTH e JØRGENSEN, 1997).

De posse da taxa de recuperação das sondas, o valor real das concentrações teciduais livres é obtido através da normatização dos dados obtidos de MD, utilizando a taxa de recuperação de cada membrana usada nos experimentos.

Para análise do dialisado pode-se empregar diversos tipos de instrumentação como, por exemplo, espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar e imunoenaios. Todas essas técnicas exigem amostras purificadas, o que na microdiálise é uma vantagem, uma vez que a amostra coletada pode ser analisada diretamente, sem processamento, pois está isenta de proteínas.

Além da pureza, a MD possibilita o monitoramento de mais de um compartimento, bem como de mais de uma substância de interesse simultaneamente, no mesmo animal experimental (JOHANSEN *et al.*, 1997).

A MD apresenta algumas desvantagens, tais como o pequeno volume coletado em cada amostra e a necessidade de testes de recuperação das membranas *in vitro* e *in vivo*, como discutido anteriormente (JOHANSEN *et al.*, 1997).

2.6.3 Microdiálise em tecido renal

O uso da técnica de microdiálise em tecido renal é relativamente recente e, em geral, aplicado à determinação de substâncias endógenas como óxido nítrico (AWAD *et al.*, 2004), angiotensina I e II (NISHIYAMA *et al.*, 2002 e AWAD *et al.*, 2004), cálcio e adenosina (MUPANOMUNDA *et al.*, 2000).

MUPANOMUNDA e colaboradores (2000) realizaram a determinação das concentrações livres intersticiais renais de cálcio, com o objetivo de avaliar sua interferência em receptores de cálcio presentes nos nervos sensitivos dilatadores da rede perivascular renal. A sonda foi inserida na região do córtex renal e infundida com um fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ com uma solução tampão contendo 120 mmol/L de NaCl e 20 mmol/L de ácido N'-2-etanosulfônico-N-2-hidroxi-etilpiperazina, por um período de 90 minutos. As taxas de recuperação *in vivo* das sondas foram determinadas pela técnica de fluxo líquido zero e o método foi capaz de determinar as concentrações deste íon no tecido renal, provando a influência dos receptores de cálcio na dilatação da rede perivascular renal.

Em estudos conduzidos por NISHIYAMA e colaboradores (2002), a MD foi empregada para a análise das concentrações livres intersticiais renais de angiotensina I e II frente a presença de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). A sonda igualmente foi inserida no córtex renal e perfundida com solução de Ringer suplementada com albumina bovina a 1%, sendo que as taxas de recuperação *in vivo* foram determinadas por retrodiálise. Neste estudo, a microdiálise permitiu determinar que o inibidor da ECA tinha uma ação específica sobre a formação de angiotensina II, no nível do córtex renal.

Até o momento não há relatos na literatura da utilização da MD renal para a quantificação de fármacos.

2.7 Modelagem PK-PD

A farmacocinética estuda a variação da concentração do fármaco no organismo em função do tempo. A farmacodinâmica, por sua vez, pode ser definida como o estudo dos efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos e dos seus mecanismos de ação (HARDMAN *et al.*,1996), sendo que modelos farmacodinâmicos descrevem o equilíbrio entre a concentração do fármaco e o efeito, independente do tempo. Desse modo, a concentração, que é o ponto de intersecção entre esses dois ramos da farmacologia, é o parâmetro mais importante na relação efeito-tempo, que é avaliada na modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD).

A modelagem PK/PD pode ser definida como a descrição matemática da relação efeito/tempo, que permite prever a variação do efeito com a variação da concentração do fármaco no organismo, em função do tempo (HOLFORD e SHEINER, 1981; DERENDORF e HOCHHAUS, 1995).

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração *versus* efeito do fármaco são os modelos E_{\max} e E_{\max} -Sigmoidal (DERENDORF e MEIBOHM, 1999). Estes modelos possuem duas propriedades importantes: determinar o efeito nulo na ausência do fármaco e prever o efeito máximo que um fármaco pode produzir.

O modelo E_{\max} descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração através de uma relação hiperbólica. O modelo de E_{\max} -Sigmoidal, que é uma variação do primeiro, é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples. O modelo sigmoidal é descrito pela seguinte equação (DERENDORF e HOCHHAUS, 1995):

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^n}{CE_{50}^n + C^n} \quad (5)$$

onde E é o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo obtido pelo fármaco; C é a concentração do fármaco; CE_{50} é a concentração do fármaco que produz 50 % do efeito máximo; n é o fator de Hill, que influencia a curvatura da curva efeito-concentração.

O modelo de E_{max} foi modificado por NOLTING e colaboradores em 1996, para avaliar o efeito bactericida da piperacilina sobre *Escherichia coli in vitro*. O desenvolvimento desse modelo foi realizado a partir de simulações, utilizando modelo de infecção experimental *in vitro*, do perfil de concentração tecidual livre esperado em tecido muscular de humanos após administração *i.v. bolus* de piperacilina.

Na ausência do fármaco, o crescimento bacteriano pode ser expresso pela variação do número de colônias em função do tempo (dN/dt), que é função direta da constante de geração bacteriana (k) e do número de unidades formadoras de colônias no tempo zero (N) ou inóculo:

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (6)$$

Quando o antibiótico é inserido no sistema, sua concentração passa a influenciar negativamente a constante de geração bacteriana, e o efeito do antibiótico pode ser determinado através da equação (NOLTING *et al.*,1996):

$$\frac{dN}{dt} = \left(k - \frac{k_{max} \cdot C}{CE_{50} + C} \right) \cdot N \quad (7)$$

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

Ao contrário da utilização da CIM, que é um parâmetro estanque, obtido com uma concentração fixa do fármaco, este modelo estabeleceu três novos parâmetros

para a avaliação do efeito antimicrobiano sobre o microrganismo: k , k_{\max} e CE_{50} . Estes parâmetros servem para descrever todo o perfil de efeito observado devido à flutuação do fármaco no local de infecção, em função da eliminação. Outra vantagem do modelo é permitir a previsão, através de simulação, do efeito esperado após a administração de diferentes posologias do fármaco podendo ser utilizado para comparação de diferentes doses e intervalos de dose de modo mais dinâmico e efetivo (NOLTING *et al.*, 1996).

Diversos antibacterianos tiveram seu perfil de morte em função do tempo avaliados pelo modelo de E_{\max} sigmoidal modificado e este modelo foi capaz de descrever as relações entre efeito e tempo para a piperacilina *in vitro* (NOLTING *et al.*, 1996) e *in vivo* (ARAÚJO, 2000), piperacilina associada ao tazobactam (DALLA COSTA *et al.*, 1996), cefaclor (DE LA PENÃ *et al.*, 2004) entre outros.

Uma importante alteração para o modelo E_{\max} sigmoidal, foi proposta por Mouton e colaboradores (1997), baseando-se no fato de que modelos *in vitro* apresentam fatores limitantes do crescimento do microrganismo como, por exemplo, nutrientes e espaço. Após a etapa de crescimento exponencial, uma cultura bacteriana atinge um platô em que a velocidade de multiplicação das bactérias diminui. Desse modo, foi proposta pelos autores a adição de um termo na equação de E_{\max} modificada, representado por N_{\max} , que indica o maior número de bactérias que uma cultura *in vitro* suporta antes de entrar na fase de platô:

$$\frac{dN}{dt} = \left\{ \left[k \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \right] - \frac{k_{\max} \cdot C_t^\gamma}{CE_{50}^\gamma + C_t^\gamma} \right\} \cdot N \quad (8)$$

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

Não há descrito na literatura a aplicação de modelos PK/PD para antifúngicos, e considerando-se que a cinética de crescimento de leveduras não é muito distinta das estudadas para bactérias, no que se refere às limitações de crescimento, neste trabalho pretende-se testar a aplicabilidade dos modelos descritos na literatura e modificá-los casos seja necessário para descrever a relação entre o efeito e o tempo do VRC.

2.8 Referências

1. ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F. *et al.* Correlation of fluconazol MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p. 1544-1548, 2000.
2. ANDES, D. *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1179-1186, 2004.
3. ANDES, D., MARCHILLO, K., STANSTAD, T., and R. CONKLIN. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.10, p. 3165-3169, 2003.
4. ANVISA - BRASIL: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 1185, de 09 julho de 2002 disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185_02re.htm
5. ARAUJO, Bibiana Verlindo. **Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica da Piperacilina em Ratos Imunodeprimidos Infectados com *Escherichia coli***. 2002. 88p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
6. AVILES, P.; FALCOZ, C.; GUILLEN, M.J. *et al.* Correlation between in vitro and in vivo activities of GM 237354, a new sordarin derivative, against *Candida albicans* in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model and influence of protein binding. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p. 1543-1551, 2001.
7. AWAD, A.S.; WEBB, R.L.; CAREY, R.M. *et al* Renal nitric oxide production is decreased in diabetic rats and improved by AT1 receptor blockade. **J. Hypertens.** v. 22, n. 8, p. 571-7, 2004.
8. BMMERT G.F.; FOSTEL, J.M. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 1255-65, 2000.
9. BARBERINO, M. G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C. *et al.* Evaluation of Blood Stream Infections by *Candida* in Three Tertiary Hospitals in Salvador, Brazil: A Case-Control Study. **The Braz. J. Infec. Dis.** v. 10, n.1, p. 36-40, 2006.

10. BRUNNER, M.; DERENDORF, H.; MULLER, M. Microdialysis for *in vivo* pharmacokinetic /pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. **Curr. Opin. Pharm.** v. 5, p. 495–499, 2005.
11. CARRILO-MUNÓZ, A. J.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.18, p.2-5, 2001.
12. CLSI - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.
13. COLOMBO, A. L. E GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p.599-607, 2003.
14. CSAJKA, C.; VEROTTA, D. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling:History and Perspectives. **J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 33, n. 3,p. 227-279, 2006.
15. CHANDRASEKAR, P. Selection criteria for antifungals: the right patients and the right reasons. **Intern. J. Antimicrob. Agents** 27S S17–S20, 2006.
16. CHAVEZ, M.; BERNAL, S.; VALVERDE, A. *et al.* *In vitro* activity of voriconazole (UK109,496), LY303366 and other antifungal agents against oral *Candida spp* isolates from HIV-infected patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 697-700, 1999.
17. DALLA COSTA, T.; NOLTING, A.; KOVAR, A.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 13, n.1, p. 91-96, 1998.
18. DE LA PENA, A.; GRABE, A.; RAND, K.H. *et al* PK-PD modelling of the effect of cefaclor on four different bacterial strains. **Int. J. Antimicrob. Agents** v. 23, n. 3, p.218-25, 2004.
19. DE LANGE, E.C.M.; DE BOER, A.G.; BREIMER, D.D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 125–148, 2000.
20. DELACHER, S.; DERENDORF, F. H.; HOLLENSTEIN, V. *et al.* A combined *in vivo* PK-*in vitro* PD approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in human. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 6, p. 733-739, 2000.
21. DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G (Ed). **Pharmacokinetics Pharmacodynamics Correlation**. Boca raton: CRC Press, 1995.

22. DERENDORF, H.; MEIBOHN, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship: concepts and perspectives. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 1999.
23. DODDS, E.S.; DREW, R. H.; PERFECT, J.R. Antifungal Pharmacodynamics: Review of the Literature and Clinical Applications. **Pharmacoth.**, v.20, n.11, p.1335-55, 2000.
24. EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; McClish, D.K.; *et al.*, Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: a three-year analysis. **Clin. Infect. Dis.** v. 29., p. 239-244.
25. ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Application of microdialysis in pharmacokinetics studies. **Pharm. Res.**, v. 14, n. 3, p. 267-288, 1997.
26. ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK 109,496) against Opportunistic Filamentous and Dimorphic Fungi and Common and Emerging Yeas Pathogens., **J. Clin. Microb.**, v. 36, n.1., p. 198-2002, 1998.
27. ESPINEL-INGROFF, A.; WARNOCK, W. D.; VASQUEZ, J. A. *et al.* *In vitro* antifungal suscetibility methods and clinical implications of antifungal resistance. **Medical Micology**, v. 38, suppl. 1, p. 293-304, 2000.
28. FDA - Background document for the antiviral drug products advisory committee meeting October 4, 2001: Voriconazole tablets and voriconazole injection. Pfizer Global Research & Development NDAs 21-66 and 21-267. Food and Drug Administration Web site. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3792b_02_FDA-voriconazole.htm. Acesso em 18 de novembro de 2003.
29. GIRMENIA C.; MARTINO, P. New antifungal and new clinical trials: interpreting results may be difficult. **Curr. Opin. Oncol.** V. 15, n.4, p. 283-8, 2003.
30. GIRMENIA, C.; LUZI, G.; MONACO,M.; *et al.* Use of voriconazole in treatment of *Scedosporium apiospermum* infection: Case report. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p. 1436-1438, 1998.
31. GRAYBILL, J.R. Systemic mycoses in the 21st century. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** v. 9 n. 2, p.297-311, 1995.
32. GRAYBILL, J.R. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. **Drug Resist. Updat.** v. 3, n. 6, p. 364-383, 2000.

33. GROTH, L.; JORGENSEN, A. *In vitro* microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. **Anal. Chem. Acta**, v. 355, p. 75-83, 1997.
34. HARDMAN *et al.* (Ed.) **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
35. HOLFORD, N. H. G.; SHEINER, L. B. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. **Clin. Pharmacokinetic**, v. 6, p. 429-453, 1981.
36. JEU, L.; LYAKHOVESKIY, A.; FUNG, H. Voriconazole. **Clin. Therap.**, v.13, p. 1321-1381, 2003.
37. JOHANSEN, M. J.; NEWMAN, R. A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetic and pharmacodynamic. **Pharmacother.**, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.
38. KLEPSEK, M. e LEWIS, R.E. Antifungal Pharmacodynamics. *In*: NIGHTINGALE, C.H. (Ed). **Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice**. New York: MacGraw Hill, 2002.
39. KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E. *et al.* Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standard models. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.
40. LAZARUS, H.; BLUMER, J.; YANOVICH, S. *et al.* Safety and Pharmacokinetics of oral voriconazole in patients at risk of fungal infection: A dose escalation study. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 42, p. 395-402, 2002.
41. LEVÊQUE, D., NIVOIX, Y. JEHL, F. *et al* Clinical pharmacokinetics of voriconazole **Intern. J. Antim. Agents** v. 27, p. 274–284, 2006.
42. Li, Y.; DERENDORF, H. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics against *Candida* sp. using time-kill curves. Abstract.
43. LÖNNROTH, P.; JANSSON, P. A.; SMITH, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in human. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 228-231, 1987.
44. LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUARDO, J.M. Antifúngicos de Uso Sistémico. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v 21, n. 7, p. 366-380, 2003.
45. MAHMMOUD, A. G.; REX, J. H.; GALGIANI, J. N. Susceptibility testing fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. **J. Clin. Microb.**, v. 34, n. 3, p. 489-495, 1996.

46. MAHAMMOUD, A. G.; RICE, L. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Correlation of these Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clin. Microb. Rev.**, v. 12, n.4, p. 501-17, 1999.
47. MARCO, F.; DANES, C.; ALMELA, M. *et al.* Trends in frequency and *in vitro* susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 46, n. 4, p. 259-264, 2003.
48. MARCO, F.; PFALLER, M. A.; MESSER, S. *et al.* *In vitro* activities of voriconazole (UK 109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 161-163, 1998.
49. MARR, K. A.; RUSTAD, T. R.; REX, J. H. *et al.* The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1383-1386, 1999.
50. MENACHERY, S.; HUBERT, W.; JUSTICE, J. B. Jr. *in vivo* calibration of microdialysis probes for exogenous compounds. **Anal. Chem.**, v. 64, p. 577-583, 1992.
51. MOUTON, J. W.; VINKS, A. T. T.; PUNT, N. C. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 733-738, 1997.
52. MUPANOMUNDA, M. M.; TIAN, B.; ISHIOKA, N. *et al.* Renal interstitial Ca^{2+} . **Am. J. Physiol Renal Physiol.**, v. 278, p. 644-649, 2000.
53. NGUYEN, M. H.; CLANCY, C. J.; YU, V. L. *et al.* Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 425-430, 1998.
54. NISHIYAMA, A.; DALE, M. S.; NAVAR, G. Renal interstitial fluid concentrations angiotensin I and angiotensin II during local angiotensin-converting enzyme inhibition. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 2207-2212, 2002.
55. NOLTING, A.; DALLA COSTA, T.; RAND, K.H.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 13, n.1, p. 91-96, 1996.
56. PALMA, Eduardo Celia. **Modelagem PK/PD do efeito bactericida do Norfloxacino contra diferentes microrganismos.** 2003 115p. Dissertação

(mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

57. PASQUALOTTO A.C., NEDEL W.L., MACHADO T.S. et al A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia **Mycopathologia** v. 160, p.111–116, 2005.
58. PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. et al. In vitro susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, SCH 56592, and voriconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 3242,-3244, 1998.
59. PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R.J. et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolates of *Candida spp.* **Antimicrob. Agents Chemother.** v.46,, p.1723-1727, 2002.
60. PFALLER, M. A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 776-784, 1996.
61. PLOCK, N.; KLOFT,C. Microdialysis:theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 25, p. 1-24, 2005.
62. POLAK, A. Experimental models in antifungal chemotherapy. **Mycoses**, v. 41, n. 1-2, p. 1-30, 1998.
63. PURKINS, L.; WOOD, N.; GHAHRAMANI, P.; et al. Pharmacokinetics and Safety of Voriconazole following Intravenous to Oral-dose escalation Regimens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n.8., p.2546-2553, 2002.
64. RANG, R.; DALE, X; et al. **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
65. Relação de cadastro de produtos novos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em 27 de novembro de 2006.
66. REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1-8, 1995.
67. REX, J.H.; PFALLER, J.N., GALGIANI, J.N et al.. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. Subcommittee on antifungal

Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Clin. Infect. Dis.** v.24, p.235-47, 1997.

68. ROFFEY, S. J.; COLE, S.; COMBY, P. *et al.* The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog and human. **Drug Met. Disp.**, v. 31, n. 6, p. 731-341, 2003.
69. ROMANI, L.; BISTONI F.; PUCCETTI P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts **Curr. Opin. Microb.** v. 6, p. 338–343, 2003.
70. RUSSEL, E. L.; LUND, B. C.; KLEPSE, M. E. *et al.* Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. **Antimicrobiol. Agents Chemother.**, v. 42, n. 6 p. 1382-1386, 1998.
71. SABO, J.A.; ABDEL-RAHMAN, S.M. Voriconazole: a new triazole antifungal. **Ann. Pharmacother.**, v.34, p. 1032-1043, 2000.
72. SANATI, H.; BELANGER, P.; FRATTI, R. *et al.*, A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida kruzei*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.41, p.2492-2496, 1997.
73. SILVA, P. **Farmacologia**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
74. SOBEL, J.D. For the Mycoses Study Group. Practice guidelines for the treatment of fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 652, 2000.
75. TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
76. THEURETZBACHER, U.; IHLE, F. DERENDORF, H. Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Profile of Voriconazole. **Clin Pharmacokinet**, v. 45, n.7, p. 649-663, 2006.
77. TURNIDGE, J.D.; GUDMUNDSSON, S.; VOGELMAN, B. *et al.* The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 34, n. 1, p.83-92, 1994.
78. WAGNER, A.; NILLS, K.; NELSON, P. W. *et al.* Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B – resistant *Candida* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 2520-2522, 1995.

79. WALSH, T.J.; MERZ, W.G. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. **Am. J. Clin. Pathol.** V.85, p.498-502, 1986.
80. WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 115-125, 1995.
81. WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, n. 39, p. 309–337, 2004.

**Capítulo 3: Experimental disseminated candidiasis induced by
albicans and *non-albicans* species in Wistar rats**

Experimental disseminated candidiasis induced by *albicans* and *non-albicans* species in Wistar rats

Bibiana V. de Araujo²; Sandra E. Haas²; Vanessa C. Blatt¹; Teresa Dalla Costa^{1,2*}

¹Faculdade de Farmácia; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Candidíase experimental disseminada induzida por espécies *albicans* e *não-albicans* em Ratos Wistar

Resumo

Este estudo teve como objetivo a adaptação do modelo de candidíase disseminada, previamente descrito na literatura para camundongos, a ratos Wistar. Foi avaliada a influência do sistema imune e da espécie de *Candida* no desfecho da infecção. Os parâmetros avaliados foram: variação de peso (g), dano tecidual e grau de colonização das leveduras nos rins (média \pm dp). Os ratos foram infectados através da injeção intravenosa de $2,5 \cdot 10^5$ UFC de *C. albicans*, *C. glabrata* ou *C. krusei*. Dois ou sete dias após a inoculação, os animais foram sacrificados e a metade de cada rim foi processada para a contagem de leveduras. A outra metade foi utilizada para histopatologia. Os animais imunocomprometidos apresentaram uma grande perda de peso; o grupo *albicans* foi o mais afetado. Os grupos *albicans* imunocompetentes mostraram Log UFC/g de $5,51 \pm 0,56$ e $6,29 \pm 0,25$ após 2 e 7 dias, respectivamente. Os grupos *albicans* imunocomprometidos apresentaram altas contagens de leveduras após 2 dias (Log UFC/g $6,43 \pm 0,59$) e todos os animais morreram no período de 4 dias. Os grupos imunocompetentes infectados com *Candida glabrata* e *Candida krusei* apresentaram Log UFC/g de $2,48 \pm 0,46$ e $2,98 \pm 0,27$ após 2 dias, respectivamente, e não foram observadas leveduras nos tecidos em 7 dias. Os grupos *não-albicans* imunocomprometidos correspondentes tiveram infecções mais pronunciadas. Todos os animais infectados com *C. krusei* morreram após 5 dias. A histopatologia mostrou maiores danos nos animais imunocomprometidos do grupo *albicans*. A infecção experimental mostrou-se reprodutível e mimetiza a candidíase disseminada observada em humanos.

Palavras-chave: candidíase disseminada, modelo de infecção experimental, *Candida sp.*, ratos Wistar

1. Introduction

Animal infection models are very useful tools given that they provide further information about the physiopathological mechanisms involved in the infection process, in a controlled environment, thus allowing a precise analysis of the cause-effect interactions between host and pathogen (2, 15). Furthermore, after validation, these models can be also applied for pharmacodynamic evaluation of new antimicrobial agents, as well as for pharmacokinetic investigation, allowing comparisons between antimicrobial drugs tissues distribution in infected (6) and in healthy animals (10).

Among the yeast experimental infection models reported in the literature, the disseminated candidiasis is extensively described in animal species such as mouse (3), guinea pig (11) and rabbits (13).

The importance of the disseminated candidiasis model can be attributed to its versatility, being applied for the analysis of virulence factors expression such as proteinases and phospholipases (9), for the pharmacodynamic evaluation of antifungal agents (3) and also in studies dealing with the histopathological alterations caused by *Candida* sp (4). Some authors consider this last application one of the main advantages of the model due to the great similarity observed between tissue alterations in human at the clinical setting and those observed in animal tissues experimentally infected. This similarity makes it possible to identify the physiopathology of the infectious process helping the determination of new drug targets for infection treatment (8, 11).

Recently, animal infection models have also been used as a tool to evaluate changes in drug penetration into infected and inflamed tissues in comparison to the healthy equivalents (10).

Alterations on antifungals tissue penetration due to *Candida* infection have not been reported in the literature so far because a suitable experimental infection model is not available. In this context, an animal model that reproduces the tissue alteration observed after *Candida* infection in humans and, at the same time, allows the determination of the kinetics of antifungal tissue penetration would be of great importance for therapy optimization. Hence, the aim of this paper was to adapt and to

evaluate the mouse disseminated candidiasis model to Wistar rats, which is a more suitable animal for pharmacokinetic investigations.

2. Material and methods

2.1 Microorganisms

Strains of *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 2001) and *Candida krusei* (ATCC 6258) were employed in this study. All strains were kindly donated by Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker from the Laboratory of Mycology (ICBS-UFRGS) and maintained on Sabouraud agar plus dextrose (SDA) (4 %) slants, at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Animals

All experiments were approved by the Ethics in Research Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocol # 2004300).

Wistar rats (weighting 200-250 g) were purchased from FEPPS (Fundação para Pesquisa e Produção em Saúde, Porto Alegre – RS, Brazil) and maintained in accordance with the criteria of the Canadian Council on Animal Care (12). The animals received water and standard rat chow *ad libitum*.

2.3 Experimental Design

The experimental design took into consideration the different degrees of virulence in animals and humans of the three *Candida* strains used and the immune conditions of the hosts, an important factor associated with systemic candidiasis. Eight experimental groups, of 6 animals each, were evaluated in this study: immunocompetent rats infected with *C. albicans* (G1) or *C. glabrata* (G2) or *C. krusei* (G3); immunocompromised rats infected with *C. albicans* (G4) or *C. glabrata* (G5) or *C. krusei* (G6). Two additional groups (G7 and G8) were included as controls, which allowed for the histopathological comparisons between healthy immunocompetent (G7) and immunocompromised (G8) animals.

The course of infection was evaluated in two different moments: two (n = 3/group) and seven (n = 3/group) days after inoculation. The parameters evaluated were the weight loss during the observation period, the degree of kidney histopathological damage and the yeast growth in the kidney, determined by the number of colony forming units per gram of tissue (Log CFU/g).

2.4 Induction of Immunosuppression

The animals from groups G4, G5, G6 and G8 were rendered immunocompromised (polymorphonuclear cell count $< 100/\text{mm}^3$) by injecting cyclophosphamide (Asta-Médica Oncology) intraperitoneally 5 days (150 mg/kg) and 1 day (100 mg/kg) before inoculation.

The total leukocytes were counted five days after the treatment with cyclophosphamide and compared with those of control group, which received saline solution in same volume and dosing regimen as the drug. These analyses were conducted by the Laboratory of Clinical and Toxicological Analyses of Faculdade de Farmácia (UFRGS, Porto Alegre – RS), employing flow cytometric technique.

2.5 Inoculum Preparation and Animals Inoculation

Viewing to prepare a calibration curve, yeast suspensions from colonies grown for 48 h in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 4% 37 ± 1 °C were prepared in 0.9% sterile saline solution in different concentration and the transmittance of these suspension were read in spectrophotometer (Analyser 800) at 530 nm (3). Suspensions were prepared in order to produce transmittances of 40, 50 and 60%. The experiment was performed in triplicate. After the transmittance was determined, the yeast suspensions were successively 10-fold diluted, plated in SDA 4% and incubated at 37 ± 1 °C for 48 h, in duplicate. Total yeast count was determined for each absorbance band. A calibration curve was build by plotting the transmittance vs. yeast cells count. The chosen inoculum size for the following experiments ($2.5 \cdot 10^6$ CFU/mL) corresponds a transmittance of 50%.

For the infection process, the animals were restrained in a plastic restrainer and were injected intravenously, through the lateral tail vein, with 0.1 mL of inoculum in saline ($2.5 \cdot 10^5$ CFU) determined using the calibration curve.

2.6 Evaluation of Infection Progress and Weight Loss

The animals were weighted in the beginning of the infection experiment (day zero) and on the 2nd or 7th day post-infection. Animals' behavior was observed during the whole experimental period. Piloerection, weight lost and weakness were used as markers of the infection progress.

The total weight variation expressed in gram (g) for each group was calculated as the perceptual ratio between total animal weight, measured right before inoculation (day zero) and total animal weight after two or seven days of inoculation.

2.7 Determination of CFU in the Kidney and Histopathology

Two and seven days after inoculation, the animals were sacrificed by decapitation and the kidneys were removed and weighted. The left and the right kidney's half of each animal was homogenized (PowerGen® 125) in 0.9% sterile saline and two aliquots of the homogenate were 10-fold diluted six times. The dilutions were plated in SDA 4%, and incubated at 37 ± 1 °C for 48 h, when the viable yeast counts were determined. The lower limit of detection of kidney CFU was 100.

The CFU per gram of kidney from each animal was converted to Log for statistical analysis. The results from the different groups were compared by ANOVA three ways using the software SigmaStat® ($\alpha = 0.05$).

The other kidney's half of the animals were submitted to histopathological examination. The kidney was removed and immediately fixed in 10 % formalin. The histopathological analyses were performed by the Laboratory of Histology of Universidade Regional Integrada (Santo Ângelo-RS-Brazil), after embedding in paraffin. Five micrometers thick sections ($n = 3$) from the kidney of each animal were stained with hematoxylin and eosin (HE), and the degree of damage was evaluated by microscopic examination with 25 x and 40 x.

3. Results

3.1 Evaluation of Infection Progress and Weight Loss

During the evaluation of immunosuppression induced by cyclophosphamide, a severe and significant leukocytopenia was observed, characterized by polymorphonuclear cells count around $78 \pm 12 \text{ cell/mm}^3$ in comparison to the $6,800 \pm 1,500 \text{ cell/mm}^3$ determined for the control group (G7) ($p < 0.05$).

The general signals of infection progress observed, piloerection and weakness, seem to be associated to the immunosuppression induced and were observed for three groups: the immunocompetent (G1) and immunocompromised rats infected with *C. albicans* (G4) and the immunocompromised *C. krusei* (G5). Lethargy, anorexia and hunched posture were observed only for the *C. albicans* groups (G1 and G4). The animals in the other groups did not present any visible difference in comparison to the control groups (G7 and G8).

The weight loss, however, was observed for several groups investigated, in different degrees. The total weight variation of each group is shown in Table 1. It can be seen that the immunosuppression lead to weight loss in the control group (G8) in opposition to the weight gain observed for the immunocompetent control (G7).

