

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<sup>a</sup> 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 mmH<sub>2</sub>O e 650 mmH<sub>2</sub>O 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 mmH<sub>2</sub>O and 650 mmH<sub>2</sub>O 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

<b>Figura 1</b> .....	19
<b>Figura 2</b> .....	21
<b>Figura 3</b> .....	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

cmH<sub>2</sub>O – 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

mmH<sub>2</sub>O – Milímetros de água

mm<sup>3</sup> - 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  $\geq 200$  mmH<sub>2</sub>O 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/mm<sup>3</sup> 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).

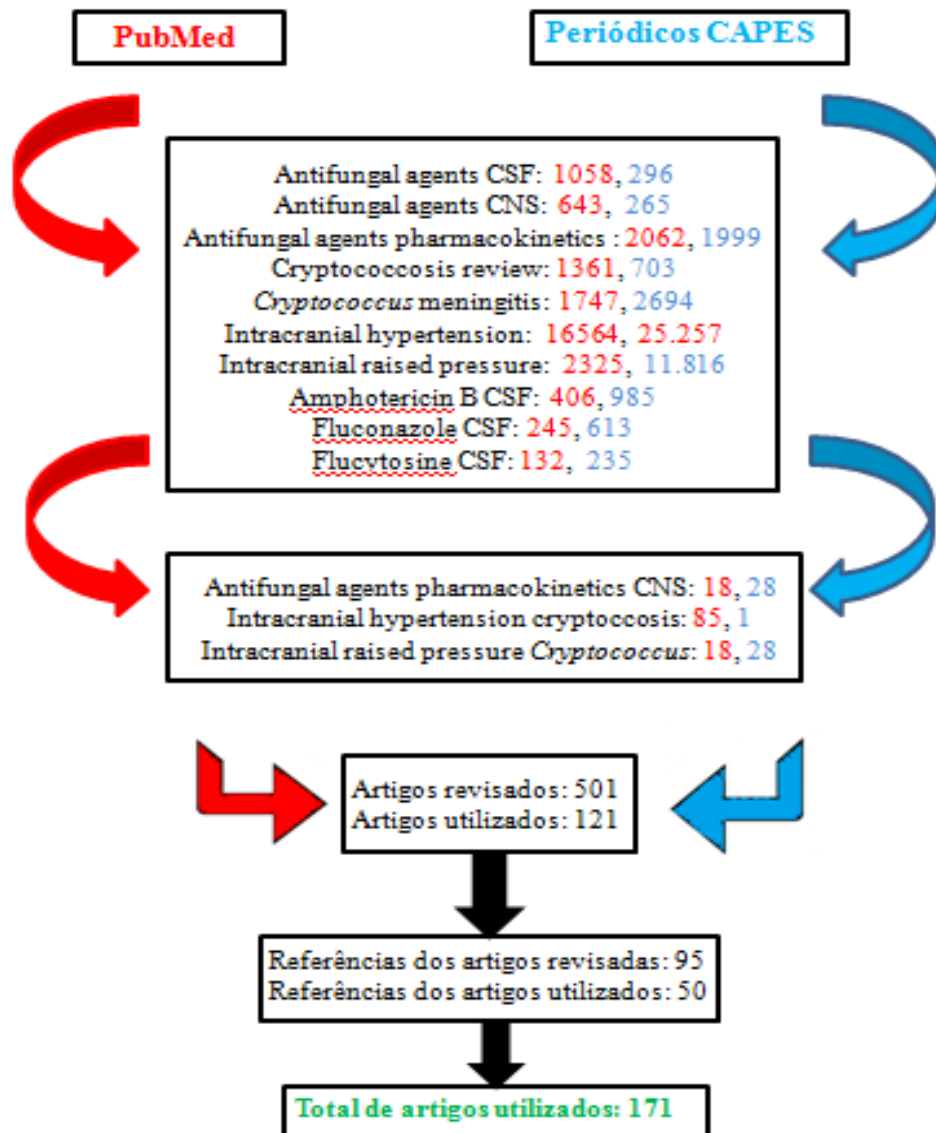
## 2. Revisão da literatura

### 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).

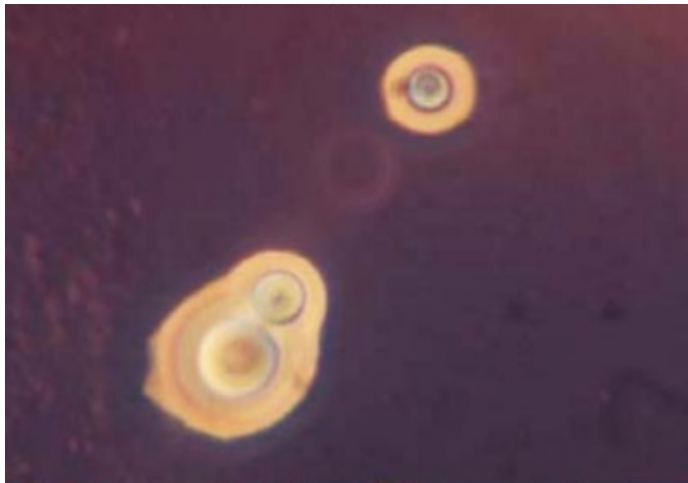
O agente etiológico *C. neoformans* é a forma assexuada do basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*, uma levedura encapsulada (Reolon *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2008), que pode se encontrar dispersa no ambiente, porém seu habitat natural são os lugares úmidos (Ribas *et al.*, 2011) e é considerado 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 cmH<sub>2</sub>O, 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, 2010<sup>2</sup>).

## **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 mmH<sub>2</sub>O) para adultos e de 3 a 4 mmHg (correspondendo a em torno de 41 a 54 mmH<sub>2</sub>O) 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 mmH<sub>2</sub>O), 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 a 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 prever 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- $\alpha$ -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.

<sup>2</sup>Banks 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*. 5<sup>th</sup> 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 <sup>111</sup>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<sup>a</sup> 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

O artigo 1 será submetido para o periódico Medical Mycology, portanto encontra-se nas normas do mesmo.

### **Relationship between intracranial pressure and antifungal agents levels in the CSF of patients with cryptococcal meningitis**

Fernanda Wirth<sup>1,2</sup>, Maria Isabel de Azevedo<sup>3</sup>, Carmen Pilla<sup>4</sup>, Valério Rodrigues Aquino<sup>4</sup>, Gustavo Wissmann Neto<sup>1,2</sup>, Luciano Zubaran Goldani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Ramiro Barcelos, 2400. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Section of Infectious Diseases. Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Maria. Laboratório de Pesquisas Micológicas. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Avenida Roraima, 1000. Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Serviço de Patologia Clínica. Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS, Brazil.

**Running title:** Intracranial hypertension and antifungal levels in the cerebrospinal fluid

**Keywords:** Meningoencephalitis, cryptococcosis, antifungal levels, fluconazole, amphotericin B, *Cryptococcus neoformans*, intracranial hypertension

Address correspondence to:

Luciano Z. Goldani PhD, M.D

Section of Infectious Diseases

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS

Brazil

Phone: 55/51/33598703

Email: [lgoldani@ufrgs.br](mailto:lgoldani@ufrgs.br)

## Abstract

The purpose of this study was to evaluate the influence of intracranial hypertension in the cerebrospinal fluid levels (CSF) of amphotericin B and fluconazole levels of patients with cryptococcal meningitis. CSF samples and intracranial pressure were obtained by means of routine punctures performed at days 1, 7, and 14 of therapy respectively. Amphotericin B and fluconazole CSF levels were measured by HPLC method as previously described. The minimum inhibitory concentration for amphotericin B, fluconazole, 5-flucytosine, and voriconazole of each *Cryptococcus* isolate was performed according to CLSI. The predominant *Cryptococcus* species found was *C. neoformans* and the major underlying condition was AIDS. Only one CSF sample had a detectable level for amphotericin B during the 14 days of therapy.

