

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VALÉRIA MATINATTI VALÉRIO MARTINS

**Impacto do transportador de efluxo P-gp na farmacocinética da anfotericina B
em pacientes em tratamento para neurocriptococose**

Ribeirão Preto

2024

VALÉRIA MATINATTI VALÉRIO MARTINS

**Impacto do transportador de efluxo P-gp na farmacocinética da anfotericina B
em pacientes em tratamento para neurocriptococose**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Bianchi
Ximenez

Ribeirão Preto

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Martins, Valéria Matinatti Valério

Impacto do transportador de efluxo P-gp na farmacocinética da anfotericina B em pacientes em tratamento para neurocriptococose. Ribeirão Preto, 2024.

34 p.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Ximenez, João Paulo Bianchi

1- transportadores; 2- farmacocinética; 3- farmacogenômica

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: Martins, Valéria Matinatti Valério

Título do trabalho: Impacto do transportador de efluxo P-gp na farmacocinética da anfotericina B em pacientes em tratamento para neurocriptococose.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Aprovado em:

Banca examinadora

Profº Drº: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profº Drº: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profº Drº: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, por todo o suporte e incentivo durante todos os anos da minha graduação, em especial à minha mãe, Telma, por sempre ter acreditado em mim e feito o possível e o impossível para me proporcionar uma vida digna. Obrigada por todo amor e apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. João Paulo Bianchi Ximenez por todo o conhecimento compartilhado e por sempre estar disposto a me ajudar nas adversidades enfrentadas, sempre com muita atenção e acolhimento. Também, à Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Lanchote por promover minha iniciação à ciência através do acolhimento em seu laboratório, desde 2021. Agradeço a todos os membros do Lab PK-Clin por sempre acolherem os novos alunos e estarem disponíveis para toda ajuda necessária.

À todos os meus amigos, de Taquaritinga, Ribeirão Preto e São Paulo, pelos diversos momentos compartilhados desde a infância até a graduação, por todo o suporte emocional, pelos momentos de descontração e pela parceria durante os anos.

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto, o qual foi utilizado como base para este Trabalho de Conclusão de Curso e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP) pela estrutura disponibilizada para sua realização.

RESUMO

A neurocriptococose é uma doença caracterizada por uma inflamação subaguda do cérebro e das meninges, causada pelo fungo *Cryptococcus* spp. Por ser uma doença oportunista, ocorre mais frequentemente em pacientes que têm o sistema imunológico comprometido, como aqueles com HIV ou outras formas de imunossupressão. O tratamento de escolha para essa condição é o uso da anfotericina B (AnfB). No entanto, a AnfB tem uma baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), o que resulta em baixas concentrações dela no líquido cefalorraquidiano (LCR) e, conseqüentemente, nos locais onde a infecção ocorre. A barreira hematoencefálica, assim como outras barreiras do corpo humano, possui proteínas transportadoras, como a glicoproteína P (P-gp) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), que funcionam como uma via importante de efluxo, ou seja, dificultam a entrada da AnfB no sistema nervoso central (SNC). Logo, inibir a P-gp e a BCRP pode aumentar a permeabilidade da AnfB na BHE e, conseqüentemente, sua concentração no LCR. O objetivo do presente relatório foi investigar como os polimorfismos genéticos no gene *ABCB1* podem influenciar a farmacocinética da AnfB em pacientes com neurocriptococose. O estudo envolveu 8 pacientes com neurocriptococose que foram tratados no HCFMRP-USP, recebendo 2 mg/kg/dia de AnfB. Foram coletadas amostras de plasma desses pacientes para a análise farmacocinética da AnfB, usando LC-MS/MS, e para a genotipagem dos polimorfismos *ABCB1*. As concentrações plasmáticas de AnfB nos pacientes do presente estudo variaram de uma concentração mínima de 70.53 ng/mL até a concentração máxima de 820.02 ng/mL. Os pacientes que não possuem nenhuma cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentaram concentrações plasmáticas com variação de 162.84 até 777.7 ng/mL. Já os pacientes com uma cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentaram concentrações plasmáticas com variações de 70.53 ng/mL até a concentração máxima de 820.02 ng/mL. Quanto ao impacto do haplótipo variante T/nonG/T sobre os parâmetros farmacocinéticos AUC_{0-t} e C_{max} , apesar dos valores de AUC_{0-t} serem 38% menores nos pacientes com 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T (GM: 3241.97 ng.h/mL) em comparação com os pacientes com nenhuma cópia do haplótipo variante (GM: 4470.30 ng.h/mL), a

diferença não apresentou significância estatística (p -valor = 0.27). Com relação a C_{max} , também não foi encontrada nenhuma diferença significativa estatisticamente (p -valor = 0.68) entre os pacientes carreadores de 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T comparado com os pacientes wild type, apesar dos pacientes portadores de um cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentarem concentrações máximas 14% menores comparados com os pacientes wild type (483.05 vs 548.72 ng/mL). Os pacientes com uma cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentaram constante de eliminação (K_{el}) 50% maior quando comparados com os pacientes wild type, mas sem diferença estatística detectada (p = 0.473). Os pacientes portadores do alelo variante apresentaram um CI 1.9 vezes maior quando comparados com os pacientes wild types (p = 0.229). Com os resultados parciais encontrados no presente estudo, é possível identificar uma tendência de redução nas concentrações plasmáticas de AnfB nos pacientes que possuem uma cópia do haplótipo variante T/nonG/T.

Palavras-chave: anfotericina B. neurocriptococose. *ABCB1*. farmacogenética. farmacocinética.

ABSTRACT

Neurocryptococcosis is a disease characterized by subacute inflammation of the brain and meninges, caused by the fungus *Cryptococcus* spp. As an opportunistic disease, it occurs more frequently in patients with compromised immune systems, such as those with HIV or other forms of immunosuppression. The treatment of choice for this condition is the use of amphotericin B (AnfB). However, AnfB has a low ability to cross the blood-brain barrier (BBB), which results in low concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) and, consequently, in the areas where the infection occurs. The blood-brain barrier, like other barriers in the human body, contains transport proteins such as P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP), which function as important efflux mechanisms, thus hindering AnfB from entering the central nervous system (CNS). Therefore, inhibiting P-gp and BCRP may increase the permeability of AnfB through the BBB and, consequently, its concentration in the CSF. The objective of this study was to investigate how genetic polymorphisms in the *ABCB1* genes could influence the pharmacokinetics of AnfB in patients with neurocryptococcosis. The study involved 8 patients with neurocryptococcosis who were treated at HCFMRP–USP, receiving 3 mg/kg/day of AnfB. Plasma samples were collected from these patients for pharmacokinetic analysis of AnfB using LC-MS/MS, as well as for genotyping of the *ABCB1* polymorphisms. Plasma concentrations of AnfB in the present study ranged from a minimum concentration of 70.53 ng/mL to a maximum concentration of 820.02 ng/mL. Patients with no copies of the T/nonG/T variant haplotype had plasma concentrations ranging from 162.84 to 777.7 ng/mL, while patients with one copy of the T/nonG/T variant haplotype had plasma concentrations ranging from 70.53 ng/mL to a maximum of 820.02 ng/mL. Regarding the impact of the T/nonG/T variant haplotype on the pharmacokinetic parameters AUC_{0-t} and C_{max}, although AUC_{0-t} values were 38% lower in patients with one copy of the T/nonG/T variant haplotype (GM: 3241.97 ng.h/mL) compared to patients with no copies of the variant haplotype (GM: 4470.30 ng.h/mL), the difference was not statistically significant (p-value = 0.27). As for C_{max}, no statistically significant difference was found (p-value = 0.68) between patients carrying one copy of the T/nonG/T variant haplotype compared to wild-type patients, although patients carrying one copy of the T/nonG/T variant

haplotype had 14% lower maximum concentrations compared to wild-type patients (483.05 vs 548.72 ng/mL). Patients with one copy of the T/nonG/T variant haplotype had a 50% higher elimination constant (K_{el}) compared to wild-type patients, but without a statistically significant difference ($p = 0.473$). Patients carrying the variant allele had a clearance (Cl) 1.9 times higher than wild-type patients ($p = 0.229$). Based on the partial results of this study, it is possible to identify a trend of reduced plasma concentrations of AnfB in patients carrying one copy of the T/nonG/T variant haplotype.