Table 1. Degree of weight loss or gain observed in different experimental groups of Wistar rats infected by *Candida sp* after 2 and 7 days of infection, expressed as perceptual variation of total weight ($\Delta\%$) regarding to the day of inoculation (day zero) expressed as average \pm sd (n = 6/group).

Immune condition Strains	Immunocompetent		Immunocompromised	
	Day 2 ($\Delta\%$)	Day 7 ($\Delta\%$)	Day 2 ($\Delta\%$)	Day 7 ($\Delta\%$)
<i>C. albicans</i> (G1 and G4)	- 9.8 \pm 2.2	- 5.5 \pm 1.5	- 23.8 \pm 3.4	†
<i>C. glabrata</i> (G2 and G5)	+ 12.4 \pm 2.8	+ 12.8 \pm 2.7	-9.8 \pm 1.0	-12.5 \pm 2.0
<i>C. krusei</i> (G3 and G6)	+ 11.8 \pm 3.2	+ 10.6 \pm 1.0	- 9.6 \pm 1.2	†
Control groups (G7 and G8)	+ 14.1 \pm 3.1	+ 20.5 \pm 2.8	-5.6 \pm 0.4	- 8.9 \pm 1.1

(+) = weight gain; (-) = weight loss, (†) = death.

The infection reduced the weight gain of all infected groups investigated, compared to the respective control groups. Furthermore, a weight loss could be observed for the *C. albicans* infected group, immunocompromised or not. *Candida albicans* immunocompetent group recovered a little bit of weight after 7 days of infection, in comparison to the second day post infection, suggesting a recovery of the infection.

Among the immunocompromised groups, all animals showed a weight loss compared to day zero. This effect was more pronounced for *C. albicans* group (G4), on the second day post-infection. After seven days, the weight evaluation could not be followed up for all groups due to animal's death in *C. albicans* (G4) and *C. krusei* (G6) groups. For the survivor groups, immunocompromised control (G7) and *C. glabrata* infected (G5), the weight loss increased in comparison to the second day post-infection.

The evaluation of the weight showed that the infection led to weight reduction, which was more pronounced in the immunocompromised animals, and led to animal death for the most virulent strains.

3.2 Yeast Count in the Kidney

The yeast counts in the kidneys of the infected animals are summarized in the Table 2.

The immunosuppression allowed the development of a more pronounced infection for all *Candida* strains investigated. The yeast counts in the immunocompromised groups were statistically bigger than those observed for the corresponding immunocompetent groups ($p < 0.05$).

Table 2. Total yeast count in the kidney evaluated 2 and 7 days post-infection for immunocompetent and immunocompromised Wistar rats infected with *C. albicans* and *non-albicans* strains (average \pm standard deviation) (n = 3/group).

Immune status/Group	Log CFU/g kidney	
	Day 2	Day 7
Immunocompetent		
<i>C. albicans</i> (G1)	5.51 \pm 0.56	6.29 \pm 0.25
<i>C. glabrata</i> (G2)	2.48 \pm 0.27*	b.l.d
<i>C. krusei</i> (G3)	2.98 \pm 0.46*	b.l.d.
Immunocompromised		
<i>C. albicans</i> (G4)	6.43 \pm 0.59	death
<i>C. glabrata</i> (G5)	5.60 \pm 0.57	6.98 \pm 0.48
<i>C. krusei</i> (G6)	6.02 \pm 0.73	death

*Statistical difference in comparison to the corresponding immunocompromised group (p < 0.001). b.l.d. = below limits of detection that was equal to 100 CFU.

The comparison among the *Candida* strains showed the higher virulence of *Candida albicans* either for immunocompetent or immunocompromised animals. *C. krusei* and *C. glabrata* were included in this study due to their increased importance among the *non-albicans* strains in nosocomial infections. The two *non-albicans* strains showed a very similar behavior, characterized by lower infectious potential in immunocompetent animals with similar Log CFU/g kidney ($\alpha = 0.05$), which improved significantly due to the induction of immunosuppression, leading to animals death in the *C. krusei* group after seven days of inoculation.

The effects of the immunosuppression on the infection were more evident when the long-time course of the infection was evaluated (7 days), becoming a determinant of the infection outcome. In this context, after seven days of infection, for the groups with preserved immune system (G1 to G3), only the group infected with the most virulent strain (G1) remained infected, while the others cleared the infection. On the other hand, for the immunocompromised groups, animal's death took place around 4-

5 days post-infection for all groups, except for the *C. glabrata*, apparently the less virulent strain against Wistar rats.

3.3 Histopathological Analysis

The histopathological analyses (Figure 1) were performed in kidney tissue removed two or seven days post-infection, in the cases where the animals survived until the end of the experiment. Control groups (G7 and G8) were also evaluated after 2 and 7 days after the beginning of the experiments. No kidney histological difference were observed due to immunosuppression and both groups presented similar histological findings (Figure 1A)

After two days of infection, a pronounced inflammation with a granulomatous appearance can be observed in the *Candida albicans* infected kidney (G1), present in the whole medulla (Figure 1B and 1C). For the other species a discrete and focal inflammation was observed (G2 and G3) in this time period (Figure 1D and 1E).

Seven days post-infection, *C. krusei* and *C. glabrata* groups did not presented inflammation signal in the tissue, probably due to the clear the infection observed in these groups. The evaluation of *C. albicans* group showed a bigger tissue invasion in the kidneys cortex and medula (Figure 1F).

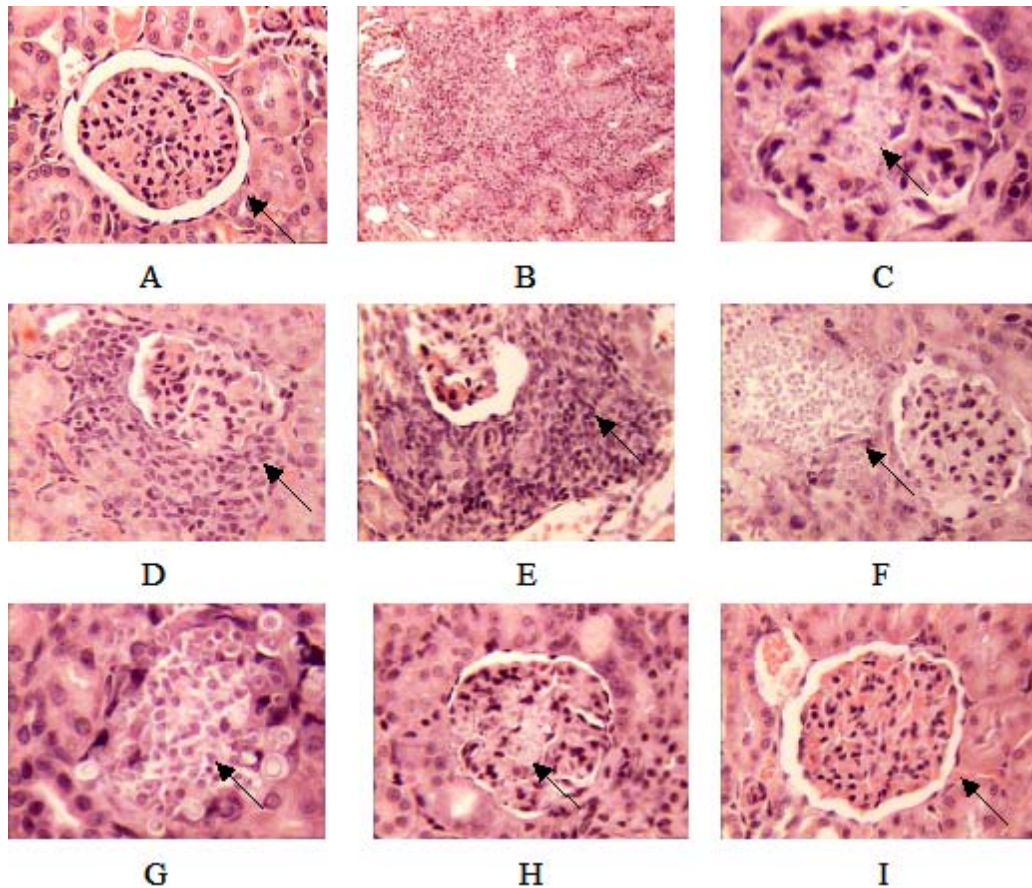


Figure 1. Histological findings in kidney tissues infected with different *Candida* strains, stained with HE (25 x amplification). The arrows point to the alteration observed. (A) Normal aspect of renal tissue, from the control immunocompetent group G7 (B) Pronounced inflammation, present in the whole medulla, with a granulomatous appearance observed in *Candida albicans* (G1) infected kidney two days post-infection. (C) Detail of *C. albicans* (G1) infection in the kidneys after two days of infection (40 x amplification). Discrete and focal inflammation observed after two days in animals infected with *C. glabrata* (G2) (D) and *C. krusei* (G3) (E). (F) *C. albicans* invasion after 7 days of infection in immunocompetent animals (G1). (G) Presence of *C. albicans* (G4) after two days of infection in immunocompromised animals. (H) Bowman space alteration and presence of *C. krusei* in immunocompromised animals after two days of infection (G6). (I) Tissue alterations observed in immunocompromised animals infected with *C. glabrata* seven days post-infection (G5).

Due to the immunosuppression, the leukocytes migration was not observed in the kidney tissue of the G4, G5 and G6 groups. However, after two days, the animals infected with *C. albicans* (G4) and *C. krusei* (G6) showed a Bowman's space alteration, possible associated with the yeasts colonization (Figure 1G and 1H). In seven days, only the animals infected by *C. glabrata* (G5) survived and showed low degree of damage in tissue (Figure 1I). The evaluation of *C. albicans* was not possible due to the animal's death, which took place after forth-fifth day post-infection.

4. Discussion

The aim of this study was to develop and to evaluate a protocol to produce an experimental model of disseminated candidiasis in Wistar rats, a less investigated animal for this kind of infection, although very useful for pharmacokinetic evaluation of drugs in pre-clinical studies.

Factors such as size, maintenance costs and amount of drug needed for administration in rats justify the use of smaller animals, such as mouse, for experimental infection (14), and new antifungal agents investigations (3, 5, 7). The use of rats, however, is justified for the evaluation of drugs distribution at the infection site, using modern techniques such as microdialysis, which are not feasible in mice.

For the rat disseminated experimental candidiasis described in this paper, the key parameter employed to monitor the infection was the colony forming units, the same parameter that has been employed by many researchers, especially in pharmacodynamic and infection progression studies (3, 4).

Although viable counts of *Candida sp.* have shown a peak in organs such as liver, lungs and spleen shortly after intravenous infection, this peak is followed by gradual decline in the number of microorganisms in all organs, except the kidney, where the viable count steadily increases with the infection's progress, becoming the most severely infected organ in disseminated candidiasis. The high predilection of *Candida sp.* for the kidney remains unexplained, but this behavior justifies the use of this organ to assess yeast systemic infection (5, 7).

Few studies in the literature evaluated the course of disseminated candidiasis in rats. Most of the studies used Sprangle-Dawley rats and described only the animal's behavior and the histopathological characteristics of infection, instead of presenting the yeast count in the infected tissue. Furthermore, all studies employed fresh clinical isolates which did not allow for the genotypic and phenotypic characterization of the yeasts employed (16, 5, 7).

The histopathological findings in the immunocompetent animals showed that only *C. albicans* could cause small tissue damage, even after seven days of infection. In the immunocompromised groups (G4, G5 and G6) however, all strains tested caused histopathological alterations, with *Candida albicans* showing the most invasive behavior. The *Candida non-albicans* species showed a lower degree of penetration in both conditions. The better ability of *C. albicans* to colonize, penetrate and damage host tissues than other strains is due to the secretion of proteolytic enzymes and hyphae formation previously reported (9).

Other signals of the infection progress such as lethargy, anorexia, hunched posture and piloerection were observed only for the *C. albicans* groups (G1 and G4). In a study conducted by Balk et al. (5), using immunocompetent adult Wistar rats infected with *C. albicans*, similar observation of lethargy, anorexia and hunched posture, besides ocular porphyrin and nasal secretions, were reported. The histopathological findings described by those authors were also more expressive than those described here, and characterized by inflammatory cells and extensive abscesses filled with polymorphonuclear leukocytes and cellular debris in the tubules, which were not seen in the glomeruli. The differences observed between the reported work and the present findings could be explained by the nature of the strain used to induce the infection. While those authors used fresh clinical isolates, in this present study ATCC strain -biosafety level 1- were used.

The yeast counts determined in this study showed that all *Candida* strains evaluated were able to cause infection, characterized by the yeast presence in the tissue homogenate after two days of inoculation (Table 2). These results are in agreement with those reported by Arendrup et al. (4) for immunocompetent mice, indicating similar infection susceptibility between rats and mice. Both species became

quickly infected recovering in within seven days post infection, except the *C. albicans* infected group (G1).

Among the immunocompromised groups (G4, G5, G6) an increase in the total yeast counts was observed for all strains two days after infection. The bigger CFU count observed in these groups is probably due to the immunosuppression, which played a fundamental role in the infection outcome.

The results obtained with disseminated candidiasis in Wistar rats support the general concept that the immunosuppression is necessary when investigating antifungal drugs because it allows keeping the infection for longer periods of time, while the immunocompetent animals can spontaneously recover from lesser virulent strains such as *C. glabrata* and *C. krusei*, after seven days of inoculation.

The present findings are compatible with those reported by Annaissie et al (1) that observed a shorter survival and higher organ fungal burden in immunocompromised mice infected with *C. krusei*, in comparison with immunocompetent animals.

As expected, *C. albicans*, the most pathogenic strain investigated, caused an infection that persisted after seven days of inoculation in the immunocompetent group and lead to death, in a shorter period of time than, the immunocompromised group. For the *Candida non-albicans* species evaluated in this study, the immune system depression was a determinant factor for the course of the infection. Only when the immune system was suppressed it was possible to observe animal's death and important yeast tissue penetration with *non-albicans strains*, phenomena also observed in immunocompromised patients.

Based on the total yeast count in kidney of immunocompetent mice and in the histopathological damage observed, Arendrup et al. (4) proposed three virulence groups of decreasing pathogenicity, among the various *Candida* species involved in human infections. According to these authors, *C. albicans* belongs to the more virulent group, followed by *C. glabrata*, which showed an intermediate virulence and by *C. krusei*, which shown a lower virulence level than the other species.

The virulence groups defined by Arendrup et al. (4) for mice were partially confirmed by ours results with Wistar rats. For the immunocompetent groups, *C.*

krusei and *C. glabrata* showed similar levels of total yeast count and histopathological degree of damage. However, in immunocompromised groups, *C. krusei* showed higher potential to cause death than *C. glabrata*.

5. Conclusions

This work is the first study that evaluated the infection produced by three standardized strains of *Candida* inoculated to rats, allowing the comparison among species that belong to the same biosafety level. The Wistar rat model described is a very useful tool that can be applied for pharmacodynamic investigation of traditional and new antifungal drugs. Furthermore, the advantage of this model over the *Candida* infection model in mice, is that it allows for blood and tissue sampling for long periods of times from the same animal, using techniques such as microdialysis, rendering possible the establishment the pharmacokinetic patterns of antifungal penetration into infected tissues, fundamental for drug dosing regimen investigation and optimization.

Acknowledgements

The authors wish to thank Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker for providing the *Candida* strains used in this work. The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Bazil) is acknowledged for the scholarships granted to Vanessa Blatt and Bibiana Verlindo de Araujo as well as for the project's financial support (Process # 4733172004-4).

References

1. Anaissie, E., Hachem, R., K-Tin-U, C., Stephens, L.C., Bodey, G.P. (1993) Experimental hematogenous candidiasis caused by *Candida krusei* and *Candida albicans*: species differences in pathogenicity. *Infect Immun.* **61** (4): 1268–1271.

2. Andes, D. (2003) *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47** (4):1179-1186.
3. Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R (2003) *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47** (10): 3165-3169.
4. Arendrup M., Horn, T., Frimodt-Moller, N. (2002) *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant candida species in an animal model. *Infect* **30** (5):286-291.
5. Balk, M.W., Crumrine, M.H., Fischer, G.W. (1978). Evaluation of miconazole therapy in experimental disseminated candidiasis in laboratory rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13** (2):321-325.
6. Dahyot, C., Marchand, S., Pessini, G. L., Pariat, C., Debaene, B., Couet, W., Mimoz, O. (2006). Microdialysis Study of Imipenem Distribution in Skeletal Muscle and Lung Extracellular Fluids of *Acinetobacter baumannii*-Infected Rats.. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50** (6): 2265-2267.
7. Fisher, M.A, Shen, S.H., Haddad, J., Tarry, W.F. (1989) Comparison of in vivo activity of fluconazole with that of amphotericin B against *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33** (9):1443-1446.
8. Graybill, J.R., Najvar, L.K. (2000) The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist.Updat*, **3**(6):364-383.
9. Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole G.T., Kitajima Y. et al (1995).Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans*. *Infect. Immun.* **63** (5) 1993-1998.
10. Marchand, S., Dahyot, C., Lamarche, Mimoz, I., Couet, W. (2005). Microdialysis Study of Imipenem Distribution in Skeletal Muscle and Lung Extracellular Fluids of Noninfected Rats. *Antimicrob. Agents. Chemother*, **49** (6): 2356–2361.

11. Odds, F.C., Oris, M., Van Dorsselaer, P., Van Gerven, F. (2000) Activities of an intravenous formulation of itraconazole in experimental disseminated *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **44** (11):3180-3183.
12. Olfert, E.D., Cross, B.M., McWilliam A.A. (Eds.) Canadian Council on Animal Care: Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canada, 1993, v.1., 298 p. Available on-line in: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf
13. Petraitiene, R.; Petraitis, V.; Kelaher, Groll, A. Candelario, H.M., Sein, T, Bell, A. et al. (2005) .Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* **49** (9): 2084-2092.
14. Repentigny, L. (2004). Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiol.* **7** (4):324-329;
15. Sande, M., Zak, O. Handbook of Animal Models of Infection: Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy. Academic Press, USA, 1999, 1136p.
16. Schmidt, A. (1996) Systemic candidiasis in Sprague-Dawley rats. *J. Med. Vet. Mycol.* **34** (2): 99-104.

**Capítulo 4: Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for
determination of voriconazole in rat plasma**

Artigo publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*– JPBA

Short communication

Validation of rapid and simple LC–MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma

B.V. Araujo^a, D.J. Conrado^a, E.C. Palma^b, Teresa Dalla Costa^{a,b,*}

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

^b Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Received 20 December 2006; received in revised form 23 March 2007; accepted 26 March 2007

Available online 30 March 2007

Abstract

A rapid, simple and sensitive LC–MS/MS analytical method was developed and validated for the determination of voriconazole (VRC) in rat plasma, using ketoconazole as internal standard (IS). Analysis was performed on a Shimadzu[®] HPLC system using a Shimadzu[®] C18 column and isocratic elution with acetonitrile–water–formic acid (60:40:0.05, v/v/v), at a flow of 1.0 mL/min (split ratio 1:5), and a mass spectrometer Micromass[®], equipped with a double quadrupole and an electrospray ionization interface, operated in a positive mode. Plasma samples were deproteinized with methanol (1:2) and 30 μ L of the supernatant was injected into the system. The retention times of VRC and IS were approximately 3.3 and 2.7 min, respectively. Calibration curves in spiked plasma were linear over the concentration range of 50–2500 ng/mL, with determination coefficient >0.98. The lower limit of quantification was 50 ng/mL. The accuracy of the method was within 5%. Intra- and inter-day relative standard deviations were less or equal to 12.5 and 7.7%, respectively. The applicability of the LC–MS–MS method for pharmacokinetic studies was tested using plasma samples obtained after intravenous administration of VRC to male Wistar rats. The reported method provided the necessary sensitivity, linearity, precision, accuracy, and specificity to allow the determination of VRC in pre-clinical pharmacokinetic studies.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Voriconazole; LC–MS/MS; Pharmacokinetics; Biologic fluid; Validation

1. Introduction

Voriconazole (VRC) (2*R*,3*S*)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoro-4-pyrimidinyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanol (Fig. 1) is a new antifungal agent that belongs to the triazole family and was the first drug in its pharmacological group, to be used in human clinical practice [1].

The compound exhibits a high activity against a broad spectrum of medically important pathogens including *Aspergillus* [2] and *Candida* species [3], as well as emerging fungal pathogens such as *Scedosporium* and *Fusarium* species [4].

The pharmacokinetics of VRC has been investigated in different animal species such as mice [5], Sprague–Dawley rats and

guinea pigs [6]. Furthermore, there are several clinical pharmacokinetic evaluation of VRC in humans, including healthy volunteers, patients and children [7–10].

Many researchers have been using free plasma levels of triazolic antifungal drugs to evaluate their pharmacokinetic/pharmacodynamic indices and predict efficacy in pre-clinical studies, assuming that these levels are a good surrogate for the concentrations in the interstitial space [5,11,12]. However, the relationship between plasma and free tissue levels of voriconazole has not been established in animals or humans. To allow this investigation in animals, a voriconazole quantification method that deals with small sample volumes and presents a low limit of quantification is needed.

Voriconazole quantification in all studies is performed using HPLC with drug detection by ultraviolet [6–8,13,14,15] or mass spectrometry (MS) [16–19]. The first report using LC/MS for voriconazole quantification in biological fluids, aqueous humor, was made by Zhou et al. [16] who used solid-phase extraction for sample cleaning. The majority of the reported analytical methods

* Corresponding author at: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3316 5418; fax: +55 51 3316 5437.

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br (T. Dalla Costa).

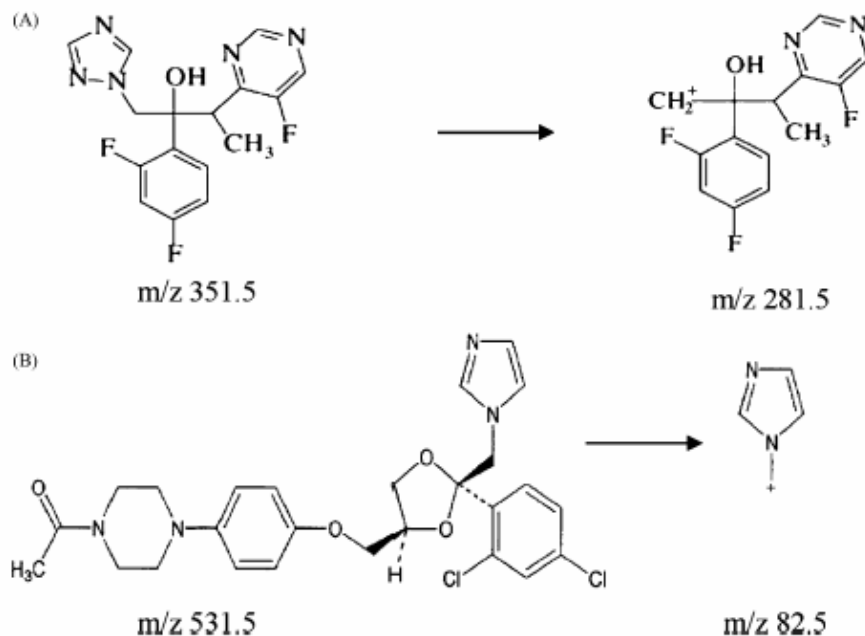


Fig. 1. Chemical structure of voriconazole (A) and the internal standard ketoconazole (B), and fragment ions formed from protonated molecules.

quantifying voriconazole in plasma by UV or LC/MS require big sample volumes, around 1–2 mL [6–8,13–15] or introduce a step to improve the limit of quantification, such as solid-phase extraction [17–19], which raises the cost of analysis. Using some these methods it is not possible to determine voriconazole pharmacokinetic profile following sequential sampling in the same animal [6,13,14] or to investigate drug disposition after the administration of small doses to animals, which are expected to produce drug levels in the low ng/mL range [6,17,18].

In this work, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the determination of voriconazole in rat plasma using small sample volumes and ketoconazole (Fig. 1) as internal standard (IS). The bioanalytical methodology was validated considering the specificity, linearity, precision, accuracy and lower limit of quantification. The applicability of the LC-MS/MS method for pharmacokinetic studies was tested using plasma samples obtained after intravenous (i.v.) administrations of voriconazole in a small dose (2.5 mg/kg) to male Wistar rats.

2. Experimental

2.1. Solvents and chemicals

Voriconazole (Mikotub, India) was kindly donated by Mikotub Laboratory. Ketoconazole was obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Analytical grade formic acid and HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC water from Millipore's Milli-Q System was used throughout the analysis.

2.2. Preparation of standard solutions and quality control samples

Two separate weighted amounts of voriconazole were used to prepare standard stock solutions at 500 µg/mL dissolved in methanol. One stock solution was used to prepare working solutions for the calibration curve standards. The other stock solution was used to prepare standard working solutions for the quality control (QC) samples. The calibration curve samples were prepared by spiking 100 µL of Wistar rat plasma with 10 µL of the appropriate standard working solution to obtain VRC final concentrations of 50, 100, 250, 500, 1000 and 2500 ng/mL. Quality control samples were prepared at 100, 800 and 2000 ng/mL. New standard stock solutions, calibration curve and QC were prepared on each analysis day.

Standard stock solution of ketoconazole (IS) was prepared at 500 µg/mL in methanol. This solution was successively diluted to result in a final concentration of 4 µg/mL of ketoconazole. The IS solutions were prepared on the day of the samples analysis, due to the low stability of IS in methanol.

Chromatographic analysis was carried out on a Shimadzu[®] liquid chromatograph and Micromass[®] model Quattro LC mass spectrometer, using LC-10ADVP solvent delivery system with low-pressure gradient flow control valve FCV-10ALVP, SCL-10AVP system controller and DGU-14A degasser. The injection was made with a Shimadzu[®] SIL-10ADVP automatic injector and analyses were performed using MassLynx[®] software (Version 3.5).

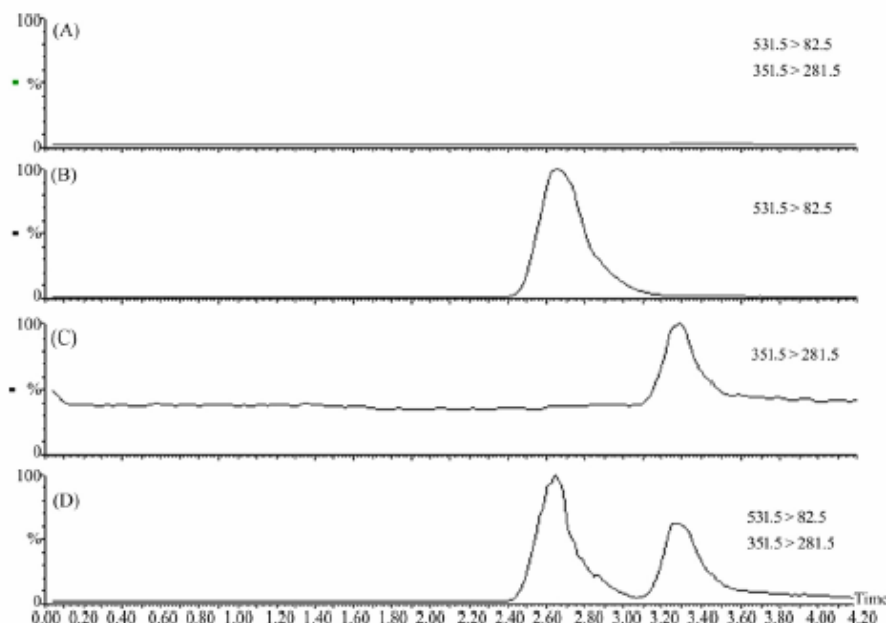


Fig. 2. Representative total ion chromatograms in MRM-ESI⁺ mode in rat plasma: (A) blank plasma, (B) plasma spiked with VRC and IS (50 ng/mL and 133 µg/mL, respectively), (C) plasma spiked with VRC and IS (2500 and 133 µg/mL, respectively), (D) plasma sample 6 h post-administration of 2.5 mg/kg i.v. VRC (plasma concentration 74 ng/mL) with IS (133 ng/mL). The following daughter ion *m/z* ratios were monitored 350.5 > 281.5 for VRC and 531.5 > 82.5 for IS. The retention times observed were: I.S.: 2.7 min and VRC: 3.3 min.

2.3. Sample preparation

Prior to the chromatographic analysis, 100 µL samples were deproteinized by addition of 190 µL of ice-cold methanol and 10 µL of IS (4 µg/mL), vortexed for 30 s and centrifuged at 12,000 rpm, 4 °C for 15 min. The final concentration of ketoconazole in the samples was 133 ng/mL. All plasma samples, including calibration curve, QC and samples from pharmacokinetic experiments were processed in the same manner.

2.4. Instrumentation

2.4.1. Chromatographic and mass spectrometer conditions

The mobile phase used for the chromatographic separation was composed of acetonitrile–water–formic acid (60:40:0.05, v/v/v). The mobile phase was filtered before using and it was delivered isocratically at a flow rate of 1.0 mL/min (split ratio 1:5). The analysis was carried out at 40 °C using Shimadzu[®] Shim-pack HPLC column (150 mm × 4.6 mm i.d.) packed with 5 µm ODS stationary phase, protected by Waters µbondapack guard column packed with 50 µm RP18 material. The autosampler was set to inject 30 µL sample aliquots.