Fluconazole CSF levels progressively increased from day 1 to day 14 of therapy for most cases. Fluconazole levels in the CSF were above the MICs for *Cryptococcus* during the initial 14 days of antifungal therapy. Variations of intracranial pressure did not affect amphotericin B and fluconazole levels in the CSF. The generalized estimating correlation (GEE) and Spearman correlation test (SCT) showed no significant correlation between the amphotericin B or fluconazole concentrations in the CSF and intracranial pressure ( $p = 0.953$  and  $p = 0.093$ , respectively for GEE test and  $p = 0.477$  and  $p = 0.847$ , respectively for SCT). Combination therapy of amphotericin B with fluconazole was effective in 60% of the patients considering CSF cultures were negative in 9 of 15 patients after 14 days of therapy. Further studies are necessary to evaluate the role of intracranial hypertension on the therapeutic efficacy of different antifungal agents in patients with cryptococcal meningitis.

## Introduction

Cryptococcal meningitis can cause significant morbidity and mortality in the immunocompromised host and invasion of the central nervous system (CNS), which may lead to devastating consequences.<sup>1</sup> More than 50% of the patients with cryptococcal meningitis exhibit intracranial hypertension.<sup>1-5</sup> Approximately 600,000 deaths associated with cryptococcal meningitis occur annually worldwide.<sup>6</sup> Intracranial hypertension is responsible for both early mortality and cognitive sequelae of cryptococcal meningitis.<sup>3, 4, 7</sup> Risk factors for cryptococcal infection include HIV, liver cirrhosis, diabetes mellitus, malignancies, and corticosteroids use. However, the disease

may also occur in immunocompetent hosts who are without any apparent underlying disease.<sup>8</sup>

The treatment of CNS infections is often difficult because the blood-brain barrier limits diffusion of drugs into the CNS and tissue efflux pumps can reduce CNS drug concentrations. In experimental fungal infections of the brain, with the probable exception of cryptococcal meningitis, outcome correlates closer with brain parenchymal antifungal penetration than with antifungal CSF concentrations accumulation.<sup>9</sup> Infectious Diseases Society of America recommends measuring the CSF pressure in patients with cryptococcal meningitis using a manometer for lumbar puncture at initial and follow-up assessment. Intracranial hypertension requires the removal of CSF using lumbar puncture and can even require shunts in refractory cases. The current recommended therapy for cryptococcal meningitis in HIV-infected patients consists of at least 2 weeks of amphotericin B (AmB) in combination with 5-flucytosine (5-FC) followed by fluconazole for a minimum of 8 weeks.<sup>10</sup> However, during this follow-up study, 5-FC was currently not available in Brazil, while fluconazole (FCZ) is widely available, even in a generic formulation or through a donation program.<sup>11</sup> Data regarding the relationship between the pharmacokinetics of FCZ and AmB in the CSF in patients with cryptococcal meningitis and intracranial hypertension is not available in the literature. Considering that intracranial hypertension might affect the penetration and concentration of antifungal agents in the central nervous system, the current recommended dosage for these drugs in this setting would have to be modified. Thus, the purpose of this study was to investigate the relationship between intracranial hypertension and the CSF concentration of AmB and FCZ in patients with cryptococcal meningitis.

## **Methods**

### **Patients and clinical samples**

A follow-up study was performed during January 2015 to December 2015 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary-care hospital in southern Brazil. Patients admitted with meningitis due to *Cryptococcus* sp. were included in the study. Cryptococcal meningitis cases were diagnosed by direct examination and cerebrospinal fluid sample culture. The study was approved by the local ethics committee. An informed consent was signed by the patients or their caregivers. The charts of the patients were consulted during the follow-up period to collect clinical data including

age, sex, underlying disease, opening intracranial pressure, microbiology data and clinical outcome. The CSF samples were collected by lumbar puncture at least 3 times according to the institutional protocol: on the day of diagnosis (D1), on day 7 (D7) and 14 (D14) after diagnosis. During the CSF collection, the opening intracranial pressure was measured with a manometer and the value of each pressure measured was registered on the chart of each patient. We could not obtain CSF samples and the opening intracranial opening pressure in some patients. D1 was used as the blank sample for AmB and FCZ. *C. neoformans* and *C. gattii* isolated from the CSF were identified based on the phenotypic method L-canavanine glycine bromothymol Blue Medium test at the Microbiology Unit as previously described<sup>12</sup>. Minimum inhibitory concentration (MIC) for AmB, FCZ, voriconazole (VRZ) and 5-FC, were assessed according to CLSI guideline M27-A3<sup>13</sup>. AmB (~80%, HPLC powder) and FCZ ( $\geq 98\%$  purity) were purchased from Sigma-Aldrich.

### **Chromatographic Standardization for CSF levels of AmB and FCZ**

A stock solution of 1 mg/mL of each antifungal agent was prepared. The AmB powder was dissolved into DMSO and the FCZ powder was dissolved in distilled water. For the AmB calibration curve, the AmB and FCZ were diluted in a pool of CSF from persons without AmB or FCZ treatment to calibrator levels of 0; 0.1; 0.25; 0.5 and 1.0  $\mu\text{g/mL}$  for AmB and 0; 2.5; 5.0; 10; 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$  for FCZ. For quality control, we produced some dilutions of AmB and FCZ (0.1 and 0.5 for AmB and 2.5 and 10 for FCZ) in known concentrations and analyzed these controls 3 times: before starting the measurements, during the measurements and in the end of the samples measurement.

The protein precipitation was performed using acetonitrile. We used 250  $\mu\text{l}$  of the CSF sample and added 250  $\mu\text{l}$  of acetonitrile. The mixture was vortexed for 30 seconds and centrifuged at 11000 g for 10 minutes. The supernatant was transferred to a new cup and a volume of 50  $\mu\text{l}$  of the clear extract was injected into the chromatographic system for each one of the analysis.

Chromatographic analysis of AmB was performed using UV-VIS detector in an LC10A liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan). The separation was done with a Supelco BDS Hypersil C18 (150 x 4.6 x 5  $\mu\text{m}$ ) column and the mobile phase was constituted by acetic acid (0.73%) and acetonitrile (60:40 v/v), pH = 4.5 at room temperature, the wavelength was 407 nm, flow rate at 0.6 mL/min and retention time

was 3 minutes<sup>14</sup>. Chromatographic analysis of FCZ was performed using UV-VIS detector in an LC-10A liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan). The separation was done with a Supelco BDS Hypersil C18 (150 x 4.6 x 5 µm) column and the mobile phase was constituted by acetonitrile and water (30:70 v/v), at room temperature, with a wavelength of 210 nm, flow rate of 0.7 mL/min and retention time of 3.7 minutes<sup>15</sup>.

### Statistical Analysis

The database was organized using an Excel spreadsheet (Microsoft Office Excel 2007) and after that, all the data collected was analyzed using the SPSS (version 18.0.0) software and the statistical test used was the Spearman correlation to correlate the IP and FCZ concentrations in the CSF. Applied the generalized estimating equation (GEE) was used to verify the behavior of the intracranial pressure and FCZ concentrations in the CSF during the follow-up period proposed for this study for each patient. In addition, a descriptive analysis was performed.

### Results

Table 1 contains the details of the 15 patients included in the study. Most of the patients were males (70%). Among them, 2 patients (13.3%) had *C. gattii* and 13 patients (86.7%) had *C. neoformans* isolated from the CSF. The most common underlying condition was AIDS (66.6%), followed by solid organ transplant (26.6%). Four patients (26.7%) died and 11 patients survived (73,3%) after 10 weeks of follow-up.

All the 15 patients (100%) used AmB and FCZ for the treatment of cryptococcal meningitis. Considering 5-FC was not available in our institution during the study, no patient used this antifungal agent. Levels of AmB and FCZ in the CSF from the patients with cryptococcal meningitis are shown in Table 2. Six (40%) of 15 patients presented negative fungal cultures after 14 days of antifungal therapy. Only three of 15 patients (20%) presented detectable, but low levels of AmB in the CSF during the initial 14 days of antifungal therapy. All detectable AmB concentrations were 0,1 µg/mL (the lowest quantifiable limit). FCZ CSF levels progressively increased from day 1 to day 14 of therapy for most cases. In contrast to AmB levels, FCZ levels were normally above the MIC for *Cryptococcus*. As shown in Figure 1 and Figure 2, variations of the intracranial pressure from normal to high levels did not influence the CSF concentrations of AmB and FCZ. The generalized estimating correlation (GEE) and Spearman correlation test (SCT) showed no significant correlation between the AmB or FLU concentrations in the



CSF and intracranial pressure ( $p=0.953$  and  $p=0.093$ , respectively for GEE test and  $p = 0.477$  and  $p = 0.847$ , respectively for SCT).

