

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

Fernanda Wirth

Relação entre hipertensão intracraniana e quantificação de antifúngicos em líquido de
pacientes com meningite criptocócica através de Cromatografia Líquida de Alta

Performance – HPLC

Porto Alegre, dezembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

Relação entre hipertensão intracraniana e quantificação de antifúngicos em
líquor de pacientes com meningite criptocócica através de Cromatografia
Líquida de Alta Performance – HPLC

Fernanda Wirth

Orientador: Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani

Tese apresentada ao Programa de
Pós - Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de doutor

Porto Alegre, dezembro de 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Wirth, Fernanda

Relação entre hipertensão intracraniana e
quantificação de antifúngicos em líquido de pacientes
com meningite criptocócica através de Cromatografia
Líquida de Alta Performance - HPLC / Fernanda Wirth. -
- 2016.

107 f.

Orientador: Luciano Zubaran Goldani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Criptococose. 2. Hipertensão intracraniana. 3.
Monitoramento terapêutico. 4. Meningite
criptocócica. 5. Agentes antifúngicos. I. Goldani,
Luciano Zubaran, orient. II. Título.

Banca examinadora

Prof^a Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Prof. Dr. Paulo Dornelles Picon

Prof. Dr. Gustavo Wissmann Neto

Dr. Valério Rodrigues Aquino

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Goldani, por me dar essa oportunidade de seguir no caminho da pesquisa clínica, pelos conselhos, pelo suporte e pela paciência em toda essa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM), em especial à Vera Suzana Vargas, por todos os esclarecimentos e pela prestatividade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a mim concedida através do PPGCM.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) pelo auxílio e pelo custeio deste projeto.

“Se você está procurando uma grande oportunidade, descubra um grande problema.”

Marthin Luther

RESUMO

Introdução: Dados sobre a relação entre a farmacocinética do fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) no líquido cefalorraquidiano (LCR) e a hipertensão intracraniana (HIC) não se encontram disponíveis na literatura.

Objetivos: Avaliar a influência da pressão intracraniana na concentração dos antifúngicos AMB e FCZ no LCR de pacientes com meningite criptocócica internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de 1 ano.

Métodos: Foram estudados 15 pacientes com meningite criptocócica durante os primeiros 14 dias de tratamento com AmB (1 mg/kg/dia) e FCZ (800 mg/dia). As amostras de LCR foram obtidas por meio de punções lombares de rotina realizadas nos dias 1, 7 e 14 da terapia antifúngica, respectivamente. Os valores das pressões intracranianas de abertura foram obtidos no momento de cada punção lombar. Os níveis de AmB e FCZ no LCR foram medidos pela metodologia de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A concentração inibitória mínima (CIM) para AmB, FCZ, voriconazol (VRZ) e flucitosina (5-FC) de cada isolado de *Cryptococcus* sp. foi realizada de acordo com as normas descritas no documento M27-A3, do CLSI, publicado em 2008.

Resultados: Entre os 15 pacientes incluídos no estudo, *C. gattii* foi isolado do LCR de 2 pacientes e *C. neoformans* foi isolado do LCR de 13 pacientes apresentaram. A condição de imunossupressão encontrada foi a AIDS, seguida de transplante de órgão sólido. Nove pacientes apresentaram cultura negativa de LCR no 14º dia de terapia antifúngica. Os níveis de AmB no LCR foram indetectáveis para a maioria das amostras de LCR durante os 14 dias de terapia antifúngica. Os níveis de FCZ no LCR aumentaram progressivamente do dia 1 ao dia 14 de terapia. Seis pacientes apresentaram HIC no dia 1, com variação da pressão de abertura entre 100 mmH₂O e 650 mmH₂O no respectivo dia. A pressão intracraniana não interferiu nas concentrações de FCZ no LCR. Não observamos correlação entre a HIC e as concentrações de AMB e FCZ no LCR de acordo com a correlação de Spearman (Spearman $p=0.122$).

Conclusão: São necessários mais estudos para avaliar o papel da HIC na eficácia terapêutica de diferentes agentes antifúngicos em pacientes com meningite criptocócica.

Palavras-chave: Criptococose, hipertensão intracraniana, meningite criptocócica, monitoramento terapêutico, agentes antifúngicos

ABSTRACT

Introduction: Data considering the relationship between pharmacokinetics of fluconazole (FCZ) and amphotericin B (BPA) in cerebrospinal fluid (CSF) and intracranial hypertension (IH) are not available in the literature.

Objectives: To evaluate the influence of intracranial pressure on the concentration of the antifungals AMB and FCZ in the CSF of patients with cryptococcal meningitis admitted at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), within a period of one year.

Methods: Fifteen patients with cryptococcal meningitis were studied during the first 14 days of treatment with AmB (1 mg / kg / day) and FCZ (800 mg / day). CSF samples were obtained by means of routine lumbar punctures performed on days 1, 7 and 14 of antifungal therapy, respectively. The values of intracranial opening pressures were obtained at the time of each lumbar puncture. The levels of AmB and FCZ in the CSF were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) methodology. The minimum inhibitory concentration (MIC) for AmB, FCZ, voriconazole (VRZ) and flucytosine (5-FC) of each isolate of *Cryptococcus* sp. was performed according to CLSI guideline M27-A3, published in 2008.

Results: Among the 15 patients included in the study, *C. gattii* was isolated from the CSF of 2 patients and *C. neoformans* was isolated from the CSF of 13 patients presented. The immunosuppressive condition found was AIDS, followed by solid organ transplantation. Nine patients presented negative CSF culture on the 14th day of antifungal therapy. AmB levels in the CSF were undetectable for most of the CSF samples during the 14 days of antifungal therapy. CSF FCZ levels increased progressively from day 1 to day 14 of therapy. Six patients presented IH on day 1, with variation of the opening pressure between 100 mmH₂O and 650 mmH₂O on the respective day. Intracranial pressure did not interfere with CSF on FCZ concentrations. We did not observe a correlation between IH and the concentrations of AMB and FCZ in the CSF according to the Spearman correlation (Spearman $p = 0.122$).

Conclusion: Further studies are needed to evaluate the role of IH in the therapeutic efficacy of different antifungal agents in patients with cryptococcal meningitis.

Keywords: Cryptococcosis, intracranial hypertension, cryptococcal meningitis, therapeutic monitoring, antifungal agents.

Lista de figuras

Figura 1.....	19
Figura 2.....	21
Figura 3.....	21

Lista de siglas e abreviaturas

5-FC – Flucitosina
AMB – Anfotericina B
AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism
ATP – Adenosina trifosfato
BHE – Barreira hematoencefálica
BHL – Barreira hemato-liquórica
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CGB – Meio de cultura Cavanina – Glicina – Azul de Bromotimol
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
cmH₂O – Centímetros de água
DNA – Ácido desoxirribonucléico
FCZ - Fluconazol
HIC – Hipertensão intracraniana
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
IDSA – Infectious Diseases of America
ITZ – Itraconazol
IV – Intravenoso
kDa - Quilodalton
kg - Quilograma
LCR – Líquido cefalorraquidiano; Líquor
MEC – Ministério da Educação
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mmH₂O – Milímetros de água
mm³ - Milímetro cúbico
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PgP – Glicoproteína P

PLB1 –Fosfolipase B1

RFLP - Restriction Fragment Length Polimorphism (polimorfismo de comprimento de fragmento)

SIDA –Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIH – SUS – Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde

SNC – Sistema nervoso central

TCD4+ - Células TCD4+

URA5 – Orotidinamonofosfatopirofosforilase

VGI – Genótipo I do *Cryptococcus gattii*

VGII – Genótipo II do *Cryptococcus gattii*

VGIII – Genótipo III do *Cryptococcus gattii*

VGIV - Genótipo IV do *Cryptococcus gattii*

VNI – Genótipo I do *Cryptococcus neoformans*

VNII – Genótipo II do *Cryptococcus neoformans*

VNIII – Genótipo III do *Cryptococcus neoformans*

VO – Via oral

µg - Micrograma

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1 Estratégias para a localização e seleção de informações.....	18
3. Criptococose.....	20
3.1 Agente Etiológico.....	21
3.2 Epidemiologia da criptococose.....	22
3.3 Neurocriptococose.....	25
4. Fisiologia da barreira hematoencefálica.....	28
5. Hipertensão intracraniana e a meningite criptococócica.....	30
6. Fatores que influenciam a concentração de drogas no sistema nervoso central em humanos.....	33
6.1 Relação entre a concentração de antifúngicos e atividade antifúngica.....	36
7. Objetivos.....	40
7.1 Objetivo geral.....	40
7.2 Objetivos específicos.....	40
8. Referências bibliográficas da revisão da literatura.....	41
9. Artigo I.....	60
10. Artigo II.....	72
11. Considerações finais e perspectivas futuras.....	106
12. Anexos.....	107
12.1 Anexo.....	107

1. Introdução

Cryptococcus neoformans é um microrganismo encontrado no solo e frequentemente associado a fezes de pombos. Mais de 40 espécies do *genus Cryptococcus* já foram descritas, mas poucas são reconhecidas como patógenos humanos (De Hoog, 2001). O patógeno predominante é o *C. neoformans*, mas outras duas espécies têm sido reportadas como causadoras de doença em seres humanos (Johnson *et al.*, 1998; Kordosis *et al.*, 1998; Khawcharoenporn *et al.*, 2007).

Infecções por esse fungo envolvem frequentemente os pulmões ou o sistema nervoso central (SNC) e, com menor frequência, o sangue, a pele, o sistema esquelético, e a próstata. A incidência de criptococose é bastante aumentada em pacientes imunocomprometidos, especialmente em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou transplantados; portanto, a criptococose é considerada uma doença fúngica oportunista (Baddley & Dismukes, 2011).

A criptococose pode apresentar-se através de infecções pulmonares, infecções no SNC (tipicamente como meningite, a qual pode ser subaguda ou crônica), infecções cutâneas, osteoarticulares, bem como em outros sítios como o sangue, próstata, rins, músculo, fígado tireóide, seios nasais, peritônio, adrenais, esôfago, coração, aorta e infecções oculares (Braman, 1981; Leavitt & Kauffman, 1988; Crump *et al.*, 1992; Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

A meningite criptocócica deve ser sempre considerada em pacientes com AIDS que apresentem cefaléia, febre inexplicada, demência progressiva e confusão mental. A hipertensão intracraniana (HIC) ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes com neurocriptococose, contribuindo para significativo aumento da morbi-mortalidade da doença (Moretti *et al.*, 2008).

A pressão liquórica desses pacientes deve ser medida sempre por ocasião da primeira punção. A HIC é definida como a pressão liquórica inicial medida por raquimanometria ≥ 200 mmH₂O com o paciente em decúbito lateral. A principal intervenção recomendada para a redução da pressão intracraniana é a punção lombar intermitente, descrita na literatura desde 1994 (Malessa *et al.*, 1994; Macsween *et al.*, 2005).

O tratamento da criptococose é decidido levando-se em consideração os sítios acometidos e o estado imunológico do hospedeiro. Para pacientes com doença

pulmonar, o objetivo principal da terapia é erradicar a infecção e prevenir a disseminação para o SNC. Para os pacientes com infecção no SNC, o tratamento objetiva erradicar ou controlar a infecção e manejar a pressão intracraniana, e prevenir seqüelas neurológicas (Baddley & Dismukes, 2011).

Nas formas graves da doença, principalmente no SNC, seja o paciente infectado ou não pelo vírus do HIV, o propósito da fase de indução é a negatização ou redução efetiva da carga fúngica, tendo como período mínimo de tratamento duas semanas. A fase que compreende a manutenção de negatividade micológica e normalização de parâmetros clínicos e laboratoriais é a fase de consolidação, que dura por pelo menos oito semanas. A terapia de manutenção, ou fase de supressão, tem sido preconizada devido ao alto risco de recaída em pacientes com imunossupressão acentuada e em pacientes com AIDS enquanto os linfócitos TCD4+ estiverem em níveis inferiores a 100 células/mm³ e tem duração de no mínimo um ano, com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imune do hospedeiro (Benson *et al.*, 2004).

Com o aumento da incidência global das doenças criptocócicas, o número de opções terapêuticas também tem aumentado. Até o presente momento, além da anfotericina B (AMB) e flucitosina (5-FC), outras drogas, como fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ) e formulações lipídicas da AMB estão disponíveis para tratar a infecções criptocócicas. Esses agentes podem ser usados isoladamente ou em combinação com outros agentes com graus variados de sucesso, mas a AMB e a 5-FC permanecem sendo drogas chave para essa doença, o FCZ e, em menor extensão, o ITZ têm um papel definitivo, especialmente no tratamento de criptococose associada à AIDS (Saag *et al.*, 2000).