The analyte was monitored using mass spectrometer equipped with a double quadrupole and an electrospray ionization interface, operated in a positive mode (ESI⁺). Samples were introduced into the interface through a heated nebulizer probe set at 250 °C. Nitrogen was the nebulizer and desolvation gas, and argon was used as collision gas. The other operating conditions were: nebulizer gas flow = 35 L/h; desolvation gas flow = 365 L/h; ion spray voltage = 3.2 kV; cone voltage = 36 V;

ion source temperature = 130 °C; entrance potential = –13 V; collision energy = –16 V; collision cell exit potential = –17 V; collision gas pressure = 18 psi. The spectrometer was programmed in multiple reaction monitoring (MRM) mode to allow the specific transition of precursor ion to fragment for each compound. The detection of ion species was performed by monitoring the decay of the mass-to-charge (*m/z*) ratio 350.5, corresponding to the parent molecular ion of voriconazole, to the *m/z* 281.5 product ion, which correspond to the loss of triazole group from the parent molecule. IS was detected by decay of the 531.5 *m/z* precursor ion to the 82.5 *m/z* daughter ion (Fig. 2). This decomposition of the molecular ion of voriconazole was previously documented by Zhou et al. [16] and Egle et al. [19].

2.5. Validation procedures

Standard calibration curve and QC samples were analyzed in triplicate in two consecutive days. Linearity of calibration curves based on peak area ratio (area of analyte/area of IS) as function of the nominal concentration was assessed by weighted (1/concentration) least square regression. Slopes, intercepts and determination coefficients were calculated. The selectivity of the method was investigated for potential interferences of endogenous substances by using six independent batches of rat plasma samples. Moreover, the chromatograms of the experimental samples obtained after i.v. administration of VRC to Wistar rats were compared to the calibration curve standards chromatograms in order to detect interfering peaks. Intra- and inter-day precision and accuracy of the analytical method were shown by triplicate processing and following anal-

ysis of QC samples (100, 800 and 2000 ng/mL). Precision was calculated as relative standard deviation (R.S.D.) of the experimental concentrations and accuracy as the comparison between the experimental and nominal samples concentration. The criteria for acceptability of the data included accuracy within $\pm 15\%$ deviation from the nominal values and precision within $\pm 15\%$ R.S.D., except for the lower limit of quantification (LLOQ), where it should not exceed 20% of R.S.D. [20]. Recovery experiments (extraction efficiency) was performed by comparing the analytical results for extracted samples ($n=3$) with unextracted standards that represent 100% recovery.

2.6. Stability preliminary studies

Preliminary studies were carried out to evaluate VRC stability under the conditions used in this work. Analytes stability was determined during blood sample collection and handling at room temperature for 2 h and after freezing plasma for 15 days at -36°C . Furthermore, the stability of the processed samples was determined at 4°C for 12 h in the autosampler.

2.7. Pharmacokinetic study

The animal experiments were approved by UFRGS Ethics in Research committee (# 2004300).

The applicability of the LC–MS/MS method for pharmacokinetic studies was tested using plasma samples obtained after intravenous administration of VRC to male Wistar rats ($n=6$). The animals were kept under controlled 12 h light–dark cycle during the acclimation period with access to water and food *ad libitum*. For the experiments the animals were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.) and the carotid artery was used for blood collection by an indwelling catheter. The exposed artery and catheter were irrigated with heparinized (125 IU/mL) saline after inserting the catheter. For intravenous administration, the solution was prepared by dissolving VRC in saline containing 20% (v/v) of dimethyl sulfoxide (DMSO). About 0.5 mL of the VRC solution was administered by the femoral vein, corresponding to a 2.5 mg/kg dose. Blood samples (200 μL) were harvested immediately before drug administration (time zero) and at 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 h after administration. Blood were harvested into heparinized tubes and immediately centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 15 min to obtain plasma. The plasma samples were frozen and stored at -36°C until assayed. Plasma (100 μL) samples were processed as described in Section 2.4 for VRC quantification.

3. Results and discussions

3.1. Selectivity and recovery

The selectivity of the analytical methodology can be observed in Fig. 2 by comparing representative chromatograms of independent blank plasma (A), blank plasma spiked with ketoconazole (400 ng/mL) (B), plasma spiked with VRC (50 ng/mL) (C) and a sample rat containing VRC and IS (D). No additional peaks due to endogenous substances were observed that

Table 1
Calibration curve parameters and statistics for VRC in rat plasma^a

Curve	Slope	y-intercept	Determination coefficient
Day 1			
1	0.00024	0.0013	0.998
2	0.00024	0.0011	0.994
3	0.00026	0.0016	0.999
Day 2			
1	0.00027	0.0012	0.999
2	0.00028	-0.0004	0.999
3	0.00028	-0.0004	0.999
Mean ($n=6$)	0.00026		
S.D.	0.000019		
R.S.D. (%)	7.5		

^a S.D., standard deviation; R.S.D., relative standard deviation reference.

would interfere with the detection of the target compounds. Furthermore, the metabolites described for voriconazole in rats [6] cannot generate the same daughter fragment used (m/z 281.5), confirming that only the drug is quantified in this method.

The retention times of VRC and IS were approximately 3.3 and 2.7 min, respectively. The extraction recovery, $72.1 \pm 2.1\%$, was concentration independent of VRC.

3.2. Linearity

The linearity of method was observed in the investigated concentration range (50–2500 ng/mL). The media calibration curve was determined in two consecutive validation days for VRC. Calibration curves of peak area ratio (VRC/IS) as function of nominal concentration were linear using weighted ($1/\text{concentration}$) linear regression, with a determination coefficient greater than or equal to 0.994 for all curves (Table 1).

3.3. Lower limit of quantification

The lower limit of quantification (LLOQ) was 50 ng/mL, which was accepted as the lowest level on the calibration curve that could be determined with appropriate precision and accuracy under the experimental conditions of this analytical method (Tables 2 and 3) [18]. Previously Keevil et al. [17] described a LC–MS/MS method for voriconazole quantification in serum also using small volume sample but a different daughter fragment (m/z 224.1), less abundant than the one used in the present study, was employed. For that method the reported lower limit of quantification was 100 ng/mL. Using the present method the limit of quantification could be reduced in 50%. Furthermore, only protein precipitation was needed to clean the sample in opposition to the solid-phase extraction described by those authors, showing the advantages of the present method for pharmacokinetic investigation in rodents.

3.4. Precision and accuracy

The intra- and inter-day relative standard deviation values for VRC are shown in Table 2. The intra-assay and inter-assay precision (R.S.D.) values for QC samples were less than or equal

Table 2
Intra- and inter-day variation of voriconazole in rat plasma

Nominal concentration	Day	Experimental concentrations		
		Mean (ng/mL)	S.D.	R.S.D. (%)
Intra-day variation				
50 ng/mL (LLOQ)	1	56	0.6	0.99
	2	49	8.1	6.8
100 ng/mL	1	105	8.0	7.7
	2	94	3.8	4.1
800 ng/mL	1	828	41.8	5.0
	2	748	48.9	6.5
2000 ng/mL	1	2069	67.9	3.2
	2	1829	232.1	5.6
Inter-day variation				
50 ng/mL (LLOQ)		53	6.6	12.5
100 ng/mL		100	8.2	8.1
800 ng/mL		788	59	7.5
2000 ng/mL		1950	151	7.7

Values (mean and S.D.) represent $n = 3$ observations/day for intra-day and $n = 6$ observations for inter-day variation.

to 7.7 and 12.5%, respectively. The method showed an accuracy within 15%, which can be observed in Table 3. The data obtained for VRC was within acceptable limits stated for bioanalytical methods validation [20].

3.5. Stability

Preliminary studies showed that VRC was stable under the conditions used in this work. The analyte was stable in blood samples at room temperature for 2 h (99.4%) and in plasma samples after freezing at -36°C for 30 days (99.4%). The stability of processed samples was determined at 4°C in the autosampler for 12 h. VRC and internal standard did not degrade at these conditions, showing 99.2 and 97.6% recovery, respectively.

3.6. Applicability of the analytical method

To investigate the suitability of this analytical method for pharmacokinetic studies, it was applied to determine VRC plasma concentration after i.v. administration of a single dose (2.5 mg/kg) to Wistar rats ($n = 6$). The mean plasma concentration–time profile of VRC is shown in Fig. 3. The results indicated that the analytical method is suitable to measure plasma concentrations of the compound in rat plasma. The peak plasma concentration was 455.5 ± 300.2 ng/mL. The esti-

Table 3
Accuracy for the analysis of voriconazole in rat plasma

Concentration (ng/mL)	Range	Accuracy
50 (LLOQ)	45–59	88.4–118.4
100	93–113	96.8–113.0
800	739–848	92.4–106.9
2000	1837–2147	91.6–107.3

$n = 6$ observations.

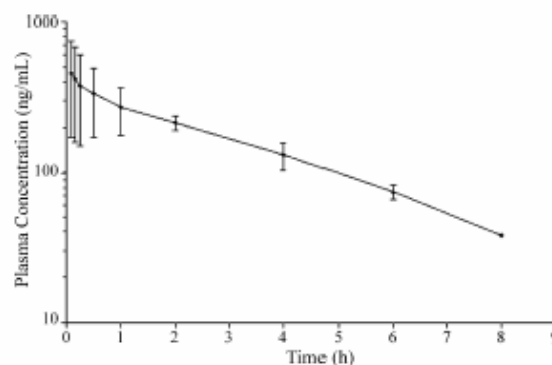


Fig. 3. Mean plasma concentration–time of VRC after single intravenous dose of 2.5 mg/kg to male Wistar rats. The data points are means and positive error bars are S.D. of six animals.

mated half-life was found to be 2.4 ± 0.6 h and the $\text{AUC}_{0-\infty}$ was 1.54 ± 0.35 $\mu\text{g h/mL}$. The elimination phase of VRC was appropriately characterized considering that the pharmacokinetic study was carried out for 8 h which, which corresponds to three elimination half-lives. The result prove the method developed here has adequate sensitivity for the intended application.

4. Conclusions

A LC–MS/MS bioanalytical method for the determination of VRC in rat plasma using ketoconazole as IS was established. This method showed adequate sensitivity, linearity, precision and accuracy and it has been successfully applied to determine the concentration–time profiles in pharmacokinetic studies employing rodents.

Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq-Brazil for the financial support (Project # 473317/2004-4). Bibiana Verlindo de Araujo acknowledges the individual grant received from CNPq-Brazil.

References

- [1] C. Lumberras, M. Lizasoain, J.M. Aguado, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (2003) 366–380.
- [2] A. Espinel-Ingroff, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 198–2002.
- [3] M.A. Pfaller, S.A. Messer, R.J. Hollis, R.N. Jones, G.V. Doern, M.E. Brandt, R.A. Hajjeh, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 3242–3244.
- [4] C. Girmenia, G. Luzi, M. Monaco, P. Martino, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 1436–1438.
- [5] D. Andes, K. Marchillo, T. Stanstad, R. Conklin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 6 (2003) 3165–3169.
- [6] S. Roffey, P. Cole, D. Conby, S.G. Gibson, A.N.R. Jezequel, D.A. Nedderman, D.K. Smith, N. Walker, *Wood Drug Met. Disp.* 31 (2003) 731–741.
- [7] L. Purkins, N. Wood, P. Ghahramani, K. Greenhalgh, M.J. Allen, D. Kleinermans, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2546–2553.
- [8] T.J. Walsh, M.O. Karlsson, T. Driscoll, A.G. Arguedas, P. Adamson, X. Saez-Llorens, A.J. Vora, A.C. Arrieta, J. Blumer, I. Lutsar, P. Milligan, N. Wood, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2166–2172.
- [9] D. Leveque, Y. Nivoix, F. Jehl, R. Herbrecht, *Int. J. Antimicrob. Agents* 27 (2006) 274–284.

- [10] U. Theuretzbacher, F. Ihle, H. Derendorf, *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006) 649–663.
- [11] D. Andes, K. Marchillo, T. Stamstad, R. Conklin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1193–1199.
- [12] D. Andes, K. Marchillo, R. Conklin, G. Krishna, F. Ezzet, A. Cacciapuoti, D. Loebenberg, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 137–142.
- [13] R. Gage, D.A. Stopher, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1449–1453.
- [14] G.J. Pennick, M. Clark, D.A. Sutton, M.G. Rinaldi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 2348–2350.
- [15] M. Wenk, A. Droll, S. Krahenbuhl, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 313–316.
- [16] L. Zhou, R.D. Glickman, N. Chen, W.E. Sponsel, J.R. Graybill, K. Lam, *J. Chromatogr. B* 776 (2002) 213–220.
- [17] B.G. Keevil, S. Newman, S. Lockhart, S.J. Howard, C.B. Moore, D.W. Denning, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 650–657.
- [18] M. Vogeser, X. Schiel, U. Spohrer, *Clin. Chem. Lab Med.* 43 (2005) 730–734.
- [19] H. Egle, R. Trittler, A. König, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 361–367.
- [20] FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).

Capítulo 5: Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug

Artigo aceito para publicação no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
DOI (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.025>)

**Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents:
a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug**

B.V. Araujo^a, C.F. Silva^b, Haas, S.E.^a, T. Dalla Costa^{a,b*}

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

*Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Tel.: +55 51 3316 5418;

Fax: +55 51 3316 5437

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Abstract

Microdialysis has been employed for the *in vivo* measurement of endogenous compounds and a variety of drugs in different tissues. The applicability of this technique can be limited by drug lipophilicity which can impair the diffusion through dialysis membrane. The objective of this study was to evaluate the feasibility of using microdialysis to study kidney penetration of voriconazole, a moderately lipophilic antifungal triazolic agent ($\text{Log } D_{7.4} = 1.8$). Microdialysis probe recoveries were investigated *in vitro* by dialysis and retrodialysis using four different drug concentrations (0.1-2 $\mu\text{g/mL}$) at five flow rates (1-5 $\mu\text{L/min}$). Recoveries were dependent on the method used for the determination as well as on the flow rate, but independent of drug concentration. The average apparent recoveries determined by dialysis and retrodialysis, at flow rate of 2 $\mu\text{L/min}$, were $21.1 \pm 1.5 \%$ and $28.7 \pm 2.0 \%$, respectively. Recovery by retrodialysis was bigger than the recovery by dialysis. The average apparent dialysis/retrodialysis recovery ratio *in vitro* was 0.73 for all concentrations investigated. The differences between retrodialysis and dialysis recoveries were attributed to the drug's binding to the plastic tubing before and after the dialysis membrane which was experimentally evaluated and mathematically modeled. The *in vivo* apparent recovery determined by retrodialysis in healthy Wistar rats kidney was $38.5 \pm 3.5 \%$, similar to that observed *in vitro* using the same method ($28.7 \pm 2.0 \%$). The *in vivo* apparent recovery after correcting for plastic tubing binding ($25.1 \pm 2.8 \%$) was successfully used for determining free kidney levels of voriconazole in rats following 40 and 60 mg/kg oral dosing. The results confirmed that microdialysis can be used as sampling technique to determine free tissue levels of moderately lipophilic drugs once the contribution of tubing binding and membrane diffusion on the apparent recovery are disentangled.

Keywords: microdialysis, lipophilic compounds, *in vitro* and *in vivo* recoveries, voriconazole

1. Introduction

Microdialysis (MD) is a sampling technique that allows to access substances in the interstitial fluid and to measure free concentrations of exogenous and endogenous compounds [1,2]. The main innovation introduced by this technique was the possibility to determine drugs free fraction at the biophase, which has been changing some misconceptions about drug tissue distribution [3,4].

One critical step to apply microdialysis is to determine the probe's relative recovery. As MD system works in sink condition, where diffusion equilibrium is never reached, the levels measured in the dialysate will always be lower than the actual levels in tissue, leading to the need of determining the probe's relative recovery, that express the ratio between measured and real concentrations in the investigated media [1]. The relative recovery, which must be determined *in vitro* and *in vivo* because of the differences in drug diffusion in solution and at the intercellular fluid, can be evaluated by retrodialysis and dialysis, among other methods, as reported previously [2].

Several factors affect drug's relative recovery including perfusion fluid flow rate, probe's characteristics such as type, membrane length and diameter, drug's physico-chemical properties, experimental conditions such as temperature and sampling time and matrix tortuosity of the tissues of interest, when the recovery is determined *in vivo* [5].

The physico-chemical properties of the drug under investigation, specially the partition coefficient which affects permeability, have a significant influence on the diffusion process through the probe's membrane and, consequently, on drug's relative

recovery [6]. For hydrophilic drugs, the diffusion across the microdialysis membrane leads to equal values of relative recovery by dialysis and retrodialysis [7,8]. For moderately or highly lipophilic drugs ($\text{Log } P \approx 1-4$), however, retrodialysis and dialysis recoveries are not similar, probably due to drug binding to microdialysis probe tubing, making it difficult to determine the real recovery *in vivo* [6,9].

The first study showing recovery by dialysis and by retrodialysis could differ depending on the drug investigated was conducted by Groth and Jørgensen (1997) who observed that the degree of recovery *in vitro* was reduced proportionally to the increase in drug lipophilicity [6]. Nowadays, other authors have shown that lipophilicity is an important determinant of drug's binding to the microdialysis device [9,10].

As a consequence of drug's binding to the microdialysis probe phenomenon, the relative recoveries determined do not express the real drug's recovery from the medium, i. e., mass transfer in *sink* condition, but an apparent recovery composed by the analyte diffusion through the probe's membrane and its binding to the MD tubing. The apparent recovery determined restricts the use of microdialysis for moderately and highly lipophilic compounds.

Some alternatives have been proposed in the literature to overcome this limitation and allow the use of microdialysis for lipophilic compounds, such as the use of albumin in the perfusion fluid that appears to prevent drug binding to the probes tubing, after a time for saturation of the dialysis membrane is observed [10]. This approach, although has proven to be efficient in terms of eliminating the binding issue, seems to alter the composition of the perfusion fluid that no longer mimics the

proteic composition of the extracellular fluid surrounding the probe, modifying the osmotic pressure and the physiology of the tissue under investigation [11].

Another approach to overcome the limitation of using microdialysis for lipophilic compounds is to mathematically model the drug's binding to the probe. Lindberger and co-workers [9] used a set of equations to separate the binding to the microdialysis tubing from the drug's diffusional process through the semi-permeable membrane and to obtain the real recovery from the apparent recovery determined experimentally.

Using an independent set of experiments the drug binding to the probe's tubing is determined experimentally and the results are expressed as binding coefficient, a constant that relates drug binding and perfusion fluid flow rate. By eliminating the binding component from the apparent recovery, determined by dialysis or retrodialysis, the diffusional part of the recovery, i. e., the real relative recovery is obtained.

For antifungal agents, lipophilicity is required to allow drug penetration into the fungal cell and promote the killing effect. The knowledge of tissue penetration of these compounds is crucial for determining their efficacy. The echinocandin caspofugin was evaluated by microdialysis by Traunmüller and co-workers [10]. The authors observed significant differences between the recoveries determined *in vitro* by dialysis and retrodialysis, probably due to drug binding to the probe's tubing. The recoveries were equalized by adding albumin to the perfusion fluid.

Voriconazole is a triazolic compound introduced in the clinical practice recently as a therapeutic alternative to treat deep fungal infections such as invasive

aspergilosis and hematogenous candidiasis, which usually disseminate to kidney, liver and brain. Deep fungal infections are the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections in the US [12], responding for 40-60 % of the deaths by fungal sepsis in Brazil [13].

In this context, the present study aimed to investigate the feasibility of using microdialysis to evaluate the tissue penetration of voriconazole, a moderately lipophilic compound ($\text{Log } D_{7.4} = 1.8$).

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Voriconazole was donated by Mikatub (India) as a powder (102.3 % purity). Sodium chloride, calcium chloride, potassium chloride and ammonium monobasic phosphate were purchased from Reagen® (Brazil). Acetonitrile and methanol, HPLC grade, were purchased from Merck® (Germany). HPLC water from Millipore's Milli-Q system was used throughout the analysis.

2.2 Standard solutions preparation

Standard stock solution of voriconazole was prepared on the day of the study by dissolving the drug in methanol. The stock solution (500 $\mu\text{g/mL}$) was diluted in Ringer's solutions viewing to obtain different final concentrations for the calibration curve and microdialysis studies.

Ringer's solution contained: 148 mM Na^+ , 2.3 mM Ca^{++} , 4 mM K^+ , and 157 mM Cl^- .

2.3 VRC quantification

The determination of VRC in microdialysate samples was conducted using a HPLC method adapted from previously published work [14]. The HPLC system consisted of a Waters® 600 pump, a Waters® UV 2487 dual λ absorbance detector, a Waters® Plus 717 autosampler and a Waters® 746 integrator. The mobile phase, acetonitrile:ammonium monobasic phosphate buffer (60:40, v/v, pH 6.0), was pumped at a flow rate of 1 μ L/min. A Shimadzu® C18 reverse phase column (4 x 150 mm) preceded by a pre-column filled with the same packing material was used as stationary phase. VRC was detected at 254 nm.

A linear calibration curve was obtained in the range of 25-2500 ng/mL using drug peak area. The method was validated by performing three calibration curves on each of two consecutive days and by analyzing quality control samples (75, 1000 and 2000 ng/mL). VRC retention time was approximately 2.9 min. The intra-assay and inter-assay precision were bigger than 94.9 and 95.8 %, respectively. The method showed accuracy bigger than 89.1 %. The results obtained for VRC was within the acceptable limits stated for bioanalytical methods validation [15].

The microdialysate samples obtained were directly injected by the autosampler (30 μ L) without previous preparation. All samples were kept frozen at -20°C until analysis by HPLC.

2.4 Microdialysis system

The microdialysis system consisted of a syringe infusion pump - MD-1001 Baby Bee Syringe Drive-connected to a MD-1020 Bee Hive Controller (Bioanalytical,

USA). A microliter syringe (1 mL, gas-tight) was used to provide the perfusate solution. CMA/20 microdialysis probes (membrane length: 4 mm, cutoff: 20 kD, CMA/Microdialysis AB, Sweden) were employed in this study.

2.5 Microdialysis experiments

The microdialysis experiments were carried out to investigate VRC binding effect to the microdialysis device (inlet and outlet tubing), as well to investigate flow rate and concentration influence on the relative recovery determined by dialysis and retrodialysis methods.

2.5.1 Influence of perfusion flow rate and VRC concentration on *in vitro* recovery

The influence of flow rate on the relative recovery of voriconazole was evaluated using five distinct flow rates: 1, 2, 3, 4 and 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

For the determination of VRC *in vitro* recovery by retrodialysis the probes (n = 3), continuously perfused with Ringer's solutions containing voriconazole 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, were inserted into tubes containing Ringer's solution devoid of drug, kept at 37 ± 1 °C. The system was allowed to equilibrate for one hour and, 30 min interval samples were collected up to 2 h. For determination of recovery by dialysis similar procedure was used, but the probes were perfused with Ringer's solution devoid of drug and the medium surrounding the probes consisted of voriconazole 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Ringer.

For the determination of VRC concentration influence on recoveries the flow rate was fixed at 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ and four different VRC concentrations were used to determine the recovery by retrodialysis and dialysis: 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The

systems were allowed to equilibrate for one hour before 30 min interval samples were collected up to 2 h.

All experiments were conducted in triplicate using different microdialysis probes (n = 3).

The relative recovery by dialysis (RR_D) was calculated as [1]:

$$RR_D (\%) = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \times 100 \right) \quad \text{Eq. 1}$$

where C_{dial} is the drug concentration on the dialysate and C_{ext} is the drug concentration on the medium surrounding the microdialysis probe.

The relative recovery by retrodialysis (RR_{RD}) was calculated as [1]:

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

where C_{perf} is the drug concentration in the perfusate solution.

2.5.2 Binding Experiments in the inlet/outlet tubing

To investigate the drug's binding to the microdialysis device, three polyurethane inlet/outlet tubing, with a length of 200 mm, were separated from the probes dialysis membranes and perfused with 1 $\mu\text{g/mL}$ of voriconazole solution at flow rates of 1, 2, 3, 4 and 5.0 $\mu\text{L/min}$. This experiment was conducted twice.

Binding (B) to the tubing was expressed as the proportion of drug lost during perfusion through the tube [9]:

$$B = 1 - \frac{C(l_b = L_b)}{C(l_b = 0)} \quad \text{Eq. 3}$$

where C is the drug concentration, l_b is the position variable along the tubing, expressed in mm, and L_b is length of tubing, also expressed in mm.

After the establishment of the tubing's binding, the drug binding coefficient (K_b) was calculated by the relationship [9]:

$$K_b = \frac{-\ln(1-B)\phi}{L_b} \quad \text{Eq. 4}$$

where ϕ is the flow rate.

When drug binds to the tubing the apparent recovery determined is the product of binding and dialysis process that are independent but additive phenomena. In this case, the determination of K_b is crucial for the establishment of the real value of drug's diffusional mass transfer coefficient (K_d), which is employed to correct the apparent recoveries determined *in vitro*.

2.5.3 Determination of diffusional mass transfer coefficient (K_d) in different flow rates

After the establishment of the drug binding coefficient (K_b) and the apparent recovery (R_{app}) by dialysis and retrodialysis for the different flow rates investigated, the diffusional mass transfer coefficient (K_d), expressed in mm^2/min , was calculated using equation 5 [9]:

$$R_{app} = \left[1 - \exp\left(\frac{-K_d L_d}{\phi}\right) \right] \exp(1-B) \quad \text{Eq. 5}$$

where R_{app} is the apparent recovery (determined experimentally) and L_d is the length of dialysis membrane, expressed in mm.

By the determination of R_{app} , K_d and K_b constants it was possible to calculate the real relative recoveries determined *in vitro* and *in vivo*. VRC binding (B) to the outlet tubing was considered negligible and no correction was used for the recovery determined by dialysis. The binding to the inlet tubing (B) was used to determine the real perfusion concentration (C_{perf}) in order to calculate the real recovery by retrodialysis.

2.5.4 *In vivo* recovery

The experiments involving animals were approved by UFRGS Ethics in Research Committee (protocol # 2004300). Specific-pathogen free male Wistar rats, weighting 200-250 were used for all studies. Animals were maintained in accordance with the criteria of the Canadian Council of Animal Care [16].

VRC *in vivo* recovery was determined by retrodialysis. Three male Wistar rats were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.). After anesthesia, the animals were put in the lateral decubitus position. Skin was surgically removed, the kidneys were exposed and the probes were inserted into the kidney cortex. The microdialysis probes were perfused with Ringer's solution at a flow rate of 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ and were allowed to equilibrate inside the kidneys for 1 h. After equilibration, plain Ringer's solution was replaced by Ringer's solutions containing VRC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was perfused at the same flow rate. Microdialysate samples were collected from each probe in 30 min intervals, up to 2 h, after 1 h equilibration. Drug concentrations in the dialysate sample (C_{dial}) and in the perfusate solution (C_{perf}) were determined by HPLC.

The *in vivo* apparent recovery by retrodialysis (R_{app}) was calculated using equation 2. For the flow rate used in the *in vivo* experiments (2 $\mu\text{L}/\text{min}$) VRC binding (B) to the outlet tubing was considered negligible and no correction was used. The binding to the inlet tubing (B) determined *in vitro* was used to calculate the real perfusion concentration (C_{perf}) in order to estimate the real *in vivo* recovery by retrodialysis.

2.5.5 Determination of free renal concentrations of VRC in rats

Two groups of 6 animals were used. After anesthesia with urethane (1.25 g/kg i.p.) the animals had the carotid artery catheterized for blood sampling. MD probes were inserted into the kidney cortex as described previously and allowed to equilibrate for 1 h. VRC 40 or 60 mg/kg was administered orally by gavage to each group. Blood (200 μL) and microdialysate samples (60 μL , 30 min intervals) were collected at pre-determined time-points up to 18 h. Plasma was separated, frozen and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed by an LC-MS/MS validate method [15]. MD samples were frozen and assayed by HPLC.

The total plasma and free kidney concentrations *versus* time profiles were analyzed individually. The $AUC_{0-18\text{ plasma}}$ and $AUC_{0-18\text{ kidney}}$ were calculated by trapezoidal rule, employing Excel[®] v. 2000 software (Microsoft[®]). The ratio $AUC_{\text{kidney}}/AUC_{\text{plasma}}$ was used as a measure of drug penetration into the organ.

2.6 Statistical Analysis

The relative recoveries determined by dialysis and retrodialysis were compared by two-way analysis of variance (ANOVA), where flow and recovery method were considered as factors. The differences were determined by Bonferroni test ($\alpha = 0.05$). The AUCs were compared by one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$).

3. Results

The investigation of VRC concentration influence on MD probes recovery showed that the recoveries determined by retrodialysis and dialysis *in vitro* are concentration independent on the range investigated (Figure 1). The recoveries determined by each method, however, were statistically different. The average relative recovery determined by dialysis was $21.1 \pm 1.5 \%$, while the average recovery by retrodialysis was $28.7 \pm 2.0 \%$, under the same experimental conditions.

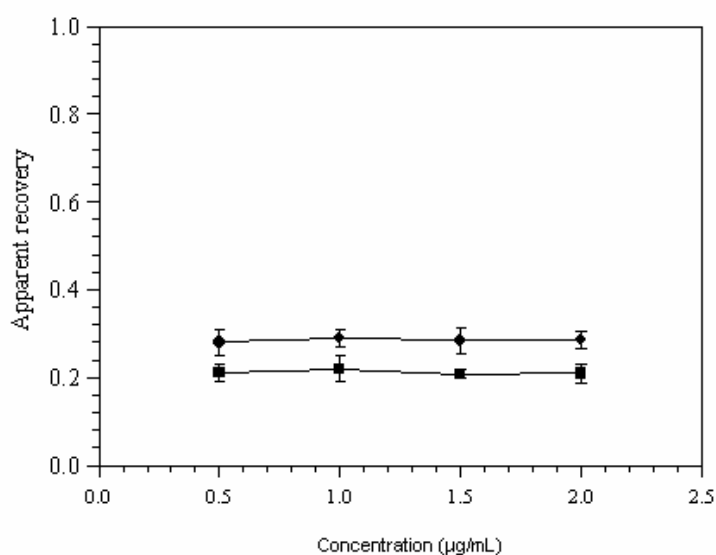


Figure 1. Concentration effect on VRC relative recovery by dialysis (■) and retrodialysis (●) (average \pm SD) (n=3 probes).