## Discussion

Intracranial hypertension a common neurologic complication in critically ill patients and is also the common pathway in the presentation of many neurologic and non-neurologic disorders.<sup>16</sup> Intracranial hypertension is reported in HIV and non-HIV patients with cryptococcal meningitis.<sup>2, 17</sup> Graybill et al. studied a large series of patients (221 patients) with cryptococcal meningitis reported that more than 50% of these patients had opening pressures  $> 250$  mmH<sub>2</sub>O on the initial lumbar puncture.<sup>4</sup> As described by other authors, intracranial hypertension may occur due to several factors in cryptococcal meningitis including the cryptococcal strain causing infection, particular conformation and capacity of a given patient's CSF absorption pathways, and the viscosity of the CSF, which is elevated to a degree that impairs its passage, and develop microscopic plug of polysaccharide that blocks the CSF flow.<sup>2, 18</sup> A large number of yeast cells are often present in the CSF and meninges in autopsy sections and this type of cell is substantially larger than the red cells of blood, so the yeast cells may block the channels and valves of the subarachnoid villi. Current guidelines for management of cryptococcal disease do not address the role of intracranial pressure on the pharmacokinetics of antifungal agents and possible dose modifications in patients with cryptococcal meningitis and intracranial hypertension.<sup>10</sup> In experimental studies, if the CSF outflow resistance increases, moderate reduction of the CSF production and absorption rates can be seen.<sup>19</sup> In the context of brain delivery, the increased intracranial pressure may present an obstacle to efficient drug delivery. The event of drug delivery against an interstitial pressure gradient has been substantially studied in solid tumors biology. Experimental in vivo studies have documented that interstitial pressure is raised in most solid tumors and this issue represents the major difficulty to the transfer of chemotherapeutics from the blood into the tumor.<sup>20, 21</sup> It is also possible that similar issues may be important in the delivery of drugs into the damaged brain. In a cat model of focal cerebral ischemia, Hatashita & Boff measured the interstitial cerebral pressure and hydraulic tissue resistance in edematous tissue.<sup>22</sup> The authors found that edema-induced interstitial pressures may represent an impasse to the efficient delivery of drugs via the intraventricular route and similar constraints may also be applied for intraventricular delivery. Therefore, cerebral edema and intracranial hypertension could affect drug delivery, especially to damaged brain in stroke and trauma.<sup>23</sup> AmB is a large

lipophilic molecule so that its size impedes the entry of the drug into the CNS. Some studies found that CSF concentrations of unencapsulated AmB were below 4% of the corresponding serum or plasma levels<sup>9, 24</sup> Consequently, a systemic application of standard doses results in low, frequently subtherapeutic levels in the CNS compartments, but an increase of the daily dose is limited by its toxicity. In adults, the As expected, according to our results, AmB levels in the CSF were below the MICs for *Cryptococcus*, which was not influenced by wide variations of intracranial pressure. Even though, and despite intracranial hypertension in most cases, combination therapy with AmB and FCZ without the association of 5-flucytosine was effective, considering most of the patients had negative CSF cultures at 14th day of therapy. FCZ readily penetrates into the CNS and achieves elevated concentrations in the CSF, even in models with an intact blood-brain barrier, the concentrations were in the range of 42 – 84% of those observed in serum.<sup>25</sup> FCZ was administered to all patients in our study. The FCZ levels found in the CSF were above the MIC for *Cryptococcus* isolates at the 7th day of antifungal therapy. Variations of intracranial pressure in patients with cryptococcal meningitis did not influence FCZ levels in the CSF concentrations independent of the inflammatory response expressed by the number of leukocytes in the CSF (table 2). In the context of infectious diseases of the CNS, we could not find any studies reporting the influence of intracranial hypertension in the concentrations of antifungal or antibacterial agents in the CNS after a systematic search on the MEDLINE. Our results have shown that variations of intracranial pressure did influence AmB and FCZ levels in the CSF. Our data suggest that dose modifications of antifungal agents including AmB and FCZ are not necessary for patients with cryptococcal meningitis and intracranial hypertension. The limitations of our study include the small number of patients evaluated and the fact that we could not assess 5-flucytosine, which is an important antifungal agent for treating patients with cryptococcal meningitis. Additional studies addressing the role of intracranial hypertension on pharmacodynamic and pharmacokinetics of novel antifungal agents in patients with cryptococcal meningitis are necessary.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest

**Funding:** This research was partially supported by CNPq (Brazilian National Council of Research)

**References**

1. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 2007; 21(16): 2119-2129.
2. 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.
3. Malessa R, Krams M, Hengge U, et al. Elevation of intracranial pressure in acute AIDS – related cryptococcal meningitis. *Clin Investig*. 1994; 72 (12): 1020 – 1026.
4. Graybill 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 (1): 47- 54.
5. Bicanic T, Brouwer AE, Meintjes G, et al. Relationship of cerebrospinal fluid pressure, fungal burden and outcome in patients with cryptococcal meningitis undergoing serial lumbar punctures. *AIDS*. 2009; 27;23(6):701-706.
6. 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*. 2008; 23(4): 525 – 530.
7. Sun HY, Hung CC, Chang SC. Management of cryptococcal meningitis with extremely high intracranial pressure in HIV- infected patients. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(12):1790-1792.
8. Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002; 16(4): 837-874, v-vi.
9. Kethireddy S, Andes D. CNS pharmacokinetics of antifungal agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2007; 3 (4): 573 – 581.
10. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 (3): 291 – 322.
11. Wertheimer AI, Santella TM, Lauver HJ. Successful public/private donation programs: a review of the Diflucan Partnership Program in South Africa. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2004; 3(3):74-79, 84-85.
12. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes Band C). *J Clin Microbiol* 1982; 15(3):535-537.

13. 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.
14. Balabathula P, Janagam DR, Mittal NK, et al. Rapid Quantitative Evaluation of Amphotericin B in Human Plasma, by Validated HPLC Method. J Bioequiv Availab. 2013; 5(3): 121-124.
15. Santos SR, Campos EV, Sanches C, et al. Fluconazole plasma concentration measurement by liquid chromatography for drug monitoring of burn patients. Clinics (Sao Paulo).2010; 65(2):237-43.
16. Rangel-Castilla L, Gopinath S, Robertson CS. Management of intracranial hypertension. Neurol Clin. 2008; 26(2):521-41.
17. Liao CH, Chi CY, Wang YJ, et al. Different presentations and outcomes between HIV-infected and HIV-uninfected patients with Cryptococcal meningitis. J Microbiol Immunol Infect. 2012 Aug; 45(4):296-304.
18. 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.
19. Scheld WM, Dacey RG, Winn HR, et al. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. J Clin Invest. 1980; 66 (2): 243-53.
20. Jain R.K. The Eugene M. Landis Lecture 1996. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. Microcirculation. 1997; 4 (1): 1–23.
21. Lo EH, Singhal AB, Torchilin VP, Abbott NJ. Drug delivery to damaged brain. Brain Res Brain Res Rev. 2001; 38 (1-2):140-8.
22. Hatashita S, Hoff J.T. Biomechanics of brain edema in acute cerebral ischemia in cats. Stroke. 1988; 19 (1) 91–97.
23. Lo EH, Singhal AB, Torchilin VP, Abbott NJ. Drug delivery to damaged brain. Brain Res Brain Res Rev. 2001; 38 (1-2):140-8.
24. Nau R, Sorgel 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.
25. Foulds G, Brennan DR, Wajszczuk C, et al. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans. J. Clin. Pharmacol. 1988; 28 (4): 363 - 366.

**Table 1. Characteristic of patients with cryptococcal meningitis.**

Patient	Age	Sex	Underlying disease	Treatment	<i>Cryptococcus</i> species *	Outcome <sup>Θ</sup>
1	55	M	Kidney transplant	Liposomal AmB	<i>C. neoformans</i>	Survive
2	6	M	Liver transplant	Lipid complex AmB	<i>C. neoformans</i>	Survive
3	45	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Death
4	27	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
5	65	M	Immunocompetent	AmB + FCZ	<i>C. gattii</i>	Survive
6	33	F	Kidney transplant	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
7	42	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
8	55	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Death
9	62	M	Kidney transplant	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
10	25	F	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
11	38	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
12	44	F	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Survive
13	37	F	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Death
14	41	M	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. gattii</i>	Survive
15	43	F	AIDS	AmB + FCZ	<i>C. neoformans</i>	Death

M – Male. F- Female. AIDS – Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome. AmB – Amphotericin B. FCZ – Fluconazole; Outcome  $\Theta$ : Outcome until 10 weeks after admission<sup>(1)</sup>. \* Species determined based on CGB medium test.