Keywords: amphotericin B, neurocryptococcosis, *ABCB1*, pharmacogenetics, pharmacokinetics.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. Material e Métodos.....	16
3.1. Estudo clínico.....	16
3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	16
3.1.2. Protocolo clínico.....	17
3.2. Métodos.....	17
3.2.1. Análise da anfotericina B em plasma.....	17
3.2.2. Análise farmacogenética.....	18
3.2.3. Análise farmacocinética.....	19
3.2.4. Análise estatística.....	19
4. Resultados.....	20
5. Discussão.....	26
6. Conclusão.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

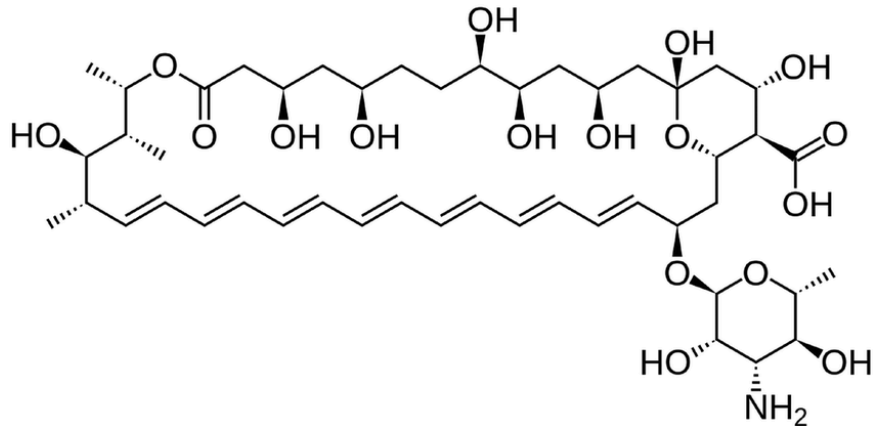
1. Introdução

A neurocriptococose é uma meningoencefalite subaguda que resulta da inalação do fungo *Cryptococcus* spp. Após um período de latência nos linfonodos pulmonares, esse fungo se dissemina pelo corpo, com uma afinidade particular pelo sistema nervoso central (SNC). O tropismo pelo SNC está relacionada a diversos fatores de virulência criptocócica, que facilitam sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Esses fatores incluem metaloproteases e ureases específicas, enzimas que modulam a resposta imunológica no sistema nervoso e mecanismos que promovem a sobrevivência em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A neurocriptococose é mais frequentemente observada em pacientes que têm o vírus HIV ou outras condições que enfraquecem o sistema imunológico, sendo menos comum em indivíduos considerados como tendo um sistema imunológico saudável. (JARVIS et al., 2010). As manifestações clínicas compreendem a ocorrência de febre, cefaléia, vômitos, ambliopia, sinais de meningismo e papiledema, além de presença de sintomatologia sugestiva de comprometimento encefálico, medular, radicular e de nervos cranianos. (SPINA-FRANÇA, 1968). Sem tratamento a doença pode progredir para sintomas como confusão, convulsões, estado de consciência reduzido e, por fim, coma e morte (WILLIAMSON et al., 2016).

A anfotericina B (AnfB) é um antifúngico da classe dos polienos, inibidores da estabilidade da membrana dos fungos. Tratam-se de macrolídeos naturais produzidos por bactérias Gram-positivas que possuem afinidade pelas membranas que contém esteróides. O mecanismo de ação proposto mais aceito é sua interação com moléculas de ergosterol da membrana celular do patógeno, alterando a permeabilidade da membrana e promovendo o desequilíbrio eletrolítico da célula fúngica. A perda de pequenas moléculas, principalmente potássio, causa a morte da célula fúngica. (BELLMANN; SMUSZKIEWICZ, 2017; GHANNOUM; RICE, 1999). O fármaco possui atividade fúngica de amplo espectro e seletiva (HAMILL, 2013).

Figura 1 - Estrutura molecular da Anfotericina B.



Fonte: ANTUNES, T. Dissecação de mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos em espécies de *Candida* não albicans.

Diferentes formulações de Anfotericina B estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Essas formulações incluem a Anfotericina B convencional (Anforicin B), o complexo lipídico de Anfotericina B (Abelcet) e a Anfotericina B lipossomal (Ambisome). Cada uma dessas formulações apresenta características farmacocinéticas distintas, o que pode influenciar tanto a eficácia quanto a segurança do medicamento em diferentes populações (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

O AmBisome, uma preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e Anfotericina B em razão molar de 2:1:0,8:0,4, demonstrou menor toxicidade em comparação com a Anfotericina B convencional, permitindo a administração de doses elevadas e tempos de tratamento mais prolongados, resultando em melhores resultados terapêuticos (SILVA et al., 2008).

A BHE constitui uma barreira química e estrutural entre o cérebro e a circulação sistêmica, que regula o movimento das substâncias entre o sangue e o cérebro (SAIDIJAM et al., 2017). Inclui, dentre outros, transportadores de efluxo da família ABC (ABBOTT et al., 2010). A glicoproteína P (P-gp) ou também denominada como proteína transportadora de cassete de ligação ao ATP da subfamília B membro

1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1 - *ABCB1*) é amplamente expressa na BHE, funcionando como uma via importante de efluxo de uma variedade de substâncias para a circulação sistêmica (CORDON-CARDO et al., 1989) e tem a AnfB como substrato (LEE et al., 2014). Ademais, há também a BCRP (proteína de resistência ao câncer de mama) ou *ABCG2* (proteína transportadora de cassete de ligação ao ATP da subfamília G membro 2), que também exerce atividade transportadora de efluxo auxiliando a P-gp na BHE (LALLOO et al., 2004).

O gene *ABCB1* é expressado em tecidos normais, tais como cérebro, fígado, pâncreas e placenta (BANIHANI et al., 2020). É altamente polimórfico, exibindo mais de 50 SNPs (single nucleotide polymorphisms). Três SNPs exônicos, que estão em forte desequilíbrio de ligação (LD), foram mais extensivamente estudados do ponto de vista farmacogenético: dois deles (1236C>T e 3435C>T) são silenciosos, enquanto o terceiro, 2677G>T/A no exon 21, leva a alterações de aminoácidos (Ala893Ser/Thr) (ESTRELA et al., 2008). Estudos demonstram que a frequência do alelo variante 3435T pode ultrapassar 50% em populações europeias (Lee et al., 2024). No Brasil, entretanto, a frequência do alelo variante varia entre 37% e 45%, dependendo da região geográfica e da composição populacional. Outro SNP relevante é o 2677G>T/A, cujas frequências alélicas variam consideravelmente entre grupos étnicos. Em populações africanas, o alelo 2677G é predominante, enquanto em europeus e asiáticos, os alelos variantes 2677T e 2677A apresentam frequências significativas (Salamanca et al., 2015).