The *in vitro* recoveries determined by dialysis and retrodialysis were different from each other and flow rate dependent, as shown in Figure 2, decreasing with the increase of flow rate in both methods. For the slower flow rates (1 and 2 $\mu\text{L}/\text{min}$) the difference between dialysis and retrodialysis recoveries was statistically significant ($p < 0.001$). For flow rates higher than 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, no differences in recoveries for the two methods investigated were observed.

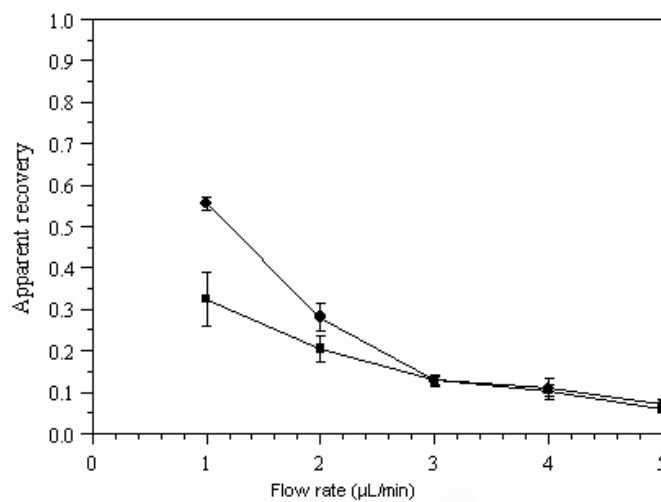


Figure 2. Recoveries determined by dialysis (■) and retrodialysis (●) for different flow rates ($n = 3$).

Voriconazole binds to the inlet and the outlet tubing devices of the microdialysis probes. The values of the binding coefficient (K_b) determined for each flow rate evaluated are shown in Table 1. The most important binding phenomenon was observed in the inlet tubing, which showed an average K_b of 0.0023 ± 0.0009

Table 1. Results of *in vitro* voriconazole (1 µg/mL) binding experiments after perfusion of tubing (200 mm) with a at different perfusion rates. Three samples were collected from each tubing at each flow rate (n = 6).

Inlet tubing					
Flow (µL/min)	1	2	3	4	5
B	0.357 ± 0.166	0.179 ± 0.036	0.135 ± 0.049	0.132 ± 0.047	0.125 ± 0.010
K _b (mm ² /min)	0.0023 ± 0.0009	0.0022 ± 0.0015	0.0022 ± 0.0009	0.0029 ± 0.0011	0.0027 ± 0.0002
Outlet tubing					
Flow (µL/min)	1	2	3	4	5
Binding (B)	0.193 ± 0.037	0.068 ± 0.016	0.074 ± 0.012	0.075 ± 0.015	0.075 ± 0.007
K _b (mm ² /min)	0.0011 ± 0.0002	0.0007 ± 0.0002	0.0011 ± 0.0002	0.0015 ± 0.0003	0.0019 ± 0.0002

B= proportion of voriconazole bound to the tubing; K_b = calculated binding coefficient for voriconazole

Table 2. VRC pharmacokinetic parameters determined after oral administration of 40 or 60 mg/kg to Wistar rats (n = 6/group) (average \pm SD).

Parameters	40 mg/kg	60 mg/kg
AUC _{0-18 plasma} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	45.6 \pm 10.8	77.0 \pm 9.0
AUC _{0-18 kidney} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	15.1 \pm 3.1	26.2 \pm 3.9
Kidney Penetration	0.33 \pm 0.03	0.34 \pm 0.09

mm²/min, twice the average K_b observed for the outlet tubing (0.0011 ± 0.0004 mm²/min).

The influence of flow rate on the relative recovery was modeled by equation 5, taking the binding effect to the outlet tubing under consideration. The mean K_b in the outlet tubing (0.0011 ± 0.0004 mm²/min) was used in equation 5 to determine the diffusion mass transfer coefficient (K_d). The mean value of K_d was determined to be 0.122 ± 0.0133 mm²/min. The apparent recoveries (R_{app}) determined experimentally for the different flow rates investigated by dialysis and the real recoveries calculated using equation 5, considering no VRC binding to the probe's tubing are shown in Figure 3.

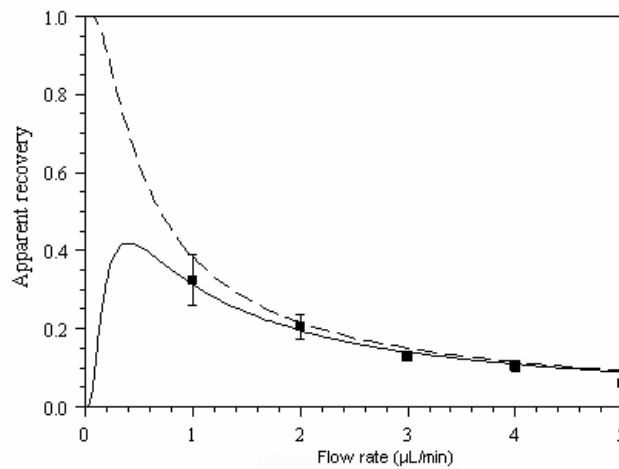


Figure 3. *In vitro* apparent recoveries (R_{app}) determined experimentally (■) by dialysis method (average \pm sd), and the values modeled by eq. 5 using mean value of K_d (0.122 mm²/min) and K_b (0.0011 mm²/min) are described by solid line (—). Real recoveries, assuming no binding to the microdialysis device are shown by hatched line (---).

VRC *in vivo* apparent recovery (R_{app}) determined by retrodialysis was 38.5 ± 3.5 %. This recovery, however, can not be used to determine the free fraction of VRC in tissue because the binding to the tube device observed *in vitro* has to be considered. To take binding into account, the percentage of inlet binding determined for the 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate (17.9 %) was used to calculate the real perfused concentration (C_{perf}) in the *in vivo* experiment. In this way, the real relative recovery was determined to be $25.1 \pm 2.8\%$, similar to the real recovery determined by retrodialysis *in vitro* using the same flow rate and approach, 23.1 ± 5.4 %, ($\alpha = 0.05$). The real *in vivo* average recovery was used to back calculate VRC tissue levels in the animal experiments.

Figure 4 shows the total plasma and free kidney profiles observed after VRC 40 and 60 mg/kg oral dosing. The pharmacokinetic parameters determined in plasma and tissue are presented in Table 2. The drug penetration calculated by the ratio $AUC_{0-18 \text{ kidney}}/AUC_{0-18 \text{ plasma}}$ was around 0.33 - 0.34, similar to the free fraction of voriconazole in rat plasma, reported to be 0.34 [17].

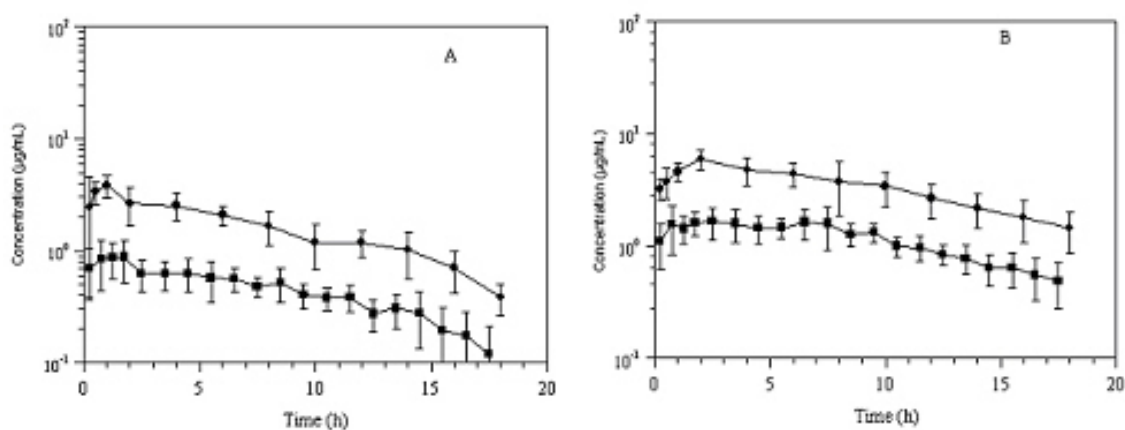


Figure 4. Total plasma (●) and free kidney (■) levels of voriconazole after oral administration of 40 (A) and 60 (B) mg/kg to healthy Wistar male rats ($n = 6/\text{group}$) (average \pm SD).

4. Discussion

Microdialysis is a very useful technique to access real tissue concentrations of drugs or endogenous compounds *in vivo*. Given that the probe is continuously flushed by the perfusate solution, the equilibrium between drug concentration in the tissue surrounding the probe and drug concentration in the internal medium is never reached, resulting in lower levels of the drug in the dialysate in comparison to the real levels in tissue, leading to the need of establishing probes recovery. The relative recoveries *in vitro* and *in vivo* can be determined by different methods, including dialysis and retrodialysis [3-4].

Drug's binding to the microdialysis tubing have been reported for lipophilic drugs such as bethametasone dipropionate [6], calcipotriol [6], caspofungin [10] and antiepileptic drugs as phenytoin, carbamazepine and phenobarbital [9]. In the cases where the drug binds to the microdialysis device, the binding should be predictable and acceptably low in order to allow the use of this technique to determine the drug free tissue levels *in vivo*.

In the present work the feasibility of using microdialysis to determine free renal levels of the antifungal agent voriconazole was investigated. Relative recoveries determined by dialysis and retrodialysis were compared and the reason for the differences observed were investigated and mathematically analyzed.

Initially, the influence of VRC concentration on the relative recovery by both methods was investigated because *in vivo* tissue concentrations change over time and it is essential to confirm that the recovery is not affected by these fluctuating concentrations. The four concentrations investigated were selected based on the free

plasma levels determined in rats after 30 mg/kg oral dosing [17]. VRC recoveries were not concentration-dependent regardless of the recovery method used. For a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate, the average apparent recovery by dialysis was $21.1 \pm 1.5 \%$ and by retrodialysis it was higher, $28.7 \pm 2.0 \%$. The ratio between retrodialysis and dialysis recoveries was constant for all concentrations evaluated (Figure 1), showing that the recovery will remain constant during VRC pharmacokinetic profiling in tissue.

Dialysis and retrodialysis recoveries were influenced by the perfusion fluid flow rate used. The inverse effect of flow rate on the relative recoveries of drugs is extensively demonstrated in the literature [1-4] and is expected for hydrophilic and lipophilic drugs. Furthermore, the recoveries differ depending on the method used for its determination, being the gap less pronounced with increasing the flow rate (Figure 2). VRC binding to the microdialysis tubing could explain the bigger recoveries observed by retrodialysis. Lindberger and co-workers reported that, for lipophilic compounds which bind to the microdialysis probes tubing, the influence of unspecific binding will be less pronounced when high flow rates are used because the contact time of the substance with the system tubing will be decreased [9]. The results obtained for voriconazole in the present study support this statement. For the lower flow rates investigated (1 and 2 $\mu\text{L}/\text{min}$), the differences between recoveries by dialysis and retrodialysis was more pronounced than those observed for higher flow rates (3, 4 and 5 $\mu\text{L}/\text{min}$), where similar recoveries were determined.

The hypothesis of VRC binding to the microdialysis device was confirmed by the tubing binding experiments. From Table 1 it is possible to verify that for lower flow rates, 1 and 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, VRC binding to the inlet tubing was 35.7% and 17.9%

and to the outlet tubing it was 19.3% and 6.8%, respectively. For flow rates higher than 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ binding was constant and two times more pronounced in the inlet tubing (13.3%), compared to the outlet tubing (7.5%). This finding showed that the drug binds to the plastic tubing of the microdialysis system, before and after the semi-permeable membrane, leading to an apparent recovery by retrodialysis bigger than that determined by dialysis. The increased recovery by retrodialysis does not represent a higher drug diffusion from inside to outside the membrane but the drug's adherence to the tubing walls. For the flow rates higher than 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ the outlet binding was statistically similar probably because the contact time between the drug and the binding sites is decreased. The same principle holds true for the binding to the inlet tubing.

It can also be observed from Table 1 that the binding to the inlet and outlet tubing was different for the same flow rate considered although the polymer (polyurethane) and length of the tubing are the same. The only plausible hypothesis to explain these differences is that the adjutants used to prepare the blue inlet tubing are different from those used to prepare the transparent outlet tubing, resulting in the differences observed for VRC binding.

Although at 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ there is no difference between recovery by dialysis and by retrodialysis, the recovery is too small, around 13%, making it impossible to determine the free renal levels of voriconazole after 40 mg/kg oral dosing to rats due to the sensitivity of the HPLC method used. For this reason the flow rate selected for the *in vivo* experiments was 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

The minimal influence of VRC binding to the outlet tubing can be observed in Figure 3, where the experimental data seems to be described by both curves the one that shows the apparent recovery and the one where the recovery was corrected for binding. Because the binding to the outlet tubing (~7%) had a little impact on the recovery, it was neglected when the real recovery was calculated. The influence of VRC binding to the inlet tubing on relative recoveries by retrodialysis was overcome by using the perfusion concentration taking into account the tubes binding.

Assuming VRC's binding to the microdialysis probe is the same whether the recovery is determined *in vitro* or *in vivo*, retrodialysis was used to determine the probes recovery *in vivo*. The *in vivo* apparent recovery was found to be $38.5 \pm 3.5 \%$, similar to those determined *in vitro* using the same method ($28.1 \pm 5.0 \%$) ($\alpha = 0.05$). The similarity between the recoveries observed for VRC in kidney and *in vitro* could be due to the high perfusion of this organ and also its histological characteristics, considering that kidney cortex is a soft and very loose tissue. For the determination of free VRC levels in renal tissue the *in vivo* apparent recovery was corrected by the binding constant (K_b). VRC recovery *in vivo* after correction was $25.1 \pm 2.8\%$

Using the real *in vivo* recovery of the antifungal, VRC penetration into the renal cortex was calculated by the ratio between $AUC_{0-18 \text{ kidney}}$ and $AUC_{0-18\text{-plasma}}$. VRC penetration, independently of the dose investigated, was similar to the plasma free fraction reported in the literature for rats (0.34) [17]. This finding indicates that unbound VRC concentrations in plasma and renal tissue are comparable, and the free plasma levels provide a good estimate of the interstitial drug concentrations.

5. Conclusions

The experimental results indicated that voriconazole is a suitable drug to be evaluated by microdialysis, despite its moderate lipophilicity. Employing the mathematical modeling it was possible to account for the drug's binding to the probes tubing and to correct the apparent relative recoveries determined *in vitro* and *in vivo* allowing the investigation of free renal levels of voriconazole in healthy rats after administration of 40 and 60 mg/kg doses. VRC free renal and plasma concentrations were similar indicating that free plasma levels can be used to estimate the drug concentrations at the biophase.

Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq-Brazil for financial support (# 473317/2004-4) as well as for the individual grants received. The authors wish to thank Roberto Debom from Cristália® (Brazil) for helping with the donation of voriconazole.

References

- [1] N. Plock, C. Kloft, Eur J Pharm Sci. 25 (2005) 1–24.
- [2] E.C.M. De Lange, A.G. De Boer, D. D. Breimer, Adv Drug Deliv Rev. 45 (2000) 125–148.
- [3] M. Müller, A. Dela Penã, H. Derendorf, Antimicrob Agents Chemother. 48 (2004) 1441–1453.
- [4] P. Liu, R. Fuhrherr, A. I. Webb, B. Obermann, H. Derendorf, Eur J Pharm Sci. 25 (2005) 439–444.
- [5] V.J. Schuck, I.Rinas, H. Derendorf, J Pharm Biomed Anal.36 (2004) 807-813.
- [6] L. Groth, A. Jorgensen, Anal Chim Acta 355 (1997) 75-83.

- [7] L. Sasongko, K. M. Williams, R. O. Day, A. J. McLachlan, *Br J Clin Pharmacol* 56 (2003) 551–561.
- [8] L. Simonsen, A. Jorgensen, E. Benfeldt, L. Groth, *Eur J Pharm Sci.* 21 (2004) 379-388.
- [9] M. Lindberger, T. Tomson, L. Stähle, *Pharmacol Toxicol.* 91(2002)158–165.
- [10] F. Traunmüller, I. Steiner, M. Zeitlinger, C. Joukhadar, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 843 (2006) 142-146.
- [11] A. J. Rosenbloom, D.M. Sipe, V.W. Weedn, *J Neurosci Methods.* 148 (2005) 147-153.
- [12] C.I. Bustamante, *Curr Opin Infect Dis.* 18 (2005) 490-495.
- [13] M.G. Barberino, N. Silva, C. Rebouças, K. Barreiro, A.P. Alcântara, E.M. Netto, L. Albuquerque, C. Brites, *Braz J Infect Dis.* 10 (2006) 36-40.
- [14] R. Gage, D. A. Stopher, *J Pharm Biomed Anal.* 17 (1998) 1449-1453.
- [15] B.V. Araujo, D.J. Conrado, E.C. Palma, T. Dalla Costa, *J Pharm Biomed Anal.* 44 (2007) 985-990.
- [16] CCAC. *The Care and Use of Experimental Animals, Vol.1, 2nd Edn.* (1993) (http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Guidelis.htm)
- [17] S. Roffey, P. Cole, D. Comby, S. G. Gibson, A. N. R. Jezequel, D. A. Nedderman, D. K. Smith and N. Wood, *Drug Met Disp.* 31 (2003) 731-741

**Capítulo 6: Modeling of voriconazole non-linear
pharmacokinetics and oral bioavailability
determination in Wistar rats**

**Modeling of voriconazole non-linear pharmacokinetics and oral bioavailability
determination in Wistar rats**

B.V. Araujo¹, C.F. Silva², S.E. Haas¹, T. Dalla Costa^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ²Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: Pharmacokinetics of voriconazole in Wistar rats

Key Words: voriconazole, non-linear pharmacokinetics, *Michaelis-Menten* kinetics,
bioavailability in non-linear kinetics, rodents.

Research supported by CNPq/Brazil (Project # 473317/2004-4). Teresa Dalla Costa,
Bibiana Verlindo de Araujo and Cristófer Farias da Silva are recipients of fellowships
from CNPq/Brazil.

Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752

90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: +55 51 3308 5418

Fax: +55 51 3308 5437

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Abstract

Voriconazole (VRC), a new triazole antifungal agent, presents a potent and wide spectrum of activity. Although the clinical use of VRC is approved and current, its pharmacokinetics (PK) in rodents is poorly described in the literature and parameters such as bioavailability have not yet been properly determined. In this study, VRC PK was investigated in male Wistar rats after oral (40 mg/kg) and i.v. administration (2.5, 5 and 10 mg/kg) (n = 6/ group). Six compartmental models were tested to describe the PK profile of VRC in rats after i.v. administration. VRC elimination showed saturation in all doses investigated, except the lower i.v. dose (2.5 mg/kg), where a two-compartmental model with linear elimination was able to describe the plasma profile. For the other two doses intravenously administered, a three-compartment model with *Michaelis-Menten* elimination was able to describe the data. The values of Michaelis constant (K_M) and maximum elimination rate (V_M) calculated after 5 and 10 mg/kg i.v. dosing were $0.54 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ and $2.53 \pm 0.54 \mu\text{g/h}$, and $0.62 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ and $2.74 \pm 0.84 \mu\text{g/h}$, respectively. VRC oral absolute bioavailability was determined to be 82.8%. VRC pharmacokinetics in rats exhibits a non-linear behavior, described by three compartment disposition after i.v. dosing and one compartment disposition after oral dosing followed by a saturable metabolic elimination. The approach used to evaluate VRC, that exhibits non-linear pharmacokinetics, including the determination of bioavailability, is an important contribution to pre-clinical pharmacokinetic investigation of drugs that exhibit similar behavior.

1. Introduction

Voriconazole (VRC) was the first triazole antifungal agent approved for humans use in Brazil (1). The drug's main clinical indication is the treatment of systemic fungal infections such as aspergillosis and disseminated candidiasis (2).

Although FDA has approved the clinical use of the drug in 2003, few pre-clinical data are available on the drug pharmacokinetic behavior in rodents, and only one study was published with this purpose (3,4). Besides the determination of security, efficacy and pharmacokinetic characteristics of new drugs, one recent application of pre-clinical data is the establishment of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) models. For PK/PD modeling it is necessary to test several dosing regimens to generate information regarding the drug PK and PD behavior. Similar investigation is not always possible in the clinical setting, turning the pre-clinical studies into a cheap, rapid and useful alternative to investigate the drug's exposure/response relationship.

When compared to other similar antifungal drugs, VRC presents some pharmacokinetic differences which make it a very peculiar molecule. The structural modifications of fluconazole that generated VRC allowed a high bioavailability in humans (96%) and an excellent distribution profile associated to a lower protein-binding (58%) than other triazole antifungal such as ravuconazole (98%), posaconazole (98%) and isavuconazole (98%), which permit a quick penetration into different tissues shortly after oral administration (2,5). However, a half-life reduction to 6-9 h was observed, shorter than the half-lives of other triazole drugs such as ravuconazole (76-202 h), posaconazole (12-24 h) and isavuconazole (56-77 h) leading to the need of twice daily dosing to maintain adequate plasma concentrations.

As other triazole compounds, VRC elimination is achieved due to metabolization with important participation of CYP2C19, CYP2C9 and CYP3A4. The enzymatic saturation is pointed as the responsible for the non-linear behavior observed after administration of multiple VRC doses in humans. It has been shown that the non-linearity in humans depends on the therapeutic dose administered, occurring in adults but not in children (6).

The non-linear pharmacokinetic behavior of VRC may impose some difficulties for determining the drug's absolute bioavailable fraction. The methods for calculating absolute bioavailability are based on the premise that the overall clearance, defined as the amount of drug eliminated divided by area under the plasma curve (AUC), is the same for i.v. and oral doses, so, it is possible to determine the absolute bioavailability by the relationship between $AUC_{oral}/AUC_{i.v.}$ when the same dose is given by both administrations routes (7).

When the elimination of a drug follows non-linear kinetics, as in the case of VRC, this premise is violated, producing an error in the estimation of bioavailability (8). Various methods for determining bioavailability of drugs with *Michaelis-Menten* kinetics have been proposed in the literature. Waschek and co-workers (1984) (9) proposed an interesting approach for estimating the bioavailability of drugs with non-linear kinetics. The method involves the administration of an intravenous reference dose as a labelled tracer at the time of administration of the oral dose. The same degree of saturation would be encountered by the drug from an oral as well as from an intravenous dose, resulting in equal values of clearance. This method offers the advantages of requiring fewer assumptions about the appropriate pharmacokinetic model. When the pharmacokinetic model is known, the authors suggest that it is possible to fit the model simultaneously to both i.v. and oral profiles, if sufficient data are available, and determine the absolute bioavailability in this process. This last approach to determined absolute bioavailability, however, has not been used before and is the object of the present study.

Thus, in this work, VRC pharmacokinetics was elucidated in rodents after the administration of different doses by i.v. and oral routes viewing to characterize the drug's non-linear elimination process as well as to determine its oral bioavailability. Due to VRC metabolism saturation at higher doses a new approach was used to determine the bioavailability.

2. Material and methods

The animal studies were approved by the Ethics in Research Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre-RS-Brazil) (Protocol # 2004300).

Before the experiment, the animals were maintained at UFRGS Faculdade de Farmácia bioterium with controlled temperature (23 ± 2 °C) and 12-hour photoperiod (7:00 am-7:00 pm). The animals received water *ad libitum* and food (certified Nuvilab CR1[®]) and were kept in collective cages containing no more than 5 animals each. Previously to the oral VRC dosing, the animals remained in fast condition for 12 h.

2.1 Experimental design

Male Wistar rats (200-250 g) were used. Four groups of six animals each were evaluated as follows: three groups received VRC intravenous doses of 2.5, 5 or 10 mg/kg and 1 group received an oral dose of 40 mg/kg.

The VRC solutions for intravenous administration were prepared in dimethylsulfoxide:water (20:80, v/v) and for oral administration the drug was prepared in polyethyleneglycol 400:water (4:96, v/v), shortly before administration.

2.2 Surgical procedures

For the collection of samples, the animals were anesthetized with intraperitoneal urethane (1.25 g/kg) and placed in supine position on the surgical board. The carotid artery was cannulated for blood collection using a polystyrene cannula connected to a 1 mL syringe containing heparine in saline solution (25 IU/mL). For groups that received the i.v. bolus doses, the drug solution was administered in the right femoral vein. For the oral group, VRC was administered through gavage with the aid of a curved steel cannula.

Blood samples were harvested into heparinized tubes at time zero (right before drug administration) and after 5, 10, 15 and 30 min and 1, 2, 4, 8, 12, 16, 18, 20 h dosing. Blood samples were centrifuged at 18000 g for 15 min at 4 °C, plasma was separated and kept frozen at -36 °C until analysis through LC-MS/MS, employing a method previously validated (6).

At the end of experiment, the animals were sacrificed through cervical dislocation.

2.3 Analytical methodology

The method described by Araujo and coworkers (2007) (10) was employed for plasma samples processing and analyzing. Briefly, plasma aliquots of 100 μL were precipitated with 190 μL of cold methanol and 10 μL of ketoconazole solution in methanol (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – internal standard) and centrifuged at 18000 g at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The supernatant (30 μL) was injected into the LC-MS/MS system (Shimadzu® SCL-10AVP system controller, LC-10ADVP solvent delivery system and an FCV-10ALVP valve with a Micromass® Quattro LC mass spectrometer in tandem). A Shimadzu® Shim-pack column (150 mm x 4.6 mm i.d.) protected by a Waters® $\mu\text{bondapack}$ guard column packed with 50 μm RP18 material was used. The mobile phase consisted of acetonitrile:water:formic acid mixture (60:40:0.05, v/v/v). The detection was performed by monitoring the parental fragment transitions in $351.5 < 281.5$ m/z for VRC and $531.5 < 82.5$ m/z for ketoconazole. The analyses were conducted by the MassLynx software (version 3.5). The method was previously validated according to FDA guidelines and was sensitive, exact and precise within the concentration range of 50 to 2500 ng/mL.

2.4 Pharmacokinetic analysis

Individual compartmental analysis were conducted with the aid of the non-linear regression program Scientist® v.2.01 (MicroMath®, USA) using the EPISODE (Adams) algorithm.

Six pharmacokinetic models were used to fit the plasma profiles observed after i.v. dosing. These models were proposed by Fujimiya and coworkers (1989) to describe the elimination kinetics of ethanol in rabbits. The models describe, by a system of two differential equations, drug distribution into one or two compartments with *Michaelis-Menten* elimination alone or in association with first order elimination (11). A three compartmental model with first order elimination or *Michaelis-Menten* elimination were also tested (12).

A three-compartment open model with first order elimination was initially used to fit the plasma profiles (12):

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = -(k_{12} + k_e + K_{13}) * C_1 + (k_{21} * V_2 / V_1) * C_2 + (k_{31} * V_3 / V_1) * C_3 \quad \text{Eq. 1a}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = (k_{12} * V_1 / V_2) * C_1 - k_{21} * C_2 \quad \text{Eq. 1b}$$

$$\frac{\partial C_3}{\partial t} = (k_{13} * V_1 / V_3) * C_1 - k_{31} * C_3 \quad \text{Eq. 1c}$$

where C_1 , C_2 and C_3 are VRC concentrations in the central and peripheral compartments, respectively; k_e is the first-order elimination rate constant; k_{12} , k_{21} , k_{31} and k_{13} are the first-order distribution rate constants out of and back into the compartment 1; and V_1 , V_2 and V_3 are apparent volumes of distribution in central and peripheral compartments, respectively. The relationship $k_{12}/k_{21}=V_2/V_1$ was considered.

The first non-linear model tested corresponded to a one compartment model with *Michaelis-Menten* elimination (MM), where the elimination rate constant is determined by the ratio between the maximum elimination rate (V_M) and the *Michaelis-Menten* constant (K_M) (11):

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = -\left(\frac{V_M}{(K_M + C_1)}\right) * C_1 \quad \text{Eq. 2}$$

In the second non-linear compartmental model investigated, the elimination does not take place exclusively through MM, but a fraction of the drug is concomitantly eliminated through linear kinetics described by k_e . In this case, the equation that describes the model is (11):

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = -\left[\left(\frac{V_M}{(K_M + C_1)}\right) + k_e\right] * C_1 \quad \text{Eq. 3}$$

The third model describes a MM elimination process after the distribution of the drug into two compartments. In this case, the drug is quickly distributed from the central compartment (C_1) to the peripheral compartment (C_2) and follows a non-linear elimination (V_M/K_M) from the central compartment. The equation that describes the

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = - \left[k_{12} + k_e + \left(\frac{V_M}{(K_M + C_1)} \right) \right] * C_1 + (k_{21} * C_2) \quad \text{Eq. 4a}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = -k_{21} * (C_1 - C_2) \quad \text{Eq. 4b}$$

distribution and elimination processes includes the constants of drug transference from the central compartment to the peripheral compartment (k_{12}) and vice-versa (k_{21}), consisting of an ordinary differential equations system (11):

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = - \left[k_{12} + \left(\frac{V_M}{(K_M + C_1)} \right) \right] * C_1 + (k_{21} * C_2) \quad \text{Eq. 5a}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = -k_{21} * (C_1 - C_2) \quad \text{Eq. 5b}$$

A variation of this model, as it was described for the one-compartment model, is the two-compartment model with simultaneous first-order and zero-order kinetics. In this case, the elimination is given through the sum of saturated and linear processes described by the following equation system (11).