De acordo com diretrizes atualizadas da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (Infectious Disease Society of America – IDSA), publicadas em 2010, os pacientes são divididos em três grupos de risco (Perfect *et al.*, 2010). O primeiro inclui pacientes infectados pelo vírus do HIV, o segundo grupo inclui pacientes no período pós-transplante de órgãos e o terceiro grupo inclui os pacientes não-transplantados e não-infectados pelo vírus do HIV. Essa classificação facilita as decisões terapêuticas, uma vez que cada grupo parece responder melhor a uma estratégia terapêutica específica (Desalermos *et al.*, 2012).

Para pacientes infectados pelo vírus do HIV, a terapia de indução recomendada é com AMB deoxicolato, na dose de 0,7 a 1 mg/kg/dia por via intravenosa (IV) e 5-FC 100 mg/kg/dia por via oral (VO) por 2 semanas ou AMB complexo lipídico, 5 mg/kg IV

diariamente e 5-FC 100 mg/kg V.O diariamente, por duas semanas. A terapia de consolidação recomendada é com FCZ, na dose de 400 mg/dia por VO, por 8 semanas e a terapia de manutenção, com FCZ, na dose de 200 mg/dia por VO.

Para pacientes pós-transplante de órgãos em terapia imunossupressora, a terapia antifúngica de indução recomendada é com AMB lipossomal, na dose de 3 a 4 mg/kg/dia I.V, durante 2 semanas ou AMB complexo lipídico na dose de 5 mg/kg/dia IV e 5-FC na dose de 100 mg/kg/dia por VO, durante 2 semanas. A terapia de consolidação recomendada para este grupo de pacientes consiste em FCZ, na dose de 400 – 800 mg/dia, por VO, durante 8 semanas. A terapia de manutenção deve ser feita com FCZ, na dose de 200 – 400 mg/dia por VO durante 6 – 12 meses.

Para pacientes não infectados pelo vírus do HIV e que não receberam transplante de órgãos, a terapia antifúngica recomendada é com AMB deoxicolato, na dose de 0,7 – 1 mg/kg/dia IV e 5-FC, na dose de 100 mg/kg/dia V.O por 4 semanas. A terapia de consolidação consiste no uso de FCZ na dose de 400 – 800 mg/dia, durante 8 semanas e a terapia de manutenção, em FCZ, na dose de 200 mg/dia VO durante 6 – 12 meses (Desalermos *et al.*, 2012).

As concentrações de AMB no LCR após a administração IV de AMB deoxicolato são baixas (Polak, 1979; Felton *et al.*, 2014). As concentrações séricas após uma infusão de 30 a 50 mg de AMB deoxicolato variam entre 1 e 2 µg/mL. O grau de ligação às proteínas plasmáticas, principalmente às lipoproteínas, é de aproximadamente 91 a 95% (Luna *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1980). Vários estudos têm mostrado forte relação entre a concentração sérica e líquórica dos antifúngicos e eficácia do tratamento (Denning *et al.*, 1989; Tucker *et al.*, 1990; Berenguer *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2000).

A 5-FC não se liga a proteínas plasmáticas e tem excelente penetração no LCR: de 1 a 2 horas após a administração, as concentrações líquóricas giram em torno de $74,4\% \pm 5,6\%$ das concentrações obtidas no soro (Block & Bennett, 1972).

O FCZ possui uma excelente absorção pelo trato gastrointestinal e sua biodisponibilidade excede 90%, portanto se obtém níveis plasmáticos similares tanto após a administração por via oral quanto após administração intravenosa. A presença do ácido do estômago não interfere na absorção (Henderson & Chapman, 2003). Os esquemas de dose múltipla utilizando 50, 100, 200 e 400 mg duas vezes ao dia evidenciam uma farmacocinética linear (Ledingham & Warrell, 2000). As

concentrações no LCR equivalem a 70% daquelas obtidas no plasma (Henderson & Chapman, 2003).

A utilidade do monitoramento terapêutico tem sido estudada utilizando-se duas estratégias de tratamento, incluindo a profilaxia para prevenir o desenvolvimento de uma infecção fúngica invasiva, bem como o tratamento dessas infecções. Os níveis séricos podem ser medidos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Warnock *et al.*, 1988; Odds *et al.*, 1999).

Em infecções fúngicas experimentais do SNC, com exceção da meningite criptocócica, a resposta terapêutica está mais intimamente relacionada com a penetração do fármaco no parênquima cerebral do que propriamente com a concentração do antifúngico no LCR. Quando a concentração de antifúngicos no SNC estiver sensivelmente diminuída, poderá permitir a multiplicação de leveduras no parênquima cerebral, portanto a quantificação destes fármacos no LCR pode contribuir para o sucesso terapêutico (Kethireddy & Andes, 2007).

A espécie *C. neoformans* é a causadora predominante da meningite criptocócica associada à AIDS no Brasil (Fernandes *et al.*, 2000; Pappalardo & Melhem, 2003), mas os pacientes infectados por *C. gattii* são mais propícios a apresentar sintomas devido às lesões inflamatórias no cérebro ou pulmão e são mais propensos a sintomas neurológicos, como paralisia de nervos cranianos e convulsões. Como resultado, terapia prolongada e excisão cirúrgica das lesões são normalmente necessários (Mitchell & Perfect, 1995; Byrnes *et al.*, 2011). Embora a identificação da espécie seja útil do ponto de vista epidemiológico, ela não é necessária para o manejo da criptococose (Desalermos *et al.*, 2012).

A maioria dos casos encontrados na literatura mostra que isolados de *C. neoformans* apresentam sensibilidade *in vitro* a diferentes antifúngicos (Franzot *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2011). A resistência de *C. neoformans* aos antifúngicos é um fenômeno pouco frequente, embora existam alguns casos (Franzot *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2005). A resistência de *Cryptococcus* tem sido atribuída aos casos de falência clínica da terapêutica. Poucos estudos têm relacionado a associação potencial entre o desfecho clínico e a susceptibilidade *in vitro* (Perkins *et al.*, 2005). No entanto, o uso de FCZ prolongado durante a terapia de manutenção nos casos de meningite criptocócica nos pacientes com AIDS pode levar a emergência de resistência de *Cryptococcus* ao FCZ (CIM > 64 µg/ml) e ITZ (CIM > 0,5 µg/ml) (Franzot *et al.*, 1999).

2. Revisão da literatura

2.1 Estratégias para a localização e seleção de informações

Na revisão da literatura são apresentados os principais aspectos referentes à criptococose, penetração de fármacos antifúngicos no SNC, farmacologia dos agentes antifúngicos utilizados no tratamento da neurocriptococose (AMB, FCZ e 5-FC), fatores que influenciam a entrada de substâncias no SNC e também um embasamento teórico geral sobre o funcionamento da barreira hematoencefálica e barreira hemato-liquórica.

As informações foram coletadas principalmente no portal MEDLINE (*PubMed*) e, secundariamente, na página do Portal de Periódicos CAPES/ MEC. Foram utilizadas algumas revisões bibliográficas encontradas nesses portais e com isso, as referências bibliográficas de outros trabalhos também foram consultadas para um melhor enriquecimento da pesquisa.

Nos portais citados acima, foram realizadas buscas utilizando as palavras-chave: “Antifungal agents CSF”, “Antifungal agents CNS”, “Antifungal agents pharmacokinetics CNS”, “Cryptococcosis review”, “Cryptococcus meningitis”, “Intracranial hypertension Cryptococcosis”, “Intracranial Raised pressure *Cryptococcus*”, “Amphotericin B CSF”, “Fluconazole CSF”, “Flucytosine CSF” e combinações destes termos, conforme Figura 1.

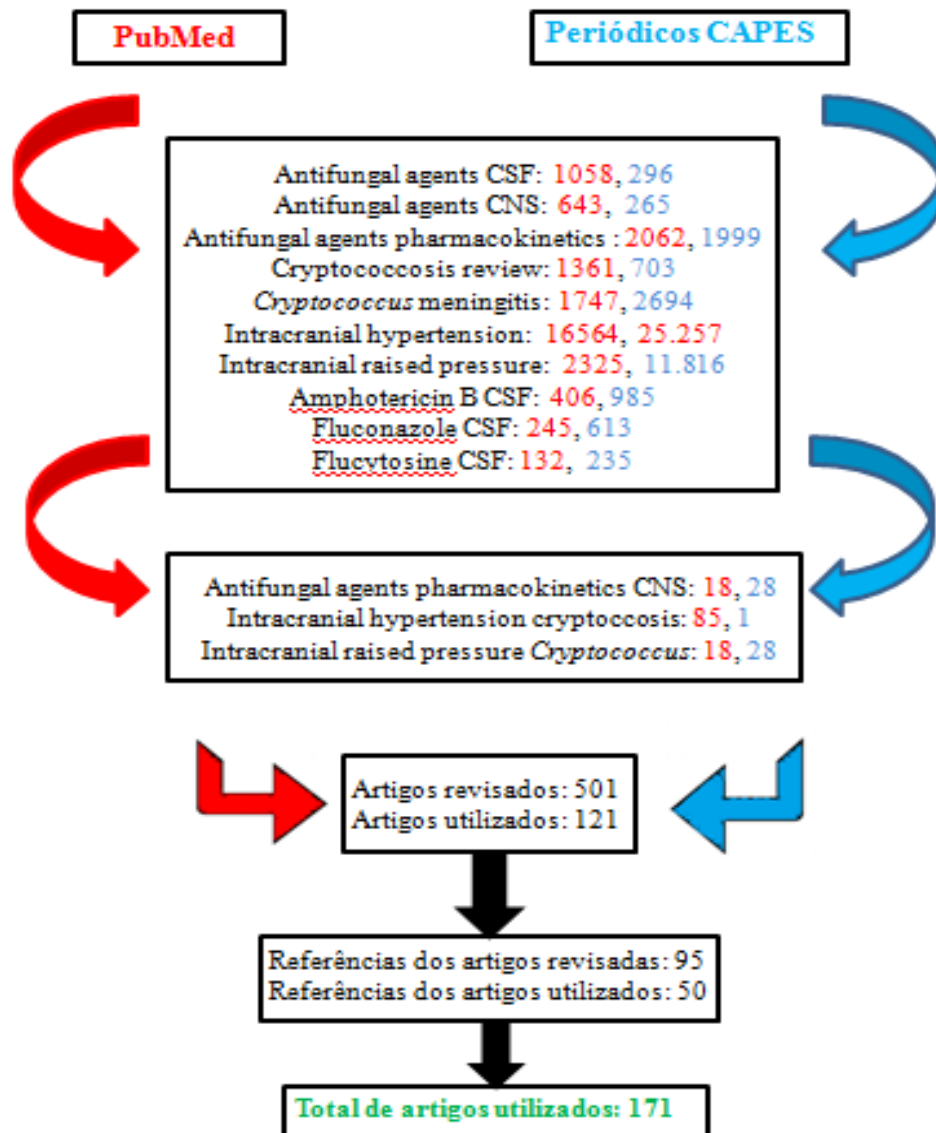


Figura 1. Estratégia de busca das referências bibliográficas das bases que fundamentam os objetivos do presente estudo. Os resultados de cada busca referente a cada termo estão representados nos quadros, com as cores correspondentes a cada portal consultado. Em verde, encontra-se o total de trabalhos utilizados como referência nesse estudo.

3. Criptococose

3.1 Agente etiológico

De acordo com o Relatório Técnico denominado Consenso em Criptococose, publicado no ano de 2008 (*Guidelines in Cryptococcosis - 2008*), essa infecção é definida como uma micose de natureza sistêmica cuja porta de entrada é a via inalatória, causada por fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*, dentro do qual encontramos duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Casadevall & Perfect, 1998; Perfect & Casadevall, 2002; Moretti *et al.* 2008).