O gene *ABCG2* também é altamente polimórfico, as duas variantes mais comuns e amplamente estudadas são rs2231137 (c.34G>A) que resulta em uma substituição p.Val12Met, e rs2231142 (c.421C>A) causa uma substituição p.Gln141Lys e na diminuição da expressão de BCRP devido ao aumento da degradação da proteína variante no retículo endoplasmático (KOBAYASHI et al., 2005; MAO; UNADKAT, 2015). A variante c.421C>A afeta a farmacocinética, a resposta e a toxicidade de compostos que são substratos de BCRP, incluindo quimioterápicos e compostos endógenos (RABINDRAN et al., 2000; LOW et al., 2016).

A BHE também expressa proteínas transportadoras de influxo como o OATP1A2. Os polipeptídios transportador de ânions orgânicos (organic anion transporting polypeptides - OATPs) são expressos pelos genes da superfamília SLCO, especificamente o transportador OATP1A2 é expresso em vários tecidos, incluindo BHE, fígado, rins e intestino. Substratos endógenos do OATP1A2 incluem ácidos biliares, hormônios tireoideanos e hormônios esteróides e seus conjugados. Além disso, o OATP1A2 também transporta vários medicamentos como fexofenadina, imatinibe, levofloxacina e metotrexato (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009). Recentemente, seis SNPs nas regiões exônicas do gene *SLCO1A2* foram identificados em diferentes populações étnicas e as proteínas variantes foram caracterizadas funcionalmente in vitro. As variantes funcionais encontradas neste estudo consistem em três SNPs (404A>T, 516A>C e 559G>A) que levam a uma diminuição da absorção de substratos (LEE et al., 2005). No exon 5, a variante 516A>C causa uma mudança de ácido glutâmico para ácido aspártico, que também reduz a captação dos substratos. A variante 516A>C está associada a concentrações diminuídas de Celiprolol em indivíduos saudáveis em comparação com o alelo T e sua frequência alélica é 5,3% em pacientes de origem europeia e 2,1% de origem africana ou hispânica (HIRVENSALO et al., 2022).

Estudos recentes sugerem que a inflamação é responsável por alterar a expressão de transportadores de membrana, alterando os parâmetros farmacocinéticos, ou seja, a resposta inflamatória pode ser considerada um importante fator na variabilidade interindividual da eficácia e toxicidade de medicamentos. É sugerido que as concentrações de AnfB no LCR sejam maiores durante o período inflamatório, quando comparadas àquelas observadas ao final do tratamento, sendo necessários ajustes de dose para pacientes no período de resposta inflamatória grave (HOSEY; CHAN; BENET, 2016; SHUGARTS; BENET, 2009). Outras variáveis, como citocinas e imunossupressores, também poderiam influenciar na permeabilidade da BHE.

As formas comercialmente disponíveis de AnfB têm toxicidades que impedem o uso seguro em altas doses e, conseqüentemente, a realização de todo o potencial clínico da AnfB. Além disso, a taxa de mortalidade significativa (~20%) nesses

pacientes com neurocriptococose tratados com AnfB indica a necessidade de melhores terapias. Uma vez que a AnfB é classificada como um composto de Classe 4 segundo o Sistema de Classificação de Disposição de Medicamentos Biofarmacêuticos (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) e que as moléculas de efluxo do SNC e de excreção biliar têm um papel significativo na farmacocinética desse medicamento, polimorfismos genéticos nas proteínas transportadores presentes na BHE podem provocar alterações nas concentrações de AnfB no plasma e no LCR com conseqüente ineficácia do tratamento (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009).

Os resultados obtidos nesta pesquisa têm o potencial de fornecer esclarecimentos sobre o papel desempenhado pelos transportadores da barreira hematoencefálica (BHE) na farmacocinética da AnfB. Além disso, esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de novos regimes terapêuticos envolvendo a administração da AnfB em pacientes que estão sendo tratados para a neurocriptococose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto que polimorfismos genéticos no transportador *ABCB1*, presente na barreira hematoencefálica, exercem sobre a farmacocinética da anfotericina B em pacientes em tratamento de neurocriptococose.

2.2. Objetivos Específicos

A. Quantificar AnfB em plasma de pacientes em tratamento de neurocriptococose como concentração total utilizando LC-MS/MS;

B. Determinar os genótipos para o transportador *ABCB1* (c.1236 T>C, c.2677T>G/A, c.3435T>C) em pacientes em tratamento de neurocriptococose com AnfB;

C. Estabelecer a disposição cinética da AnfB no plasma e avaliar o impacto dos polimorfismos genéticos no transportador *ABCB1* nos pacientes em tratamento de neurocriptococose.

3. Material e Métodos

3.1. Estudo clínico

Os participantes estavam cientes de todas as etapas do estudo, tendo recebido explicação detalhada dos procedimentos e sendo incluídos no estudo apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, foi garantida a liberdade dos pacientes de recusar sua participação ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao seu tratamento. Houve a aprovação do protocolo do estudo nos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP–USP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP–USP).

3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram recrutados 8 pacientes em tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMRP–USP) em quadro de neurocriptococose com indicação de tratamento com AnfB (formulação de complexo lipídico) associada com fluconazol, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos. Foram considerados elegíveis para o estudo os pacientes com resultado positivo para exame microscópico direto do LCR para fungos com nanquim (tinta da China) ou resultado positivo para antígeno criptocócico no LCR. A inclusão dos pacientes foi posteriormente confirmada pelo crescimento de *Cryptococcus* spp. em meio de cultura inoculado com amostra de LCR.

Os pacientes que apresentaram alguma das condições clínicas a seguir foram excluídos da investigação: valores de creatinina sérica basal superiores a 300 $\mu\text{mol/L}$; contagem de neutrófilos inferior a 500×10^6 células/L; contagem de plaquetas inferior a 50.000×10^6 células/L; níveis de aminotransferases superiores a cinco vezes o limite superior dos valores de referência (superior a 200 UI/L); gravidez ou lactação; histórico de reação adversa grave ao uso de AnfB (FALCI et al., 2010).

3.1.2. Protocolo clínico

Os pacientes com neurocriptococose em tratamento com dose de manutenção de AnfB administrada por infusão intravenosa permaneceram internados no HCFMRP-USP para a avaliação farmacocinética. As amostras seriadas de sangue (volumes aproximados de 2 mL) foram colhidas por punção venosa com escalpe em tubos contendo EDTA no intervalo de dose de 24 horas nos tempos zero, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 18, 22, 23 e 24 horas. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 min a 4 °C e as alíquotas de plasma separadas e armazenadas a -80 °C até análise.

3.2. Métodos

3.2.1. Análise da anfotericina B em plasma

Tais análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) com base no método analítico já publicado pelo laboratório (PIPPA et al., 2021). Inicialmente, 25 µL de solução de padrão interno (PI) em metanol, contendo 100 ng/mL de piroxicam, foram adicionados às alíquotas de 25 µL de plasma, seguidos por 25 µL de metanol. Em seguida, precipitamos as amostras adicionando 100 µL de uma solução de ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila. Agitamos os tubos por 5 segundos e depois os centrifugamos a 4°C por 15 minutos a 21.500×g. Posteriormente, transferimos 100 µL do sobrenadante resultante para os frascos de injeção e misturamos com 100 µL de ácido fórmico a 0,1% em água. Dessa mistura final, utilizamos apenas 20 µL para a análise cromatográfica. Este procedimento foi realizado com sucesso para a análise das amostras e curvas de calibração.