A three-compartment open model with *Michaelis-Menten* elimination from the central compartment was also used viewing to fit the data (12):

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = \left[\frac{-CL_1 * C_1 - \left(\frac{V_M * C_1}{K_M + C_1} \right) + CL_1 * C_2}{V_1} \right] \quad \text{Eq. 6a}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = \left[\frac{CL_1 * C_1 + CL_2 * C_3 - CL_1 * C_2 - CL_2 * C_2}{V_2} \right] \quad \text{Eq. 6b}$$

$$\frac{\partial C_3}{\partial t} = \left[\frac{CL_2 * C_2 - CL_2 * C_3}{V_3} \right] \quad \text{Eq. 6c}$$

where C_1 , C_2 and C_3 are the concentrations in compartments 1, 2 and 3; V_1 , V_2 and V_3 are the volumes of distribution for each compartment; and CL_1 and CL_2 are the distributional clearances between compartments 1 and 2 and 2 and 3.

The search for the most adequate model to describe the plasma profiles was performed through the fitting of the mean profile of each i.v. administration group to the linear kinetic and all non-linear equations. After selecting the best model for each profile, the individual profiles of all animals in each group was modeled with the selected equation. The criteria employed to select the appropriate model to describe the mean profiles, given by the computer program Scientist[®], were: the coefficient of determination (r^2), the model selection criterion (MSC), a modified Akaike Information Criterion (AIC), and the mathematical coherence between the pharmacokinetic parameters determined by modeling and the phenomena experimentally observed.

The plasma profile obtained after oral dosing of VRC was modeled assuming one compartment with linear absorption and MM elimination, according to the following equation (13):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \left[\frac{k_a DF}{V} \right] \times e^{-k_a t} - \frac{V'_M \times C}{K_M \times C} \quad \text{Eq. 7}$$

where V is the volume of distribution, D is the dose, F is the bioavailability, k_a is the first-order absorption constant, V'_M is the V_M/V ratio, in which V_m is the maximum enzymatic velocity, and K_M is the *Michaelis-Menten* constant.

2.6 Bioavailability determination

Individual VRC areas under the curve ($AUC_{0-\infty}$) were initially determined by trapezoidal rule for all doses evaluated (7).

The oral bioavailability was determined by simultaneous fitting of the mean plasma profiles obtained after intravenous dosing of VRC 10 mg/kg and oral dosing of 40 mg/kg using equations 6 and 7, respectively, with the aid of computer program Scientist[®] v. 2.0.1.

After the simultaneous fitting of oral and i.v. doses, the value of the bioavailability determined was fixed and the individual profiles were fitted allowing the estimation of V_d , K_a , K_M and V_M for each animal.

2.7 Statistical analysis

The pharmacokinetic parameters obtained from the compartmental analysis for the different doses investigated were compared using the analysis of variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) followed by Tuckey, with the aid of the software Sigma Stat[®] v. 3.5 (Systat[®], USA).

3. Results and discussion

VRC is a relatively new antifungal agent available in market which has few reports of pre-clinical pharmacokinetics (3,4). Due to its non-linear pharmacokinetics in humans and animals (2,3,5), the determination of oral bioavailability is tricky, requiring the use of alternative approaches.

This work presents a detailed pharmacokinetic analysis of this triazole drug conducted in Wistar rats throughout the compartmental fitting of plasma profiles observed after three intravenous doses. Besides, the present work presents an alternative approach for the evaluation of the VRC's bioavailability not yet described in the literature.

Voriconazole mean plasma profile after the administration of 2.5 mg/kg *i.v. bolus* administration was adequately fitted by the three-compartment model with linear elimination (Eq. 1) as can be seen in Figure 1.

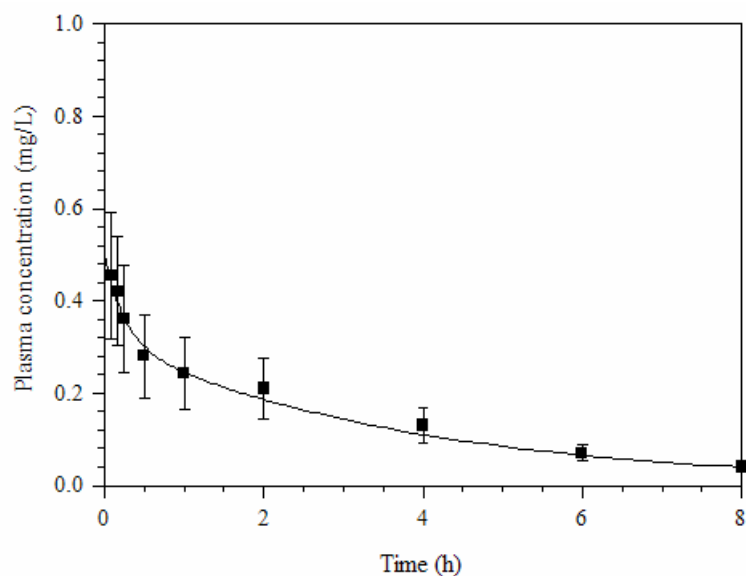


Figure 1. Mean plasma profile after *i.v. bolus* administration of 2.5 mg/kg of VRC. (Points represent average \pm standard deviation of six animals).

Pharmacokinetic parameters determined through individual compartmental modeling of plasma profiles are shown in Table 1.

Table 1. VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a linear three-compartment open model after *i.v. bolus* administration of 2.5 mg/kg (n = 6).

Pharmacokinetic Parameters*	Average \pm SD
k_{12} (h^{-1})	0.68 ± 0.46
k_{21} (h^{-1})	3.20 ± 2.18
k_{13} (h^{-1})	3.36 ± 2.00
k_{31} (h^{-1})	1.40 ± 1.17
k_e (h^{-1})	0.36 ± 0.06
Cl_{tot} (L/h/kg)	1.66 ± 0.38
MSC range	2.9 – 3.6
Determination coefficient range*	0.98 – 0.99

*See the text for parameters definition.

The two higher *i.v bolus* doses investigated could not be described by linear models. The plasma profiles observed after 5 and 10 mg/kg *i.v.* dosing showed a pattern distinct from that observed after 2.5 mg/kg *i.v.* administration, compatible with saturation of elimination. VRC mean plasma profiles after these doses were modeled using equations 2 to 6. The results can be observed in Figures 2 and 3 for 5 and 10 mg/kg dosing, respectively.

Table 2. Pharmacokinetic and statistical parameters obtained by fitting VRC mean plasma profiles, obtained in anesthetized Wistar rats after *i.v. bolus* administration of 5 and 10 mg/kg doses, to different pharmacokinetic models (n = 6/group).

Pharmacokinetic and Statistic Parameters ¹	Model A ² Equation 2		Model B ² Equation 3		Model C ² Equation 4		Model D ² Equation 5		Model E ² Equation 6	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
Dose (mg/kg)	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
K _M (µg/mL)	1098	0.60	1.00	0.69	0.62	0.64	1.18	0.95	0.74	0.57
V _M (µg/h)	0.354	0.24	1237	0.21	0.24	0.32	0.34	0.24	1.66	2.50
k _e (h ⁻¹)	nd	nd	0.48	0.41	nd	nd	1.2 e ⁻¹⁷	0.35	nd	nd
MSC	-2.34	-0.65	0.09	0.876	3.80	4.0	4.1	-2.34	2.06	1.98
Determination coefficient (r)	0.09	0.23	0.43	0.08	0.97	0.97	0.99	0.09	0.98	0.97

¹See the text for parameters definition; ²**Model A:** one compartment model with *Michaelis-Menten* elimination; **Model B:** one compartment with simultaneous linear and *Micahelis-Menten* elimination; **Model C:** two compartment model with *Michaelis-Menten* elimination; **Model D:** two compartment model with simultaneous linear and *Michaelis-Menten* elimination; **Model E:** three compartment model with *Michaelis-Menten* elimination; nd = not determined because it is not part of the model.

Analyzing Figure 2, one may observe that one-compartment models (panels A and B) were not capable of describing the experimental data after VRC 5 mg/kg dosing and did not characterize the quick decline of plasma concentrations observed at the first two hours after drug administration. The same misfit was observed when VRC 10 mg/kg was modeled using this equation (Figure 3A and 3B). The failure of the one-compartment model to fit the experimental data is reflected in the pharmacokinetic parameters and statistical result (MSC and r^2) shown in Table 2.

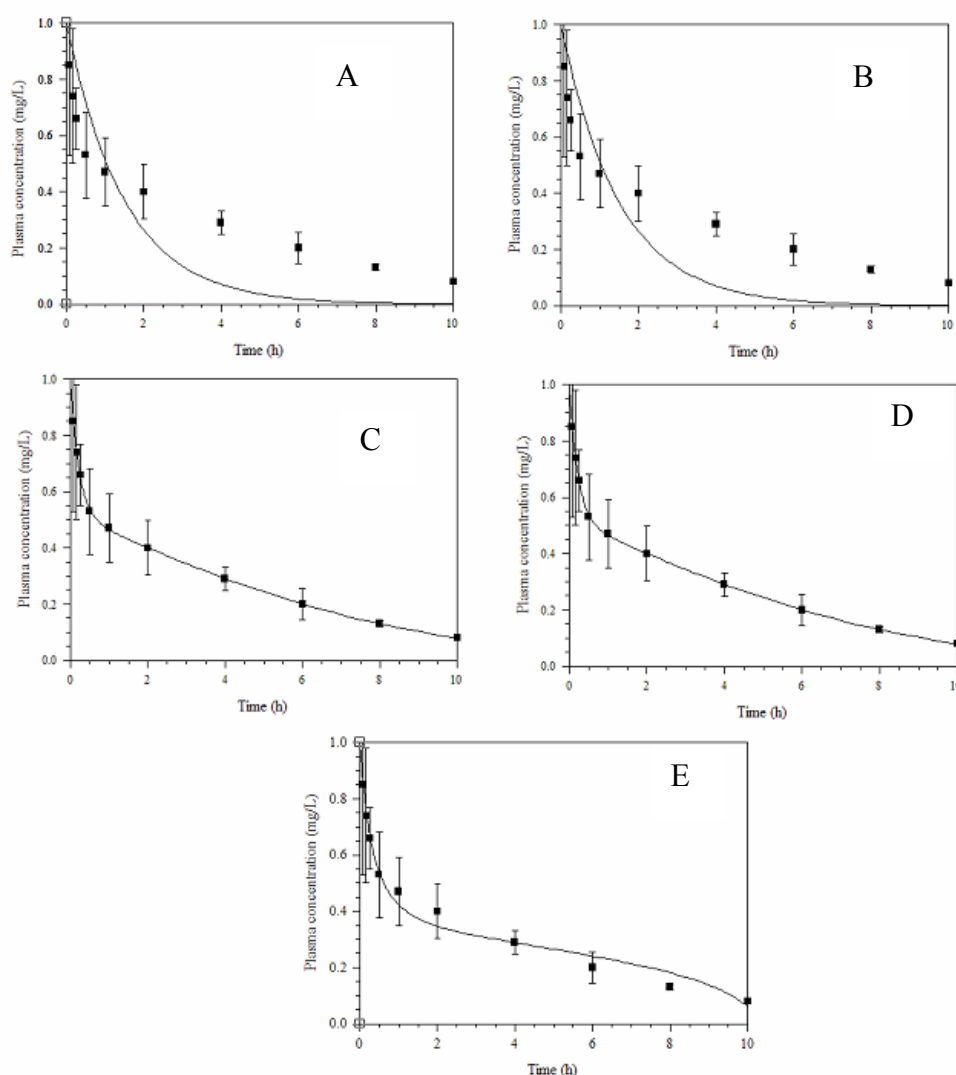


Figure 2. Mean VRC plasma profile after i.v. bolus administration of 5 mg/kg to anesthetized Wistar rats modeled with equations 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) and 6 (E). See text for models explanation. (Points represent average \pm standard deviation of six animals).

The two-compartment model with *Michaelis-Menten* elimination (Model C) adequately described the quick decline of the initial concentrations after *i.v* administration showing a better MSC and *r* than the one-compartment models (Figures 2 and 3, Table 2). The mean pharmacokinetic parameters, K_M and V_M , estimated for both evaluated doses, were $0.63 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and $0.28 \pm 0.05 \mu\text{g/h}$, respectively. The two-compartment model with simultaneous *Michaelis-Menten* and first order elimination (Model D), although presented a good visual fit and adequate MSC and *r* values (Table 2) estimated a k_e of 1.2 e^{-17} for the 5 mg/kg dose; the 10 mg/kg dose was poorly fitted by this model, as it can be observed by the MSC and *r* values obtained.

The three-compartment model with *Michaelis-Menten* kinetics (Model E), characterized by a quick distribution phase by diffusion followed by a metabolism saturation stage, during which the drug remains a long time with concentrations almost constant in the bloodstream, described the VRC pharmacokinetics adequately in anesthetized Wistar rats after 5 and 10 mg/kg *i.v.* doses administration. The mean values of K_M and V_M estimated for both doses were $0.66 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ and $2.08 \pm 0.59 \mu\text{g/h}$, respectively.

Although both multi-compartment models with only *Michaelis-Menten* elimination tested have been able to describe the VRC pharmacokinetic profiles, the values of V_M determined by the two-compartment model were not compatible with the experimental data observed in the oral administration. If the value of V_M were around $0.28 \mu\text{g/h}$, as estimated by the two-compartment model, plasma concentrations would be kept constant for much longer than it was observed experimentally. For this reason, the three compartment with *Michaelis-Menten* elimination model was selected as the best model to describe the plasma profiles of the two higher doses investigated.

After the three-compartment model with *Michaelis-Menten* elimination (Eq. 6) was selected, based on the mean profiles, the model was used to fit the individual profiles obtained after *i.v bolus* doses of 5 and 10 mg/kg. The results are shown in Table 3.

Table 3. VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a three compartment model with *Michaelis-Menten* elimination after i.v. *bolus* administration of 5 and 10 mg/kg doses to anesthetized rats (n = 6/group).

Pharmacokinetic Parameters*	VRC 5 mg/kg	VRC 10 mg/kg
K_M ($\mu\text{g/mL}$)	0.54 ± 0.25	0.62 ± 0.12
V_M ($\mu\text{g/h}$)	2.53 ± 0.54	2.74 ± 0.84
CL_1 (L/h/kg)	1.39 ± 0.3	$1.0 \pm 0.03^{**}$
CL_2 (L/h/kg)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
CL_{tot} (L/h/kg)	1.16 ± 0.76	0.69 ± 0.32
V_1 (L/kg)	4.04 ± 2.01	3.09 ± 1.01
V_2 (L/kg)	60.54 ± 34.91	58.02 ± 24.02
V_3 (L/kg)	276 ± 56	138 ± 67
Intervals of MSC	1.96 – 3.21	1.65 – 4.09
Intervals of r	0.96 – 0.99	0.98 – 0.99

*See the text for parameters definition; ** statistically different form CL_1 5 mg/kg ($p < 0.038$).

Observing the mean plasma profiles for both doses (Figures 2 and 3) one can see that VRC concentrations reached levels above the average K_M determined ($0.58 \mu\text{g/mL}$ in average for both doses, Table 3). The saturation of VRC metabolization can also be confirmed by the non-compartmental analysis, were a disproportional increase in $AUC_{0-\infty}$ was observed with increasing the dose. The $AUC_{0-\infty}$ calculated by trapezoidal rule for 2.5, 5 and 10 mg/kg i.v. *bolus* doses were 1.5 ± 0.3 , 4.3 ± 2.9 and $14.4 \pm 2.9 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, respectively. The $AUC_{0-\infty}$ increased by the 2.8 and 9.4 times when the doses were doubled from 2.5 to 5 and from 5 to 10 mg/kg, respectively.

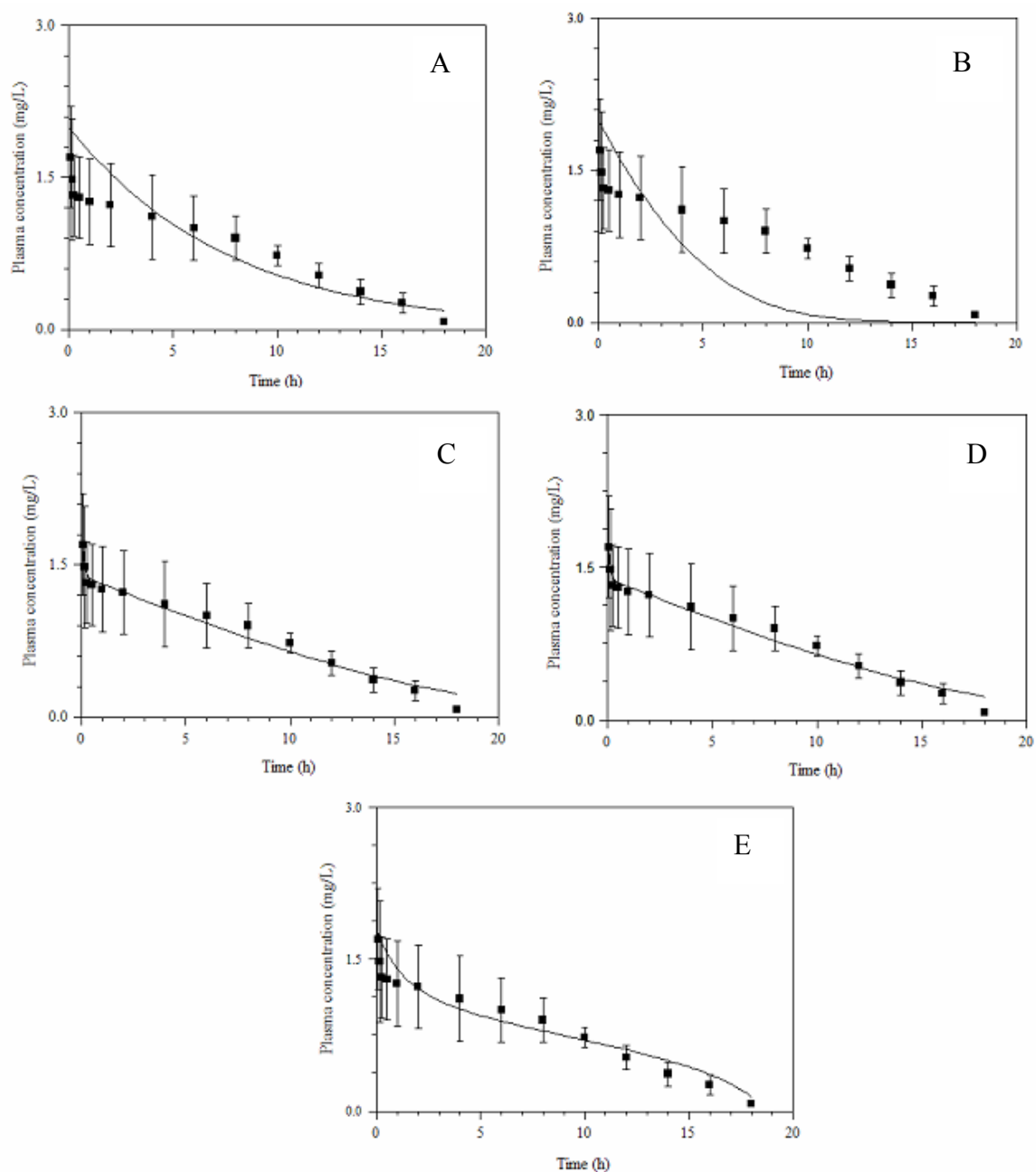


Figure 3. Mean VRC plasma profile after *i.v. bolus* administration of 10 mg/kg to Wistar anesthetized Wistar rats modeled with equations 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) and 6 (E). See text for models explanation. (Points represent average \pm standard deviation of six animals).

Table 4. VRC pharmacokinetic parameters obtained by fitting individual plasma profiles to a one compartment model with first order absorption and *Michaelis-Menten* elimination after oral administration of 40 mg/kg doses to anesthetized rats (n = 6).

Pharmacokinetic Parameters*	Average \pm SD
k_a (h^{-1})	6.60 ± 2.30
k_M ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.58 ± 0.03
V_M ($\mu\text{g}/\text{h}$)	2.32 ± 0.85
V (L/kg)	9.9 ± 2.7
$AUC_{0-\infty}$ plasma ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	45.6 ± 10.8

*See text for parameters definition.

The results obtained in the present work can be compared to the only work that reports VRC pharmacokinetics in rats published in the literature. Roffey and co-workers (2003) (3) employed a one-compartment model with *Michaelis-Menten* elimination to describe the non-linear VRC pharmacokinetics using only a 10 mg/kg i.v. dose administered to two Sprague-Dawley rats. In this experiment, blood sampling was not sequential in the same animal. Instead, two animals were used per sampling time to obtain a single average profile. The authors determined a K_M of 1.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a V_M of 2.56 $\mu\text{g}/\text{h}$, which are in the magnitude of the values determined in the present work.

It has been stated that it is essential to determine the parameters K_M and V_M using more than one intravenous dose in order to attain bigger precision, due to the complex nature of the physiologic processes under modeling (11). Because Roffey and co-workers (2003) (3) used only one dose of VRC and produced only a single mean profile, the parameters determined in the present study certainly better describe the disposition and elimination process of the drug after administration to rodents.

A three compartment model was also used to fit the plasma data of the triazole antifungal ravuconazole after i.v. dosing of 1.25 to 40 mg/kg to rabbits. The authors reported that the compound revealed a non-linear behavior at higher doses, indicating saturable clearance or protein/binding (14).

The bioavailability of drugs exhibiting saturable elimination kinetics is usually difficult to assess. The use of the conventional method for bioavailability determination, the ratio between the $AUC_{0-\infty}$ oral/ $AUC_{0-\infty}$ i.v., requires the clearance to be constant during elimination. This method is based on the premises that when the clearance is constant, the AUC is proportional to the total amount of drug eliminated, which, in turns, equals the amount of drug that reaching the systemic circulation (13). For drugs that exhibit *Michaelis-Menten* elimination, however, clearance is concentration dependent and, for a given amount of drug reaching the systemic circulation, AUC_{oral} is generally expected to be smaller than $AUC_{i.v.}$ (8). Due to the non-linear pharmacokinetics of VRC at the doses evaluated, which are equivalent to the dose the range used in humans, the $AUC_{0-\infty}$ values are not proportional to the bioavailable fraction, leading the bioavailability of the drug to be incorrectly determined when the usual method is employed. A reflection of this limitation can be observed in the oral bioavailability of 159% determined for VRC in Sprague-Dowley rats after a 30 mg/kg dose administration (3).

To overcome this limitation and present an alternative method to determine the drug's bioavailability in non-linear situation, an alternative approach was employed to determined VRC oral bioavailability in the present work. The validity of the methodology employed is based on the fact that this drug presents saturation only in the elimination process and thus, it behaves linearly in relation to absorption, the biopharmaceutic stage under evaluation in bioavailability determination.

A separation of the absorption and the saturable elimination phases of VRC plasma profile after oral dosing was achieved by adapting the technique proposed by Waschek and co-workers (9) and the theoretical considerations in the calculation of bioavailability of drugs that exhibits *Michaelis-Menten* kinetics published by Rubin and Tozer (1987) (8), in order to determine the bioavailable fraction of the dose administered. This evaluation was easily performed by the simultaneous fitting of

plasma profile obtained after 10 mg/kg intravenous and 40 mg/kg oral VRC dosing by equations 6 and 7, respectively using the Scientist[®] software v.2.0.1. The profiles simultaneously fitted are presented in Figure 4.

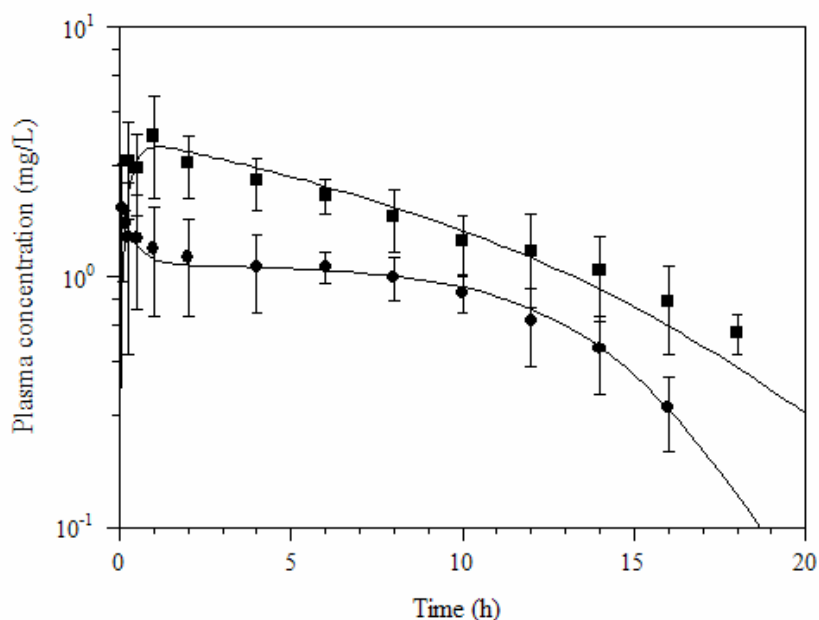


Figure 4. Simultaneous fitting of mean plasma profiles after *i.v.* (●) and oral (■) administration of VRC 10 and 40 mg/kg, respectively, to anesthetized Wistar rats. (Points represent average \pm standard deviation of 6 animals/dose).

The approach employed in this study allows for calculating the real bioavailability, where the saturation of the elimination process was taken into account. The bioavailability of VRC in anesthetized rats was found to be 82.8 %, similar to the humans bioavailability reported to be around 96 % (3) and more reasonable than the 159% previously reported for rats (3). The application of this approach makes it possible to determine bioavailability in saturated conditions, being an alternative for the calculation of this parameter when K_M and V_M are obtained from intravenous administration data.

The individual plasma concentration *versus* time profiles after oral administration of 40 mg/kg were properly described by one-compartment model with first-order absorption and zero-order elimination (equation 7). The profile presented in Figure 4 shows a quick VRC absorption, reaching peak plasma concentration around 2

hours, equivalent to a t_{\max} between 1 and 2 hours previously reported (3). The pharmacokinetic parameters determined by modeling of the oral data are shown in Table 4. The absorption rate constant (k_a) was of $6.6 \pm 2.3 \text{ h}^{-1}$ and the volume of distribution was $9.91 \pm 2.7 \text{ L/kg}$.

Statistical differences were found only among the total clearances for the three VRC i.v. doses evaluated, showing a significant reduction in the Cl_{tot} with increasing dose: from $1.66 \pm 0.38 \text{ L/h/kg}$ for 2.5 mg/kg, to $1.16 \pm 0.76 \text{ L/h/kg}$ for 5 mg/kg and to $0.69 \pm 0.32 \text{ L/h/kg}$ for 10 mg/kg ($\alpha = 0.05$). The values of K_M and V_M determined by oral and all i.v. doses tested were statistically similar (Tables 3 and 4) ($\alpha = 0.05$).

4. Conclusions

The approach applied in this study to determine the VRC bioavailability in rats is an important contribution to pharmacokinetic evaluation of drug that displays a non-linear behavior given that the methodologies to calculate this pharmacokinetic parameter are scarce in literature and hard to be found.

The pharmacokinetics of VRC in Wistar rats after i.v. administration of different doses showed a non-linear behavior, best described by a three-compartment pharmacokinetic model. The drug displayed a non-linear disposition in rats, indicating a saturable elimination as described for other animal species and humans. After oral administration VRC is better described by a one compartment model with *Michaelis-Menten* elimination, showing a bioavailability of 82.8%.

The comprehensive evaluation of VRC pre-clinical pharmacokinetics presented here can be applied in the establishment of PK/PD modeling of this antifungal drug viewing to further elucidate its exposure/response relationship and optimize its dosing regimens.

5. References

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 1185 de 09 julho de 2002 http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185_02re.htm; 2007.

2. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45 (7): 649-663.
3. Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman ANR, *et al.* The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog and human. *Drug Met Disp* 2003; 31 (6): 731-741.
4. Andes D, Marchillo K, Stanstad T, Conklin R. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 6 (10): 3165-3169.
5. Leveque D, Nivoix Y, Jehl F, Herbrecht R. Clinical pharmacokinetics of voriconazole. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27 (4): 274-284.
6. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(5): 540-547.
7. Shargel L, Yu ABC, Wu-Pong S. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. New York: McGraw-Hill, 2005.
8. Rubin GM, Tozer TN. Theoretical considerations in the calculation of bioavailability of drugs exhibiting *Michaelis-Menten* elimination kinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1984; 12 (4): 437-450.
9. Waschek J, Fielding R, Pond S, Rubin G, Effeney, D and Tozer T. Dose-dependent sulfoconjugation of salicylamide in dogs: effect of sulfate depletion or administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 234 (2): 431-434.

10. Araujo BV, Conrado DJ, Palma EC, Dalla Costa T. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazol in plasma rat. *J Pharmaceutical and Biomed Anal* 2007; (44): 985-990.
11. Fujimiya T, Yamaoka K, Fukui Y. Parallel first-order and *Michaelis-Menten* elimination kinetics of ethanol. Respective role of alcohol dehydrogenase (ADH), non-ADH and first-order pathways. *J Pharm Exp Therapeutics* 1989; 249 (1): 311-317.
12. Jungbluth GL, Jusko WL. Dose-dependent pharmacokinetics of mezlocillin in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(6): 839-843.
13. Wagner JG. *Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist*. Pennsylvania: Technomic Publishing, 1993.
14. Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher A, Sarafandi A *et al*. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal triazole ravuconazole following intravenous administration of its di-lysine phosphoester prodrug (BMS-379224) in rabbits. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (5): 899-907.