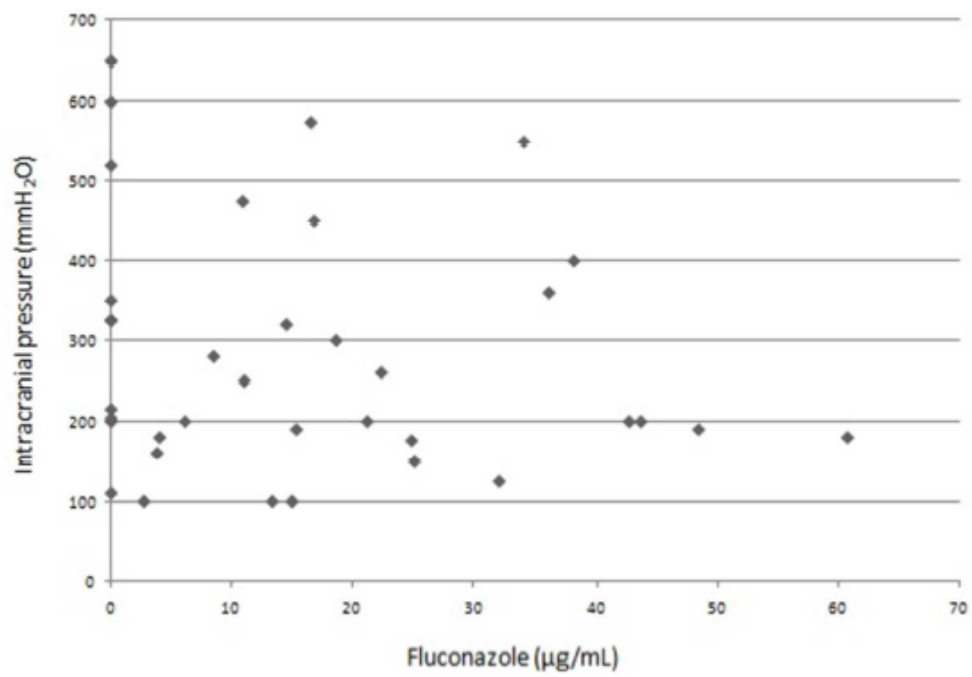
**Table 2 – CSF antifungal agent levels, opening intracranial pressure values, and CSF profile of patients with cryptococcal meningitis**

Patient	Day	AmB ( $\mu\text{g/mL}$ )	FCZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IP ( $\text{mmHg}$ )	Leuc.	MIC AmB	MIC FCZ	MIC VCZ	MIC 5-FC	Culture $\pi$
1	D1*	BDL	BDL	NM	88	1.0	1.0	0.0625	0.25	Yes
	D7	BDL	BDL	325	84					
	D14	0.1	43.66	190	108					
2	D1	BDL	BDL	NM	0	1.0	2.0	0.0625	0.25	No
	D7	BDL	BDL	350	1					
	D14	BDL	BDL	200	1					
3	D1	BDL	13.38	NM	92	2.0	16	0.125	1.0	No
	D7	BDL	14.96	100	167					
	D14	0.1	16.78	450	70					
4	D1	BDL	BDL	650	480	1.0	1.0	0.0625	0.25	Yes

	D7	BDL	16.52	575	329					
	D14	BDL	36.18	360	80					
5	D1	BDL	BDL	325	64	1.0	2.0	0.0625	0.25	Yes
	D7	0.1	22.32	260	8					
	D14	BDL	14.5	320	26					
6	D1	BDL	27	NM	87	0.5	32	0.0625	4.0	Yes
	D7	BDL	38.08	400	87					
	D14	BDL	24.86	176	90					
7	D1	BDL	BDL	520	83	0.0612	4.0	0.125	1.0	Yes
	D7	BDL	48.42	190	685					
	D14	BDL	15.32	190	404					
8	D1	BDL	BDL	600	32	1.0	32	0.125	2.0	No
	D7	BDL	34.12	550	21					
	D14	BDL	60.74	180	40					
9	D1	BDL	BDL	215	1	0.125	1.0	0.0625	1.0	Yes
	D7	BDL	11.02	250	2					
	D14	BDL	18.60	300	16					
10	D1	BDL	2.7	100	6	0.5	32	0.125	2.0	Yes
	D7	BDL	25.1	150	14					
	D14	BDL	32.08	125	18					
11	D1	BDL	BDL	NM	96	0.5	64	0.125	4.0	No
	D7	BDL	BDL	204	37					
	D14	BDL	21.16	200	45					
12	D1	BDL	BDL	110	3	0.125	8.0	0.0625	4.0	Yes
	D7	NM	NM	120	<b>NR</b>					
	D14	BDL	3.78	160	4					
13	D1	BDL	27.6	NM	42	0.125	2.0	0.0625	0.5	No
	D7	BDL	6.12	200	36					
	D14	NM	NM	NM	71					
14	D1	BDL	21.3	NM	1	0.5	16	0.25	8.0	No
	D7	BDL	4.0	180	12					
	D14	BDL	8.5	280	16					
15	D1	BDL	10.9	475	49	NM <sup>1</sup>	NM <sup>1</sup>	NM <sup>1</sup>	NM <sup>1</sup>	Yes
	D7	BDL	13.34	100	96					
	D14	BDL	42.7	200	152					
Median	-	0	13.38	209,5	45	0.5	6	0.0625	1	-
Range	-	BDL – 0,1	BDL – 60,74	100 – 815	0 – 685	0,0612 – 2,0	1 – 64	0,0625 – 0,25	0,25 – 8,0	-

AmB– amphotericin deoxycholate, FCZ – fluconazole, VCZ – voriconazole, 5-FC – 5-flucytosine, IP – opening intracranial pressure WBC– white blood cells per microliter; NM - The isolate was not available for the MIC test.; BDL– Below detection limit; MIC for Cryptococcal isolates for AmB (µg/mL); FCZ(µg/mL); VCZ(µg/mL); 5-FC(µg/mL)

**Figure 1.** Relationship of fluconazole levels and intracranial pressures of patients with cryptococcal meningitis.



## 10. Artigo 2

### Central nervous system pharmacokinetics of antifungal agents: Update

**Authors:** Fernanda Wirth <sup>1,2</sup>, Priscila Dallé da Rosa <sup>1,2</sup>, Luciana Antonioli <sup>1</sup>, Luciano Zubaran Goldani <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Ramiro Barcelos, 2400. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Section of Infectious Diseases. Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS, Brazil.

#### Abstract

The incidence of central nervous system (CNS) fungal infection has been increased over the past 3 decades and it may be happening not only due to the AIDS epidemic, but also due to an increase in solid organ and hematopoietic stems cells transplant and to the emerging resistance to antifungal agents. The purpose of the antifungal treatment in the CNS is to achieve adequate concentrations in this site because in some cases, the effectiveness is closely linked to concentration and understanding the principles of pharmacokinetics and pharmacodynamics are critical points in determining the appropriate dose-response binding. The objectives of this review are: to update informations about the antifungal agents penetration into the CNS in animal models and humans; to show the markedly difference among the available antifungal agents; and to analyze the difference between all antifungal agents efficacy despite the CNS concentration achieved. Little is known about some antifungal agents penetration in the CNS and this may damage its indication and prescription

**Keywords:** Antifungal agents, central nervous system, cerebrospinal fluid, pharmacokinetics, fungal infections

#### Central nervous system fungal infections

The incidence of central nervous system (CNS) fungal infection has been increasing over the past 3 decades<sup>(88, 122)</sup> and this increasing incidence appears to be related to the AIDS epidemic, to an increase in solid organ and hematopoietic stems cells transplants and to the emerging resistance to antifungal agents<sup>(88, 129)</sup>. These



infections can develop via hematogenous dissemination from a distant focus such as lung, through direct implantation after trauma or secondary to the local extension. Acute or subacute fungal meningitis is often caused by yeasts organisms and cerebrospinal fluid (CSF) analysis serves as the diagnostic gold standard<sup>(45, 96)</sup>, but is the immune status and inflammatory response of the host that determines the CNS involvement<sup>(45)</sup>.