A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa LiChrospher® 60 RP-Select B partículas de 5 µm, 125 × 4,6 mm com fase móvel constituída de um sistema solvente isocrático de 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila na proporção de 40:60 (v/v) para análise de plasma, todos a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A AnfB foi quantificada por espectrometria de massas Xevo LC triplo-quadrupolo (LC-MS/MS) (Waters, Milford, EUA) no modo de ionização por eletrospray de íons positivos. Os íons protonados

[M + H]⁺ e seus respectivos íons de produto foram monitorados nas transições de m/z 906 → 743 para AnfB para todas as matrizes e m/z 332 → 95 para PI em análises de plasma. A aquisição de dados e a quantificação da amostra foram realizadas usando MassLynx® versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.2. Análise farmacogenética

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total periférico coletadas com EDTA, empregando o QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hombrechtikon, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, United States) para validação da extração. O ensaio de discriminação alélica (TaqMan® Real-Time PCR Assays, Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) para a identificação do polimorfismo (single nucleotide polymorphism - SNP) do gene *ABCB1* foi realizado utilizando o termociclador Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), mensurando a fluorescência final emitida da clivagem na sonda específica para o alelo (Endpoint Genotyping Analysis). Os SNPs selecionados no gene *ABCB1* foram: rs1128503 localizado no exon 13 (c.1236 T>C, p. Gly412Gly), rs2032582 no exon 22 (c.2677T>G/A, p. Ser893Thr/Ala) e rs1045642 no exon 26 (c.3435T>C, p. Ile1145Ile).

Como os três SNPs no gene *ABCB1* têm alta proximidade no genoma - 1236T>C (rs1128503), 2677T>G/A (rs2032582) e 3435T>C (rs1045642) - estão em alto desequilíbrio de ligação, esses três SNPs foram analisados como diplotipos. Como 1236C-2677G-3435C (C/G/C) é considerado o tipo selvagem (wild type), os pacientes do presente estudo foram divididos em dois subgrupos diplotípicos baseado no número de cópias dos alelos variantes 1236T-2677nonG-3435T (T/nonG/T): pacientes com zero cópias do alelo variante T/nonG/T e pacientes carreadores de uma cópia do alelo variante T/nonG/T. Os haplótipos foram estimados a partir dos dados do genótipo usando o pacote de software haplo.stats (versão 1.9.3).

3.2.3. Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos da anfotericina B foram calculados empregando o programa Phoenix WinNonlin™, versão 8.3.3.33 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ, EUA) para análise não compartimental. A área sob a curva de concentração plasmática vs tempo (AUC_{0-t}) foi calculada até 24 horas após a administração do fármaco utilizando o método dos trapezóides, após a normalização da dose pelo peso de cada paciente, resultando também na normalização da AUC.

Também foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: concentração plasmática máxima observado no intervalo de dose ($C_{máx}$), constante de eliminação (kel), clearance ($CL = dose / AUC_{0-t}$) e meia-vida de eliminação ($t_{1/2} = 0,693 / kel$), tempo necessário para a concentração plasmática do fármaco cair pela metade.

3.2.4. Análise estatística

Para avaliar o impacto do alelo variante T/nonG/T do *ABCB1* sobre os parâmetros farmacocinéticos da AnfB, foi desenvolvido um modelo de regressão linear simples considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Foram consideradas como variáveis dependentes os parâmetros farmacocinéticos da AnfB com transformação em log. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados pelo teste χ^2 de qualidade de ajuste usando o pacote HardyWeinberg (versão 1.7.3). As análises estatísticas foram realizadas com a plataforma RStudio (versão 2021.9.0.351).

4. Resultados

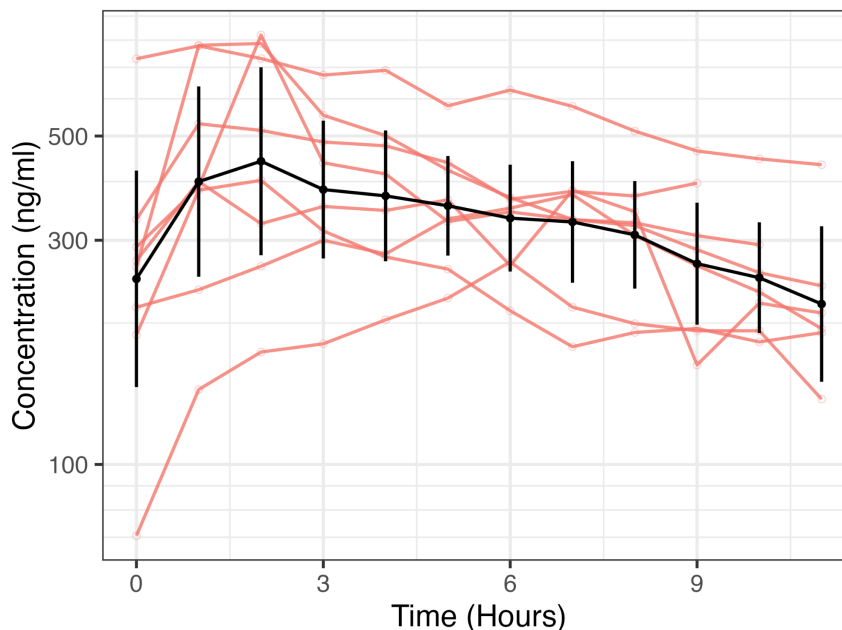
A tabela 1 reporta os resultados dos parâmetros farmacocinéticos concentração máxima (C_{max}), área sob a curva da concentração plasmática vs tempo (AUC_{0-t}), volume de distribuição (Vd), constante de eliminação (Kel) e clearance (Cl) de 8 pacientes em tratamento para neurocriptococose com AnfB com dose de 2 mg/kg/dia. As concentrações plasmáticas de AnfB nos pacientes do presente estudo variaram de uma concentração mínima de 70.53 ng/mL até a concentração máxima de 820.02 ng/mL, estabelecendo uma flutuação de 10.63 (Figura 1). A variação da AUC_{0-t} foi de 5977.43 até 10848.20 ng.h/mL e a concentração máxima apresentou uma variação de 358.08 ng/mL até 717.03 ng/mL. O volume de distribuição apresentou variação de 205.80 a 424.26 mL. A variação de Kel oscilou de 0.02 até 0.10 h⁻¹ e do clearance de 8.25 até 23.69 L/h. Por fim, os valores de $t_{1/2}$ dos pacientes apresentaram uma mediana de 16.95 h e coeficiente de variação de 76.76.

Tabela 1 - Valores dos parâmetros farmacocinéticos da AnfB em pacientes em tratamento para neurocriptococose com AnfB.

Parâmetro	GM (IC 95%)
C_{max} (ng/mL)	506.70 (358.08 - 717.03)
AUC_{0-t} (ng.h/mL)	8052.60 (5977.43 - 10848.20)
Vd (L)	295.49 (205.80 - 424.26)
Kel (1/h)	0.05 (0.02 - 0.10)
CL (L/h)	13.98 (8.25 - 23.69)

Fonte: Autoria própria. Legenda: GM: Média geométrica; IC 95%: Intervalo de confiança 95%.

Figura 1 - Concentrações plasmáticas médias de AnfB.