Capítulo 7: Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida sp.* infected Wistar rats

Artigo submetido ao *International Journal of Antibiotics*

**Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and
Candida sp. infected Wistar rats**

Bibiana Verlindo de Araujo¹, Cristófer Farias da Silva², Sandra Elisa Haas¹, Teresa Dalla Costa^{1,2*}

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

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Running title: Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis

*Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

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

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

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Synopsis

Objectives: The aims of this study were to evaluate free levels of voriconazole (VRC) in kidney of healthy and *C. albicans* or *C. krusei* infected Wistar rats employing microdialysis, and to establish the relationship between free renal and free plasma levels in both conditions. **Methods:** Animals were infected by injecting $2.5 \cdot 10^5$ CFU inoculum through the tail vein ($n = 6/\text{group}$). After 48 h, they were anaesthetized and a microdialysis probe (CMA 20) was inserted into the renal cortex of the left kidney. VRC (40 or 60 mg/kg) was administered orally and blood and microdialysate samples were collected at pre-determined time points up to 18 h. Total plasma and free tissue concentrations (CT_{free}) were determined by LC-MS/MS and LC-UV, respectively. **Results:** The mean $AUC_{0-\infty}$ increased from 49.2 ± 3.94 to 81.4 ± 6.4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ for plasma and from 16.5 ± 1.5 to 31.1 ± 6.1 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ for tissue after 40 mg/kg and 60 mg/kg VRC dosing, showing a non-linear pharmacokinetics described by a one compartment model with *Michaelis-Menten* elimination. There was no statistical differences between the $AUC_{0-\infty}$ of plasma and tissue for healthy and infected groups. The antifungal tissue penetration was similar for both doses and conditions investigated (0.34 ± 0.01). VRC protein binding was 66 %, allowing the prediction of free renal levels. **Conclusions:** The results showed that VRC free renal and free plasma levels are similar in healthy and disseminated candidiasis by *C. albicans* and *C. krusei* and plasma levels can be used to optimize the drug's dosing regimen.

Keywords: voriconazole, microdialysis, *Candida sp.*, renal penetration

1. Introduction

The incidence of systemic *Candida* infections has increased substantially in recent years¹. The risk of opportunistic infections associated to this pathogen is markedly increased in patients who are severely immunocompromised due to cancer chemotherapy, organ or bone marrow transplantation, or human immunodeficiency virus infection (HIV)². Fungal infections can take place on either mucous membrane or by hematogenous dissemination. In the second case, the yeasts have the ability to invade numerous sites, including kidney, liver and brain³. While gradual decline in the number of *Candida sp* viable count occur in organs such as liver, lungs and spleen shortly after intravenous infection, in the kidney the viable count steadily increases with the progress of the infection, becoming the most severely infected organ in disseminated candidiasis. The high predilection of *Candida sp.* for the kidney remains unexplained, but this behavior justifies the use of this organ to assess yeast systemic infection⁴.

Although *Candida albicans* have been the most common specie associated with the fungal mucosal infections, in the last twenty years there was an increase in the clinical importance of other species, especially *Candida krusei*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*, all associated to high mortality rates in nosocomial infections in USA⁵.

The high morbidity and mortality (around 40-50%) observed in systemic *Candida* infections are due to the difficulty in establishing the best strategy for treatment, given that the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indexes predictive of antifungal efficacy are not completely established for this class of drugs^{1,6}.

Many researchers have been using free plasma levels of antifungal drugs to evaluate their PK/PD indexes and predict efficacy, especially in studies conducted with triazole drugs, assuming that free plasma levels are a good surrogate for the concentrations in the interstitial space⁶⁻⁸. However, the knowledge of antifungal drugs tissue distribution is crucial for PK/PD indexes, because only the free fraction of the drug in the tissue is active against the yeast infection.

Free tissue levels of drugs can be accessed by microdialysis, a semi-invasive sampling technique whose principle is the dialysis⁹. Recent studies employing this technique for the determination of antimicrobial drugs free tissue concentrations have indicated that antimicrobial distribution process is characterized by high intertissue variability and that drug levels at the target site may substantially differ from corresponding free plasma levels even in healthy tissues¹⁰. In other cases, the impaired penetration is not observed in healthy tissues but it is associated to the infection or the inflammatory responses at the infection site, as observed in soft tissue infections¹¹, septic shock¹², pneumonia¹³ or vascular alterations associated to diabetes¹⁴.

As it occurs with antimicrobial drugs, plasma levels may not be a good surrogate of free tissue levels observed in healthy and infected organs after disseminated fungal infection. Only few reports are present in the literature dealing with this issue.

In this context, the goals of this work were to evaluate free levels of voriconazole (VRC) in kidney of healthy, *C. albicans* and *C. krusei* infected Wistar rats employing microdialysis and to establish the relationship between free renal and free plasma levels of the drug in both conditions.

2. Material and Methods

The experiments involving animals were approved by UFRGS Ethics in Research Committee (Protocol # 2004300). Specific-pathogen free male Wistar rats were used for all studies. Animals were maintained in accordance with the criteria of the Canadian Council of Animal Care¹⁵.

2.1. Chemicals and reagents

VRC was donated by Mikatub (India) as a powder (purity, 102.3 %) and ketoconazole (Internal Standard - IS) was purchased from Delaware (Brazil). Analytical grade formic acid and HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Germany). HPLC water from Millipore's Milli-Q System was used throughout the analysis.

2.2. Determination of VRC in rat plasma and microdialysis samples

The determination of VRC in rat plasma and microdialysate samples was conducted by LC-MS/MS and LC-UV, respectively.

For VRC quantification in plasma samples a previously published method was employed¹⁶. Briefly, plasma aliquots of 100 μ L were precipitated with 190 μ L of cold methanol and 10 μ L of ketoconazole solution in methanol (4 μ g/mL – internal standard) and centrifuged at 18000 g at – 4 °C for 15 min. The supernatant (30 μ L) was injected into the LC-MS/MS system (Shimadzu® SCL-10AVP system controller, LC-10ADVP solvent delivery system and an FCV-10ALVP valve with a Micromass® Quattro LC mass spectrometer in tandem). A Shimadzu® Shim-pack column (150 mm x 4.6 mm i.d.) protected by a Waters μ bondapak guard column packed with 50 μ m RP18 material was used. The mobile phase consisted of acetonitrile:water:formic acid mixture (60:40:0.05, v/v/v). The detection was performed by monitoring the parental fragment transitions in 351.5 < 281.5 m/z for VRC and 531.5 < 82.5 m/z for ketoconazole. The analyses were conducted by the MassLynx software (version 3.5). The method was previously validated according to FDA guidelines and was sensitive, exact and precise within the concentration range of 50 to 2500 ng/mL.

For quantification of VRC in microdialysate samples, which were injected directly into the system without processing, a previously reported LC-UV method was adapted¹⁷. The HPLC system consisted of a Waters® 600 pump, a Waters® UV 2487 dual λ absorbance detector, a Waters® Plus 717 autosampler and a Waters® 746 integrator. The mobile phase, acetonitrile:ammonium monobasic phosphate buffer (60:40, v/v, pH 6.0), was pumped at a flow rate of 1 μ L/min. A Shimadzu® C18 reverse phase column (4 x 150 mm) preceded by a pre-column filled with the same packing material was used as stationary phase. VRC was detected at 254 nm.

A linear calibration curve was obtained in the range of 25-2500 ng/mL using drug peak area. The method was validated by performing three calibration curves on each of two consecutive days and by the analysis of quality control samples (75, 1000 and 2000 ng/mL). VCR retention time was approximately 2.9 min. The intra-assay and inter-assay precision were bigger than 94.9 and 95.8 %, respectively. The method

showed accuracy bigger than 89.1 %. The results obtained for VRC was within the acceptable limits stated for bioanalytical methods validation¹⁸.

2.3. Experimental design

Male Wistar rats (weighting 200-250 g) were randomly distributed in six groups of six animals each: two healthy groups received either 40 or 60 mg/kg oral dose of VRC by gavage; the other four groups were infected by *Candida albicans* or *Candida krusei* and received either one of the two doses by the same route.

2.4. Induction of infection

The infection protocol in Wistar rats was previously developed and certified¹⁹. The animals were infected with *C. albicans* (ATCC 10231) or *C. krusei* (ATCC 6258) two days prior to the pharmacokinetic experiment by injecting intravenously, through the lateral tail vein, 0.1 mL of the inoculum ($2.5 \cdot 10^5$ CFU) prepared in 0.9% sterile saline.

2.5. Surgical Procedure

In the day of the experiments the animals were anesthetized with urethane (1.25 g/kg ip). The carotid artery was used for blood collection via an indwelling catheter was irrigated with heparinized saline (25 IU/mL). The rat was put in the lateral decubitus position, skin and muscle were surgically removed and the kidney was exposed. The microdialysis probe was inserted into the kidney cortex with the aid of a needle, which was removed after insertion. The CMA/20 microdialysis probe (4 mm membrane length, 20 kD cutoff) (CMA/Microdialysis AB, Sweden) was perfused with Ringer's solution at a flow rate of 2.0 μ L/min. The probe was allowed to equilibrate inside the kidney for one hour before drug administration by oral gavage. VRC solutions for oral administration was prepared in water using polyethylene glycol 400 (Sigma, USA) as co-solvent (96:4,v/v).

Blood samples (200 μ L) were collected immediately prior to dosing and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, and 18 hours after drug administration. Blood were harvested into heparinized tubes and centrifuged immediately after collection.

The plasma was separated, frozen and stored at $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed. Microdialysis samples, collected over 30 min intervals, were also frozen and stored at $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed.

2.6. Determination of probes recovery *in vivo*

VRC microdialysis probe recovery *in vivo* was determined by retrodialysis. A group of three animals was anesthetized with urethane (1.25 g/kg ip) and the microdialysis probes were inserted into the kidney as previously described. The probes (CMA 20), perfused with Ringer's solution at a flow rate of $2.0\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$, were allowed to equilibrate for 1 h. After equilibration, Ringer's solutions was replaced by VRC $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ in Ringer's solutions. Microdialysate samples were collected from each probe in 30 min intervals, during two hours.

Dialysate (C_{dial}) and perfusate (C_{perf}) concentrations were determined by LC-UV. The *in vivo* recovery (RR) by retrodialysis was calculated as²⁰:

$$RR\ (\%) = 100 - \left(\frac{C_{\text{dial}}}{C_{\text{perf}}} \times 100 \right) \quad (1)$$

VRC average recovery *in vivo* of was used to determine the free tissue levels of the drug in all experiments.

2.7. Protein binding

VRC binding to rat's plasma protein was determined by ultrafiltration. Different VRC concentrations (0.5, 2.5, 5.0 and $10.0\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) were investigated, based on the total plasma concentrations observed in the animals after oral administration of 40 and $60\text{ mg}/\text{kg}$ doses. Plasma samples spiked with VRC were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one hour and an aliquot was separated for the determination of total plasma concentrations. An aliquot of $1000\text{ }\mu\text{L}$ was placed into the upper part of the Centrifree® ultrafiltration device (95 mm, 30 kDa cutoff, Millipore, USA) and centrifuged at 2000 g for 15 min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The ultrafiltrate was collected and VRC concentration was determined in each sample by LC-MS/MS as described early. Duplicates were analyzed for each concentration. VRC free fraction was determined by the ratio between ultrafiltrate and total plasma concentrations. VRC binding to the

ultrafiltration device was determined in the same range of concentrations employing drug aqueous solutions.

2.8. Pharmacokinetics evaluation

For the description of VRC plasma profiles a one-compartment open model with first-order input and *Michaelis-Menten* elimination was used²¹:

$$\frac{dC}{dt} = \left[\frac{K_a D}{V} \right] e^{-K_a t} - \frac{V' m C}{K_m + C} \quad (2)$$

where C is the drug concentration in the volume V at time t, D is the absorbed dose, K_a is the first order absorption rate constant, $V'm = V_m/V$, where V_m is the maximal rate of metabolism, and K_m is the Michaelis constant. To model the data, the values of V_M (2.63 $\mu\text{g/h}$), K_M (0.58 $\mu\text{g/mL}$) and bioavailability (0.82) previously determined in anesthetized rats were fixed²².

Free kidney concentrations (CT_{free}) were predicted based pharmacokinetic parameters obtained from plasma data using the following equation:

$$\frac{dCT_{\text{free}}}{dt} = fu \times \left[\frac{k_a D}{V} \right] e^{-K_a t} - \frac{V' m C}{K_m + C} \quad (3)$$

where fu is the unbound fraction of the drug in plasma.

The compartmental analysis was performed using the computer program Scientist® version 2.01 (MicroMath®, USA). The criteria employed for the evaluation of the pharmacokinetic model suitability to fit the experimental data were the coefficient of determination (r), which is a measure of the fraction of the total variance accounted for by the model and the model selection criterion (MSC), a modified Akaike Information Criterion (AIC).

The plasma and tissue concentrations *versus* time profiles were analyzed individually for each animal. The total plasma concentration area under the curve ($AUC_{0-\infty \text{ plasma}}$) and the free kidney area under the curve ($AUC_{0-\infty \text{ tissue}}$) were determined by trapezoidal method²¹. The ratio $AUC_{0-\infty \text{ tissue}} / AUC_{0-\infty \text{ plasma}}$ was calculated as a measure of drug penetration into the organ.

2.9. Statistical analysis

The pharmacokinetic parameters obtained from each group were compared by analysis of variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$).

3. Results

VRC binds to microdialysis probes plastic tubing as it was shown by our group²⁰. After correcting for plastic tubing binding, microdialysis probes recovery *in vivo* by retrodialysis was found to be $24.2 \pm 2.8\%$. The average value of 0.24 was employed to correct the renal free levels measured by microdialysis in healthy and infected animals.

VRC binding to the ultrafiltration device was $5.2 \pm 3.0\%$ and this value was taken into consideration for the protein binding determination. Protein binding was concentration independent and it was determined to be $66.0 \pm 4.0\%$, in the range of VRC concentrations evaluated ($0.2 - 10 \mu\text{g/mL}$). This result agrees with previously published data that report a protein binding of 66 % in rats²³.

Concentration *vs.* time profiles of VRC total plasma and free kidney concentrations after administrations of 40 and 60 mg/kg to healthy and infected Wistar rats are shown in Figure 1. Total plasma concentrations were fitted using equation 2 and free tissue levels were predicted using pharmacokinetic parameters derived from plasma and protein binding, using equation 3. The one compartment model with first order absorption and *Michaelis-Menten* elimination adequately fitted the plasma data, with MSC levels between 3.45 and 2.69 and correlation coefficient levels between 0.96 and 0.99.

The pharmacokinetic parameters determined by individual modeling of plasma data using equation 2 are summarized in Table 1. There were no statistical differences between the parameters estimated for both doses in healthy and *Candida* infected animals.

Table 1. Voriconazole pharmacokinetic parameters determined by fitting plasma profiles of healthy and infected Wistar rats after oral administration of 40 and 60 mg/kg (n = 6/group) (average \pm SD).

Pharmacokinetic Parameters ¹	VRC 40 mg/kg			VRC 60 mg/kg		
	Healthy animals	<i>C. albicans</i> infected	<i>C. krusei</i> infected	Healthy animals	<i>C. albicans</i> infected	<i>C. krusei</i> infected
k_a (h ⁻¹)	6.6 \pm 2.3	4.4 \pm 1.8	3.6 \pm 1.9	3.2 \pm 1.2	6.4 \pm 1.5	3.7 \pm 1.6
V (L/kg)	9.9 \pm 2.7	8.0 \pm 1.5	8.12 \pm 1.7	9.5 \pm 1.1	7.85 \pm 2.1	6.93 \pm 2.1
AUC _{0-∞ plasma} (μg*h/mL)	45.6 \pm 10.8	53.4 \pm 13.6	48.5 \pm 7.8	77.0 \pm 9.0 ^a	88.8 \pm 6.3 ^b	78.5 \pm 21.1 ^c
AUC _{0-∞ tissue} (μg*h/mL)	15.9 \pm 3.1	20.80 \pm 4.1	15.3 \pm 2.8	26.2 \pm 3.9	29.2 \pm 4.2	28.1 \pm 3.6
Kidney penetration ²	0.35 \pm 0.09	0.39 \pm 0.10	0.32 \pm 0.04	0.34 \pm 0.09	0.33 \pm 0.05	0.36 \pm 0.08

¹For symbols definition see text; ²kidney penetration determined as the ratio of AUC_{0-∞ tissue}/AUC_{0-∞ plasma}

^{a,b,c}Statistical difference compared to the equivalent group that received smaller dose ($\alpha = 0.05$).

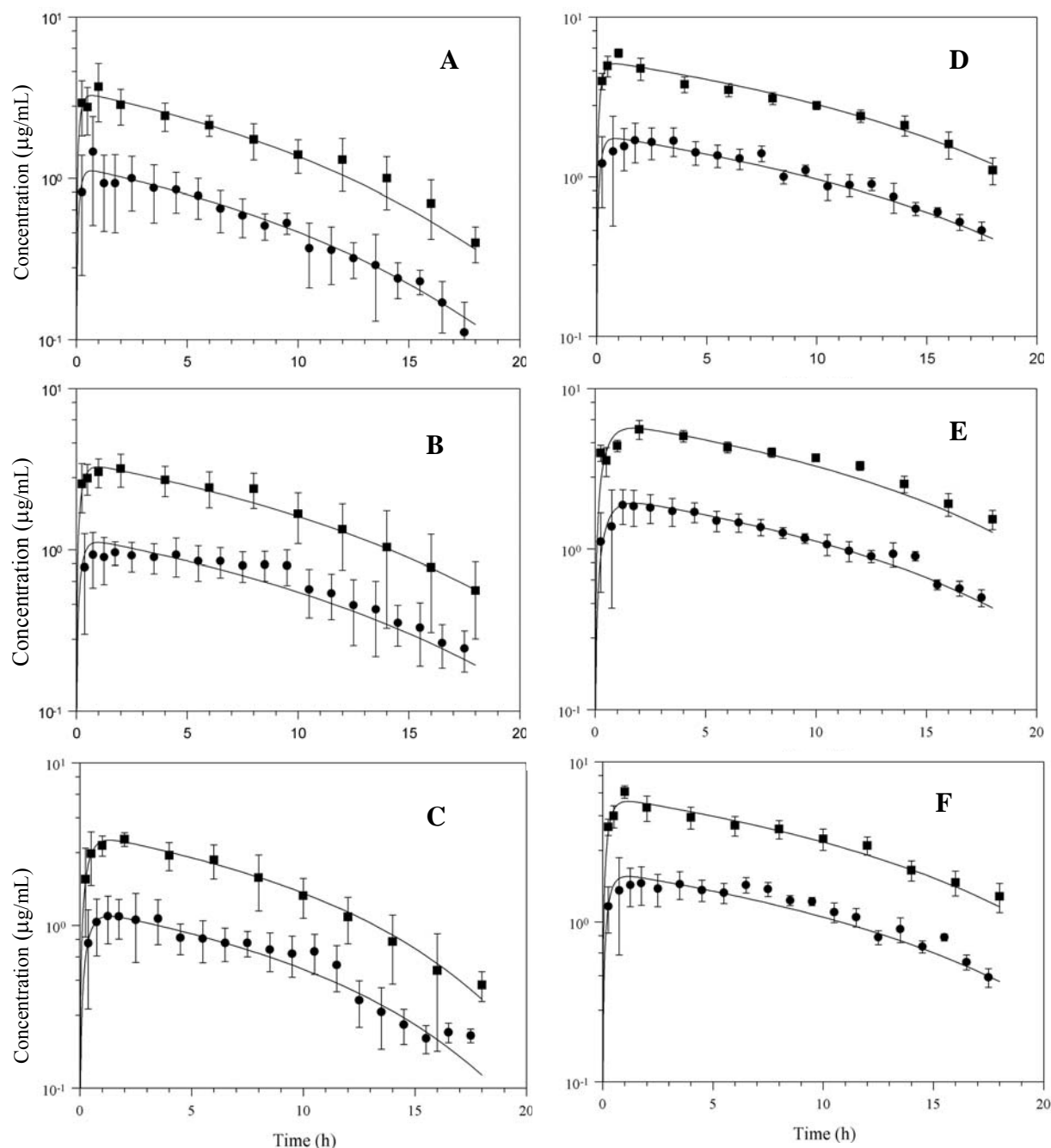


Figure 1. Mean concentration-time profiles of voriconazole in total plasma (filled squares) and free kidney (filled circle) determined by microdialysis in healthy (panels A and D) and infected Wistar rats by *Candida albicans* (panels B and E) or *Candida krusei* (panels C and F) after administration of a single oral dosage of 40 mg/kg (left panels) or 60 mg/kg (right panels). Lines represent total plasma levels fitted using equation 2 and free tissue levels predicted using equation 3. See text for details. (Average \pm SD of 6 animals/group).

4. Discussion

In the present study, voriconazole renal penetration was evaluated in healthy and *Candida* infected rats by microdialysis. Antifungal tissue penetration is fundamental to better design dosing regimens because fungal infection mainly occurs in tissues and only the free fraction of the drug in the interstitial fluid is responsible for the antifungal effect. In this context, the efficacy of antifungal agents is strongly influenced by its distribution characteristics.

Many researches have demonstrated that microdialysis is a powerful tool to investigate tissue distribution of antimicrobial agents. In the last decade, many research papers were published showing tissue penetration of different drugs such as β -lactams²⁴, quinolones¹¹, aminoglycosides²⁵, among others antimicrobial agents^{13,26}. The information accumulated in these studies have shown that it is crucial to evaluate each compound independently, because, even in the same antimicrobial class, is not possible to forecast whether free plasma concentrations will be capable of predicting the free tissue levels of the drug. The differences in tissue penetration of these drugs are associated to many factors, especially protein binding, lipophilicity and the physiological mechanisms involved in antimicrobial distribution. Furthermore, even when a relationship is established between plasma and tissue levels in healthy individuals, the infection process and the inflammation that follows can change this equilibrium²⁷.

Similar to antimicrobial agents, antifungal agents can have diverse tissue penetration in healthy individuals. Furthermore, changes in free drug equilibrium between plasma and interstitial space can also be expected when *Candida sp.* infections are present, due to the secretion of lytic enzymes like phospholipases and proteinases, which play an important role in the endothelial cells invasions, changing the physiological conditions in tissue and inducing an inflammatory response by macrophages²⁸. The influence of these factors on drug penetration has to be evaluated to better understand the pharmacokinetics of the antifungal agent under investigation.

Studies employing microdialysis to determine free tissue concentrations of antifungal agents are rare in the literature. There are two articles reporting fluconazole brain penetration in rats²⁹ and subcutaneous tissue distribution in humans³⁰. The use of

microdialysis to evaluate free skin levels of voriconazole was described recently by Saunte and co-workers³¹ in a guinea pig infection model of dermatophytosis. The tissue penetration of the drug in skin was compared in healthy and *M. canis* infected animals. The authors found similar unbound concentrations of free voriconazole in tissue interstitial fluids in healthy and infected skin, showing that drug penetration was not influenced by inflammation response.

Due to VRC extensive metabolism, it presents a non-linear pharmacokinetic elimination that can be fitted to the one-compartment model with first order absorption and *Michaelis-Menten* elimination after oral dosing²². VRC shows a rapid absorption, with an absorption rate constant around 4.0 h^{-1} , which was not dose dependent or altered by the disseminated candidiasis. This rapid absorption is due to the drug's moderated lipophilicity ($\text{Log } D_{7.4} = 1.8$), responsible for its ability to cross biological membranes²³.

Parameters determined from individual VRC plasma fitting adequately predicted free kidney levels of the drug as can be seen in Figure 1 by the good agreement between concentrations measured by microdialysis and the predicted ones for all groups investigated. VRC kidney penetration, determined by the ratio $\text{AUC}_{0-\infty}^{\text{tissue}}/\text{AUC}_{0-\infty}^{\text{plasma}}$, 0.34 in average, was similar to the free plasma fraction of the drug (0.34), indicating that the free tissue levels are similar to the free plasma levels. This finding indicates that, at equilibrium, unbound VRC concentrations in plasma and renal tissue are comparable, and free plasma levels are a good surrogate of the drugs active concentrations in healthy and *Candida* infected kidney.

Lutsar³² *et al.* (2003) evaluated VRC concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) and brain tissue of guinea pigs using tissue homogenate. The authors observed that VRC penetrates the CSF and brain tissue with a mean ratio of CSF/plasma concentration of 0.68, near to the free fraction of the drug determined in these animals (0.55). In the same study, the correlation between CSF/plasma concentrations for immunocompromised patients was evaluated and the ratio was 0.46, closer to the free plasma fraction determined in humans (0.42). These results corroborate the findings described in the present study, indicating that VRC shows an excellent diffusibility,

which is reflected by the good agreement between free tissue and free plasma concentrations observed.

Although, there are many papers relating impaired tissue penetration of antimicrobials due to the inflammatory process and in infected tissues, the present results showed that VRC kidney penetration is not affected by the *Candida albicans* or *Candida krusei* disseminated infection. These results indicating that the kidney alterations described in disseminated candidiasis^{4,19} were not enough to change VRC distribution in the experimental conditions employed.

5. Conclusions

As a conclusion, the present study showed that VRC easily penetrates the kidney and that pharmacokinetic parameters determined in plasma can be used to predict free kidney levels of the drug assuming the drug's protein binding is known. Furthermore, *Candida sp.* infection did not interfere with VRC kidney penetration indicating that free plasma concentrations are a good surrogate for active levels in healthy and infected kidney and can be used to establish and optimizing the drug regimens to treat disseminated candidiasis.

Acknowledgements

The authors wish to thank Roberto Debom from Cristália® (Brazil) for helping with the donation of voriconazole. The authors thank CNPq/Brazil and CAPES/Brazil for the individual grants received.

Funding

This work was financed by CNPq/Brazil (Process # 473317/2004-4).

Transparency Declaration

Nothing to declare.

References

1. Chandrasekar,P. Selection criteria for antifungals: the right patients and the right reasons. *Inter J Antimicrob Agent* 2006; **S27**: S17-S20.

2. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**: 599-607.
3. Calera JA, Calderone R. Histidine kinase, Two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. *Mycoses* 1999; **42** Suppl 2: 49-53.
4. Balk, MW, Crumrine MH., Fischer, GW. Evaluation of miconazole therapy in experimental disseminated candidiasis in laboratory rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; **13** (2):321-325.
5. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nation wide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; **39**:309– 337.
6. Andes D, Marchillo K, Stamstad T *et al.* *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3165-9.
7. Andes D, Marchillo K, Stamstad T *et al.* *In vivo* pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1193-9
8. Andes D, Marchillo K, Conklin R *et al.* Pharmacodynamics of a New Triazole, Posaconazole, in a Murine Model of Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 137–142.
9. Brunner M, Derendorf H, Muller, M. Microdialysis for *in vivo* pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drug. *Curr Opin Pharmacol* 2005; **5**: 495-499.

10. Ping L, Muller M, Grant M *et al.* Tissue Penetration of Cefpodoxime and Cefixime in Healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2005; **45**: 564-569.
11. Joukhadar C, Stass H, Müller-Zellenberg U *et al.* Penetration of moxifloxacin into healthy and inflamed subcutaneous adipose tissues in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3099–3103.
12. Joukhadar C, Frossard M, Mayer BX *et al.* Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2001; **29**: 385-391.
13. Tomaselli F, Maier A, Matzi V *et al.* Penetration of Meropenem into Pneumonic Human Lung Tissue as Measured by *In Vivo* Microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2228–2232.
14. Skhirtladze K, Hutschala D, Fleck T *et al.* Impaired target site penetration of vancomycin in diabetic patients following cardiac surgery. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1372–1375.
15. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. *Guide to the care and use of experimental animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993.
16. Araujo BV, Conrado DJ, Palma EC, Dalla Costa, T. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007; **44**: 985-990.
17. Zhou L, Glickman RD, Chen N *et al.* Determination of voriconazole in aqueous humor by liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2002; **776**: 213–220.

18. FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, May 2001. (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).
19. Araujo, BV, Haas SE, Dalla Costa, T. Comparison between the disseminated experimental candidiasis induced by albicans and non-albicans species in Wistar rats. Article submitted to the *Can J Microbiol*, 2007.
20. Araujo, BV, Haas SE, Dalla Costa, T. Microdialysis as a tool to determine the free kidney levels of voriconazole in healthy Wistar rats: a model to study the feasibility of a moderate lipophilic drug. Article submitted to the *J Pharm Biomed Anal* 2007.
21. Gibaldi, M.; Perrier, D. *Pharmacokinetics*. New York: Marcel Dekker, 1989.
22. Araujo, BV, Farias C, Haas SE, Dalla Costa, T. Determination of voriconazole pharmacokinetics parameters and its bioavailability in Wistar male rats. Article submitted to the *Braz J Med Biol Res*, 2008.
23. Roffey SJ, Cole S, Comby P. *et al* The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog and human. *Drug Met Disp* 2003; **31**: 731-341.
24. Marchand S, Chenel M, Lamarche I *et al*. Modeling of free amoxicillin concentrations in rat muscle extracellular fluids determined by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3702–3706.
25. Panidis D, Markantonis SL, Boutzouka E *et al*. Penetration of gentamicin into the alveolar lining fluid of critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2005; **128**: 545-552.