Although invasive mycoses have been recognized as significant pathogens, the frequency of opportunistic fungi is increasing over time and the spectrum of invasive mycoses is changing<sup>(143)</sup>. The dissemination of mold infections to the CNS is the most serious and life-threatening complication of fungal infections, with mortality rates >90%<sup>(14, 166)</sup> and the inflammatory response in fungal disease results in deposits of thick gelatinous exudates containing inflammatory cells, fibrin and hemorrhage leading to arachnoiditis<sup>(45, 96)</sup>. This inflammatory response occurs due to fungal large cell size, so they can occlude the meningeal microcirculation causing a more focal disease leading to cerebritis, abscess formation, or involvement of larger vessels, resulting in vasculitis, vascular occlusion, cerebral infarctions, or formation of mycotic aneurism<sup>(45, 88)</sup>. Fungal CNS infections still present diagnostic challenges<sup>(45)</sup> but the progress of new and effective antifungal agents has improved the prognosis of the CNS fungal infections<sup>(174)</sup>.

### **CNS drug penetration and accumulation**

The intracranial space and vertebral canal are divided into the CSF space, extracellular and intracellular spaces of the brain and spinal cord<sup>(27, 28, 106)</sup>. Even in the individual parts of the same compartment, concentrations often differ<sup>(28, 106)</sup>, after an intravenous injection and most drugs may achieve higher concentrations in the lumbar than in the ventricular CSF<sup>(79, 106)</sup>.

The CNS drug levels are affected by the blood brain-barrier(BBB) and the potential effect of efflux transporters that can influence drug concentrations in the CSF and neural tissues<sup>(128, 133, 152)</sup>. Furthermore, there are several physiochemical properties that determine the ability of drugs to cross the CNS tissue barrier. These factors include diffusion coefficient of the compound, molecular size, lipophilicity, plasma protein binding, efflux pump affinity, molecular charge and cerebral blood flow<sup>(71)</sup>. The diffusion coefficient is an estimate of the ability of a compound to enter into the CNS serum barrier and it is approximately proportional to the reciprocal of the square root of the molecular mass. If doubling the size of a compound from a molecular weight(MW)

of 250 – 400 Da, it will decrease its permeation by 100-fold<sup>(3, 4, 71)</sup>. The superior limit of MW allowed for an efficient diffusion is from 300 Da to 400 Da<sup>(3, 71)</sup>, but among the antifungal agents, only flucytosine (5-FC) fulfills the MW requirement and is expected to diffuse easily through the BBB due to its small MW. Polyene and triazole molecules are of intermediate-to-large size molecules and echinocandins are considered large molecules (MW exceeds 1000 g/mol) and due to this, drugs such as caspofungin (CAS), micafungin (MCF) and anidulafungin (AND) have limited penetration into the CNS. Among the amphotericin B (AmB) preparations, the MW of this compound remains the same but the particle size of the complex varies markedly<sup>(71)</sup>. Some of the antifungal agents biochemical properties are described on Table 1.

The lipophilicity of a compound increases its ability to cross the CNS membranes because the CNS compartments comprise at least one cell layer and two lipid membranes per cell, linked predominantly by tight junctions, so the whole CNS can be viewed to be surrounded by lipid layers<sup>(106)</sup>. So, the lipid diffusion is a critical determinant of drug penetration because the capillaries of the brain are devoid of aqueous pores to facilitate aqueous diffusion. Drugs that easily enter into the CNS compartments often have an octanol:water (or lipid:aqueous) partition (Log P) coefficient of  $\sim 1$ <sup>(71)</sup>, since very lipophilic compounds tend to highly bind to proteins and to lipid membranes, the ideal log P coefficient at pH 7.4 for diffusion from plasma into CSF is around 1 to 10, corresponding to a Log P of 0 to 1<sup>(105, 106)</sup>.

Binding to plasma proteins is a factor that highly influences the entry of drugs into the CNS compartments. It is possible that only the plasma fraction unbound can freely enter into the CNS in the absence of BBB inflammation because binding proteins can pass the BBB or the blood-CSF-barrier (BCB) only in small degrees<sup>(106, 110)</sup>.

After the entry into the CNS, the drug must accumulate to achieve therapeutic concentrations. The efflux pumps at the CNS tissue barrier are able to remove molecules from the CSF. Substrates are removed from the CNS by P-glycoprotein (P-gp), a membrane bound P-ATPase efflux pump and an abundant transporter protein at the BBB, which has high affinity for lipophilic molecules<sup>(70, 106)</sup>. These transporters protect the brain from toxic xenobiotics and also decrease penetration of some therapeutic drugs into the CNS but the only antifungal that fit as substrates for the P-gp are the drugs from azole class<sup>(71)</sup>.

The CNS compartments are bordered by a diffusional barrier, which consists of at least one lipid membrane, with the exception of a few leaky regions that allow even large hydrophilic molecules entrance into the extracellular space of the brain, CSF and into the BBB/BCB. This barrier was compared with a second cell membrane surrounding the whole CNS<sup>(106, 114)</sup>. In order to maintain the proper function of the CNS, many small molecules which are able to penetrate lipid membranes to a certain extent have to be inactivated, but other important compounds for brain metabolism can enter more readily than by diffusion along a concentration gradient<sup>(106)</sup>. For drugs, in order to penetrate into the CSF and parenchyma of the brain, the compounds need to cross either the epithelial layer of the choroid plexus or the cerebral endothelium. This tissue barrier is structurally different from other blood tissue barriers due to the size of the intercellular connections through which the drugs pass. Therefore, to penetrate into the CNS, the drugs must cross small tight junctions (20Å) that impede diffusion of large MW drugs. Once a compound crosses the CNS barrier tissues, there are efflux pumps in the choroid plexus that can impact the ability of drugs to accumulate in the CNS<sup>(71)</sup>. Therefore, to be able to predict drugs penetration and accumulation into the CNS, it is important to understand these basic principles of CNS pharmacokinetics.

### **Amphotericin B**

AmB is a polyene antifungal agent with activity in vitro against a wide variety of fungal pathogens<sup>(33, 34)</sup>. This antifungal agent exerts its antifungal effect by disruption of fungal cell wall synthesis because of its ability to bind to sterols, primarily ergosterol, which leads to the formation of pores that allow leakage of cellular components. This affinity may also account for its toxic effects against select mammalian cells. AmB is generally considered cidal against susceptible fungi at clinically relevant concentrations<sup>(34, 87)</sup>.

Although the molecular weight of the parent AmB molecule is identical among the four preparations: deoxycholate AmB(D-AmB), liposomal amphotericin B (L-AmB), amphotericin B lipid complex (ABLC) and amphotericin B colloidal dispersion (ABCD), the particle size of the complex varies markedly and among the lipid preparations (Table 1). The liposomal product is two orders of magnitude smaller than other lipid associated preparations<sup>(71)</sup> and the lipid formulations of AmB were developed to attenuate the toxicity of the D-AmB and to allow higher doses<sup>(108, 151, 157)</sup>,

but several studies have indicated that the three lipid-based formulations are not therapeutically equivalent. Based on animal models and clinical studies, these formulations reduce the risk of AmB-related nephrotoxicity. The pharmacokinetics of AmB and the various lipid formulations has been carefully characterized in serum and tissues for several patient populations. Several investigations have attempted to demonstrate a correlation between the minimum inhibitory concentration (MIC) of AmB and outcome. Most of these studies have found it difficult to discern MIC impact, likely related to the narrow MIC range observed with current testing methods<sup>(5, 115)</sup>.