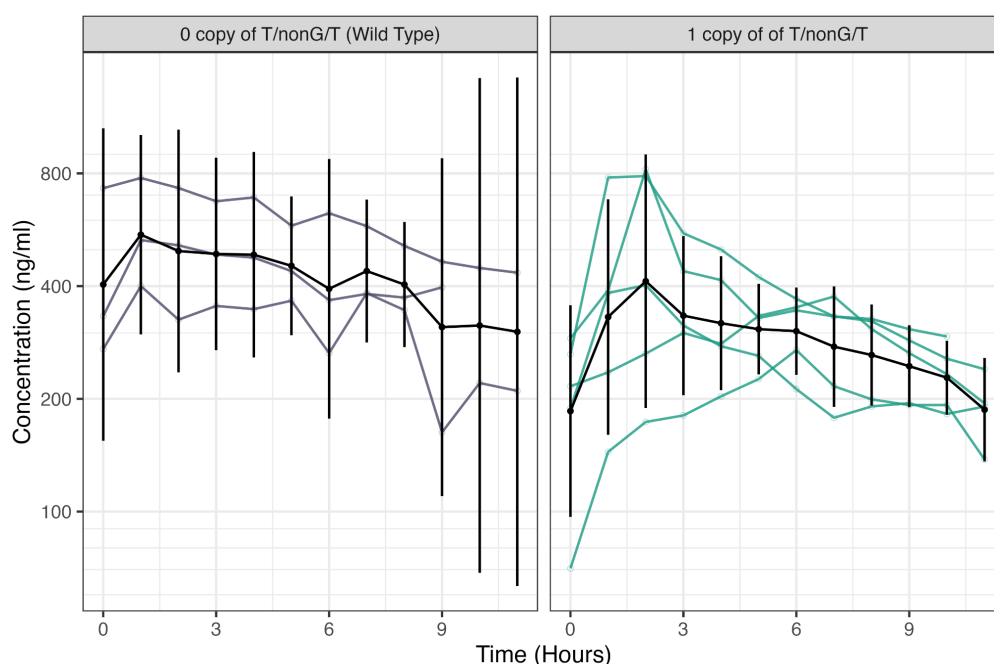
Fonte: Autoria própria. Legenda: IC 95% (linha preta) e individuais (linhas vermelhas) em pacientes em tratamento para neurocriptococose (n = 8) após receberem infusão de 2 mg/kg/dia de AnfB.

Os haplótipos e diplótipos do gene *ABCB1* foram calculados com base nos genótipos dos três SNPs no gene *ABCB1*: - 1236T>C (rs1128503), 2677T>G/A (rs2032582) e 3435T>C (rs1045642), que apresentam alta proximidade no genoma e estão em alto desequilíbrio de ligação. A inferência estatística dos haplótipos e diplótipos do gene *ABCB1* foi realizada utilizando o pacote *haplo.stats*, versão 1.9.3, em ambiente R. O programa atribui um valor de probabilidade posterior para a configuração do diplótipo para cada indivíduo, com base nas frequências estimadas de haplótipos. Os diplótipos foram inferidos com probabilidades superiores a 0,95 para todos os pacientes do presente estudo. Para maior poder estatístico, os pacientes do estudo foram divididos em dois grupos com base no número de cópias do haplótipo variante T/nonG/T. Portanto, três pacientes foram classificados com zero cópia do haplótipo variante T/nonG/T, e cinco pacientes apresentaram 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T.

Os pacientes que não possuem nenhuma cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentaram concentrações plasmáticas com variação de 162.84 até

777.7 ng/mL e uma flutuação de 3.8 (Figura 2a). Já os pacientes com uma cópia do haplótipo variante T/nonG/T apresentaram concentrações plasmáticas com variações de 70.53 ng/mL até a concentração máxima de 820.02 ng/mL, totalizando uma flutuação de 10.63 (Figura 2b).

Figura 2 - Concentrações plasmáticas médias de AnfB com base no número de cópia do haplótipo variante T/nonG/T.

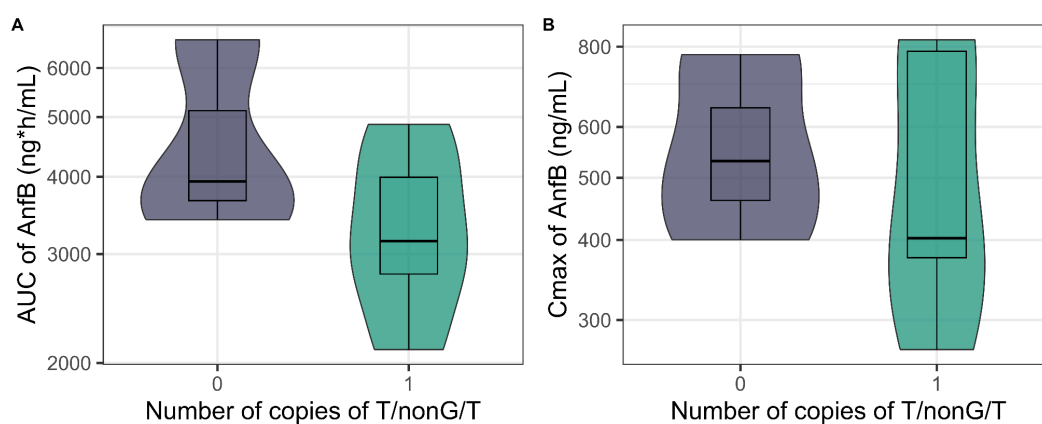


Fonte: Autoria própria. Legenda: IC 95% (linha preta) e individuais em pacientes com 0 cópias do haplótipo variante T/nonG/T (linhas roxas, painel A, n = 3) e em pacientes com 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T (linhas verdes, painel B, n = 5) em tratamento para neurocriptococose após receberem infusão de 2 mg/kg/dia de AnfB.

Quanto ao impacto do haplótipo variante T/nonG/T sobre os parâmetros farmacocinéticos (tabela 2), os indivíduos com a variação mutante apresentaram menores AUC_{0-t} (figura 3a) e C_{max} (figura 3b). O volume de distribuição manteve-se na mesma faixa de valores (figura 4a). Foi observada uma maior constante de eliminação (K_{el}) e um maior clearance (CL), porém os parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Os pacientes carreadores do alelo variante T/nonG/T apresentaram uma constante de eliminação (K_{el}) 50% maior quando

comparados com os pacientes wild type, mas sem diferença estatística detectada ($p = 0.473$). Como representado na figura 4b, os pacientes portadores do alelo variante apresentaram um CI 1.9 vezes maior quando comparados com os pacientes wild types ($p = 0.229$).

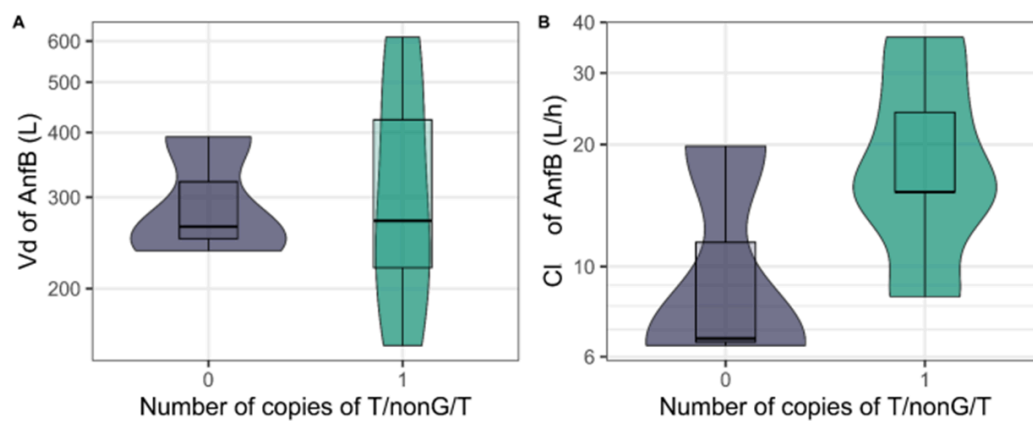
Figura 3 - Valores de AUC_{0-t} e C_{max} de AnfB.