26. Legat FJ, Maier A, Dittrich P, *et al.* Penetration of fosfomycin into inflammatory lesions in patients with cellulitis or diabetic foot syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 371-374.
27. Sauermann R, Delle-Karth G, Marsik C *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefpirome in subcutaneous adipose tissue of septic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 650–655.
28. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts *Curr Opin Pharmacol* 2003, **6**: 338–343.
29. Yang H, Wang Q, Elmquist WF. Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using *in vivo* microdialysis. *Pharm Res* 1996; **13**: 1570-5.
30. Sasongko L, Williams KM, Day RO *et al.* Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**: 551-61.
31. Saunte DM, Simmel F, Frimodt-Moller *et al.* *In vivo* efficacy and pharmacokinetics of voriconazole in an animal model of dermatophytosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3317-3321.
32. Lutsar I, Roffey S, Troke P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 728-32.

**Capítulo 8: Modelagem PK-PD do efeito fungistático do voriconazol
contra *C. albicans* e *C. krusei***

Artigo em preparação a ser submetido ao *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* –
AAC

Modelagem PK-PD do efeito fungistático do voriconazol contra *C. albicans* e *C. krusei* em modelo de infecção experimental *in vitro*

Running title: PK-PD modeling of voriconazole effect against *Candida sp*

Bibiana Verlindo de Araujo^a, Cristófer Farias da Silva^b, Teresa Dalla Costa^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ^bFaculdade de Farmácia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752 – Porto Alegre – RS – Brazil

*Autor para correspondência:

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

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

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

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Abstract

Although the minimal inhibitory concentration has been used as the most popular prediction tool for antifungal action, lately integrated into the PK/PD indexes, this pharmacodynamic parameter do not consider time-related antifungal effects, such as killing rate. The concept of PK/PD modeling, an integrative and more predictive approach that has been used to improve antimicrobial dosing regimens in clinical practice, has not been applied to antifungal agents yet. Thus, the aim of this study was to propose a PK/PD modeling for voriconazole (VRC), against *C. krusei* (ATCC 6258) and *C. albicans* (ATCC 10231) employing an *in vitro* infection model. A one-compartment *in vitro* model was used to simulate free VRC tissue levels expected after oral administrations of 200 and 300 mg doses (q8h, q12h and q24h) and constant infusion (2 and 4 mg/kg up to 24 h). VRC was added to the model to reach concentrations equivalent to the free peak tissue levels expected after each dose and, by sequential dilution, the drug's half-life of 6 h was simulate into the system. The antifungal effect was evaluated by determining the number of yeasts over time up to 24 h. An E_{\max} -model was used to model the dynamic effect as a function of time and fluctuating concentrations with the aid of the Scientis® v 2.01 software. VRC showed a fungistatic effect against *C. albicans* and *C.krusei* as described in literature previously. The PK/PD parameters obtained by the modeling were: EC_{50} of $2.96 \pm 2.11 \mu\text{g/mL}$ and K_{\max} of $0.26 \pm 0.18 \text{ h}^{-1}$ for *C. albicans* and EC_{50} of $3.47 \pm 1.18 \mu\text{g/mL}$ and K_{\max} of $0.51 \pm 0.33 \text{ h}^{-1}$ for *C. krusei*. A significant difference was determined for the maximum effect indicating that *C. krusei* is more susceptible to the drug. The PK/PD model tested adequately described VRC antifungal activity and can be used to compare and optimize drug regimens for this drug.

Key words: voriconazole, PK/PD modeling, antifugal, *in vitro* infection models

1. Introdução

O tratamento das infecções fúngicas sistêmicas constitui um dos maiores desafios do século XXI. Devido à baixa prevalência dessas infecções até o início dos anos 80, a pesquisa de novos fármacos antifúngicos e o melhoramento das estratégias terapêuticas para o manejo dessas doenças não despertou grande interesse por parte de clínicos e da própria indústria farmacêutica, ao contrário do observado para outras doenças infecciosas (11,12).

Como consequência desse processo, o tratamento das infecções fúngicas contou por muitos anos com um reduzido arsenal terapêutico, representado apenas pela anfotericina B (11,15) Além disso, dificuldades no estabelecimento dos parâmetros norteadores da terapia antifúngica se refletem até hoje na alta taxa de mortalidade (35 %) observada nos pacientes (12).

A introdução de novos agentes antifúngicos, no início dos anos 90, levou a necessidade da padronização dos ensaios de suscetibilidade a antifúngicos, primeiramente proposta pelo NCCLS em 1997. Desta forma, a experiência adquirida com os antibacterianos foi transposta para os antifúngicos, e os parâmetros farmacodinâmicos concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) passaram a ser determinados.

Embora o MIC seja o parâmetro mais utilizado para a determinação da atividade de fármacos antimicrobianos, ele tem uma série de limitações. O ensaio não permite, por exemplo, que se observe o comportamento do microrganismo em concentrações flutuantes, mais próximas da realidade *in vivo*; a leitura é realizada em tempos pré-determinados (24 ou 48 h), de forma que o efeito do tempo de exposição ao antibiótico não pode ser avaliado; finalmente, não são obtidos dados sobre a taxa de crescimento microbiano ao longo do período de exposição ao fármaco (8,18). Todos estes fatores tornam o MIC uma medida farmacológica de pouco valor, quando avaliada isoladamente, uma vez que a dinâmica de interação fármaco-microrganismo não pode ser observada.

Apesar dos problemas do MIC, a integração desta medida farmacodinâmica (PD) com parâmetros farmacocinéticos (PK) como a área sob a curva ($AUC_{0-\infty}/MIC$), a concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}/MIC$) e o tempo em que o microrganismo ficou exposto

a concentrações do antimicrobiano acima do MIC (Tempo > MIC) são propostas na literatura para otimizar terapias antimicrobianas. Estas relações entre PK e PD são conhecidas como índices PK/PD e estão bem estabelecidas para algumas classes de antibacterianos (16).

A aplicação dos índices PK/PD para os antifúngicos, no entanto, é ainda muito recente. Andes (2003) (4) propôs a classificação dos antifúngicos em três grupos: i) antifúngicos com efeito concentração-dependente e prolongado efeito pós-antifúngico (PAE), que incluem a anfotericina B e as equinocandinas; (ii) antifúngicos com efeito tempo-dependente e PAE curto ou inexistente, que tem como representante a flucitocina; e (iii) fármacos com efeito tempo-dependente e prolongado PAE, representados pelos antifúngicos triazólicos.

Embora esses índices PK/PD possibilitem uma maior integração entre a cinética e a dinâmica dos fármacos, eles ainda possuem limitações, uma vez que o MIC continua sendo o parâmetro farmacodinâmico utilizado para expressar o efeito. Desta forma, outros parâmetros importantes para o desfecho da infecção não são considerados, como a taxa de crescimento microbiano (k), o efeito máximo do antifúngico em determinada infecção (E_{max}) e a concentração de fármaco necessária para alcançar 50% do efeito máximo (EC_{50}).

Para superar essas limitações, uma abordagem mais realista tem sido aplicada com sucesso em estudos que relacionam a concentração do fármaco em função do tempo e efeito antimicrobiano resultante: a modelagem PK/PD. Nesses estudos, o modelo de E_{max} é utilizado para descrever o curso do efeito em função do tempo e parâmetros como a taxa de crescimento microbiano (k) e o tempo para o efeito máximo (k_{max}) podem ser determinados (8,18). A maior vantagem dos modelos PK/PD estabelecidos é permitir que simulações e previsões do efeito sejam feitas para diversos regimes terapêuticos, possibilitando a otimização da terapia.

Entre os fármacos novos que integram o arsenal terapêutico para o manejo de infecções fúngicas sistêmicas encontra-se o derivado triazólico voriconazol (VRC), que foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico em humanos em 2002. Esse fármaco foi aprovado inicialmente para o tratamento de aspergilose invasiva, de infecções invasivas graves por *Candida* resistentes ao

fluconazol (incluindo *C. krusei*) e infecções fúngicas graves causada por *Scedosporium spp.* e *Fusarium sp.* (9). Devido ao potencial farmacológico promissor que o composto tem apresentado em ensaios *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura, seu uso clínico tem se expandido para o tratamento de outras infecções sistêmicas, associadas ao *Criptococcus neoformans*, por exemplo (14).

Considerando o exposto, no presente trabalho foi realizada a modelagem PK/PD do efeito fungistático do VRC frente a *Candida albicans* e *Candida krusei*, duas importantes espécies fúngicas associadas a altas taxas de colonização em pacientes hospitalizados e que apresentam infecções sistêmicas de difícil tratamento, visando estabelecer parâmetros que permitam otimizar a terapia com esse antifúngico. O curso do efeito antifúngico em função do tempo foi determinado a partir de simulações das concentrações livres esperadas do VRC em tecidos humanos após administração de doses orais e infusão contínua do fármaco em um modelo de infecção experimental *in vitro*.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo da solução de VRC

As soluções estoque de VRC (Mikatub Laboratories[®], Índia) foram preparadas conforme as recomendações do CLSI (*Clinical Laboratory Standartization Institute*). O fármaco foi primeiramente dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) e as soluções padrão de VRC empregadas no estudo de foram obtidas a partir da diluição da solução mãe em meio de cultura RPMI 1640 (7).

2.2 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o preconizado pela norma M27-A2 do CLSI (2002) (7). Leveduras (*C. albicans* ATCC 10231 E *C. krusei* ATCC 6258) crescidas em Sabouraud dextrose agar (SDA) por 24 h a 35 ± 1 °C foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0.9 g/L). A turbidimetria de cada suspensão de leveduras foi ajustada a 0.5 de turbidez através de espectrofotômetro espectrofotômetro (Analyser[®] 800) utilizando comprimento de onda de 530 nm. A

concentração final da suspensão padrão de leveduras continha 1 a $5 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colônia/mL (CFU/mL).

2.3 Determinação do MIC

As MIC foram determinadas por macrodiluição, de acordo com a norma M27-A2 do CLSI (2002). Em tubos de ensaio contendo 0.1 mL de cada uma das diferentes concentrações de VRC (faixa 0.03-16 $\mu\text{g/mL}$), a suspensão de trabalho produzida foi diluída em meio líquido RPMI 1640 tamponado com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) 0.165 M, resultando em concentração de $5.0 \cdot 10^2$ a $2.5 \cdot 10^3$ células por mL. Os tubos foram incubados por 24 h at 35 ± 1 °C e procedeu-se a avaliação visual.

O valor de MIC corresponde à menor concentração de fármaco que mostra uma diminuição do crescimento de leveduras (80% ou mais) quando comparado ao controle, isento do fármaco. Esta comparação foi realizada através da diluição de 0.2 mL de suspensão do controle de crescimento, isento do fármaco, em 0.8 mL do meio de cultura.

2.4 Avaliação da taxa de crescimento fúngico *in vitro*

Após a preparação do inóculo, uma alíquota de 100 μL foi adicionada a um frasco contendo 20 mL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0.165 M a 35 ± 1 °C, correspondendo a 10^4 CFU/mL ($n = 3$). Os frascos foram mantidos nessa temperatura durante o experimento. Em intervalos de 2 horas, durante 24 horas, foram coletadas amostras de 20 μL para a quantificação das leveduras. As amostras foram coletadas em duplicata de cada frasco e diluídas em série (10 x), sendo as diluições semeadas em placa contendo SDA e incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h. Após este período, foi realizada a leitura do número de CFU/mL, para a determinação da taxa de crescimento fúngico *in vitro*.

2.5 Modelo de infecção *in vitro*

Um modelo de um compartimento foi utilizado para simular *in vitro* o perfil de concentração livre tecidual do VRC em função do tempo em humanos. O perfil livre tecidual simulado foi calculado a partir dos perfis plasmáticos totais e da fração livre do VRC em plasma, previamente descritos na literatura (6,13). O modelo simulou as concentrações livres teciduais esperadas para o VRC a partir do pico de concentração tecidual, considerando apenas a fase de eliminação do fármaco do organismo. As simulações assumiram tratamento em dose múltipla, após doze dias de administração de dose única diária de 200 ou 300 mg administradas em uma, duas ou três tomadas diárias ou infusão contínua de 2 ou 4 mg/kg por 24 horas. Os parâmetros farmacocinéticos utilizadas para calcular os perfis simulados foram: constante de velocidade de eliminação de 0.104 h^{-1} , fração livre plasmática (f_u) de 0.42 e $C_{\text{máx}}$ plasmático obtido para cada dose, cujos valores foram de $2.35 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para a dose de 200 mg, $4.96 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para as doses de 300 mg e 4 mg/kg infusão contínua e $0.607 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para dose de 2 mg/kg infusão contínua. Os valores de concentração livre tecidual de VRC em humanos foram determinados assumindo-se que a concentração livre plasmática é igual à concentração livre tecidual, conforme determinado em roedores em estudo anterior do grupo (5). Desta forma, os valores simulados como $C_{\text{máx}}$, no modelo de infecção experimental *in vitro* foram iguais a $0.987 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para a dose de 200 mg, $2.085 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para as doses de 300 mg e 4 mg/kg infusão contínua e $0.252 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para dose de 2 mg/kg infusão contínua.

A não-proporcionalidade observada entre os valores de $C_{\text{máx}}$ para as doses avaliadas é explicada pela cinética não-linear do fármaco em humanos adultos, que é descrita pelo modelo de um compartimento com eliminação tipo *Michaelis-Menten*. Após 12 dias de utilização contínua do fármaco nas doses terapêuticas, no entanto, os valores da constante de eliminação ficam iguais a 0.104 h^{-1} , conforme observado nos estudo de Purkins e colaboradores (2003), que foi o valor utilizado nos experimentos.

O modelo de infecção *in vitro* constitui-se de um frasco de cultura contendo 20 mL de meio RPMI tamponado com MOPS 0.165 mM. O inóculo utilizado foi de $5 \cdot 10^4$ CFU/mL. Após 4 horas de crescimento do inóculo a $35 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ adicionou-se o fármaco

em uma concentração equivalente ao pico de concentração livre tecidual esperado após a administração das doses nos regimes posológicos mencionados. As concentrações iniciais utilizadas foram: 0.987 µg/mL para 200 mg q8h, q12h e q24h; 2.085 µg/mL para 300 mg q8h, q12h e q24h; 0.252 µg/mL para infusão contínua de 2 mg/kg e 2.085 µg/mL para infusão contínua de 4 mg/kg. Todas as posologias foram simuladas por 24 horas. Após a adição do fármaco ao meio realizaram-se diluições do mesmo mimetizando o tempo de meia-vida de eliminação do VRC em humanos (6.5 h) nas posologias que envolviam dose múltipla. Para tanto, a cada 30 min, removeu-se 1 mL de meio de cultura, com o auxílio de uma seringa conectada a um filtro estéril (0.22 µm), e repôs-se o mesmo volume com meio de cultura estéril a 35 ± 1 °C, isento do fármaco, mantendo-se inalterado o volume do sistema. O filtro adaptado à seringa permitiu a retirada apenas do meio contendo o fármaco, não alterando o número original de microrganismos no sistema. Nas simulações de infusão contínua não foram realizadas diluições no meio, mantendo-se a concentração constante durante todo o experimento.

O modelo *in vitro* foi mantido a 35 ± 1 °C durante todo experimento, que foi realizado em triplicata para cada dose avaliada. Paralelamente a todos os experimentos um controle negativo, sem fármaco, serviu para confirmar o crescimento do inoculo *in vitro*.

Amostras de 20 µL foram retiradas de cada frasco nos tempos 0 (4 horas após início do experimento, antes da adição do fármaco), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 h. As alíquotas foram diluídas em solução salina estéril (10 x) e 20 µL foram plaqueadas em SDA, em duplicata, e incubadas a 35 ± 1 °C para o desenvolvimento das colônias, que foram contadas após 48 horas de incubação.

2.6 Avaliação da concentração do VRC no modelo de infecção experimental

Para assegurar que o método de diluição utilizado era capaz de simular adequadamente a meia-vida de eliminação tecidual do VRC, as concentrações do fármaco no modelo *in vitro* foram determinadas, em tempos pré-determinados, por um

período de 6 horas. Os experimentos, em triplicata, foram conduzidos conforme descrito anteriormente, sem a adição dos fungos ao meio.

Para quantificação do VRC nas amostras de meio de cultura foi utilizado um método de HPLC-UV previamente descrito na literatura (19). O sistema de HPLC constituiu-se de uma bomba Waters® 600, um detector Waters® UV 2487, um auto-injetor Waters® Plus 717 e um integrador Waters® 746. A fase móvel foi composta de acetonitrila:tampão monofostato de amônio (60:40, v/v, pH 6.0) e a fase estacionária de uma coluna de fase reversa Shimadzu® C18 (4 x 150 mm). A velocidade de fluxo foi de 1 mL/min e a detecção do fármaco foi realizada a 254 nm. As amostras (50 µL) foram injetadas diretamente no sistema após diluição com metanol (1:1 v/v). O método foi previamente validado apresentando linearidade na faixa de 100 - 2500 µg/mL, com exatidão maior que 96.6 % e precisão intra e inter-dia maior que 98.4 % e 96.3 %, respectivamente.

2.7 Modelagem PK/PD

O efeito do VRC sobre as diferentes espécies de *Candida* em função do tempo foi determinado através de modelagem matemática, empregando-se o modelo de Emáx sigmoidal modificado, proposto por Mouton e colaboradores (1997) (10):

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

onde k é a taxa de crescimento microbiano, N é o número inicial de unidades formadoras de colônia (CFU) no inóculo, N_{\max} é o número máximo de leveduras que o sistema permite crescer sem limitação; k_{\max} é a velocidade máxima de morte microbiana, EC_{50} é a concentração necessária para 50% do efeito máximo, C é a concentração livre tecidual de VRC e γ é o coeficiente de Hill, que age como um fator de ajuste das curvas concentração-efeito. Este modelo leva em consideração os fatores limitantes do crescimento do microrganismo em modelos de infecção *in vitro*, como por exemplo, nutrientes e espaço, através da adição do termo N_{\max} , que indica o maior número de bactérias que uma cultura *in vitro* suporta antes de entrar na fase de platô.

O termo C na equação 1 foi substituído pela equação que descreve o modelo de um compartimento com eliminação de primeira ordem simulado *in vitro*:

$$C = C_{max} \cdot e^{-ke \cdot t} \quad 2$$

onde C é a concentração livre do VRC esperada nos tecidos, C_{max} é a concentração adicionada ao frasco de infecção *in vitro* e representa a concentração máxima livre esperada no tecido após administração do VRC em diferentes posologias, k_e é a constante de eliminação do VRC em humanos.

A modelagem dos dados de cinética, simulados no modelo *in vitro*, e os dados de dinâmica obtidos (CFU vs. tempo) foi realizada com o auxílio do software Scientist® v.2.01. (MicroMath®, Salt Lake, Utah, USA). Não foram usados pesos para a modelagem matemática dos perfis de efeito em função do tempo. Para a avaliação da adequação do modelo empregado aos dados experimentais utilizou-se o critério de seleção do modelo (MSC), uma modificação do critério de informação de Akaike, o coeficiente de determinação, que expressa o ajuste dos dados modelados aos pontos experimentais (r^2), e a avaliação visual dos dados modelados.

2.8 Análise estatística

A comparação estatística dos valores obtidos para os parâmetros da modelagem PK/PD para as duas cepas de *Candida* avaliadas e as diferentes posologias foi realizada através de ANOVA, empregando-se teste de Tuckey para identificar as diferenças entre os grupos ($\alpha = 0.05$), com auxílio do software SigmaStat® v. 3.5 (Systat, USA).

3. Resultados

3.1 Valores de MIC

Os valores de MIC determinados através da metodologia de macrodiluição para *C. albicans* ATCC 10231 e *C. krusei* ATCC 6258 foram de 0.25 µg/mL e 0.5 µg/mL,

respectivamente, indicando que ambas as cepas utilizadas nos ensaios eram sensíveis ao fármaco.

3.2. Avaliação da taxa de crescimento fúngico *in vitro* e da concentração do VRC no modelo de infecção experimental

Os estudos de crescimento fúngico em função do tempo mostraram um perfil de crescimento lento, com o início da fase de crescimento Log exponencial em aproximadamente 4-5 horas após a adição do inóculo nos frascos de meio de cultura. Desta forma, determinou-se que o VRC seria adicionado aos frascos de infecção *in vitro* após 4 horas de inoculação dos mesmos, possibilitando a avaliação do efeito do fármaco em fase de crescimento fúngico exponencial.

A avaliação da simulação das concentrações livres teciduais no modelo de infecção experimental geraram um valor médio de constante de eliminação de $0.108 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$, o qual foi semelhante ao descrito na literatura e pré-estabelecido para os experimentos, que era de 0.104 h^{-1} . Desse modo, os perfis simulados *in vitro* para as diferentes posologias utilizadas são mostrados na Figura 1.

3.3 Modelagem PK/PD

As curvas de efeito em função do tempo obtidas para o VRC contra *C. albicans* e *C. krusei* modeladas com a equação de E_{\max} são mostradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. O modelo PK/PD de E_{\max} modificado foi capaz de descrever adequadamente os perfis de inibição do crescimento das duas espécies de *Candida* em função do tempo, para todos os regimes terapêuticos avaliados. Os parâmetros PK/PD determinados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, para *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente.

A análise dos parâmetros PK/PD indicou que a cinética de crescimento das duas espécies de *Candida* foi similar, com valores de constante de geração (k) iguais a $1.19 \pm 0.38 \text{ h}^{-1}$ e $0.93 \pm 0.16 \text{ h}^{-1}$ para *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente. Para a modelagem PK/PD fixou-se o valor médio de k para cada espécie, calculado a partir da modelagem de todas as curvas controle de crescimento fúngico.

O número máximo de leveduras no modelo *in vitro* nos frascos controle (sem o fármaco) foi de 9.5 ± 0.56 Log CFU/mL para *C. albicans* e 8.6 ± 0.71 Log CFU/mL para *C. krusei*.

Em relação aos parâmetros determinados na modelagem PK/PD, o VRC apresentou potência semelhante para ambas as espécies de *Candida*, com valores médios de EC_{50} iguais a 2.96 ± 2.11 µg/mL para *C. albicans* e 3.47 ± 1.18 µg/mL para *C. krusei*. A única diferença estatística observada foi em relação ao efeito máximo (k_{max}), que foi significativamente maior para *C. krusei* (0.51 ± 0.33 h⁻¹) do que para a *C. albicans* (0.26 ± 0.18 h⁻¹) ($p < 0.008$).

4. Discussão

Nesse trabalho um modelo PK/PD de E_{max} -modificado foi utilizado para descrever o perfil de efeito em função tempo do antifúngico VRC contra *C. albicans* e *C. krusei* após a exposição a diferentes posologias do fármaco. O efeito do VRC foi testado utilizando-se modelo de infecção experimental *in vitro*, onde foram simuladas as concentrações livres teciduais esperadas em humanos após a administração das doses de 200 e 300 mg a cada 8, 12 ou 24 h, bem como as concentrações esperadas após infusão contínua de 2 e 4 mg/kg.

A aplicação de modelos PK/PD permite que se estabeleça, através de uma descrição matemática, a variação do efeito com a variação da concentração de um fármaco no organismo, em função do tempo (8). Esta abordagem apresenta vantagens em relação a outros estudos que objetivam integrar características PK e PD de antimicrobianos em geral como os tradicionais índices PK/PD, por exemplo. A principal vantagem se refere à verdadeira integração PK/PD obtida na prática, uma vez que o microrganismo é exposto a concentrações flutuantes do fármaco, através de modelos de infecção *in vitro* ou *in vivo*, e seu comportamento de crescimento, morte ou re-crescimento é acompanhado ao longo do tempo, permitindo a determinação das taxas de crescimento e morte microbianos, muito mais próximos da realidade do que a simples determinação da MIC. Além disso, muitos dos modelos PK/PD empregados são derivados dos modelos farmacodinâmicos de E_{max} , os quais permitem descrever tanto a situação de ausência de efeito (quando o fármaco não está presente) quanto à

situação de efeito, quando alterações de concentração não produzem alteração de efeito.

O modelo de E_{\max} modificado utilizado incluiu, além dos tradicionais parâmetros velocidade máxima de morte microbiana (k_{\max}), concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo (EC_{50}) e constante de geração microbiana (k), um termo para modelar a formação de platô de crescimento fúngico 12 horas após o início do experimento (N_{\max}). Após esse tempo o meio não tem mais condições de sustentar as culturas em termos de espaço e nutrientes, que então param de crescer. Esse platô de crescimento pode ser observado nas curvas de controles de crescimento das Figuras 1 e 2, para ambas as espécies de *Candida* testadas.

As curvas de efeito antifúngico do VRC em função do tempo contra *Candida albicans* e *Candida krusei*, para os diferentes regimes terapêuticos testados, tiveram as fases de inibição e re-crescimento adequadamente descritas pelo modelo de E_{\max} -modificado escolhido (Figuras 2 e 3). A análise das curvas mostrou um crescimento fúngico persistente logo após a exposição das leveduras ao antifúngico. O lento processo de redução do crescimento das leveduras, observado para as duas espécies de *Candida* estudadas, pode ser explicado pelo mecanismo de ação do VRC, que envolve a inibição da enzima 14- α -demetilase, enzima chave no processo de biossíntese do ergosterol, um dos principais componentes da membrana celular do fungo. Como o processo de síntese do ergosterol ocorre em diversas etapas, com a participação de outras enzimas além da 14- α -demetilase, a inibição dessa enzima bloqueia apenas em parte a rota de formação da membrana, levando algum tempo para observar-se o resultado da ação do fármaco (17).

O efeito fungistático do VRC sobre *C. albicans* e *C. krusei* ocorreu em todos os grupos tratados, independente do regime terapêutico investigado, com uma redução máxima de 4.65 ± 0.24 Log CFU/mL, observada na dose de 300 mg/kg administrada a *C. albicans* q8h e de 3.65 ± 0.45 de Log CFU/mL observada na dose de 4 mg/kg para de infusão contínua contra *C. krusei*.

Para *C. albicans*, um aumento no pico de concentração do VRC simulado *in vitro* não promoveu um efeito mais rápido ou mais pronunciado sobre as leveduras, o que pode ser observado através da comparação do efeito do fármaco após a

administração de dose única de 200 e 300 mg q24h (Figura 2A e 2D). Estas doses correspondem a valores de pico de concentração livre tecidual de 0.987 µg/mL e 2.085 µg/mL, equivalentes a 4 e 8 vezes o valor da MIC determinada para o fungo (0.25 µg/mL), respectivamente. Esse resultado indica que as doses de 200 e 300 mg geram concentrações teciduais superiores às necessárias para a inibição do crescimento da *C. albicans* e que as concentrações muito superiores à MIC não alteram significativamente o perfil de morte fúngica dessa levedura. O aumento do intervalo entre doses, mantendo-se a dose total diária de 600 mg constante, através do regime 200 mg q8h (3 vezes ao dia) (Figura 2C) ou 300 mg q12h (Figura 2E) (duas vezes ao dia), promoveu um efeito fungicida semelhante, demonstrando que o VRC não apresenta um perfil de efeito tempo-dependente. A análise dos perfis de efeito em função do tempo indica que quando a concentração de VRC é mantida em níveis acima do MIC, um efeito semelhante é observado independente da razão concentração/MIC (Figura 1, painéis C, E, F e G) e quando as concentrações caem a níveis abaixo do MIC, há um re-crescimento da leveduras.

Os estudos de exposição continuada de *C. albicans* à concentrações teciduais correspondentes a 0.256 µg/mL (2 mg/kg), e 2.085 µg/mL (4 mg/kg), equivalentes a 1 e 8 vezes o valor de MIC, indicaram mais uma vez que o aumento da concentração de fármaco não modifica o perfil marcadamente fungistático do VRC frente ao fungo.

Estudos com diferentes fármacos triazólicos têm demonstrado que o curso da infecção fúngica *in vivo* é dependente da concentração total de fármaco (AUC) e não do intervalo entre dose (1-3), o que é indicativo de que o índice PK/PD mais preditivo da eficácia para estes agentes seria a razão de AUC/MIC.

Inúmeros estudos com antimicrobianos têm demonstrado que a magnitude dos parâmetros PK/PD preditivos de eficácia são semelhantes para fármacos dentro de uma mesma classe terapêutica e este fenômeno parece ocorrer igualmente com os antifúngicos. Estudos *in vivo* com posaconazol (1), ravuconazol (2) e VRC (3) demonstraram que quando a razão AUC/MIC destes compostos varia entre 16.9 h e 25 h observa-se a produção de 50% do efeito máximo dos fármacos. Esses resultados consideram o valor de AUC da fração livre de cada antifúngico investigado.

O efeito fungistático do VRC contra *C. albicans* observado para todas as posologias investigadas no presente estudo pode ser justificada através da análise dos valores de AUC/MIC simulados, os quais foram sempre superiores ao valor proposto para o índice PK/PD do VRC, que é de 24.9 h para uma faixa de dose que varia de 10-2500 mg/(kg) (3). Desta forma, observa-se que há efeito do fármaco em todas as doses investigadas (caracterizado pela diferença no crescimento dos controles em comparação com os tratados), mesmo para as menores doses. O índice PK/PD, no entanto, não foi eficaz em prever tratamentos efetivos uma vez que a 20 mg q24h e q12h não foram efetivas apesar de apresentarem valores de AUC/MIC considerado adequados.

Os perfis de efeito das diferentes doses de VRC em função do tempo para *C. krusei* foram muito semelhantes ao observados para *C. albicans*, com valores médios de EC₅₀ e k muito próximos (Tabela 1 e 2). Uma diferença mais marcante no perfil de efeito do VRC entre as duas espécies de *Candida* pode ser visualizada quando *C. krusei* foi exposta a concentrações constantes, acima do MIC (Figura 3G e 3H). Na dose de 4 mg/kg IC (Figura 3H) pode-se observar um elevado grau de inibição do crescimento da levedura após 24 horas, o que não foi observado para *C. albicans*.