CSF levels are low after administration of intravenous D-AmB<sup>(41, 125)</sup> and serum concentrations following intravenous infusions of 30 to 50 mg of D-AmB have ranges from 1 to 2 µg/mL. The degree of protein binding is approximately 91 – 95% (Table 1), primarily to lipoproteins. Animal and human data have found concentrations of AmB in the CSF in the range of 2 – 4% (or less) of the serum concentrations and many times are immeasurable in this compartment<sup>(75, 80)</sup>. Thus, poor penetration into inflamed and uninflamed meninges has been reported, despite demonstrated clinical efficacy in CNS fungal infections, such as cryptococcal meningitis and other fungal infections<sup>(87)</sup>. One theory regarding its successful use is that the presence of lesions in the CNS leads to a disruption of the BBB, allowing for improved penetration of this compound<sup>(34, 126)</sup>.

L-AmB appears to be substantially less toxic than the other two lipid-based formulations in terms of nephrotoxicity and incidence of infusion-related adverse events and can be administered in higher dosages than conventional D-AmB. A disadvantage of the lipid-based formulations is the significantly higher cost when compared with D-AmB<sup>(17, 34, 37, 60, 97, 134, 163, 170)</sup>. Some data suggest the superiority of L-AmB over D-AmB for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV infected individuals<sup>(77, 80)</sup> but no difference in clinical response was observed and L-AmB demonstrated to be just as effective as D-AmB for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia<sup>(165)</sup>. According to our findings in the literature, L-AmB achieves the highest concentrations in serum, CSF and brain tissue in animal models and in some human reports as well (Tables 2 and 3).

ABCD is not extensively studied, especially in CNS infections and it is not fully clear how ABCD and ABLC can achieve sufficient tissue concentrations, especially in the acute phase of an infection since only the free drug fraction will be biologically

active, clinical success will directly depend on these concentrations<sup>(68)</sup>. Some researchers studied its efficacy in systemic fungal infections to compare with the other formulations. ABCD was similar to ABLC in the CNS<sup>(51)</sup>. According to our literature review, ABCD is the AmB formulation with the lowest levels in the CSF and brain tissue ( $\mu\text{g/mL}$ ).

ABLC showed a rapid clearance of CNS infection in rabbit model of coccidioidomycosis<sup>(13)</sup> and according to analyzed data, ABLC achieves better CSF and brain concentrations than D-AmB or ABCD in humans and animal models because ABLC is rapidly and effectively absorbed by cells of the mononuclear phagocytic system, resulting in a larger volume of distribution than the D-AmB<sup>(60, 68, 171)</sup> and the therapeutic index of ABLC is substantially increased in comparison with D-AmB<sup>(68)</sup> but in comparison to D-AmB and L-AmB, ABLC achieved a lower exposure of total AmB in plasma and was only partially effective<sup>(171)</sup>.

In the CSF of animal models and humans (Tables 2 and 3), the concentrations of all the AmB formulations do not differ significantly, but the low CSF levels of AmB following AmB infusion do not necessarily predict low brain tissue levels as well. In brain tissue, all AmB formulations have higher concentrations than in the CSF. It may be due to the kinetics of the liposomes carrying the drug, because of the drug compound itself, and also the high affinity for tissues<sup>(148)</sup>. The concentrations of AmB have been measured in human brain tissue obtained at autopsy and the brain tissue concentrations are at least more than 10-fold higher for each formulation. However, corresponding drug concentrations measured indicated that considerable amounts of AmB in brain tissue are inactive<sup>(23, 24, 141)</sup>. AmB is effective in the treatment of CNS histoplasmosis, even with undetectable levels in the CSF, but is less effective at sterilizing the brain tissue than the lungs or spleen in an animal model, when compared its efficacy to ITZ and FCZ. These data are consistent with the hypothesis penetration of the BBB plays some role in efficacy of treatment of CNS histoplasmosis. The authors also suggest that a better outcome could occur with formulations of AmB that penetrate the brain better than the D-AmB<sup>(58)</sup>. However, the correlation between AmB, CSF concentration and efficacy in treatment of CNS fungal infections is limited<sup>(71)</sup>.

Despite over many years of clinical use, relatively little is known about the pharmacokinetics of AmB<sup>(26, 34)</sup>, but it still remains the standard treatment for many

severe and invasive fungal infections even its toxic effects are associated with the intravenous use. Most human reports of cryptococcal meningoencephalitis respond to AmB monotherapy, even the CSF levels of AmB are remarkably low <sup>(132, 141)</sup>.

### **Flucytosine**

5-FC is one of the oldest antifungal agents, a fluorinated analogue of cytosine. It was synthesized in 1957, as a potential anti-tumour agent<sup>(35, 160)</sup>. This compound is most active against yeasts, including *Candida*, *Torulopsis* and *Cryptococcus* spp., and against the dematiaceous fungi causing chromomycosis (*Phialophora* and *Cladosporium* spp.) and *Aspergillus* spp.<sup>(139, 160)</sup> and does not bind to plasma proteins, having an excellent penetration into the CSF<sup>(9, 106)</sup>. There are scarce reports evaluating the concentrations of 5-FC in the CSF and CNS of humans and animals. In an animal model studied by O'Connor and contributors, it was found a brain penetration of 13% of those measured in plasma<sup>(111)</sup>. A human study reported a range of values of 5-FC in the CSF corresponding to 84% of the corresponding plasma concentration <sup>(11)</sup>. These concentrations overpass most of those associated with growth inhibition *in vitro* and this could predict the efficacy of 5-FC (Table 3). In an experimental rabbit model (Table 2) which tested the impact of dose and addition of 5-FC to FCZ therapy, the addition of 5-FC to FCZ at low-dose failed to result in a consistent improvement of any experimental parameters over that observed with low-dose of FCZ alone. With the lower dose of 5-FC, there was a trend of toward reduced antifungal activity, suggesting a possible antagonism at low concentrations of 5-FC<sup>(70)</sup>. Nevertheless, a combination with D-AmB or L-AmB is still a recognized first-line induction therapy for cryptococcal meningitis <sup>(41, 118)</sup>.

### **Triazoles**

The triazoles agents inhibit the cytochrome P450 enzyme 14- $\alpha$ -sterol-demethylase. This enzyme is implicated in the biosynthetic pathway of ergosterol, which is an essential molecule of the fungal cell membrane <sup>(175)</sup>. The available triazole antifungal agents exhibit variable physiochemical characteristics and differ in CNS pharmacokinetics. Fluconazole (FCZ) is the triazole that achieves the highest concentrations in the CSF even in the absence of meningeal inflammation <sup>(71)</sup>. Among all studies analyzed in animals and humans, it is possible to find high concentrations of FCZ in the CSF. In animal models, the range achieved in the CSF varied from 41% to

86% of those observed in serum, however, brain concentration in animal models was lower, with the values ranging from 10% to 50% of the serum concentrations. In humans, similar CSF ranges were found (52% to 85% of those observed in serum), but a huge difference was found in brain concentrations of FCZ, which varied from 110% to 142% of serum concentrations. It is important to highlight that only one study analyzing human brain tissue for FCZ measurement was found in the literature from 1990 to 2016 (Tables 2 and 3).

Nevertheless, a review published in 2007 reported FCZ brain concentration in humans of 116% of those found in serum and this value is in agreement with our findings in the literature. Therefore, the ability of FCZ to enter in the CNS and achieve high concentrations suggest that this antifungal agent would be effective against many pathogens, considering that these concentrations are much higher than most MICs found for these pathogens<sup>(71)</sup>.

Voriconazole (VRZ) is poorly soluble despite it is structurally related to FCZ<sup>(71, 175)</sup> and exhibits nonlinear pharmacokinetics<sup>(62)</sup>. Studies with antibiotics have shown that from that in humans<sup>(81, 82)</sup>. In animals, VRZ penetration in the CSF and brain tissue appears not to be related to meningeal inflammation. From that analyzed studies, a variation of 15% to 42% of plasma VRZ concentration was found among all studies in animal models. Only one study measured the brain tissue concentration of 2 guinea pigs and the values found were: 2,7 and 6,8  $\mu\text{g/g}$ <sup>(82)</sup> (Table 2). Even with a large use of VRZ nowadays, there are only a few researches reporting VRZ concentrations in the parenchymal compartments in animal models. In humans, VRZ was more extensively studied and the variation of the percentages of VRZ concentrations in the CSF is larger, varying from 22% to 100% of plasma/serum concentrations<sup>(15, 36, 59, 82, 83, 109, 113, 127, 140, 142, 145, 146, 161, 167)</sup>; in biopsies, VRZ concentrations ranged from 1,2 to 1,9  $\mu\text{g/g}$ <sup>(36)</sup>. Another study measured the concentrations in the brain tissue of humans using the fluoride magnetic resonance spectroscopy technique and found brain tissue concentrations in the range of 120 – 470% (including predose and postdose samples) of plasma concentrations<sup>(59)</sup> (Table 3). All together, these data suggest VRZ accumulation in the brain parenchyma<sup>(36, 82)</sup>. The exact mechanism of VRZ penetration through the BBB is not known, however, because of the moderate lipophilicity, the observed ratio of CSF to free plasma concentrations of VRZ of >1 in animals without CNS

inflammation, and the rapid achievement of peak VRZ concentrations in the CSF suggest the occurrence of transcellular penetration through the BBB<sup>(1, 82)</sup>.