Fonte: Autoria própria. Legenda: O painel A representa os valores de AUC_{0-t} e painel B os valores de C_{max} de AnfB em pacientes em tratamento para neurocriptococose estratificados pelo genótipo do *ABCB1*.

Os valores de meia-vida ($t_{1/2}$) dos pacientes com haplótipo T/nonG/T apresentaram uma mediana de 7.82 h e coeficiente de variação de 91.44. Já para os indivíduos que não apresentaram o haplótipo, os valores de $t_{1/2}$ apresentaram uma mediana de 24.640 h e coeficiente de variação de 91.44 ($p = 0.473$).

Figura 4 - Valores de Vd e Cl de AnfB.



Fonte: Autoria própria. Legenda: O painel A representa os valores de Vd e painel B os valores de CL de AnfB em pacientes em tratamento para neurocriptococose estratificados pelo genótipo do *ABCB1*.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos da AnfB estratificados baseado nos haplótipos do gene *ABCB1* representados por GM (IC 95%).

<i>ABCB1</i> (cópias T/nonG/T)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng.h/mL)	V_d (L)	K_{el} (1/h)	CL (L/h)
0 (n = 3)	548.72 (239.64 - 1256.44)	10065.02 (4365.30 - 23206.78)	290.14 (149.56 - 562.86)	0.03 (0.00 - 0.22)	9.44 (1.92 - 46.57)
1 (n = 5)	483.05 (263.40 - 885.91)	7043.83 (4700.68 - 10554.98)	298.75 (152.79 - 584.13)	0.06 (0.02 - 0.03)	17.69 (8.90 - 35.14)

Fonte: Autoria própria. Legenda: GM: média geométrica; CI 95%: intervalo de confiança 95%.

5. Discussão

Este estudo investigou a influência dos polimorfismos genéticos nos transportadores da barreira hematoencefálica, com ênfase no gene *ABCB1*, sobre os parâmetros farmacocinéticos da anfotericina B (AnfB) em pacientes com neurocriptococose. Foram analisados parâmetros como C_{max} , AUC_{0-t} , V_d , e Cl . O estudo incluiu pacientes com 0 e 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T do gene *ABCB1*. O principal objetivo foi compreender o impacto dessa variante sobre a disposição farmacocinética da AnfB, que é amplamente utilizada no tratamento de infecções fúngicas graves, mas que apresenta desafios em termos de penetração no sistema nervoso central (SNC) devido à barreira hematoencefálica.

A anfotericina B em sua formulação de complexo lipídico (ABLC) é composta por dimiristoil fosfatidilcolina e dimiristoil fosfatidilglicerol em uma proporção molar de 1:1 de lipídio para anfotericina B, formando estruturas em formato de fita. Após administração intravenosa, o ABLC é rapidamente captado por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente no fígado, baço e pulmões, resultando em um volume de distribuição maior (V_d) em comparação com a anfotericina B desoxicolato (DAMB) convencional, mas com menor concentração plasmática máxima e valores menores da área sob a curva concentração-tempo no sangue. Com base em uma série de ensaios clínicos abertos e não comparativos, o ABLC foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes adultos e pediátricos que são intolerantes ou refratários à terapia com DAMB. Além disso, um ensaio clínico prospectivo e randomizado em 231 pacientes com ≥ 16 anos de idade com infecções invasivas por *Candida* demonstrou que uma dosagem de 5 mg/kg de ABLC foi menos nefrotóxica e tão eficaz quanto DAMB em uma dosagem de 0,6 a 1,0 mg/kg (Würthwein et al., 2005).

A farmacocinética clínica do complexo lipídico de anfotericina B foi previamente relatada em voluntários saudáveis (Kan et al., 1991) e em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas (Adedoyin et al., 2000). Os parâmetros farmacocinéticos da anfotericina B, como o clearance total e o volume de distribuição no estado de equilíbrio, são dose-dependentes, considerando que o

fármaco se acumula nos tecidos. Kan et al. (1991) observaram valores de clearance em voluntários saudáveis variando de 0.07 a 0.09 L/h/kg, valores próximos aos encontrados no presente estudo, que variaram de 8.25 a 23.69 mL/h (equivalente a 0.00825 a 0.02369 L/h). No estudo de Adedoyin et al. (2000), a administração de 5 mg/kg/dia de complexo lipídico de anfotericina B resultou em valores de clearance mais altos (17.8 ± 5.2 L/h), comparados aos observados no presente estudo, em que os pacientes receberam infusões diárias de 2 mg/kg (13.98 mL/h). Esses valores, quando normalizados pela dose, são equivalentes, confirmando a similaridade no comportamento farmacocinético da anfotericina B entre os estudos. O complexo lipídico de anfotericina B é altamente distribuído nos tecidos. Os volumes de distribuição no estado de equilíbrio também foram avaliados por Kan et al. (1.7–3.9 L/kg) e Adedoyin et al. (865 ± 347 L), sendo que o volume de distribuição observado no presente estudo, de 295.49 L, está dentro da faixa relatada quando normalizado pela dose. A anfotericina B é classificada como um composto de Classe 2 segundo o Sistema de Classificação de Disposição de Medicamentos Biofarmacêuticos (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System), o que significa que sua absorção e disposição dependem significativamente de mecanismos de transporte. Como as moléculas de efluxo do SNC e de excreção biliar desempenham um papel importante na farmacocinética desse fármaco, polimorfismos genéticos nos transportadores presentes na barreira hematoencefálica podem alterar as concentrações de AnfB no plasma e no LCR, comprometendo assim a eficácia do tratamento.

A BHE constitui uma barreira química e estrutural que regula o movimento de substâncias entre o sangue e o cérebro (SaidiJam et al., 2017), e inclui, entre outros, transportadores de efluxo da família ABC (Abbott et al., 2010). A glicoproteína P (P-gp), também denominada proteína transportadora de cassete de ligação ao ATP da subfamília B membro 1 (*ABCB1*), é amplamente expressa na BHE e atua como uma via crucial de efluxo de várias substâncias de volta para a circulação sistêmica (Cordon-Cardo et al., 1989). O gene *ABCB1* é expresso em diversos tecidos normais, como cérebro, fígado, pâncreas e placenta (Banihani et al., 2020), e apresenta um elevado polimorfismo, com mais de 50 variantes conhecidas. Entre os SNPs exônicos mais estudados do ponto de vista farmacogenético estão o 1236C>T

e 3435C>T, que são silenciosos, e o 2677G>T/A no exon 21, que resulta em alterações nos aminoácidos (Ala893Ser/Thr) (Estrela et al., 2008). Esses polimorfismos podem influenciar a função da P-gp e, conseqüentemente, a farmacocinética da AnfB, alterando sua capacidade de atravessar a BHE e afetando as concentrações no SNC.

Fukushi et al. (2022) evidenciam a importância do estudo ao relatar os efeitos dos polimorfismos do gene transportador *ABCB1* nas proporções de LCR para plasma de ponatinib em pacientes com leucemia linfoblástica aguda positiva para o cromossomo Filadélfia. Em pacientes homocigotos para polimorfismos *ABCB1* que estão associados com menor atividade da glicoproteína P, as proporções de LCR para plasma de ponatinib 4 horas após a administração foram significativamente maiores do que aquelas observadas no grupo de pacientes com outros genótipos *ABCB1*.