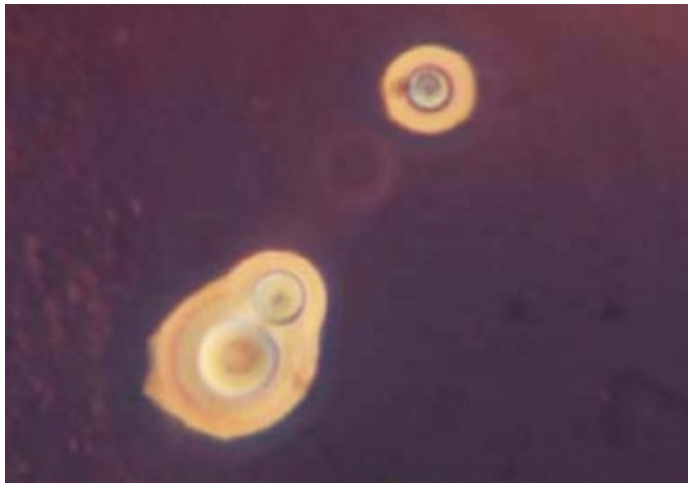
O agente etiológico *C. neoformans* é a forma assexuada do basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*, uma levedura encapsulada (Reolon *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2008), que pode se encontrar dispersa no ambiente, porém seu habitat natural são os lugares úmidos (Ribas *et al.*, 2011) e é considerado um saprófita ambiental. *C. neoformans* raramente é considerado um comensal humano e tampouco é transmitido de humano para humano, o que sugere que a infecção humana é um evento acidental em seu ciclo de vida (Casadevall & Steenbergen, 2003; Binamic & Harrison, 2005).

Esta levedura é encontrada nos tecidos como um fungo unicelular esférico com uma parede celular dupla com um ou mais brotamentos ou blastoconídeos e geralmente encontra-se circundado por uma cápsula espessa que às vezes excede o diâmetro da levedura. A cápsula é a característica mais marcante desse fungo e pode ser evidenciada através de preparações em tinta nanquim diluída ou através da observação com um microscópio de contraste de fase (Figura 2). A coloração de Giemsa é capaz de colorir a cápsula apenas parcialmente, e, em cortes histológicos, a cápsula apresenta-se com cor vermelha com as colorações de mucicarmim ou azul alciano (Salfelder *et al.*, 1990; Arechavala *et al.*, 1993; Perfect & Casadevall, 2002; Chayakilkeeree *et al.*, 2006; Negroni, 2012).

Este organismo também se desenvolve facilmente em meios de cultura rotineiros como Agar Sabouraud dextrose (Figura 3) ou ágar Sabouraud mallosado com mel de abelhas. Após 3 a 4 dias de incubação às temperaturas de 28°C e 37°C, pode-se observar o desenvolvimento de colônias com aparência mucóide, que se apresentam inicialmente brancas e vão tornando-se marrom-claras. Na microscopia, essas colônias apresentam brotamentos similares aos observados nos tecidos, porém com a cápsula mais fina (Negroni, 2008; Palmieri *et al.*, 2009; Negroni, 2012). A habilidade do *Cryptococcus* de utilizar a glicina como sua fonte de carbono e nitrogênio e sua

resistência à canavalina azul de bromotimol permite a diferenciação de *C. gattii* do *C. neoformans* no meio CGB (Canavanina – Glicina – azul de Bromotimol), com a cor do meio de cultura ficando azul quando houver a ocorrência do *C. gattii* (Moretti *et al.*, 2008).

Figura 2. Imagem microscópica do *C. neoformans* em uma preparação com tinta nanquim.



Fonte: Moretti *et al.*, 2008.

Figura 3. Desenvolvimento do *C. neoformans*, com presença de colônias mucóides em Ágar Sabouraud dextrose .



Fonte: Negroni, 2012.

C. neoformans e *C. gattii* possuem vários fatores de virulência, especialmente a presença de cápsula polissacarídica. Essa cápsula é composta por polissacarídeos de alto peso molecular, especialmente aglucuronoxilomanana e, em menor quantidade, a galactoxilomanana e manoproteína. A cápsula age como uma barreira contra o sistema imunológico do hospedeiro. Outros fatores de virulência deste fungo estão: a sua capacidade de crescer a 37°C, a produção de melanina a partir de difenóis através de enzimas denominadas lacases, geradas em suas células, pois a melanina protege o *Cryptococcus* sp. contra a fagocitose; e a produção de diversas enzimas como proteases, ureases, superóxido dismutase, e fosfolipase B, as quais facilitam a invasão tecidual (Perfect & Casadevall, 2002; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Negroni *et al.*, 2008; Viviani & Tortorano, 2009; Negroni, 2012).

3.2 Epidemiologia da criptococose

A criptococose é uma infecção fúngica de distribuição geográfica global, mas ocorre com mais frequência na América e África (Negroni, 2012). Do ponto de vista clínico e epidemiológico, essa micose abrange duas formas distintas: a criptococose oportunista e a criptococose primária. A primeira está geralmente associada a condições de imunossupressão celular e é causada pelo *C. neoformans* e a segunda é causada principalmente pelo *C. gattii*. As espécies e variedades se diferem no que diz respeito a aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (Queiroz *et al.*, 2008).

A espécie *C. neoformans* pode ser encontrada principalmente em fezes e ninhos de pássaros, os quais são habitats ideais devido ao seu conteúdo rico em nitrogênio, creatinina e sal. Formas viáveis deste fungo podem manter-se nesses ambientes por um período de até 2 anos. Essa espécie de *Cryptococcus* também já foi isolada de várias espécies de árvores e a luz solar é capaz de destruir esses microrganismos. Quando no meio ambiente, as células do *Cryptococcus* não possuem cápsula, e o diâmetro dessa célula alcança apenas 1 a 2 µm, o que facilita sua passagem pelos pequenos brônquios. O *Cryptococcus* sp. também possui uma enzima capaz de digerir a lignina (Telles & Moretti-Bianchini, 2004; Chayakilkeeree & Perfect, 2006; De Queiroz-Kidd *et al.*, 2007; Viviani & Tortorano, 2009; Nucci *et al.*, 2010; Negroni, 2012). Essa espécie também inclui os sorotipos A (variação *grubii*), D (variação *neoformans*) e AD (sorotipo diplóide). O *Cryptococcus neoformans*, variedades A, D e AD, tem a

capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos, sem causar a doença, comportando-se como agente endossaprófito natural destas aves (Filiú *et al.*, 2002)

A espécie *C. gattii* é característica de hospedeiros aparentemente imunocompetentes e é endêmica em regiões tropicais e subtropicais na Austrália, África, Ásia, sul da Califórnia e América do Sul. O habitat do *C. gattii* está relacionado a eucaliptos, onde o fungo é encontrado em sua casca e nos frutos, e também no chão, próximo às árvores (Kwong-Chung & Bennett, 1992; Kidd *et al.*, 2007; Viviani & Tortorano, 2009; Nucci *et al.*, 2010; Negroni *et al.*, 2012). Nesta espécie de *Cryptococcus* estão presentes os sorotipos B e C (Ribas *et al.*, 2011).

A estimativa do órgão *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) é de 1 milhão de casos de meningite criptocócica por ano em todo o mundo em pacientes HIV/AIDS, resultando em torno de 625 mil mortes (Park *et al.*, 2009), porém evidências diretas de infecção latente provindas de estudos feitos em autópsias mostraram células criptocócicas dentro de granulomas pulmonares em indivíduos falecidos por causa não relacionada (Salyer *et al.*, 1974; Binamic & Harrison, 2005). Outra prova disso foi um modelo experimental em ratos, descrito em 2000, que pode refletir uma infecção latente em um hospedeiro inerentemente resistente como o homem. Nesse modelo experimental, a infecção pulmonar foi controlada sem disseminação, porém células criptocócicas permaneceram viáveis por pelo menos 18 meses em granulomas intersticiais dentro de macrófagos e de células epitelióides. A administração de imunossupressores como corticosteróides resultaram na presença de leveduras extracelulares e infecção extrapulmonar disseminada (Goldman *et al.*, 2000; Binamic & Harrison, 2005).

De qualquer maneira, a maioria dos casos de meningite criptocócica ocorre na África subsaariana (em torno de 720 mil casos), onde *Cryptococcus* sp. é o principal agente causador de meningite em adultos. A meningite criptocócica é uma das principais causas de óbito em pacientes HIV/AIDS nessa região da África, sendo ainda mais letal do que a tuberculose em relação ao número de óbitos por ano. A mortalidade por criptococose nos países desenvolvidos é estimada em 10%, podendo chegar a 43% em países em desenvolvimento como a Tailândia e um tempo médio de sobrevivência de 14 dias (Moretti *et al.*, 2008).

No Brasil, dentre as micoses sistêmicas, a criptococose tem sido relatada como a mais prevalente em termos de internação. Dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS) mostram que a criptococose apresentou o maior

número de internações no período de 2000 a 2007. Nas regiões sul e sudeste do Brasil, a criptococose associada à AIDS é a forma predominante e é causada pela variedade *neoformans*, com letalidade em torno de 35 a 40%. As infecções causadas pela variedade *gattii* importados ou não de outras regiões do país ocorrem esporadicamente nessas duas regiões brasileiras (Vigilância Epidemiológica da Criptococose, 2011).

Na última década, um grande número de técnicas de tipagem de DNA tem sido utilizado para estudar a epidemiologia do *C. neoformans*. Essas técnicas incluem cariotipagem, amplificação randomizada de DNA polimórfico, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), estudos de hibridização de DNA, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e reação em cadeia de polimerase *fingerprinting* (PCR *fingerprinting*) (Varma & Kwon-Chung, 1992; Crampim *et al.*, 1993; Currie *et al.*, 1994; Spitzer & Spitzer, 1994; Brandt *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1999). O PCR *fingerprinting* tem sido utilizado como a principal técnica de genotipagem na pesquisa molecular global para o estudo epidemiológico de *C. neoformans* (Meyer *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2000), dividindo mais de 400 isolados clínicos e ambientais em 8 principais tipos moleculares: VNI (var. *grubii*, sorotipo A), VNII (var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (var. *gattii*, sorotipos B e C). Nenhuma correlação entre o sorotipo e o tipo molecular foi encontrado para *C. neoformans* var. *gattii*. Os tipos moleculares foram confirmados pela técnica de RFLP através da análise dos genes da orotidinamonofosfatopirofosforilase (URA5) e da fosfolipase (PLB1) (Meyer *et al.*, 2002). Globalmente, a maioria das infecções em hospedeiros imunocomprometidos são causadas pelo *C. neoformans* var. *grubii* (Mitchell & Perfect, 1995; Casadevall & Perfect, 1998; Meyer *et al.*, 1999).

Em nosso país, alguns estudos já foram realizados com o objetivo de avaliar a epidemiologia dos isolados de *Cryptococcus neoformans*. Por exemplo, no Rio Grande do Sul (RS), Casali e colaboradores (2003) analisaram um total de 124 isolados (105 isolados clínicos e 19 isolados ambientais) de *C. neoformans* provindos de diversos lugares do estado e encontraram uma prevalência de 97,9% (91 isolados) do genótipo VNI, ao qual pertence o *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) dos 105 isolados clínicos (Casali *et al.*, 2003). Em 2008, Trilles *et al.*, realizaram um estudo utilizando um total de 443 isolados (320 isolados de *C. neoformans* e 123 isolados de *C. gattii*) de várias regiões do Brasil. De uma forma geral, os genótipos VNI (64%) e VGII (21%) foram os mais prevalentes, seguidos dos genótipos VNII (5%), VGIII (4%), VGI

e VGIV (3% cada) e VNIII (<1%). O genótipo VGIV não foi identificado entre os isolados deste estudo (Trilles *et al.*, 2008).

A criptococose foi descrita em 1970 como “um gigante adormecido” entre as micoses sistêmicas (Ajello, 1970; Negroni, 2012). Alguns anos mais tarde, outros autores descreveram essa micose não mais como “um gigante adormecido”, mas sim como “um gigante verdadeiramente despertado” entre as micoses sistêmicas em termos de morbidade e mortalidade (Kaufman & Bulmer, 1978); e desde 1987, a criptococose é a micose sistêmica que apresenta os maiores índices de morbidade e mortalidade. O termo “criptococose” inclui as doenças causadas pelo *C. neoformans* e pelo *C. gattii* e ambas as formas são consideradas infecções graves e o SNC é frequentemente afetado (Negroni, 2012).

3.3 Neurocriptococose

A contaminação pelo *Cryptococcus* sp. ocorre geralmente através da inalação dos esporos suspensos no ar, o que leva posteriormente à infecção primária do sistema respiratório, acometendo mais frequentemente a cavidade nasal do que propriamente os pulmões (Malik *et al.*, 1997; Honsho *et al.*, 2003; Pereira & Coutinho, 2003; Kommerset *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2008). Estudos sorológicos sugerem que a maioria dos indivíduos são expostos a esse fungo após os primeiros 2 anos de vida (Goldman *et al.*, 2001; Binamic & Harrison, 2005), contudo, as circunstâncias precisas e a frequência de exposição, bem como a ecologia deste microrganismo ainda não estão completamente compreendidas (Stephen *et al.*, 2002; Binamic & Harrison, 2005).