Itraconazole (ITZ) is a triazole derivative with a broad antifungal spectrum which includes the *Aspergillus* species<sup>(48, 66, 136)</sup>. Both animal and human studies of CSF and brain tissue report almost undetectable concentrations<sup>(58, 66, 144, 146, 161)</sup> (Tables 2 and 3). ITZ achieves low concentrations in these compartments and its concentration in the CSF is below 10% of those found in serum. ITZ has a large MW (705 Da), has a high percentage of protein binding to albumin and high lipophilicity<sup>(71)</sup>. Due to its large MW and protein binding property, its entry through the BBB is difficult. Bioassay techniques have been employed for the measurement of ITZ and also its major metabolite, the hydroxyl-ITZ<sup>(63, 66)</sup>. There are no determined concentrations of ITZ or hydroxyl-ITZ that actually predict a favorable clinical response against invasive aspergillosis<sup>(31, 66)</sup>. Although FCZ penetrates the CSF and brain tissue better than AmB and ITZ, it has been shown the least effective therapy in a meningitis model. While high concentrations of FCZ were achieved in the brain tissue, hydroxyl-ITZ was detected at low levels and AmB was undetectable, however, the opposite relationship was observed in the antifungal effect. A possible explanation for this fact is that ITZ has a greater antifungal effect when compared to FCZ against most fungi and for the AmB, a possible explanation is that AmB has fungicidal effect and FCZ has fungistatic effect. This mode of action may partly explain this discrepancy<sup>(58)</sup>.

Posaconazole (PCZ) was the third extended-spectrum triazole to be approved for use against invasive fungal infections, following the availability ITZ and VRZ. Similar to VRZ, PCZ has potent *in vitro* activity against yeasts<sup>(168)</sup>. As far as we know, there is no available study in animal models to investigate the pharmacokinetics of PCZ in the CNS. On the other hand, some recent reports in humans have been published (Table 3). Wiederhold and colleagues measured PCZ levels in serum and 22 CSF samples and found that concentrations in the CSF were <10% of those concentrations found in plasma. Another single case report confirmed these findings<sup>(12, 168)</sup>. Only one study found considerable concentrations of PCZ in the blood and CSF. The values corresponded to 41% to 237% of those PCZ concentrations found in plasma. The authors suggest that a disturbance in the BBB may have occurred, what increased its permeability and this may have facilitated the drug entry through the BBB<sup>(131)</sup>. PCZ



pharmacokinetics should be better evaluated in different populations, since many factors, such as HIV infection and ethnic differences may have a significant impact<sup>(12)</sup>.

Albaconazole (ALB) has a potent a broad-spectrum antifungal activity, good pharmacokinetics and excellent oral bioavailability (nearly 80% in rats and 100% in dogs)<sup>(8, 117)</sup>. Only 1 study reported the ALB penetration in the CNS in a rabbit model. The CSF penetration was approximately 15% of the concentration found in serum. Despite the limited penetration into the subarachnoid space, all ALB doses were effective for the treatment of cryptococcal meningitis in rabbits and was 100-fold more potent in vitro than FCZ on a per-weight basis and presented fungicidal effect at potentially relevant concentrations for 2 isolates (Table 2)<sup>(95)</sup>.

Isavuconazole (ISA) has been used in humans in Phase I/II studies aimed at the definition of the pharmacokinetic properties of the drug<sup>(46, 137, 138)</sup> but very little information on clinical efficacy is available<sup>(46)</sup>. The efficacy of ISA has recently been established in a phase III clinical trial (SECURE), which compared the clinical response and mortality of patients with invasive aspergillosis receiving ISA or VCZ<sup>(10)</sup>. In the CNS, a very recent murine model investigated by Wiederhold and colleagues, found ISA concentrations in brain tissue ranging from undetectable to 17,3 µg/g (Table 2) in different doses groups and the brain tissue/plasma ratio was high, approximately 1,35 for each dose level tested<sup>(169)</sup>.

Ravuconazole (RAV) belongs to the second generation of triazoles, such as VRZ and PCZ. The main attributes of these drugs are: good bioavailability after oral administration, high effectiveness in treatment of deep-seated mycosis, broad activity spectrum and negligible side effects. The pharmacokinetics of RAV, which is currently in phase II/III clinical trials, is similar to PCZ because of its strong lipophilic properties. RAV shows fungicidal activity similar to VRZ, although it has not activity against *Fusarium* and *Scedosporium* species<sup>(54, 117, 119, 120)</sup>. The tissue penetration has been investigated in animal models, but published data on the pharmacokinetics of RAV are limited. Groll and contributors evaluated the penetration of RAV in several tissues, including the CNS. Low concentrations were found in non-inflamed CSF, aqueous and vitreous fluid, but substantially higher concentrations in brain tissue and choroid, suggesting the potential therapeutic usefulness of RAV also in secluded compartments<sup>(53)</sup>(Table 3).

## Echinocandins

The echinocandins are concentration-dependent, non-competitive inhibitors of 1,3- $\beta$  and 1,6- $\beta$  D-glucan synthase. The echinocandins class possesses many pharmacokinetic similarities, including low oral bioavailability, high protein binding, and relatively low CSF and urine concentrations of parent drug. They have minimal CSF penetration, mainly due to their high protein binding and large MW, although the clinical relevance of these findings are similar to other antifungal agents (AmB and ITZ) that are effective for the treatment of fungal meningitis despite low CSF concentrations<sup>(32, 38)</sup>. The echinocandins efficacy and pharmacokinetics have been investigated in animal models and in humans.

In vitro, MCF has demonstrated potent and broad-spectrum fungicidal activity against clinically relevant *Candida* spp. and a potent inhibitory activity against *Aspergillus* spp.<sup>(52, 94, 150, 158)</sup>. This compound displayed promising antifungal efficacy in murine models of disseminated candidiasis as well as disseminated and pulmonary aspergillosis<sup>(52, 65, 85, 89)</sup>. Although MCF was could not be detected in the CSF, it was detectable at low concentrations in brain tissue in all animals and therapeutically effective levels of MCF in brain tissue could be achieved in the state of tissue inflammation and/or necrosis, as evidenced by the effective clearance of *Candida albicans* from the CNS in this rabbit model (Table 2). Little is known, however, about the disposition of MCF in plasma and tissues<sup>(52)</sup>. In humans (Table 3), there are not manystudies that investigated the MCF distribution in CSF and tissues, however, higher concentrations were found in human CSF and brain tissue, when compared to the animal model developed by Groll and colleagues. The studies reported a range varying from 0,2% to 73% of the concentration found in the serum<sup>(112, 172)</sup>. Only 1 case report measured the MCF concentration in human brain tissue and a similar, but higher concentration than animal model brain tissue concentration was found<sup>(52, 73)</sup>. In all cases, despite the poor penetration in the CSF, it had good efficacy and animals and patients had good clinical response in the treatment of the infection. Taken in combination with the animal data, MCF raises a possibility that may have limited penetration into the CNS tissue and so requires further characterization of its pharmacokinetics in these body sites in humans and animals.