Comparando os pacientes com 0 e 1 cópia do haplótipo variante T/nonG/T do *ABCB1*, observamos que os pacientes com 1 cópia apresentaram valores de C_{max} 14% menores, além de uma AUC_{0-t} 38% menor. Apesar dessas diferenças, nenhuma delas foi estatisticamente significativa, o que pode ser explicado pelo pequeno tamanho amostral. No entanto, observou-se uma tendência de aumento do clearance nos pacientes com 1 cópia da variante, sendo 1.9 vezes maior em relação aos pacientes com 0 cópias, o que sugere que a variante pode estar associada a uma maior eliminação da AnfB. Nossos resultados indicam que o polimorfismo T/nonG/T no gene *ABCB1* pode estar relacionado a uma variação na disposição farmacocinética da AnfB, embora os dados não sejam conclusivos. A tendência observada de menor exposição sistêmica (AUC_{0-t}) nos pacientes com a variante sugere que o polimorfismo pode ter um impacto modesto na eficácia do tratamento com AnfB, especialmente em condições em que a penetração no SNC é crucial.

Com base nos resultados do presente estudo, observamos uma tendência de redução nas concentrações plasmáticas de AnfB em pacientes que possuem uma cópia do haplótipo variante T/nonG/T. Embora o foco deste estudo tenha sido a anfotericina B, nossos achados refletem um comportamento semelhante ao observado por Kim et al. (2021), que investigaram os polimorfismos do gene *ABCB1*

em um grupo de 37 indivíduos americanos de ascendência europeia e 23 afro-americanos saudáveis, utilizando a fexofenadina como substrato. No estudo de Kim et al., foi demonstrado que a AUC da fexofenadina foi significativamente menor nos participantes com alelos variantes em comparação com o grupo wild type. Embora os dois estudos envolvam fármacos diferentes, a similaridade na redução da AUC observada tanto com a fexofenadina quanto com a AnfB sugere que os polimorfismos no gene *ABCB1* podem impactar de forma geral a farmacocinética de diferentes substratos, incluindo a anfotericina B.

Esses resultados complementam os nossos achados, fortalecendo a evidência de que os polimorfismos genéticos no transportador *ABCB1* presente na barreira hematoencefálica podem influenciar a farmacocinética da anfotericina B no plasma e no líquido cefalorraquidiano de pacientes em tratamento de neurocriptococose. No entanto, apesar de relevante, devido a alta frequência do alelo variante, é importante ressaltar que o presente estudo apresenta algumas limitações, sendo a principal delas o reduzido número de participantes recrutados até o momento. Para fortalecer os resultados e aumentar a robustez do estudo, é essencial recrutar mais pacientes, permitindo uma análise mais abrangente do impacto dos polimorfismos genéticos nos transportadores sobre a farmacocinética da AnfB.

6. Conclusão

Este estudo explorou o impacto dos polimorfismos do gene *ABCB1* sobre os parâmetros farmacocinéticos da anfotericina B em pacientes com neurocriptococose. Embora as diferenças observadas entre os grupos com 0 e 1 cópia do haplótipo T/nonG/T não tenham sido estatisticamente significativas, foi possível identificar uma tendência de menor exposição sistêmica e maior clearance nos pacientes portadores da variante. Esses achados sugerem que o polimorfismo pode influenciar modestamente a farmacocinética da anfotericina B, o que pode ter implicações na eficácia do tratamento, especialmente em doenças que requerem altas concentrações da droga no sistema nervoso central.

Apesar das limitações, como o pequeno tamanho amostral, este trabalho contribui para uma compreensão mais detalhada dos fatores genéticos que podem afetar a resposta ao tratamento com anfotericina B. Estudos futuros com maior número de pacientes e a análise de outros genes transportadores são necessários para fortalecer essas conclusões e possivelmente adaptar a terapia antifúngica de acordo com o perfil genético dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Adedoyin, A., Swenson, C. E., Bolcsak, L. E., Hellmann, A., Radowska, D., Horwith, G., et al. (2000). A Pharmacokinetic Study of Amphotericin B Lipid Complex Injection (Abelcet) in Patients with Definite or Probable Systemic Fungal Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2900–2902. doi:10.1128/aac.44.10.2900-2902.2000
- SAIDIJAM, M. et al. Efflux proteins at the blood–brain barrier: review and bioinformatics analysis. *Xenobiotica*, v. 48, n. 5, p. 506-532, 2017.
- BANIHANI, MN. et al. The Association between *ABCB1* C1236T/C3435T SNPs and *H. pylori* Infection among Jordanians. *Genes (Basel)*. 2020.
- ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.*, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.
- ALMEIDA, R.L.G.; MACHADO, E.R. *Cryptococcus* spp. em pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. *Ensaio Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde*,v.18,n.1, p.55-63, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, dispõe os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.
- BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection*, 2017.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: *Adv. Appl. Microbiol.* [s.l: s.n.]. v. 87p. 1–41.
- CORDON-CARDO, C. et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, 1989.
- ESTRELA, R.C., et al. Distribution of *ABCB1* polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics*, v. 9, n. 3, p. 267-76. 2008.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999.
- Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013.
- HIRVENSALO, P. et al. Pharmacogenomics of celiprolol - evidence for a role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide 1A2 in celiprolol pharmacokinetics. *Clin Transl Sci.*,v. 15, n. 2, p. 409-421, 2022.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. *AAPS*, v. 18, n. 1, p. 251–260, 2016.

JARVIS, J. N. et al. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infectious Diseases*, v. 10, n. 67, 2010.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.*, p. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

Kan, V. L., Bennett, J. E., Amantea, M. A., Smolskis, M. C., McManus, E., Grasela, D. M., and Sherman, J. W. (1991). Comparative safety, tolerance, and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex and amphotericin B desoxycholate in healthy male volunteers. *Journal of Infectious Diseases* 164, 418–421. doi:10.1093/INFDIS/164.2.418

KIM, RB; LEAKE, BF; CHOO, EF; et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(2):189-99.

KLAASSEN, C. D. (Ed.). *Casarett & Doull's toxicology - The Basic Science of Poisons* (9^a ed.). McGraw-Hill, 2020.

KOBAYASHI, D. et al. Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Dispos.*, v. 33, n. 1, p. 94-101, 2005.

LALLOO, A.K. et al. Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC Med* 2, 16, 2004.

LOW, S.K. et al. Association Study of a Functional Variant on ABCG2 Gene with Sunitinib-Induced Severe Adverse Drug Reaction. *PLoS One*, v. 11, n. 2, p. 0148177, 2016.

MAO, Q.; UNADKAT, J.D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS*, v. 17, n. 1, p. 65-82, 2015.

RABINDRAN, S.K. et al. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.*, v. 60, n. 1, p. 47-50, 2000.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm. Res.*, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SLAGLE, D. Antifungal Drugs. In: *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. 5th ed.

SPINA-FRANÇA, A.; SILVA, JB. Diagnóstico e tratamento da criptococose do sistema nervoso central. Considerações sobre 16 casos. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 1968.