Grande parte das infecções pulmonares é assintomática ou apresenta sintomas leves, mas já foram relatados focos de infecção latente nos pulmões ou nos linfonodos em forma de granuloma compacto com cápsula fibrosa e poucos fungos viáveis. A partir dessas fontes, a reativação da criptococose pode ocorrer quando os mecanismos imunológicos falham (Salfelder *et al.*, 1990; Casadevall & Perfect, 1998; Negroni *et al.*, 2012). A partir desse sítio primário, o fungo pode disseminar-se sistemicamente por via linfática ou hematogênica, porém essa disseminação depende do quadro clínico em si e do estado imunológico do hospedeiro (Nelson & Couto, 2001; Honsho *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 2003; Taboada, 2004; Queiroz *et al.*, 2008).

A criptococose pode se apresentar como uma doença pulmonar crônica, uma condição extrapulmonar unifocal com manifestações cutâneas ou neurológicas, ou um

processo disseminado (Palmieri *et al.*, 2009; Negroni, 2012), porém a meningoencefalite é a forma clínica mais comum e ocorre em mais de 80% dos casos, de forma isolada ou com acometimento pulmonar (Rozenbaum & Gonçalves, 1994; Moretti *et al.*, 2008).

O *Cryptococcus* possui tropismo pelo SNC, pois ele utiliza as catecolaminas para o seu desenvolvimento. Este fator, juntamente com a incapacidade do tecido cerebral de gerar uma resposta inflamatória eficaz, faz deste órgão um alvo suscetível para essa infecção (Bava *et al.*, 1997; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Negroni, 2012). Ambas as espécies causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renais, entre outros (Moretti *et al.*, 2008). Em humanos, essa infecção é mais freqüente em adultos, mas apesar de rara pode afetar crianças. A neurocriptococose em pacientes não portadores do vírus do HIV pode se manifestar como uma meningoencefalite subaguda ou crônica, que particularmente afeta os gânglios basais, semelhante a uma massa que ocupa o cérebro, ou então como uma meningiomielorradiculite. Quando não há um envolvimento sério da imunidade, os sinais são: com dores de cabeça, alterações de comportamento, hipertermia leve, fadiga e sonolência. Problemas visuais, visão borrada ou diplopia, convulsões, vômitos, e finalmente, a síndrome meníngea, às vezes incompleta, podendo ocorrer mais tarde. Também pode ocorrer a paralisia dos nervos cranianos, especialmente o sexto nervo. Papiledema, e coroidite são sintomas frequentemente observados.

O diagnóstico muitas vezes é feito alguns meses após o início dos sintomas. O aspecto do LCR geralmente é límpido e incolor, com um aumento no nível de proteínas, hipoglicorraquia e pleocitose, predominantemente linfocítica; a presença de mais de 200 células por mililitro é rara (Baddley & Dismukes, 2003; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Palmieri *et al.*, 2009; Viviani & Tortorano, 2009; Negroni, 2012). O aumento da incidência da AIDS foi acompanhado pelo aumento da incidência de criptococose (Pappalardo & Melhem, 2003. Queiroz *et al.*, 2008). Isso se torna especialmente preocupante uma vez que, no caso dos pacientes imunocomprometidos, em particular os pacientes com AIDS, a meningoencefalite está presente em mais de 90% dos casos, porém com um curso mais agudo (Hospenthal & Bennett, 2001; Moretti *et al.*, 2008).

Os sintomas comuns incluem cefaléia, febre e por vezes, vômitos, convulsões, fotofobia e alterações de consciência. A síndrome meníngea é incompleta e leva apenas a uma rigidez do pescoço e paralisia do nervo craniano. Esses pacientes raramente

apresentam sinais focais, como paralisia do nervo abducente, afasia, síndrome cerebelar, e paralisia dos membros. A persistência das dores de cabeça e febre por uma semana deve ser avaliada através da análise do LCR. No momento da punção lombar, a pressão de abertura deve ser medida; se ela for superior a 25 cmH₂O, o paciente possui riscos de complicações graves como hérnia bulbar, convulsões ou perda da visão (Negroni, 2012). Outras lesões intracranianas podem estar relacionadas à neurocriptococose, como os cistos mucinosos, a dilatação dos espaços de Virchow-Robin, a meningite circunscrita, o criptococoma, a forma granulomatosa miliar, o realce meníngeo, a ependimite, a ventriculite e a hidrocefalia (Hospenthal & Bennett, 2001; Moretti *et al.*, 2008).

No tratamento das formas graves da criptococose, especialmente as que acometem o SNC, sendo o paciente imunossuprimido ou não, a fase de indução tem como função a negatar ou a reduzir a carga fúngica, sendo então de 2 semanas o período mínimo de tratamento. A fase de consolidação dura aproximadamente 8 semanas e compreende a manutenção da negatividade micológica e normalização de parâmetros clínicos e laboratoriais. Então, segue-se a fase de supressão (também denominada de manutenção), por no mínimo 1 ano, com tempo adicional que pode variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro (Moretti *et al.*, 2008). O tratamento de escolha para a neurocriptococose é feito com associação de AMB deoxicolato dada por via intravenosa (IV) a uma dose de aproximadamente 0,7 mg/kg diariamente, e 5-FC por via oral (VO) em uma dose de 25 mg/kg a cada 6 horas. Esse tratamento é mantido por 3 semanas em pacientes aidéticos e por 6 semanas em pacientes HIV-negativos (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Nguyen *et al.*, 2002; Baddley & Dismukes, 2003; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Negroni, 2012).

No Brasil, a terapia antifúngica de indução para a neurocriptococose é igual para pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, com AMB (0,7 a 1,0 mg/kg, I.V., diariamente) e 5-FC (100 mg/kg, V.O., diariamente), por 2 semanas. A consolidação é feita com FCZ (400 mg por dia, V.O.) por um período que varia entre 6 e 10 semanas para pacientes não portadores do vírus do HIV (Saag *et al.*, 2000; Pappas *et al.*, 2001; Moretti *et al.*, 2008) e seguido por 10 semanas em pacientes com HIV ou outra forma de imunossupressão (Van der Horst *et al.*, 1997; Brouwer *et al.*, 2004; Bicanic *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2008), estando disponíveis esquemas alternativos para ambos os grupos (Moretti *et al.*, 2008).

Para a profilaxia, não há medidas preventivas eficazes, portanto, pacientes imunocomprometidos devem evitar áreas contaminadas, principalmente por fezes de pássaros (Negroni, 2012).

4. Fisiologia da barreira hematoencefálica

O SNC é considerado um compartimento à parte em nosso organismo e é protegido por três elementos estruturais que controlam e regulam a homeostase do cérebro, medula espinhal e LCR com o resto dos sistemas (Hawkins *et al.*, 2005; Banks, 2009). É um sistema isolado da circulação sistêmica e com acesso altamente restrito, uma vez que o mesmo é envolvido por uma camada celular firmemente conectada entre si por junções oclusivas (também conhecidas como *tight junctions*). Essa camada age como uma verdadeira membrana lipídica, formando duas barreiras: a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira hemato-liquórica (BHL) (De Vries *et al.*, 1997). Anatomicamente, a BHE é uma vasta rede de aproximadamente 650 quilômetros de microcapilares, cada um possuindo um lúmen de aproximadamente 6 milímetros de diâmetro (Zlokovic *et al.*, 1995; Zlokovic *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 2005; McCaffrey *et al.*, 2012).

O conceito de BHE surgiu no final do século XIX, na Alemanha, através de experimentos do cientista Paul Ehrlich, através de injeções de corantes em animais, tanto na circulação arterial como na circulação venosa e todos os órgãos, exceto o cérebro e a medula espinhal se coravam, o que levou à hipótese de dois compartimentos, mas somente no século XX, Edwin Goldmann injetou azul de tripano intravenosa e subcutaneamente. O azul de tripano corou o plexo coróide e a dura máter, mas não entrou substancialmente no LCR. Reciprocamente, após uma injeção direta de azul de tripano no LCR, o cérebro e medula espinhal ficaram corados, indicando então a ausência de uma barreira difusional entre o LCR e o tecido cerebral (Goldmann, 1909; Goldmann, 1913; Nau *et al.*, 2010), mas somente na década de 60 identificaram-se os capilares do SNC e as células endoteliais como o sítio da BHE (Davson, 1976).

As células endoteliais, as ocludinas, as claudinas, os astrócitos, o pericito, e a matriz extracelular são componentes desse complexo sistema. As células endoteliais consistem em uma barreira formada pela presença das junções endoteliais que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula (Stamatovic *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2011), além disso, esse endotélio se distingue do endotélio

capilar do restante do organismo por diversas características específicas: não é fenestrado; possui junções oclusivas que conectam os espaços intercelulares, restringindo a passagem de qualquer substância com diâmetro superior a 10 a 15 Å; a ausência quase total de vesículas pinocitóticas intracitoplasmáticas, o que impede o transporte transcelular; e por possuir grande quantidade de mitocôndrias na sua porção luminal (Janzer *et al.*, 1993; De Vries *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2011).

As ocludinas foram as primeiras proteínas integrais de membrana identificadas nas junções oclusivas das células endoteliais. Seu domínio citoplasmático carboxi terminal fornece a conexão da ocludina com o citoesqueleto, o que assegura uma alta resistência elétrica das monocamadas de células endoteliais e diminui a permeabilidade paracelular (Persidsky *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2011). As claudinas também são proteínas integrais, porém menores do que as ocludinas em termos de peso molecular (claudinas possuem peso molecular de 21 – 28 kDa e as ocludinas possuem peso molecular de 65 kDa) e são responsáveis pela regulação da seletividade paracelular aos íons pequenos (Ohtsuki *et al.*, 2007; Findley *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2011). Os astrócitos são células gliais em forma de estrela e geralmente apresentam-se em número muito superior ao número de neurônios (em torno de 10 vezes) e possuem um papel importante no controle do tônus vascular (Giaume *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011). Os pericitos comunicam-se diretamente com as células endoteliais e essa comunicação tem se mostrado crítica para a regulação da BHE através de estudos *in vitro* (Daneman *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011).

Alguns estudos também têm demonstrado que os pericitos expressam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular e metaloproteinases de matriz que regulam a integridade da BHE (Thanabalasundaram *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011). Outro componente importante é o espaço extracelular, o qual representa aproximadamente 20% do volume total do cérebro e é preenchido com uma matriz extracelular altamente organizada, localizada na interface entre vasos sanguíneos e a glia. O papel principal da matriz extracelular aparentemente é o de ancoramento, juntamente com o epitélio, através de interações de proteínas da matriz extracelular com os receptores endoteliais tipo integrinas (Bazzoni *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2011), cuja função se dá na sinalização celular, migração e formação capilar cerebral durante a angiogênese (Zlokovi, 2008; Rojas *et al.*, 2011).

A principal função da BHE é a de servir como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre o sangue e o SNC. A impermeabilidade da BHE é o

resultado de uma série de características únicas, que acrescenta dificuldade às moléculas que tentam penetrar nesta barreira. Esta propriedade é baseada na existência de uma permeabilidade muito restrita do endotélio, além da presença de enzimas degradantes presentes em grande número no interior deste endotélio de modo que, com exceção de água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis muito pequenas podem passar de forma íntegra (Banks, 2010; Rojas *et al.*, 2011). As moléculas hidrofílicas, que são essenciais para o metabolismo do cérebro, tais como íons, glicose, aminoácidos e componentes de ácido nucléico, passam pela BHE através de canais especializados (Begley & Brightman, 2006; Rojas *et al.*, 2011).

A transferência de algumas moléculas é regulada por transportadores de múltiplas drogas, os quais podem limitar as suas concentrações dentro do SNC. Os transportadores de múltiplas drogas são proteínas de transporte que exploram a hidrólise do ATP (trifosfato de adenosina) para canalizar moléculas através das membranas lipídicas. Eles também facilitam o transporte de moléculas para dentro das células, mas podem também evitar o acúmulo de moléculas dentro do espaço intersticial. Os transportadores de múltiplas drogas e a glicoproteína-P (Pgp) são expressos na BHE e limitam o acesso das drogas ao tecido cerebral (Abbott & Friedman, 2012; Serlin *et al.*, 2015). Recentes estudos sugerem que a supra-regulação dos transportadores de moléculas em condições patológicas podem reduzir os níveis das drogas no cérebro, explicando assim a falha terapêutica (farmacorresistência) em doenças neurológicas e psiquiátricas (Potschka, 2010; Serlin *et al.*, 2015). A BHE também possui funções importantes como função neuroimune, com a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (Banks, 2010²).