A avaliação global dos perfis de efeito em função do tempo, obtidos para as duas espécies de *Candida* testadas mostra um efeito concentração dependente, mais relacionado a AUC do que ao C_{max}. Este resultado, embora discordante em relação à classificação dos antifúngicos proposta por Andes em 2003, que classifica os triazólicos em antifúngicos com efeito tempo dependentes, está de acordo com o observado pelo mesmo autor em estudo no qual avaliou-se o perfil de efeito de vários fármacos triazólicos em um modelo de infecção experimental em camundongos. As doses de VRC administradas foram de 10 a 50 mg/kg (Andes et al., 2003). Nesse trabalho, os autores determinaram que o índice AUC/MIC seria mais preditivo do efeito do VRC do que a relação T>MIC, baseado nos valores de correlação entre o efeito do fármaco determinado em modelo de candidíase disseminada em camundongos (Log CFU/mL) e os índices PK/PD. O índice T>MIC mostrou uma correlação de 75% enquanto o índice AUC/MIC mostrou 82% de correlação.

O efeito fungistático persistente observado para a maioria dos regimes do VRC posológicos investigados (Figura 2 e 3), pode ser explicado pela manutenção dos níveis de concentração acima do MIC por longos períodos de tempo. Simulações de perfis de concentrações livres teciduais abaixo do MIC, empregando os parâmetros PK/PD determinados experimentalmente, mostrariam crescimento microbiano persistente, semelhantes ao descrito nos painéis A e B das Figuras 2 e 3.

Finalmente, a determinação de um efeito máximo (k_{max}) superior para a *C. krusei* em relação a *C. albicans* pode ser um indicativo de que, exposições mais prolongadas e em níveis de concentração maiores, um efeito de morte mais efetiva poderia ser obtido para infecções com a primeira espécie de levedura, indicando sua maior susceptibilidade ao VRC.

Os resultados obtidos no presente trabalho não podem ser extrapolados para a prática clínica, em virtude das diferenças existentes em uma infecção experimental *in vitro* e a infecção tecidual *in vivo*. Entretanto, os resultados comprovam a aplicabilidade da modelagem PK/PD para a otimização de terapias com antifúngicos triazólicos. Essa ferramenta possibilitou uma melhor compreensão da dinâmica de interação antifúngico-levedura, abrindo um novo campo para investigação de antifúngicos triazólicos e fungos de diferentes espécies.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos através da modelagem PK/PD do antifúngico VRC, pode-se concluir que o fármaco apresenta um perfil de efeito concentração-dependente, sendo que a AUC/MIC parece ser o índice mais preditivo de eficácia. Os resultados mostraram que a utilização da modelagem PK/PD é possível para os antifúngicos utilizando-se os mesmos modelos descritos para antibacterianos. Os parâmetros PK/PD gerados a partir da modelagem matemática do VRC podem ser aplicados em simulações para previsão do efeito do fármaco com distintas doses e intervalos entre doses, possibilitando a racionalização de sua utilização clínica, sendo uma abordagem mais descritiva e interativa do que a relação fixa AUC/MIC.

6. Referências

- 1- **Andes, D., Marchillo, K., Conklin, R., Krishna, G., Ezzet, F., Cacciapuoti, A., Loebenberg, D.** 2004. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:137-142.
- 2- **Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R.** 2003. *In vivo* pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:1193-1199.
- 3- **Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R.** 2003. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:3165-3169.
- 4- **Andes, D.** 2003. *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:1179-86.
- 5- **Araujo, B.V., da Silva, C.F., Haas, S.E., Dalla Costa, T.** Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp. infected Wistar rats. Artigo submetido ao Journal of Antimicrobial Chemotherapy – JAC
- 6- **Azanza, J.R., García-Quetglas, E., Sádaba, B.** 2007. Pharmacology of azoles *Rev Iberoam Micol.* **30**:223-7.
- 7- **Clinical Laboratory Standartization Institute.** 2002. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M-27-2A, Wayne, Pa.
- 8- **Derendorf, H., Hochhaus, G.** Handbook of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Correlation. CRC-Press: EUA, 1995.

- 9- **Levêque, D., Nivoix, Y., Jehl, F., Herbrecht, R.** 2006. Clinical pharmacokinetics of voriconazole. *Int J Antimicrob Agents*. **27**:274-284.
- 10- **Mouton, J.W., Vinks, A.A., Punt, N.C.** 1997. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrob Agents Chemother*. **41**:733-738.
- 11- **Petrikkos, G., Skiada, A.** 2007. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. **30**:108-17.
- 12- **Pugliese, F., Ruberto, F., Cappannoli, A., Perrella, S.M., Bruno, K., Martelli, S., Marcellino, V., D'Alio, A., Diso, D., Rossi, M., Corradini, S.G., Morabito, V., Rolla, M., Ferretti G, Venuta, F., Berloco, P.B., Coloni, G.F., Pietropaoli, P.** 2007. Incidence of fungal infections in a solid organ recipients dedicated intensive care unit. *Transplant Proc*. **39**:2005-2017.
- 13- **Purkins, L., Wood, N., Greenhalgh, K., Allen, M.J., Oliver, S.D.** 2003. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety *Br J Clin Pharmacol*, **56**: 10–16
- 14- **Sabbatani, S., Manfredi, R., Pavoni, M., Consales, A., Chiodo, F.** 2004. Voriconazole proves effective in long-term treatment of a cerebral cryptococcoma in a chronic nephropathic HIV-negative patient, after fluconazole failure. *Mycopathologia*. **158**:165-71.
- 15- **Shao, P.L., Huang, L.M., Hsueh, P.R.** 2007. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents*. **30**: 487-495.

- 16- **Slavik, R.S., Jewesson, P.J.** 2003. Selecting antibacterials for outpatient parenteral antimicrobial therapy: pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet.* **42**:793-817.
- 17- **Fukuoka, T. T., Johnston, D.A., Winslow, C.A., Groot, M.J., Burt, C., Hitchcock, C.A., Filler, S.G.** 2003. Genetic Basis for Differential Activities of Fluconazole and Voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 1213–1219.
- 18- **Treyprasert, W., Schmidt, S., Rand, K.H., Suvanakoot, U., Derendorf, H.** 2007. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of in vitro activity of azithromycin against four different bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents.* **29**:263-70.
- 19- **Zhou, L., Glickman, R.D., Chen, N., Sponsel, W.E., Graybill, J.R., Lam, K.W.** 2002. Determination of voriconazole in aqueous humor by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **5**:213-20

Tabela 1. Parâmetros da modelagem PK/PD do VRC contra *C. albicans* ATCC 10231.

Parâmetros ^a VRC Doses ^b	EC ₅₀ (µg/mL)	k (h ⁻¹)	k _{max} (h ⁻¹)	Coefficiente Hill (γ)	MSC	r
200 mg q24h	1.11	1.9	0.657	4.64	3.3-4.0	0.96-0.99
200 mg q12h	1.05	0.88	0.22	6.92	3.0-3.8	0.98-0.99
200 mg q8h	2.15	0.88	0.198	2.27	2.7-3.9	0.97-0.99
300 mg q24h	2.46	1.63	0.37	4.99	2.9-3.6	0.98-0.99
300 mg q12h	3.08	0.88	0.150	2.10	1.4-3.5	0.97-0.99
300 mg q8h	7.60	0.94	0.319	1.738	2.3-4.6	0.97-0.99
2 mg/kg IC ^c	4.10	1.24	0.092	2.89	3.7-4.1	0.98-0.99
4 mg/kg IC ^c	2.26	1.24	0.153	0.98	2.6-3.9	0.98-0.99
Média ± SD	2.96 ± 2.11	1.19 ± 0.38	0.26 ± 0.18	3.31 ± 2.00	---	---

^aVer texto para definição dos parâmetros; ^bn = 3 para cada posologia investigada; ^cIC = infusão contínua.

Tabela 2. Parâmetros da modelagem PK/PD do VRC contra *C. krusei* ATCC 6258.

Parâmetros ^a VRC Doses ^b	EC ₅₀ (µg/mL)	K (h ⁻¹)	K _{máx} (h ⁻¹)	Coefficiente Hill (γ)	MSC	r
200 mg q24h	2.88	0.917	0.84	2.87	3.1-4.2	0.96-0.99
200 mg q12h	2.85	0.917	0.94	2.89	2.3-3.9	0.98-0.99
200 mg q8h	2.52	0.917	0.25	2.17	2.1-3.5	0.97-0.99
300 mg q24h	5.98	0.917	0.28	1.69	1.9-4.0	0.98-0.99
300 mg q12h	3.02	0.917	0.12	1.80	3.4-4.2	0.97-0.99
300 mg q8h	2.89	0.917	0.27	2.89	3.0-4.1	0.97-0.99
2 mg/kg IC ^c	4.57	0.69	0.91	4.96	3.3-4.0	0.98-0.99
4 mg/kg IC ^c	3.04	1.27	0.46	1.13	2.9-4.6	0.98-0.99
Média ±SD	3.47 ± 1.18	0.93 ± 0.16	0.51 ± 0.33	2.55 ± 1.17	---	---

^aVer texto para definição dos parâmetros; ^bn = 3 para cada posologia investigada; ^cIC = infusão contínua.

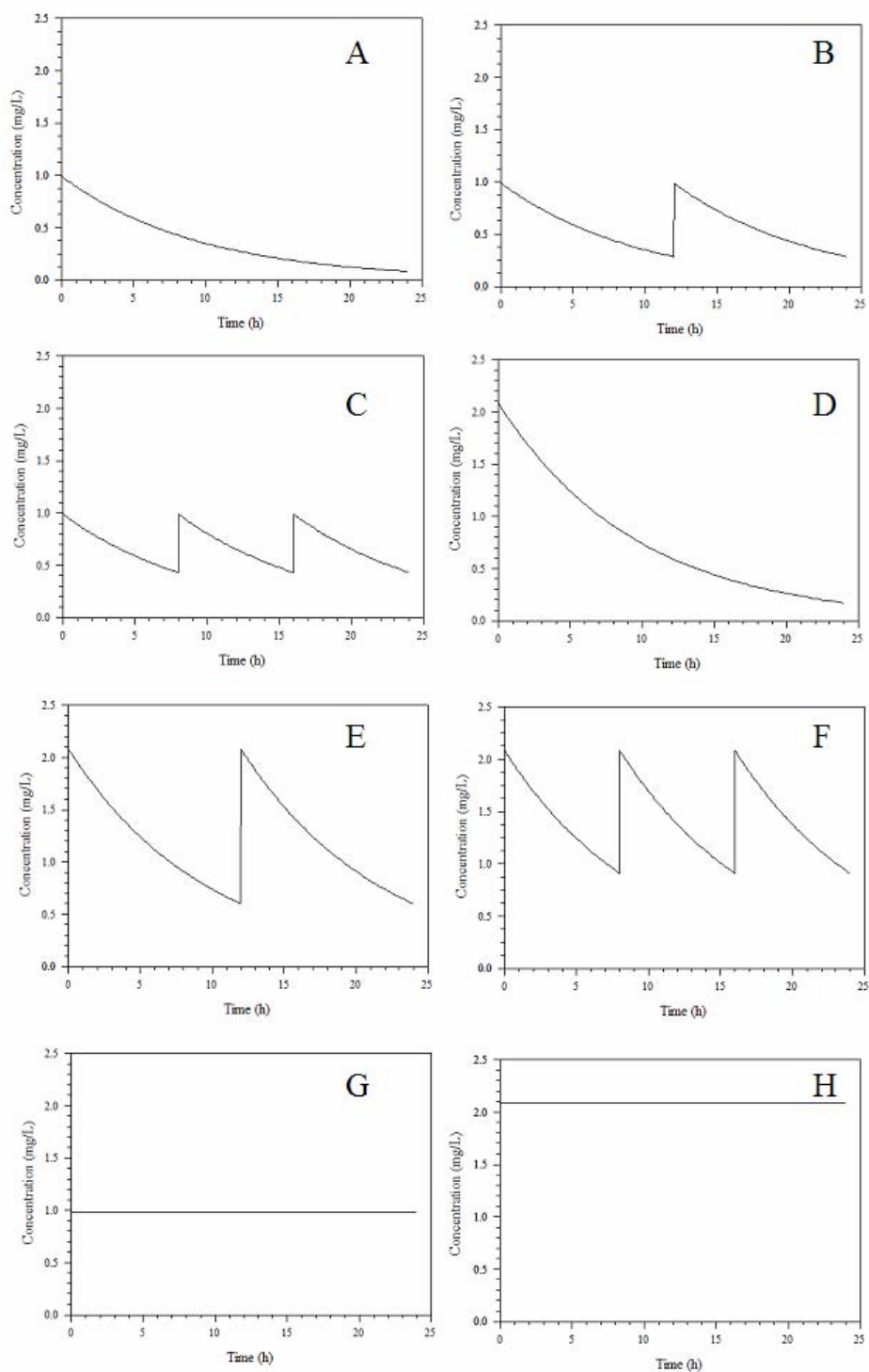


Figura 1. Perfis de concentração livre tecidual do VRC simulados nos experimentos de infecção *in vitro*. Doses de 200 mg (q24h – painel A; q12h – painel B; q8h – painel C), 300 mg (q24h – painel D; q12h – painel E; q8h – painel F), 2 mg/kg (infusão contínua - painel G) e 4 mg/kg (infusão contínua - painel H).

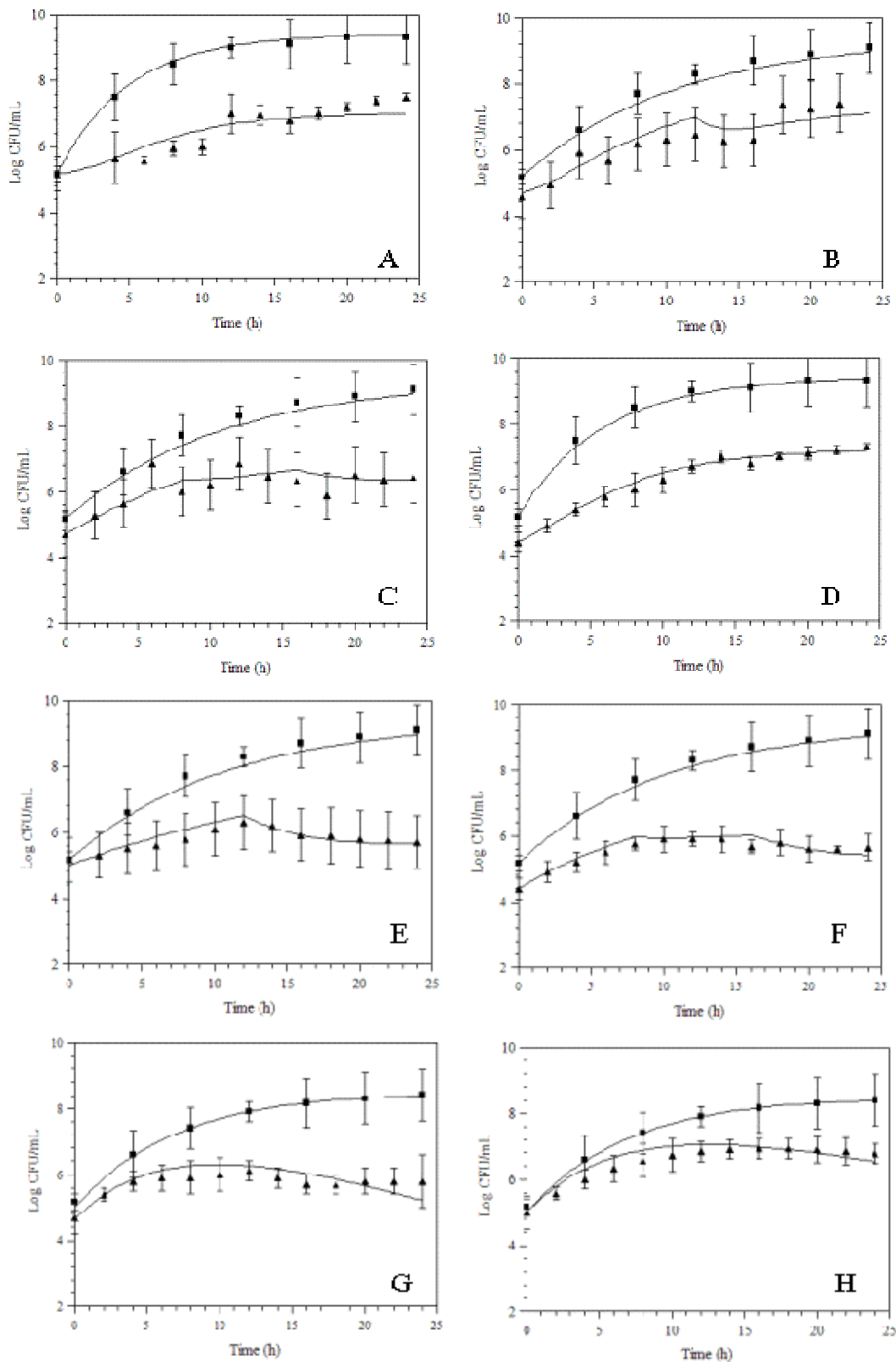


Figura 2. Perfil de inibição do crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 induzido por VRC após administração das doses de 200 mg (q24h – painel A; q12h – painel B; q8h – painel C), 300 mg (q24h – painel D; q12h – painel E; q8h – painel F), 2 mg/kg (infusão contínua - painel G) e 4 mg/kg (infusão contínua - painel H). Pontos representam a média \pm DP para experimentos controles (●) e tratados (▲), (n = 3/ ponto).

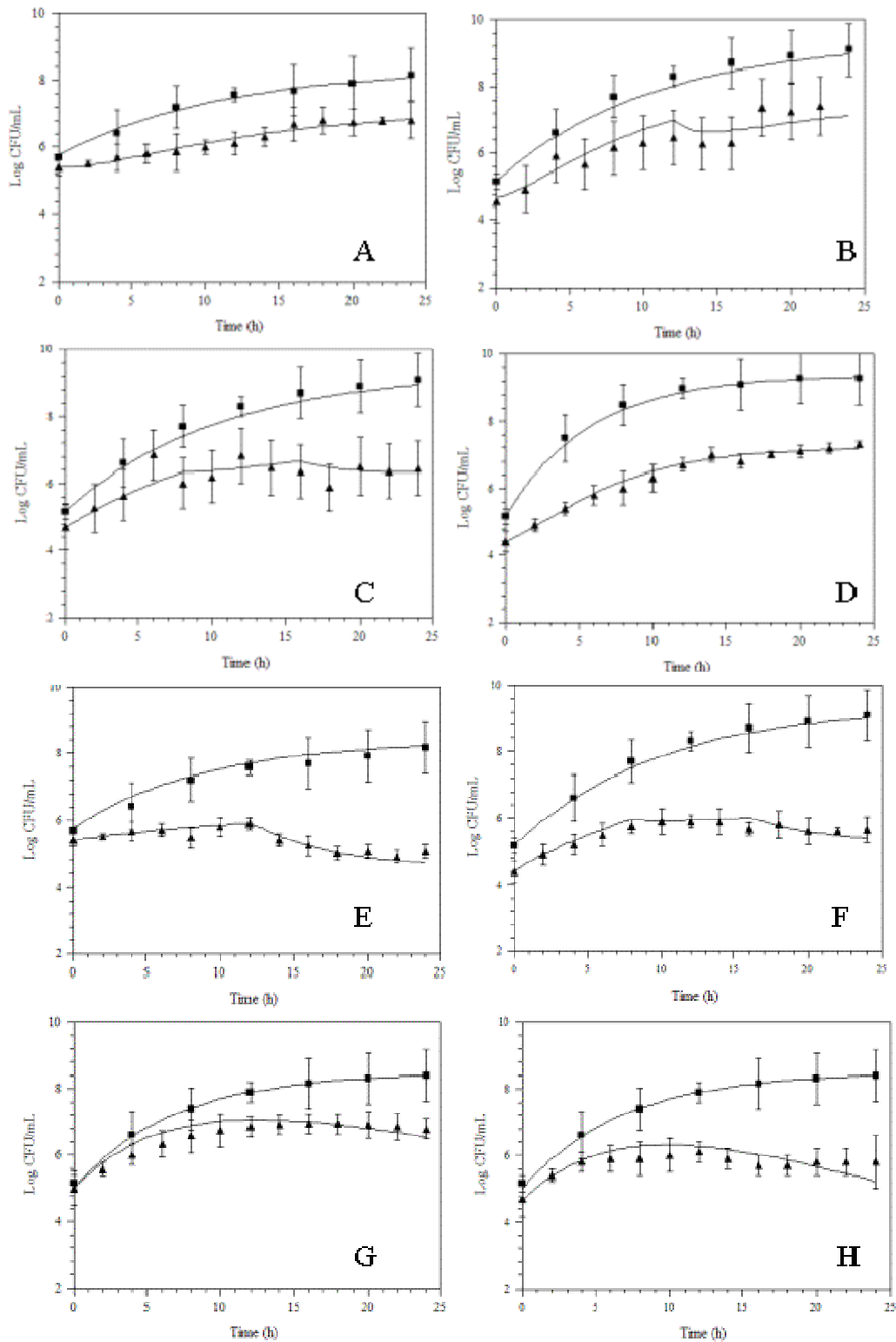


Figura 3. Perfil de inibição do crescimento de *C. krusei* ATCC 6258 induzido por VRC após administração das doses de 200 mg (q24h – painel A; q12h – painel B; q8h – painel C), 300 mg (q24h – painel D; q12h – painel E; q8h – painel F), 2 mg/kg (infusão contínua - painel G) e 4 mg/kg (infusão contínua - painel H). Pontos representam a média \pm DP para experimentos controles (\bullet) e tratados (\blacktriangle), (n = 3/ ponto).

Capítulo 9: Considerações Finais

A proposta de utilização da modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) para o aprimoramento da compreensão da dinâmica de interação microrganismos-antifúngicos, aplicada neste trabalho de tese para o voriconazol, é uma abordagem ainda inédita na literatura para essa classe terapêutica.

Diversos fatores contribuíram para a falta de interesse na compreensão e melhoramento de estratégias terapêuticas para o tratamento de micoses profundas. No entanto, o aumento da prevalência e a alta morbi-mortalidade observada nos paciente com infecção fúngica sistêmica nos últimos anos têm impulsionado pesquisadores e clínicos na busca de estratégias mais racionais para condução dos tratamentos farmacológicos, as quais tem sido grandemente influenciadas pelos conhecimentos gerados a partir dos estudos de interação entre bactérias e antimicrobianos, classe de fármacos para a qual o conhecimento científico está mais consolidado.

Um primeiro reflexo da falta de interesse na área de pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é a escassez de modelos animais de infecção fúngica validados, quando comparados aos modelos animais de infecção bacteriana, os quais constituem uma ferramenta importante para a pesquisa farmacológica de antimicrobianos. Por esta razão, a primeira fase desse trabalho foi dedicada ao estabelecimento e padronização de modelo de candidíase disseminada (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*) em ratos Wistar, o qual serviria para a avaliação das possíveis alterações de penetração do voriconazol em tecido renal infectado, em comparação com tecido renal sadio.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram uma diferença importante no nível de infecção causado pelas espécies *albicans* e *não-albicans*, em animais imunocompetentes, e o papel desempenhado pelo sistema imune no desfecho da infecção, o que já tinha sido relatado para as espécies animais convencionalmente utilizadas em modelos de infecção experimental *in vivo* (cobaios e camundongos).

Após a obtenção de um modelo de infecção experimental em ratos Wistar capaz de gerar alterações renais compatíveis com as infecções associadas a *Candida* sp. observadas em humanos, utilizou-se o modelo pra avaliar a penetração renal do voriconazol através da técnica de microdiálise.

Para executar os estudos de penetração tecidual do fármaco e avaliação de sua farmacocinética plasmática e tecidual, métodos analíticos foram validados para a quantificação do voriconazol em amostras de plasma e microdialisado de tecido renal. As amostras de microdialisado foram quantificadas com sucesso, com detecção por UV a 254 nm. Para as amostras de plasma foi necessária a utilização de uma nova metodologia com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS), a qual foi mais sensível e adequada para a quantificação do fármaco em matriz complexa.

Um segundo pré-requisito para poder-se avaliar a penetração renal do voriconazol após administração oral, era conhecer-se detalhadamente sua farmacocinética em ratos, uma vez que em humanos o fármaco mostrava saturação de eliminação em altas doses. A análise dos perfis plasmáticos do voriconazol após administração oral das doses de 40 e 60 mg/kg, indicou uma eliminação com cinética de Michaelis-Menten, caracterizada pela pouca flutuação dos níveis de concentração plasmática até aproximadamente 10 horas após a administração, e um aumento não proporcional de valor de ASC_{0-24} para as duas doses avaliadas. Como uma avaliação detalhada da não-linearidade do voriconazol em roedores não estava descrita na literatura, houve necessidade de realizá-la nesse projeto. Após a determinação dos valores médios de K_M e V_M para as doses iv, foi possível calcular a biodisponibilidade oral do VRC através do duplo fitting dos dados orais da dose de 40 mg/kg e da dose iv de 10 mg/kg, o que resultou em uma biodisponibilidade oral de 82,8%. A escassez de dados de literatura e a dificuldade de acesso a modelos matemáticos que descrevem cinéticas multicompartimentais não-lineares possibilitaram a utilização de metodologia alternativa para determinação de biodisponibilidade na condição de saturação de eliminação, ainda não descrita na literatura.

Finalmente, para a avaliação da penetração renal do voriconazol por microdiálise havia a necessidade de avaliar a taxa de recuperação das sondas em condições *in vitro* e *in vivo*. Nesse sentido foram conduzidos estudos para estabelecimento das condições de microdiálise, nos quais foram avaliadas as influências do fluxo e da concentração do fármaco nas taxas de recuperação, e investigados os fenômenos de ligação do fármaco às tubulações do sistema de microdiálise, o qual poderia ocorrer devido à moderada lipofilia do voriconazol.

Observou-se uma diferença nas taxas de recuperação relativa determinadas por perda e por ganho, indicando que efetivamente o fármaco apresentava ligação às tubulações.

Através da modelagem matemática desta ligação, foi possível determinar experimentalmente o valor do coeficiente de ligação do voriconazol às tubulações do sistema de microdiálise e utilizar esse coeficiente para corrigir a recuperação aparente obtidos in vivo, tornando possível à avaliação dos níveis de concentração livre renal do voriconazol após administração de doses orais a roedores.

Estudos de penetração tecidual de antifúngicos através de microdiálise são raros na literatura e ainda não envolvem o estabelecimento de correlação entre as concentrações livres teciduais e plasmáticas, como proposto no presente trabalho. Os resultados obtidos para o voriconazol em ratos saudáveis e infectados por *C. albicans* ou *C. krusei* mostraram que a penetração renal não se altera com a candidíase disseminada, sendo que os níveis plasmáticos livres do fármaco podem ser usados como substitutos dos níveis livres renais visando ajustes posológicos.

A capacidade preditiva dos níveis renais a partir dos níveis plasmáticos livres observada em ratos foi extrapolada para humanos, visando o estabelecimento de modelo PK/PD para o voriconazol. Para atingir esse objetivo maior, o curso temporal do efeito fungistático do voriconazol contra *C. albicans* e *C. krusei* foi avaliado através das curvas de morte fúngica obtidas in vitro após a simulação das concentrações livres esperadas para o fármaco após o uso de posologias tradicionalmente utilizadas na clínica (200 e 300 mg q8h, q12h, q24h e infusão contínua de 2 e 4 mg/kg). Os dados de cinética e dinâmica foram modelados utilizando-se modelo de $E_{máx}$ modificado. Os parâmetros do modelo PK/PD obtidos foram: CE_{50} de 2,97 $\mu\text{g/mL}$ e $k_{máx}$ de 0,203 h^{-1} para *C. albicans* e CE_{50} de 3,46 mg/mL e $k_{máx}$ de 0,531 h^{-1} para *C. krusei*. Os resultados mostraram diferença estatística apenas no valor de $k_{máx}$, indicando uma maior suscetibilidade da *C. krusei* frente ao voriconazol.

O modelo PK/PD de E_{max} -modificado empregado foi capaz de descrever adequadamente o perfil de inibição do crescimento de *Candida* sp em função do tempo, para todos os regimes terapêuticos avaliados. Esse modelo pode ser utilizado

para comparação de regimes posológicos do voriconazol visando o estabelecimento de terapias mais efetivas para o tratamento de candidíase sistêmica.

Biografia

Bibiana Verlindo de Araujo, nascida em 18 de julho de 1976, filha de Felisberto J.B. de Araujo e Maria das Graças Verlindo de Araujo. Ingressou na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1995, graduando-se em 1999. Durante este período desenvolveu atividades inicialmente ligadas a área de otimização de novas metodologias para o setor industrial, como bolsista de iniciação da PROPEsq. No ano seguinte atuou como monitora nas disciplinas de Química Geral e Inorgânica I e II do Instituto de Química da UFRGS e em projetos no Centro de Biotecnologia da mesma Universidade, na área de Purificação de Quitinases de *Metarhizium anisoplae*. Mais tarde iniciou seus trabalhos no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob orientação da Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, no projeto de iniciação científica intitulado “*Modelagem PK-PD da piperacilina em ratos infectados com E. coli*”, como bolsista do CNPq. Ao concluir a graduação, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, sob orientação da mesma professora, recebendo o grau acadêmico de Mestre em Ciências Farmacêuticas em maio de 2002. Pouco antes de concluir o curso de Mestrado, foi contratada como Professor de Farmacologia do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Regional Integrada, onde atua até o presente momento em diversos cursos de graduação. Em 2004 ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, com projeto de tese intitulado “*Modelagem PK/PD do antifúngico voriconazol*”. Recebeu o grau acadêmico de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela UFRGS em março de 2007.