- WHALEN, K. et al. Farmacologia ilustrada. 6a edição, 2016.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Neurol.*, v. 13, n. 1, p. 13–24, 2016.
- ZAITZ, RUIZ & SOUZA. Atlas de micologia médica, Ed. Guanabara & Koogan, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico para Uso de Anfotericina B. Disponível em: Protocolo Clínico para Uso de Anfotericina B.
- SILVA, J. R. et al. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 3, p. 469-478, 2008.
- LEE, W. et al. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem.*, v. 280, n. 10, p. 9610-7. 2005.
- FUKUSHI, Y. et al. Effects of *ABCB1* polymorphisms on the transport of ponatinib into the cerebrospinal fluid in Japanese Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia patients. *British Pharmacological Society*. 2022.
- Würthwein G, Groll AH, Hempel G, Adler-Shohet FC, Lieberman JM, Walsh TJ. Population pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in neonates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5092-8.
- LEE, J. Y.; TAKEMOTO, J. K.; SCHNEIDER, J. D.; et al. Modulation of Amphotericin B Transport through the Blood-Brain Barrier by P-glycoprotein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 10, p. 6311–6318, 2014.
- Lee et al., 2024: Lee, J., Kim, H., & Park, S. (2024). *Unveiling recent and ongoing adaptive selection in human populations*. *PLOS Biology*, 22(3), 3002469.
- Salamanca et al., 2015: Salamanca, F., Santos, M., & Oliveira, L. (2015). *Haplotypes of ABCB1 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A (rs2032582), and 3435C>T (rs1045642) in patients with bullous pemphigoid*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 40(4), 1842-1850.

ANEXOS

ANEXO A – Ofício de aprovação do CEP/FCFRP – USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP n°. 024/2018
kms

Ribeirão Preto, 07 de dezembro de 2018.

Ao pós-graduando
Leandro Francisco Pippa
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia Lanchote
FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**MODELAGEM PBPK E PK POPULACIONAL DA ANFOTERICINA B NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES EM TRATAMENTO DE NEUROCRÍPTOCOCOSE: APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA COM UTILIZAÇÃO DE NEUROIMAGEM**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP n°. 482 – CAAE: 96780618.7.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 182ª reunião ordinária, realizada em 12/11/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP n° 3.014.878.

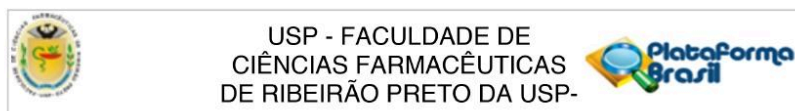
Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B – Parecer de aprovação do CEP/FCFRP – USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelagem PBPK e PK populacional da anfotericina B no líquido cefalorraquidiano de pacientes em tratamento de neurocriptococose: aplicação na avaliação da quebra da barreira hematoencefálica com utilização de neuroimagem

Pesquisador: Leandro Francisco Pippa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 96780618.7.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.014.878

Apresentação do Projeto:

Vide parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios foram adequadamente mensurados. Foi anexada a plataforma Brasil a declaração dos médicos responsáveis pelo estudo isentando de risco as duas administrações do radiofármaco ácido dietileno triamino pentacético marcado com Tecnécio-99m (99mTc DTPA) nos participantes do estudo, em curto espaço de tempo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer anterior

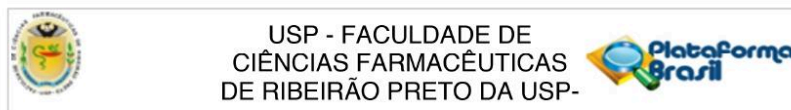
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos termos de apresentação obrigatória foram anexados a plataforma Brasil.

Recomendações:

Não se aplica.

Endereço: Avenida do Café s/n°
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fctrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.014.878

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas pendências foram atendidas adequadamente.

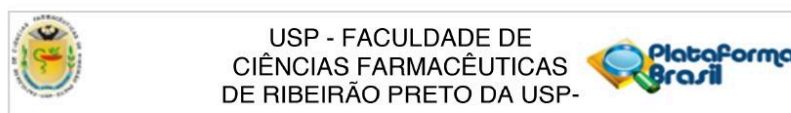
- 1) A faixa etária foi estipulada em idade igual ou superior a 18 anos e foi informada no projeto, item "3.2.3. Critérios de inclusão", destacado em amarelo (folha 13 do PDF, página 12). A informação foi adicionada na Plataforma Brasil, item "Critério de Inclusão".
2. Foi anexada a declaração dos médicos responsáveis pelo estudo sobre os potenciais riscos das duas administrações do radiofármaco ácido dietileno triamino pentacético marcado com Tecnécio. Foi destacado que será respeitado o intervalo mínimo de 24 horas entre as duas administrações do radiofármaco e que os riscos declarados estão contemplados no TCLE.
3. No TCLE, foi informado que após a colheita de sangue haverá risco potencial de formação de hematoma no local da punção sanguínea. A informação foi adicionada ao final do terceiro parágrafo do texto do TCLE, página 1, destacado em amarelo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 182ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fctrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.014.878

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1083294.pdf	05/10/2018 14:56:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao2.pdf	05/10/2018 14:56:05	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Outros	Declaracao_Medicos_Radiofarmaco.pdf	05/10/2018 14:55:27	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_versao2.pdf	05/10/2018 14:54:49	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2912241.pdf	05/10/2018 14:53:59	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado.pdf	05/10/2018 14:44:02	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	31/07/2018 20:09:28	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Orçamento	Orcamento_UPC_HCFMRP_USP.pdf	23/07/2018 11:32:35	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Compromisso_HCFMRP_USP.pdf	23/07/2018 11:31:43	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Compromisso_FCFRP_USP.pdf	23/07/2018 11:31:18	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_HCFMRP_USP.pdf	23/07/2018 11:30:57	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_FCFRP_USP.pdf	23/07/2018 11:30:01	Leandro Francisco Pippa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

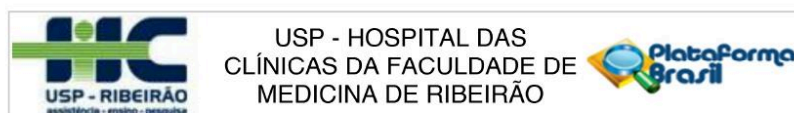
Não

RIBEIRAO PRETO, 12 de Novembro de 2018

Assinado por:
Cleni Mara Marzocchi Machado
 (Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/n°
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br

ANEXO C – Parecer de aprovação do CEP/HCFMRP – USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelagem PBPK e PK populacional da anfotericina B no líquido cefalorraquidiano de pacientes em tratamento de neurocriptococose: aplicação na avaliação da quebra da barreira hematoencefálica com utilização de neuroimagem

Pesquisador: Leandro Francisco Pippa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96780618.7.3001.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.025.268

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa da instituição proponente FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO. O HCFMRP_USP será uma coparticipante da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados na Plataforma Brasil e estão de acordo com as normas éticas vigentes.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da instituição proponente e aprova o HCFMRP-USP

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.025.268

como coparticipante da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao2.pdf	05/10/2018 14:56:05	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Outros	Declaracao_Medicos_Radiofarmaco.pdf	05/10/2018 14:55:27	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_versao2.pdf	05/10/2018 14:54:49	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2912241.pdf	05/10/2018 14:53:59	Leandro Francisco Pippa	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado.pdf	05/10/2018 14:44:02	Leandro Francisco Pippa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 19 de Novembro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



INFORMAÇÃO GRAD 0023/2025

Nome do Interessado(a): Valéria Matinatti Valerio Martins

Assunto: TCC - Autorização para Biblioteca Digital e Aprovação CG

A Comissão de Graduação da FCFRP, órgão que atua como coordenação do curso Farmácia desta, declara para os devidos fins que:

- Este trabalho foi apresentado e aprovado no dia 22/11/2024;
- O(a) estudante autorizou a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte pelo formulário entregue a esta comissão após aprovação.

Ribeirão Preto, 23 de julho de 2025

Comissão de Graduação FCFRP/USP