5. Hipertensão intracraniana e a meningite criptocócica

O conteúdo intracraniano é composto de tecido cerebral (80%), LCR (10%) e sangue (10%) (Shapiro K, 1997; Giugno *et al.*, 2003). O volume de LCR estimado gira em torno de 150 mL em adultos, sendo que 125 mL ficam entre o espaço subaracnóide e crânio e o restante (25 mL) encontram-se nos ventrículos, porém com diferenças interindividuais. A produção de LCR em adultos varia entre 400 e 600 mL por dia, dependendo do método utilizado para estudar essa produção. De 60 a 75% do LCR é produzido pelos plexos coróides dos ventrículos laterais e pela tela coróideia do terceiro e quarto ventrículos (Sakka *et al.*, 2011). A circulação do LCR é um fenômeno

dinâmico e sua regulação é responsável pela homeostase cerebral. O LCR circula dos sítios de produção para os sítios de absorção, com um fluxo unidirecional em cavidades ventriculares e fluxo multidirecional em espaços subaracnóides. Após ser produzido pelos plexos coróides nos ventrículos laterais, o LCR atravessa o forame interventricular em direção ao terceiro ventrículo, então viaja em direção ao quarto ventrículo através do aqueduto cerebral e por fim alcança o espaço subaracnóide através de uma abertura mediana (forame de Magendie) do quarto ventrículo. No espaço subaracnóide, o LCR circula até os locais de absorção ou para o espaço subaracnóide da coluna vertebral (Zervas *et al.*, 1982; Sakka *et al.*, 2011).

A pressão do LCR é definida como pressão intracraniana na posição de pronação e é o equilíbrio dinâmico entre produção e absorção de LCR e a dificuldade (resistência) do fluxo (Büki *et al.*, 2002; Chomicki *et al.*, 2007; Traboulsi & Avan, 2007; Sakka *et al.*, 2011). Essa pressão é aquela encontrada no interior da caixa craniana, tendo como referência a pressão atmosférica (Marmarou & Tabaddor, 1993; Carlotti *et al.*, 1998). A pressão intracraniana tem uma variação fisiológica de 5 a 15 mmHg (em torno de 68 a 204 mmH₂O) para adultos e de 3 a 4 mmHg (correspondendo a em torno de 41 a 54 mmH₂O) em crianças (Lee & Hoff, 1996; Carlotti *et al.*, 1998; Sakka *et al.*, 2011), refletindo o conteúdo da caixa craniana e o volume do crânio. Qualquer alteração do volume de algum desses conteúdos pode causar HIC (Carlotti *et al.*, 1998), que é o aumento dessa pressão no interior da caixa craniana.

A HIC é uma consequência severa do edema cerebral após uma variedade de injúrias cerebrais, tais como processos isquêmicos ou traumáticos, que podem ameaçar a perfusão do cérebro inteiro. As alterações líquóricas que levam à HIC geralmente estão associadas com a obstrução da circulação líquórica em qualquer ponto de sua via ou então com a dificuldade de reabsorção do LCR (Carlotti *et al.*, 1998).

O controle da HIC é um parâmetro crítico no manejo das infecções criptocócicas do SNC (Garbyll *et al.*, 2000; De Vedia *et al.*, 2013). Aproximadamente 50% dos pacientes com meningite criptocócica apresentam pressão intracraniana elevada (> 250 mmH₂O), atribuível à alta carga fúngica e também à falta de resposta imunológica adequada no LCR (Perfect *et al.*, 2010; De Vedia *et al.*, 2013). No ano 2000, a diretriz da *American Society of Infectious Diseases* (IDSA) sugeriu que fosse feito um rígido controle da pressão intracraniana (Saag *et al.*, 2000; De Vedia *et al.*, 2013), mas os vários relatos de vários centros que lidam com a alta complexidade dessa condição chamam atenção para a falta de cumprimento dessas

recomendações (Pappas, 2005; Shoham *et al.*, 2005; De Vedia *et al.*, 2013). A HIC é frequentemente considerada assintomática devido à sua clínica ser um pobre marcador para a pressão intracraniana (Garbyll *et al.*, 2000; De Vedia *et al.*, 2013). A principal intervenção utilizada para reduzir a HIC é a drenagem lombar percutânea de LCR (Denning *et al.*, 1991; De Vedia *et al.*, 2013), pois reduzir a pressão intracraniana a níveis normais é essencial para diminuir a morbi-mortalidade causada pela meningite criptocócica (Garbyll *et al.*, 2000; De Vedia *et al.*, 2013), situação que ainda ocorre com frequência em pacientes acometidos pela meningite criptocócica, considerando os estudos que associam a HIC à alta mortalidade nesse pacientes (Powderly, 1997; De Vedia *et al.*, 2013).

Em pacientes com meningite criptocócica, a HIC pode ocorrer devido a vários fatores: a cepa causadora da meningite, a severidade da infecção, e/ou a conformação e capacidade de um dado paciente de absorver o LCR, por causa da viscosidade do LCR, a qual normalmente encontra-se aumentada e impede sua própria passagem, ou então podemos ter a formação de um tampão polissacarídico microscópico que pode bloquear diretamente o fluxo de LCR (Small *et al.*, 1986; Denning *et al.*, 1991). Um grande número de células leveduriformes normalmente está presente nos casos de meningite criptocócica no LCR e nas meninges, especialmente em pacientes imunossuprimidos, e esse tipo celular é substancialmente maior do que as hemácias, portanto as células leveduriformes podem bloquear os canais e válvulas das vilosidades subaracnóides. Além disso, variações na capacidade de absorção do LCR intra-individuais podem influenciar o desenvolvimento da HIC.

Outra hipótese, mesmo que seja improvável, é a de que a meningite criptocócica por si só seria capaz de alterar a taxa de produção de LCR, a qual se estiver aumentada e sem uma absorção adequada, pode levar ao quadro de HIC devido à resistência para a saída do LCR; uma taxa reduzida de escoamento do LCR é também um fator importante na indução da HIC (Denning *et al.*, 1991). Em condições normais, se houver resistência para o LCR sair, a produção dele também diminui (Scheld *et al.*, 1980).

No contexto das doenças infecciosas do SNC, até o presente momento, não há publicações que relatem o papel da pressão intracraniana na penetração ou biodisponibilidade de agentes antimicrobianos no LCR. A pressão intracraniana elevada pode representar um obstáculo para uma penetração de drogas eficiente no SNC. A penetração de drogas contra o gradiente de pressão tem sido bastante estudado na

biologia de tumores sólidos. Estudos experimentais *in vivo* documentaram que a pressão intracraniana está aumentada na maioria dos casos de tumores sólidos e essa questão representa a maior dificuldade na transferência de quimioterápicos do sangue para o tumor (Jain, 1997; Lo *et al.*, 2001). É também possível que questões similares possam ser importantes na penetração de drogas em um cérebro danificado. Em um modelo experimental em gatos de isquemia cerebral focal, Hatashita & Boff mediram a pressão intracraniana e a resistência hidráulica em um tecido edematoso e concluíram que as pressões intracranianas induzidas por um edema podem representar um grande obstáculo à penetração eficiente de drogas por via intraventricular. Deste modo, edema cerebral e pressões intracranianas elevadas são fatores a serem considerados no que diz respeito à penetração de drogas, especialmente nas circunstâncias de danificação cerebral durante o acidente vascular e trauma (Hatashita & Boff, 1988; Lo *et al.*, 2001).

6. Fatores que influenciam a concentração de drogas no SNC em humanos

Após a injeção intravenosa, a maioria das drogas possui maior concentração no LCR da região lombar do que no LCR da região ventricular; e a injeção de drogas no LCR da região lombar frequentemente não produz concentrações terapêuticas no LCR das regiões cisternal e ventricular (Kaiser & McGee, 1975; Shapiro *et al.*, 1975; Nau *et al.*, 2010). O tempo de meia-vida parece ser maior após uma injeção no LCR lombar do que no LCR ventricular: o tempo de meia-vida de um composto hidrofílico radioativo injetado no LCR lombar foi estimado entre 12,4 e 131,1 horas (Nau *et al.*, 1993; Nau *et al.*, 2010). Por outro lado, o tempo de meia-vida de uma droga hidrofílica de molécula grande, como a vancomicina, após a injeção intraventricular, variou de 3,0 a 20,5 horas (Reesor *et al.* 1988; Pfausler *et al.*, 1997; Pfausler *et al.*, 2003; Nau *et al.*, 2010). Nenhuma barreira difusional separa o espaço intersticial do tecido nervoso e o LCR, e até moléculas grandes vindas do espaço liquórico podem penetrar no espaço intersticial do tecido por difusão (Reese *et al.*, 1971; Nau *et al.*, 2010). A troca entre o espaço liquórico e o espaço intersticial do cérebro foi estudada em um paciente que recebia anfotericina B intraventricularmente; o espaço liquórico foi estimado em 139 mL, enquanto que o volume de distribuição no tecido nervoso foi estimado em 677 mL, e a transferência constante entre ambos os espaços foi de 0,78/hora, correspondendo a um tempo de meia-vida de 0,9 horas para a troca entre ambos os compartimentos (Atkinson & Bindschadler, 1969; Nau *et al.*, 2010).

Aproximadamente dois terços (2/3) do LCR produzido pelos plexos coróides como um fluido ultrafiltrado com baixas concentrações de proteínas plasmáticas e drogas; um terço (1/3) do LCR se origina do espaço extracelular do cérebro e medula espinhal e existe um fluxo contínuo dentro do espaço extracelular do cérebro e medula espinhal em direção ao espaço liquórico, o que impede o igualamento de concentrações de drogas no espaço liquórico e no fluido extracelular do tecido nervoso por difusão. Humanos e animais diferem consideravelmente no que diz respeito à relação entre produção de LCR e volume do espaço liquórico (a razão de ambos os parâmetros é bastante aumentada em animais pequenos). Por esta razão, os dados quantitativos derivados de animais são difíceis de relacionar com humanos (Nau *et al.*, 2010)

Atualmente, para muitos compostos, após a administração sistêmica, a concentração da droga no espaço intersticial do tecido nervoso está relacionada com a concentração liquórica. Ambas as concentrações devem ser da mesma ordem de magnitude. As concentrações de drogas encontradas em homogeneizados de cérebro não refletem as concentrações do espaço extracelular, mas refletem uma concentração média de vários compartimentos dependendo de como o homogeneizado foi preparado, como a droga de interesse foi extraída, e por qual método de quantificação a mensuração foi feita (Nau *et al.*, 2010).

O objetivo farmacológico da administração da terapia antimicrobiana é alcançar concentrações adequadas do fármaco no sítio da infecção. Os tecidos do SNC e dos olhos, contudo, são tecidos relativamente protegidos devido às barreiras que limitam a difusão de muitas moléculas. Além disso, existem as bombas de efluxo teciduais que podem impactar no acúmulo de drogas no SNC. Para que as drogas penetrem no LCR e no parênquima cerebral, os compostos precisam atravessar a camada epitelial do plexo coróide ou o endotélio cerebral. Essa barreira tecidual é estruturalmente diferente de outras barreiras devido ao tamanho das conexões intercelulares através das quais as drogas passam. Todos os outros tecidos possuem conexões celulares abertas para qual o espaço entre as células é de 100Å, permitindo a pronta difusão da maioria das moléculas farmacológicas (Kethiredy & Andes, 2007).

Um fator de grande influência na penetração de fármacos no SNC é a presença ou ausência de inflamação na BHE. As concentrações de drogas medidas na ausência de inflamação das meninges representam a concentração mínima que pode ser encontrada no início do curso de uma infecção no SNC ou durante a sua resolução. Por esta razão, é

necessário alcançar concentrações efetivas de drogas nos compartimentos do SNC não somente na presença como também na ausência de inflamação meníngea. A entrada de drogas no LCR e no espaço extracelular, incluindo os antibióticos, depende de fatores como: tamanho molecular, lipofilicidade, grau de ligação às proteínas plasmáticas, afinidade por bombas de efluxo, polaridade e fluxo sanguíneo cerebral (Kethirredy & Andes, 2007; Nau *et al.*, 2010).

O peso molecular é um fator óbvio, pois quanto maior for a molécula, menos ela irá penetrar no SNC através das junções oclusivas, e, conseqüentemente, menor será concentração esperada no SNC. A lipofilicidade de um composto aumenta sua habilidade de penetração no SNC através da BHE, uma vez que os compartimentos do SNC são circundados por pelo menos uma camada de células e duas membranas lipídicas por células, ligadas predominantemente pelas junções oclusivas (Nau *et al.*, 2010).

Os capilares do cérebro são desprovidos de poros aquosos para facilitar a difusão aquosa, portanto, a difusão lipídica torna-se um determinante crítico na penetração de drogas. O coeficiente de permeabilidade para difusão lipídica é conhecido como partição lipídica:aquosa ou partição octanol:água (Log P) (Andes & Craig, 1999; Katzung, 2004; Kethirredy & Andes, 2007). O coeficiente octanol:água ideal a um pH de 7,4 para difusão do plasma para o LCR varia de 1 a 10, correspondendo a um Log P entre 0 e 1 (Nau *et al.*, 1994; Nau *et al.*, 2010).

Contudo, compostos altamente lipofílicos frequentemente demonstram um alto grau de ligação às proteínas plasmáticas, portanto, as propriedades de lipofilicidade e afinidade pelas proteínas plasmáticas podem ser características conflitantes no que diz respeito à penetração no SNC, pois torna o prognóstico farmacocinético mais difícil. A afinidade por proteínas plasmáticas está associada à alta afinidade pela albumina sérica e esse fator influencia fortemente a entrada de drogas nos compartimentos do SNC. Em geral, acredita-se que na presença de uma barreira intacta, somente a fração livre consegue penetrar livremente, porque proteínas de ligação (em particular albumina e globulinas) atravessam a BHE apenas em pequenas quantidades (Norrby, 1985; Kethirredy & Andes, 2007; Nau *et al.*, 2010).

Após a penetração no SNC, a droga precisa acumular para alcançar níveis terapêuticos adequados. Nesse contexto, as bombas de efluxo presentes no tecido do SNC são capazes de remover moléculas do LCR (Kethirredy & Andes, 2007). A influência desses sistemas nas concentrações das drogas nos compartimentos

intracranianos é variável (Nau *et al.*, 2010). A remoção de compostos neurotóxicos é feita principalmente pela glicoproteína-P (Pgp), uma proteína transportadora abundante na BHE, a qual possui grande influência no sistema de transporte ativo (Nau *et al.*, 2010). A Pgp tem um amplo espectro de ligantes que favorecem compostos lipofílicos. A bomba controla substratos de aproximadamente 300 a 4000 Da em massa (Miller *et al.*, 2008; Nau *et al.*, 2010).

Os únicos compostos antifúngicos que servem como substratos para as Pgps são as drogas da classe dos azólicos, em especial o itraconazol, o triazol que exhibe a afinidade mais significativa por essa proteína (Imbert *et al.*, 2002; Kethirredy & Andes, 2007). Nesse aspecto, o entendimento desses princípios básicos da farmacocinética no SNC, deve permitir a predição sobre a penetração de antifúngicos no SNC e sua acumulação nesse compartimento. Entretanto, a natureza complexa e frequentemente conflituosa dessas várias propriedades fisicoquímicas pode dificultar essas predições.

6.1 Relação entre concentração de antifúngicos e atividade antifúngica

A relação entre concentração da droga e efeito tem sido estudada em modelos animais de meningite. Em infecções fúngicas experimentais do SNC, com a provável exceção da meningite criptocócica, a cura está mais correlacionada com a penetração do antifúngico no parênquima cerebral do que propriamente com a concentração do antifúngico no LCR (Kethirredy & Andes, 2007; Nau *et al.*, 2010).

Por isso, o monitoramento das concentrações de drogas nos órgãos ou tecidos infectados se torna útil para avaliar a eficácia e os efeitos colaterais. Em pacientes com meningoencefalite, a infecção está localizada principalmente no interior do espaço cefalorraquidiano, local onde as drogas antifúngicas muitas vezes não alcançam os níveis adequados, portanto o tratamento torna-se difícil em muitos casos. Por afetar o SNC, a meningoencefalite requer um tratamento apropriado na sua fase inicial para evitar sintomas mais graves (Shoji *et al.*, 2012).

De acordo com o Relatório Técnico denominado Consenso de Criptococose (2008) (*Guidelines in Cryptococcosis – 2008*), a terapia de escolha para a neurocriptococose consiste em AMB, 5-FC e FCZ (fase de consolidação) (Moretti *et al.*, 2008), porém as evidências mostram uma grande variabilidade entre os diferentes agentes antifúngicos no que diz respeito à distribuição desses agentes no SNC.

O agente antifúngico clássico AMB pertence à classe dos poliênicos, possui ação fungicida e é ativo contra a maioria dos fungos de importância clínica (Dismukes, 2006; Drew, 2015). Esse agente antifúngico exerce seu efeito através do impedimento da síntese da parede celular fúngica devido à sua capacidade de se ligar aos esteróis, especialmente o ergosterol, levando à formação de poros que permitem a saída dos componentes celulares. Essa afinidade também pode ser responsável pelos efeitos tóxicos contra as células de mamíferos (McEvoy, 1996; Drew, 2015). A molécula da AMB é uma molécula grande e lipofílica, portanto, seu tamanho impede sua entrada no SNC (Nau *et al.*, 2010).

A farmacocinética da AMB deoxicolato e suas preparações lipídicas no SNC tem sido estudada em modelos experimentais em coelhos com e sem infecção do SNC (Lee *et al.*, 1994; Groll *et al.*, 2000; Kethirredy & Andes, 2007) e as concentrações da AMB não encapsulada foram inferiores a 1% da concentração correspondente em soro ou plasma (Liu *et al.*, 1995; Kethirredy & Andes, 2007).

Em geral, a administração de qualquer uma das formulações de AMB não produz concentrações mensuráveis no LCR independente da existência de inflamação nas meningites causadas por *Candida* sp. ou *Cryptococcus* sp.. Contudo, foram observadas concentrações detectáveis no parênquima cerebral mesmo na ausência de infecção no SNC, mas a penetração desses compostos pode encontrar-se aumentada em duas a quatro vezes quando na presença de infecção (Kethirredy & Andes, 2007). Embora existam muitas barreiras físicas e químicas que impedem a entrada de compostos no cérebro, o processo infeccioso é capaz de alterar a vasculatura normal, possivelmente permitindo a penetração aumentada de agentes como a AMB. Essa situação pode explicar o sucesso terapêutico, embora em geral esse antifúngico possua penetração limitada no SNC (Eltoukhy & Crank, 2010), mas apesar das baixas concentrações no LCR, existe uma grande experiência clínica de sucesso terapêutico com as diferentes formulações da AMB para infecções do SNC em humanos (Kethirredy & Andes, 2007; Nau *et al.*, 2010), embora hajam poucos relatos na literatura sobre a farmacocinética da AMB em humanos.

A 5-FC é um dos antifúngicos mais antigos existentes, um análogo fluorado da citosina. Esse composto foi sintetizado em 1957, como um potente agente anti-tumoral (Duschinski *et al.*, 1957; Vermes *et al.*, 2000). A 5-FC possui melhor atividade contra leveduras, incluindo *Candida*, *Torulopsis* e *Cryptococcus* spp., contra fungos demáceos causadores da cromoblastomicose (*Phialophora* e *Cladosporium* spp.) e *Aspergillus* sp.

(Scholer *et al.*, 1980; Vermes *et al.*, 2000) e não se liga às proteínas plasmáticas, tendo assim uma excelente penetração no SNC (Block *et al.*, 1972; Nau *et al.*, 2010).

Existem poucos estudos que avaliem as concentrações de 5-FC no SNC e LCR em humanos e animais. Em um modelo experimental estudado por O'Connor e colaboradores (2013), encontrou-se uma taxa de 13% de penetração desse fármaco no cérebro em um modelo animal (O'Connor *et al.*, 2013). Em humanos, esse número aumenta consideravelmente, sendo de até 84% da concentração sérica (Brouwer *et al.*, 2007). Essas concentrações ultrapassam a maioria das concentrações necessárias para inibir o crescimento fúngico *in vitro* e isso poderia predizer a eficácia da 5-FC frente a esses agentes fúngicos. Um modelo experimental em coelhos que testou o impacto da dose e da combinação de 5-FC com FCZ não resultou em nenhuma melhora de quaisquer dos parâmetros experimentais quando comparado com o grupo que recebeu apenas FCZ. O mesmo estudo concluiu que com a diminuição da dose de 5-FC, a atividade antifúngica também reduziu, sugerindo um antagonismo em baixas concentrações de 5-FC (Kartaliya *et al.*, 1996). No entanto, a combinação da 5-FC com AMB deoxicolato ou lipossomal continua sendo a terapia de primeira linha para o tratamento da meningite criptocócica (fase de indução) (Perfect *et al.*, 2010; Felton *et al.*, 2014).

Os triazólicos inibem a enzima 14- α -esterol-demetilase do citocromo P450. Essa enzima está envolvida na via de biossíntese do ergosterol, uma molécula essencial da membrana celular fúngica (Zonios & Bennett, 2008). Os antifúngicos triazólicos disponíveis exibem propriedades químicas variadas e diferem no que diz respeito à farmacocinética no SNC. O FCZ é o triazólico que atinge as concentrações mais altas no LCR. Em modelos animais, existe uma variação de concentração líquórica que varia de 41 a 86% da concentração plasmática. No entanto, as concentrações encontradas no cérebro de animais foram mais baixas, variando entre 10 e 50% das concentrações plasmáticas. Em humanos, resultados similares foram encontrados, com concentrações de FCZ no LCR variando de 52 a 85% das concentrações encontradas no plasma desses indivíduos. A grande diferença entre animais e humanos foi a concentração de FCZ encontrada no cérebro. Em humanos, as concentrações variaram de 110 a 142% das concentrações plasmáticas desse fármaco, porém é importante ressaltar que apenas um estudo com humanos relatou concentrações cerebrais de FCZ em mais de 15 anos. Todavia, um estudo de revisão publicado em 2007 relata concentração de FCZ em cérebro humano na proporção de 116% da concentração plasmática. A habilidade do

FCZ em penetrar no SNC e alcançar concentrações elevadas sugere que ele seja eficaz contra muitos patógenos e faz dele uma boa alternativa no tratamento de infecções fúngicas do SNC (Kethirredy & Andes, 2007).

7. Objetivos

7.1 Objetivo principal

Realizar a avaliação da influência da pressão intracraniana na concentração líquórica de antifúngicos (AMB e FCZ) em pacientes com meningite criptocócica internados no HCPA.

7.2 Objetivos secundários

- Determinar as CIMs dos antifúngicos AMB, FCZ, voriconazol e 5-FC de cada isolado provindo pacientes com meningite criptocócica internados no HCPA.
- Correlacionar as CIMs dos isolados de *Cryptococcus* sp. dos pacientes frente aos antifúngicos AMB e 5-FC, das amostras de líquido do dias 0, 7 e 14, com a resposta terapêutica e com os níveis líquóricos de antifúngicos.
- Correlacionar os níveis de antifúngicos encontrados no LCR com a resposta imunológica do paciente (dado coletado do exame citológico do LCR do paciente) para verificar o comportamento da BHE na presença de um número maior de leucócitos e com isso, se a concentração de antifúngico no LCR se torna maior.

8. Referências bibliográficas da revisão da literatura

Abbott NJ, Friedman A. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia*. 2012; 53(Suppl 6):1–6.

Ajello L. The medical mycology iceberg. In: Pan American Health Organization, Proceeding of the International Symposium on the Mycoses, Washington, DC. 1970; p. 3-12.

Andes DR, Craig WA: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in meningitis. *Infect. Dis. Clin. North Am*. 1999; 13 (3): 595 -611.

Arechavala AI, Robles AM, Negroni R, et al. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico en las micosis sistémicas asociadas al sida. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; 35:163-9.8.

Atkinson AJ Jr, Bindschadler DD. Pharmacokinetics of intrathecally administered amphotericin B. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1969; 99:917–924.

Baddley JW, Dismukes WE. Cryptococcosis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Medical mycology*. Oxford: Oxford University Press; 2003. p. 188-205.

Baddley and Dismukes. Cryptococcosis. *Essentials of Clinical Mycology*. Second Edition. Carol A. Kauffmann, Peter G. Pappas, Jack D. Sobel, William E. Dismukes (Editors). 2011. Springer. New York.

Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 2009; 9 Suppl 1:S3.

Banks WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. Review. *Forum Nutr*. 2010; 63:102-10.

²Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*. 2010; 37(1):26-32.

Bava AJ, Negroni R, Arechavala A, et al. Cryptococcosis associated with AIDS in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Mycopathologia* 1997; 140:13-7.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. Review. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):869-901.

Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood–brain barrier. *Prog Drug Res.* 2003; 61:39-78.

Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK, CDC – Centers for Disease Control; National Institutes of Health; Infectious Diseases Society of America. Treating opportunistic infections among HIV infected adults and adolescents. *MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Reports.* 2004; 53 (RR15): 1 – 112.

Berenguer J, Ali NM, Allende MC, et al. Itraconazole for experimental pulmonary aspergillosis: comparison with amphotericin B, interaction with cyclosporin A, and correlation between therapeutic response and itraconazole concentrations in plasma. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38:1303–8.

Bicanic T, Harrison T. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull.* 2005; 18;72:99-118.

Bicanic T, Wood R, Meintjes Grebe, K, Brower A, Loyse A, Bekker LG, Jaffar S, Harrison T. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. *Clinical Infectious Diseases.* 2008; 47:123-130.

Block ER e Bennett JE. Pharmacological studies with 5-flucytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1972; 1: 476 – 482.

Braman RT. Cryptococcosis (torulosis) of prostate. *Urology.* 1981;17:284–5.

Brandt ME, Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner WS. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1890–5.

Brouwer AE, Rajanu Wong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, Harrison TS. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized trial. *Lancet*. 2004; 363:1764-1767.

Brouwer AE, van Kan HJ, Johnson E, Rajanu Wong A, Teparrukkul P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Day N, Harrison TS. Oral versus intravenous flucytosine in patients with human immunodeficiency virus-associated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(3):1038-42.

Büki B, de Kleine E, Wit HP, et al. Detection of intracochlear and intracranial pressure changes with otoacoustic emissions: a gerbil model. *Hear Res*. 2002; 167:180—91.

Byrnes EJ III, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*. 2011; 13: 895 – 907.

Carlotti CG Jr, Colli BO, Dias LAA. Hipertensão intracraniana. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1998; 31: 552-562.

Casadevall, A. and Perfect, J.R. *Cryptococcus neoformans*, 541 pp. ASM Press, Washington, DC. 1998.

Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. ‘Ready made’ virulence and ‘dual use virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol*. 2003; 6, 332–337.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res*. 2003; 3(4): 405-15.

Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am*. 2006; 20:507-44. 10.

Chomicki A, Sakka L, Avan P, et al. Derivation of cerebrospinal fluid: consequences on inner ear biomechanics in adult patients with chronic hydrocephalus. *Neurochirurgie*. 2007; 53:265—71.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

Crampin AC, Mathews RC, Hall D, Evans EG. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1993; 31:463–5.

Crump JR, Elnor SG, Elnor VM, Kauffman CA. Cryptococcal endophthalmitis: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1992; 14: 1069–73.

Currie BP, Freundlich IF, Casadevall A. Restriction fragments length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeons excreta) and clinical sources in New York City. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:1188–92.

Davson H. Review lecture. Yeblood-brain barrier. *J Physiol*. 1976; 255(1):1-28.

De Hoog G. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2001.

De Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol Rev* 1997; 49:143-55.

Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010; 468(7323):562-6.

Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, Hamilton JR, Stevens DA. Itraconazole therapy for cryptococcal meningitis and cryptococcosis. *Arch Intern Med.* 1989;149:2301–8.

Denning DW, Armstrong RW, Lewis BH, Stevens DA. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1991; 91(3):267-72.

De Queiroz-Telles F, Moretti-Bianchini ML. Criptococose. In: Cimerman S, Cimerman B, editors. *Conduas em Infectologia.* Sao Paulo: Atheneu. p. 367-75. 2004.

Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Mylonakis E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2012; 13 (6): 783 – 789.

De Vedia L, Arechavala A, Calderón MI, Maiolo E, Rodríguez A, Lista N, Di Virgilio E, Cisneros JC, Prieto R. Relevance of intracranial hypertension control in the management of *Cryptococcus neoformans* meningitis related to AIDS. *Infection.* 2013; 41(6):1073-7.

Dismukes WE. Antifungal therapy: lessons learned over the past 27 years. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:1289.

Drew RH. Pharmacology of amphotericin B. Kaufmann CA, Thorner AR, editors. *UpToDate.* Wolters Kluwer. 2015.

Duschinsky, R., Plevin, E. & Heidelberger, C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *Journal of the American Chemical Society.* 1957; 79: 4559–60.

Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol.* 2000; 38:173–82.

Eltoukhy NS and Crank CW. Antifungal Distribution Into Cerebrospinal Fluid, Vitreous Humor, Bone, and Other Difficult Sites *Current Fungal Infection Reports.* 2010; Volume 4.Issue 2.pp 111–119.

Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol.* 2014; 27(1):68-88.

Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva M, Rosario R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2000; 33 (1): 75 – 78.

Filiú, W.F.O.; Wanke, B.; Agüena, S.M. *et al.* Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35: 591-595.

Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life.* 2009; 61(4):431-7.14.

Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, Casadevall A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35: 2243–2251.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999; 37: 838 – 840.

Garbyll JR, Sobel J, Saag M, et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:47–54.

Giaume C, Koulakoff A, Roux, L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(2): 87-99.

Giugno KM, Maia TR, Kunrath CL, Bizzi JJ. Tratamento da hipertensão intracraniana. *J. Pediatr.* 2003; 79 (4): 287 – 296.

Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L, Casadevall A. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun.* 2000; 68, 832–838.

Goldman DL, Khine H, Abadi J et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics.* 2001; 107 (5): E66.

Goldmann, E. E. Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der “vitalen Färbung.” *Beitr. Klin. Chirurg.* 1909; 64:192–265.

Goldmann, E. E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. Preußischen Akad. Wiss. Phys. Math.* 1913; Kl. 1:1–60.

Groll AH, Giri N, Petraitis V, et al. Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 2000; 182 : 274 -282.

Hatashita S and Hoff J.T, Biomechanics of brain edema in acute cerebral ischemia in cats. *Stroke.* 1988; 19: 91–97.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(2):173–85.

Henderson HM e Chapman SW. Infections due to Fungi, *Actinomyces* and *Nocardia*. In: Betts RF, Chapman SW, Penn RL, eds. *Reese and Betts' a practical Approach to Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2003; P. 628 – 630.

Honsho C.S., Mine S.Y., Oriá A.P., Benato N., Camacho A.A., Alessi A.C. & Laus J.L. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2003; 55(2):155-159.

Hospenthal DR, Bennett JE. Persistence of cryptococcomas on neuroimaging. *Clinical of Infectious Diseases*. 2000; 31:1303-1306. Erratum in: *Clinical of Infectious Diseases*. 2001; 32: 175.

Imbert F, Jardin M, Fernandez C. Effect of efflux inhibition on brain uptake of itraconazole in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Drug Metab. Dispos.* 2002; 31:319 -325.

Jain R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Microcirculation*. 1997; 4 .1–23.

Janzer RC. The blood-brain barrier: cellular basis. *J Inher Metab Dis*.1993; 16:639-47.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses*.1998; 41:277–80.

Kaiser, A. B., and Z. A. McGee.. Aminoglycoside therapy of Gram-negative bacillary meningitis. *N. Engl. J. Med.* 1975; 293:1215–1220.

Kartalija M, Kaye K, Tureen JH, Liu Q, Täuber MG, Elliott BR, Sande MA. Treatment of experimental cryptococcal meningitis with fluconazole: impact of dose and addition of flucytosine on mycologic and pathophysiologic outcome. *J Infect Dis.* 1996; 173(5): 1216-21. 1996.

Katzung: *Basic and Clinical Pharmacology*. 9th Edition. Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, USA. 2004.

Kaufman L, Blumer S. Cryptococcosis: the awakening giant. In: Pan American Health Organization, *Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses*, Washington, DC. 1978; 176-182.

Kethireddy S e Andes D. CNS pharmacokinetics of antifungal agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2007; 3:573 – 581.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*. 2007;35:51–8.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, et al. Characterization of environmental sources of human pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia Canada and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73:1433-43.

Kommers G.D., Souza T.M., Souto M.A.M., La Corte F.D.&Barros C.S.L. Granulomatous cryptococcal pneumonia in a horse. *Cienc. Rural*. 2005; 35(4):938-940.

Kordosis T, Avlami A, Velegraki A, et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med Mycol*. 1998;36:335–9.

Kwon-Chung KL, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KL, Bennett JE, editors. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea &Febiger; 1992. p. 397-446.

Larsson C.E., Otsuka M., Michalany N.S., Barroa P.S.M., Gambale W. & Safatle A.M.V. Canine ocular cryptococcosis: a case report. *Arq. Bras. Med. Vet.Zootec*. 2003; 55(5):533-538.

Lawrence RM, Hoepflich PD, Jagdis FA, Monji N, Huston AC, Schaffner CP. Distribution of doubly radiolabelled amphotericin B methyl ester and amphotericin B in the non-human primate, *Macaca mulatta*. *J Antimicrob Chemother*. 1980; 6(2): 241-9.

Lazera, M.S.; Salmito-Cavalcanti, M.A.; Londero, A.T et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol*. 2000; 38: 379-383.

Leavitt AD, Kauffman CA. Cryptococcal aortitis. *Am J Med*. 1988; 85:108–10.

Ledingham JGG, Warrell DA. *Concise Oxford Text Book of Medicine*, Oxford University Press. 2000. P. 1727.

Lee JW, Amantea MA, Francis PA et al. Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38 (4): 713 -718.

Lee KR & Hoff JT. Intracranial pressure. In: Youmans JR, ed: *Neurology surgery*. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1996; 1: 491-518.

Lee YC, Wang JT, Sun HY, Chen YC. Comparisons of clinical features and mortality of cryptococcal meningitis between patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2011; 44: 338 – 345.

Liu, H., H. Davoudi, and T. Last. Determination of amphotericin B in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995; 13:1395–1400.

Lo EH, Singhal AB, Torchilin VP, Abbott NJ. Drug delivery to damaged brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 38(1-2): 140-8.

Luna B, Drew RH, Perfect JR. Agents for treatment of invasive fungal infections. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000; 33(2):277-99.

McCaffrey G, Davis TP. Physiology and pathophysiology of the blood-brain barrier: P-glycoprotein and occludin trafficking as therapeutic targets to optimize central nervous system drug delivery. *J Investig Med.* 2012;60 (8): 1131-40.

McEvoy, G (Ed). *American Hospital Formulary Service — 1996.* American Society of Health System Pharmacists, Bethesda, MD, 1996.

Macswen FK, Bicanic T, Brouwer AE, Marsh H, Macallan DC, Harrison TS. Lumbar drainage for control of raised cerebrospinal fluid pressure in cryptococcal meningitis: case report and review. *Journal of Infection.* 2005;51: 221 – 224.

Malessa R, Krams M, Hengge U, Weiller C, Reinhardt V, Volbracht L, Ranhut E, Brockmeyer NH. Elevation of intracranial pressure in acute AIDS – related cryptococcal meningitis. *Clinical Investigation*. 1994; 72: 1020 – 1026.

Malik R., Wigney D.I., Muir D.B. & Love D.N. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 1997; 35(1):25-31.

Marmarou A & Tabaddor K. Intracranial pressure: physiology and pathophysiology. In: Cooper PR, ed. *Head injury*. 3th ed. Williams&Wilkins, Baltimore. 1993; p.159-176.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999; 20:1790–9.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8: 515 – 548.

Meyer W, Kidd S, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Latouche GN, ET al. Global molecular epidemiology offers hints towards ongoing speciation within *Cryptococcus neoformans*. In: Abstracts of the 5th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, Adelaide, Australia, March 3–7, 2002. Adelaide: South Australian Postgraduate Medical Education Association; 2002.

Miller, D. S., B. Bauer, and A. M. Hartz. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2008; 60:196–209.

Mitchell, T.G. and Perfect, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol.* 1995; 8, 515 - 548.

Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Guidelines in cryptococcosis – 2008. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(5):524-44.

Nau, R., D. Emrich, and H. W. Prange. Inverse correlation between disappearance of intrathecally injected ^{111}In -DTPA from CSF with CSF protein content and CSF-to-serum albumin ratio. *J. Neurol. Sci.* 1993; 115:102–104.

Nau, R., F. Sorgel, and H. W. Prange. Lipophilicity at pH 7.4 and molecular size govern the entry of the free serum fraction of drugs into the cerebrospinal fluid in humans with uninflamed meninges. *J. Neurol. Sci.* 1994; 122:61–65.

Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(4):858-83.

Negróni R. Criptococosis. In: Benetucci J, editor. *Sida y Enfermedades Asociadas. Diagnóstico, Clínica y Tratamiento.* 3rd ed. Buenos Aires: FUNDAI; 2008. p. 332-6.

Negróni R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol.* 2012; 30(6):599-609.

Nelson R.W. & Couto C.G. Doenças micóticas polissistêmicas, In: Nelson R.W. & Couto C.G. (eds.). *Medicina Interna de Pequenos Animais.* 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001; p.1023-1030.

Nguyen MH, Clancy J, Husain S. *Cryptococcus neoformans* (cryptococcosis). In: Yu V, Weber R, Raoult D, editors. *Antimicrobial therapy and vaccines.* 2nd ed. New York: Apple Tree Productions, LLC. 2002; p. 1045-57.

Norrby, S. R. Role of cephalosporins in the treatment of bacterial meningitis in adults. Overview with special emphasis on ceftazidime. *Am. J. Med* 1985; 79:56–61.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón A, et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:561-70.

Odds FC, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Warnock DW, Woestenborghs R. Bioassays for itraconazole blood levels: an interlaboratory collaborative study. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43:723–727.

Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2007; 210(1):81-6.

Pfausler, B., H. P. Haring, A. Kampfl, J. Wissel, M. Schober, and E. Schmutzhard. Cerebrospinal fluid (CSF) pharmacokinetics of intra-ventricular vancomycin in patients with staphylococcal ventriculitis associated with external CSF drainage. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 25:733–735.

Pfausler, B., H. Spiss, R. Beer, A. Kampl, K. Engelhardt, M. Schober, and E. Schmutzhard. Treatment of staphylococcal ventriculitis associated with external cerebrospinal fluid drains: a prospective randomized trial of intravenous compared with intraventricular vancomycin therapy. *J. Neurosurg.* 2003; 98:1040–1044.

Palmieri OJ, Corti ME, Laube GE, et al. *Enfermedades Infecciosas*. 3rd ed. OJ Palmieri: Buenos Aires. 2009; p. 591-596.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 2003; 45 (6): 299 – 305.

Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen R A, Pankey GA, Lancaster DJ, Henderson H, Kauffman CA, Haas DW, Saccente M, Hamill RJ, Holloway MS, Warren RM, Dismukes WE. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clinical of Infectious Diseases.* 2001; 33:690-699.

Pappas PG. Managing cryptococcal meningitis is about handling the pressure. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:480–2.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 2009; 23(4):525-530.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. Review. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006; 1(3):223-36.

Pereira A.P.C. & Coutinho S.D.A. Criptococose em cães e gatos – revisão. *Rev. Clin. Vet*. 2003; 8(45):24-32.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infection Diseases Clinical of North American*. 2002; 16:837-874.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50: 291 – 322.

Perkins, A., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L. & Cuenca-Estrella, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 1144–1147.

Polak A. Pharmacokinetics of amphotericin B and flucytosine. *Post-grad. Med. J*. 1979; 55:667–670.

Potschka H. Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches. *Pharmacogenomics*. 2010; 11:1427–1438.

Powderly WG. Current approach to the acute management of cryptococcal infections. *J Infect*. 2000; 41:18–22.

Queiroz, J.P. A. F.; Sousa, F.D.N.; Lage, R.A *et al.* Criptococose: uma revisão bibliográfica. *Acta Vet. Bras.* 2008; 2: 32-38.

Reese, T. S., N. Feder, and M. W. Brightman. Electron microscopic study of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers with microperoxidase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1971; 30:137–138.

Reesor, C., A. W. Chow, A. Kureishi, and P. J. Jewesson. Kinetics of intraventricular vancomycin in infections of cerebrospinal fluid shunts. *J. Infect. Dis.* 1988; 158:1142–1143.

Reolon A; Perez LRR, Mezzar A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2004; 40 (5): 293 – 298.

Ribas, R.C.; Baeza, L.C.; Ribeiro, F.H. M.. Isolation of *Cryptococcus* spp.in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.* 2011; 15: 45-50.

Rojas H, Ritter C, Pizzol FD. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011; 23(2): 222-227.

Rozenbaum R, Gonçalves AR. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. *Clinical of Infectious Diseases.* 1994; 18:369-380.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal meningitis. *Clinical of Infectious Diseases.* 2000; 30:710-718.

Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011; 128(6):309-16.

Salfelder K, de Liscano TR, Sauerteig E. Cryptococcosis. Atlas of fungal pathology. Boston: Kluwer Academic Publishers. 1990; p. 60-72.9.

Salyer WR, Salyer DC, Baker RD. Primary complex of *Cryptococcus* and pulmonary lymph nodes. J Infect Dis. 1974; 130: 74–77.

Scheld WM, Dacey RG, Winn HR, Welsh JE, Jane JA, Sande MA. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. J Clin Invest 1980; 66: 243-53.

Scholer, H. J. Flucytosine. In Antifungal Chemotherapy (Speller, D. C. E., Ed.), Wiley, Chichester. 1980. pp. 35–106.

Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. Semin Cell Dev Biol. 2015; 38:2-6.

Shapiro, W. R., D. F. Young, and B. M. Mehta. Methotrexate: distribution in cerebrospinal fluid after intravenous, ventricular and lumbar injections. N. Engl. J. Med. 1975; 293:161–166.

Shapiro K. Increased intracranial pressure. In: Levin D, Morriss F, Fletcher J. Essentials of pediatric intensive care. 2^a ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone. 1997; p.43-7.

Shoham S, Cover C, Donegan N, Fulnecky E, Kumar P. *Cryptococcus neoformans* meningitis at 2 Hospitals in Washington, DC: adherence of health care providers to published practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Clin Infect Dis. 2005; 40:477–9.

Shoji H, Takuma T, Ohbayashi H, Yoshida K, Yamamoto T, Niki Y. Measurement of antifungal drug levels in cerebrospinal fluid for cryptococcal meningoencephalitis. J Infect Chemother. 2012; 18(5):775-9.

Small JM, Mitchell TG, Wheat RW. Strain variation in composition and molecular size of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect Immun.* 1986; 54(3):735-41.

Souza, L. K., Fernandes, O. F., Kobayashi, C. C. B. A., Passos, X. S., Costa, C. R., Lemos, J. A., Souza-Júnior, A. H. & Silva, M. R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47: 253–256.

Spitzer SG, Spitzer ED. Characterization of the CNRE-1 family of repetitive the DNA elements in *Cryptococcus neoformans*. *Gene.* 1994; 144:103–6.

Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol.* 2008; 6(3):179-92.

Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J.* 2002;43: 792–794.

Taboada J. Micoses Sistêmicas. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. eds.. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato.* 5. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2004; p.478-503.

Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res.* 2010; 1347:1-10.

Traboulsi R, Avan P. Transmission of infrasonic pressure waves from cerebrospinal to intralabyrinthine fluids through the human cochlear aqueduct: non-invasive measurements with otoacoustic emissions. *Hear Res.* 2007; 233:30 - 9.

Trilles L, Lazéra M dos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(5):455-62.

Tucker RM, Denning DW, Arathoon EG, Rinaldi MG, Stevens DA. Itraconazole therapy for nonmeningeal coccidioidomycosis: clinical and laboratory observations. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 23:593–601.

Van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, Johnson PC, Tuazon CU, Kerkering T, Moskovitz BL, Powderly WG, Dismukes WE. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. Treatment of cryptococcal meningitis associated with acquired immunodeficiency syndrome. *New England of Journal Medicine.* 1997; 337:15-21.

Varma A, Kwon-Chung KJ. DNA probes for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:2960–2967.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(2):171-9.

Vigilância epidemiológica da Criptococose. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2012.

Viviani MA, Tortorano AM. Cryptococcosis. In: Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical mycology.* 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Elsevier. 2009; p. 231-49.

Warnock DW, Turner A, Burke J. Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* 1988; 21:93–100.

Zervas NT, Liszczak TM, Mayberg MR, et al. Cerebrospinal fluid may nourish cerebral vessels through pathways in the adventitia that may be analogous to systemic vasa vasorum. *J Neurosurg.* 1982; 56:475—81.

Zlokovic BV. Cerebrovascular permeability to peptides: manipulations of transport systems at the blood-brain barrier. *Pharm Res.* 1995; 12(10):1395–406.

Zlokovic BV, Apuzzo ML. Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery*. 1998. 43(4):877–8.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008. 57(2):178-201.

Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008; 29(2): 198-210.

9. Artigo 1

10. Artigo 2

11. Considerações finais e perspectivas futuras

A HIC pode ser um fator de grande influência no que diz respeito à penetração de fármacos no SNC, porém algumas vezes, na prática clínica, ela é negligenciada, porém a sua mensuração correta no momento da punção lombar é de suma importância para o manejo correto das meningites. É importante ressaltar que em estudos envolvendo tumores do SNC, a HIC é considerada uma barreira para a penetração de fármacos no SNC.

É importante ressaltar que a meningite criptocócica tem emergido nos últimos anos, especialmente devido aos eventos de imunossupressão. Em um hospital de referência como o HCPA, o número de casos por ano é alto e trata-se de uma infecção com alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

Com isso, é importante que mais estudos de seguimento em pacientes com meningite criptocócica sejam realizados, com um número maior de participantes, pois a determinação da CIM e monitoramento terapêutico são fatores muito importantes para a adequação da dose e avaliação da resposta terapêutica. O conhecimento epidemiológico dos isolados mais comumente envolvidos, através de métodos genotípicos também se faz importante no contexto hospitalar para evitar o desenvolvimento de resistência dos isolados aos fármacos disponíveis no mercado.

12. Anexos

12.1 Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos pacientes participantes do projeto – aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando um estudo sobre o aumento da pressão dentro do crânio (hipertensão intracraniana) em pacientes com meningite internados no HCPA. Você (ou o familiar pelo qual você é responsável) está sendo convidado a participar deste estudo por apresentar uma infecção (meningite) que pode causar hipertensão intracraniana. Neste estudo vamos medir a quantidade de medicamento presente no líquido (líquido que se encontra dentro do crânio e na região lombar) para relacionar com os resultados da medida da hipertensão.

Durante o seu tratamento, ou do familiar pelo qual você é responsável, serão solicitadas pela equipe médica, no mínimo três punções para retirada de líquido. Estas punções ocorrerão, pelo menos, no dia da internação, dia 7 e dia 14 após a internação, e se necessário, em outros dias também, dependendo da resposta do paciente ao tratamento. O material coletado (líquor) será encaminhado ao Laboratório de Patologia Clínica do HCPA para exames necessários para a rotina do tratamento de meningite, e, após o uso, poderá ser descartado. Solicitamos sua autorização para utilizar neste estudo o material que poderia ser descartado.

Os procedimentos das punções lombares ocorrerão independentemente do estudo, mas lembramos que as punções lombares apenas ocorrerão no caso de necessidade e nunca para a finalidade apenas desse estudo. Gostaríamos de solicitar também sua autorização para consultarmos o prontuário do paciente, com o objetivo de verificarmos os valores das medições de pressão intracraniana realizadas e demais dados clínicos e resultados de outros exames laboratoriais.

Você ou o familiar pelo qual você é responsável poderão não ter benefício direto com a participação neste estudo, mas estarão contribuindo para o aumento do conhecimento sobre o assunto pesquisado e com o tratamento de pacientes que venham a ter meningite no futuro.

Não são conhecidos riscos pela participação neste estudo, uma vez que os procedimentos de punção fazem parte da rotina assistencial do paciente. Poderá haver algum desconforto em autorizar o acesso ao prontuário. Mas, a participação no estudo é totalmente voluntária e o participante terá total liberdade de retirar o consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do tratamento.

Os resultados da pesquisa serão divulgados em conjunto, apenas para fins científicos, sem que apareça o nome dos pacientes incluídos no estudo.

O participante não terá nenhum custo por participar do estudo e não receberá nenhum pagamento por sua participação.

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável por este Projeto de Pesquisa, Dr. Luciano Zubaran Goldani, no Serviço de Medicina Interna do HCPA, fone 51 33598152; ou com a Dra. Fernanda Wirth, no Laboratório Especial de Doenças Infecciosas, no fone 51 33598836. Você poderá contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA no fone 51 33597640.

Este Termo será assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador.

Nome do paciente ou responsável

Assinatura

Nome do responsável pela obtenção do consentimento

Assinatura

Data: ____/____/____