CAS is a semisynthetic derivative of the natural product pneumocandin B<sub>0</sub> (L-688-786)<sup>(30, 47)</sup> and has displayed potent in vitro activity *Candida* species, including AmBand FCZ-resistant isolates; *Aspergillus* species; and other clinically important moulds<sup>(29, 47)</sup>. In animal studies, this antifungal agent showed excellent antifungal activity for the treatment of disseminated aspergillosis, candidiasis<sup>(2, 47, 49)</sup>, histoplasmosis<sup>(50)</sup> and pneumocystosis<sup>(86)</sup>. All available studies agree that CAS penetration in the CNS increases with the intensity of BBB inflammation (relation of brain/plasma AUC<sub>0-24</sub> = 0,08 to 0,12 µg/mL in uninfected animals and 0,14 – 0,22 µg/mL in infected animals)<sup>(42, 127)</sup> and CAS also reduced significantly the fungal burden in an animal model of aspergillosis<sup>(19)</sup>. In humans, Reminiacand colleagues reported the highest CSF concentration of CAS until now. The case report found the highest concentrations of CAS in the CSF until now, together with the highest inflammatory response in the patient<sup>(127)</sup> (Table 3). These findings are in line with data from experimental studies that showed that brain CAS levels are higher in infected animals<sup>(42)</sup>, and with several data showing that the penetration of hydrophilic anti-infective drugs increases the intensity of BBB inflammation<sup>(19, 127)</sup>. In neonatal patients, Jans and contributors found similar CSF/plasma correlation. The concentrations were adequate and serial sampling showed increasing concentrations of CAS in the CSF while those in plasma decreased, suggesting that lower clearance of CAS from the CSF could be possibly beneficial<sup>(69)</sup>.

AND is approved for the treatment of adults with esophageal candidiasis, candidemia and invasive candidiasis<sup>(90)</sup>. In preclinical studies, AND demonstrated activity against *Candida albicans* (including FLZ-resistant strains), *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*<sup>(124)</sup>. Scarce studies measured AND in the CNS in animal models. Ripp and colleagues found AND concentration in brain tissue corresponding to 21% of the concentration found in plasma. The brain concentrations were low at early time points, but increased over time in adult rats<sup>(25, 130)</sup>. These current data indicate that AND penetrates the BBB in rats, but at relatively slow rate. The distribution of AND observed in brain tissue in this study might be considered unexpected because of its large molecular weight and amphiphilic nature of the molecule. Groll et al. measured AND in a rabbit model and found from undetectable to low concentrations of AND in brain tissue (Table 2). The authors noticed that measurable concentrations in brain tissue were noted at dosages of 0,5 mg/kg and higher and increased antifungal efficacy

in the brain could be achieved only through intermittent and continuous administration of high daily dosages, which deduced nonlinear saturable plasma pharmacokinetics with sustained held plasma and tissue drug concentrations<sup>(21, 52, 164)</sup>.

Even with promising results, the penetration of an antifungal drug to the site of infection is a prerequisite for successful treatment and the available reports observed low or undetectable levels of echinocandins in the CSF and brain of animals and humans, more studies should be performed to evaluate echinocandins distribution in the tissues, entry mechanism and the real efficacy for infections in the CNS.

### **Conclusions**

Little is known about some antifungal agents penetration in the CNS and this may damage its indication and prescription, because some of indications are based only on *in vitro* studies or few animal models (Table 4). More studies should be performed to evaluate the CNS penetration for some antifungal agents and also their interaction, with the purpose of avoiding antagonism.

## References

1. Abbot NJ, Romero A. Transporting therapeutics across the blood-brain-barrier. *Mol Med Today* 1996;2:106-13.
2. Abruzzo, G. K., A. M. Flattery, C. J. Gill, L. Kong, J. G. Smith, V. B. Pikounis, J. M. Balkovec, A. F. Bouffard, J. F. Dropinski, H. Rosen, H. Kropp, and K. Bartizal. 1997. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2333–2338.
3. Alffenaar, J. W., P. M. de Vries, G. J. Luijckx, D. van Soolingen, T. S. van der Werf, and R. van Altena. 2008. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of moxifloxacin in a patient with tuberculous meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2293–2295.
4. Alffenaar, J. W., R. van Altena, H. J. Bokkerink, G. J. Luijckx, D. van Soolingen, R. E. Aarnoutse, and T. S. van der Werf. 2009. Pharmacokinetics of moxifloxacin in cerebrospinal fluid and plasma in patients with tuberculous meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 49:1080–1082.
5. Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am.* 2006 Sep;20(3):679-97.
6. Bafeltowska JJ, Buszman E. Pharmacokinetics of fluconazole in the cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *Chemotherapy.* 2005 Oct;51(6):370-6.
7. Bailey EM, Krakovsky DJ, Rybak MJ. The triazole anti-fungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy* 10: 146-153, 1990.
8. Bartoli J, Turmo E, Alguero M et al. New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. *J Med Chem* 1998; 41: 1869–82.
9. Block ER, Bennett JE. Pharmacological studies with 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972 Jun;1(6):476-82.
10. Box H, Livermore J, Johnson A, McEntee L, Felton TW, Whalley S, Goodwin J, Hope WW. Pharmacodynamics of Isavuconazole in a Dynamic In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct 26;60(1):278-87.

11. Brouwer AE, van Kan HJ, Johnson E, Rajanuwong 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 Mar;51(3):1038-42.
12. Calcagno A, Baietto L, De Rosa FG, Tettoni MC, Libanore V, Bertucci R, D'Avolio A, Di Perri G. Posaconazole cerebrospinal concentrations in an HIV-infected patient with brain mucormycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jan;66(1):224-5.
13. Capilla J, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA. Efficacy of amphotericin B lipid complex in a rabbit model of coccidioidal meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):673-6.
14. Carter JH, Lenahan JL, Ishak GE, Geyer JR, Pollard J, Englund JA. Medical management of invasive fungal infections of the central nervous system in pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Jun;62(6):1095-8.
15. Ceccarelli G, Ghezzi MC, Raponi G, Brunetti G, Marsiglia C, Fallani S, Novelli A, Venditti M. Voriconazole treatment of *Candida tropicalis* meningitis: persistence of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in the cerebrospinal fluid is a marker of clinical and microbiological failure: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2016 Aug;95(31):e4474.
16. Chin T, Fong IW, Vandenbroucke A. Pharmacokinetics of fluconazole in serum and cerebrospinal fluid in a patient with AIDS and cryptococcal meningitis. *Pharmacotherapy.* 1990;10(4):305-7.
17. Cifani, C., Costantino, S., Massi, M. & Berrino, L. (2012). Commercially available lipid formulations of amphotericin B: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? *Acta Biomed* 83, 154–163.
18. Clemons KV, Sobel RA, Williams PL, Pappagianis D, Stevens DA. Efficacy of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) against coccidioidal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Aug;46(8):2420-6.
19. Clemons KV, Schwartz JA, Stevens DA. Experimental central nervous system aspergillosis therapy: efficacy, drug levels and localization, immunohistopathology, and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Aug;56(8):4439-49.
20. Coker RJ, Harris JR. Failure of fluconazole treatment in cryptococcal meningitis despite adequate CSF levels. *J Infect.* 1991 Jul;23(1):101-3.
21. Cole, G. T., K. T. Lynn, and K. R. Seshan. 1990. Evaluation of a murine model of hepatic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 28:1838–1841.

22. Colitz CM, Latimer FG, Cheng H, Chan KK, Reed SM, Pennick GJ. Pharmacokinetics of voriconazole following intravenous and oral administration and body fluid concentrations of voriconazole following repeated oral administration in horses. *Am J Vet Res.* 2007 Oct;68(10):1115-21.
23. Collette N, van der Auwera P, Lopez AP, Heymans C, Meunier F. Tissue concentrations and bioactivity of amphotericin B in cancer patients treated with amphotericin B-deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 362368.
24. Collette N, van der Auwera P, Meunier F, et al. Tissue distribution and bioactivity of amphotericin B administered in liposomes to cancer patients. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27: 535548.
25. Damle B, Stogniew M, Dowell J. Pharmacokinetics and tissue distribution of anidulafungin in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jul;52(7):2673-6.
26. Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1983 Jan-Feb;8(1):17-42.
27. Davson, H. 1967. *Physiology of the cerebrospinal fluid.* Churchill, London, United Kingdom.
28. Davson, H., K. Welch, and M. B. Segal. 1987. *Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid.* Churchill Livingstone, London, United Kingdom.
29. Del Poeta, M., W. A. Schell, and J. R. Perfect. 1997. In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1835–1836.
30. De Lucca, A. J., and T. J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1–11.
31. Denning DW, Lee JY, Hostetler JS, Pappas P, Kauffman CA, Dewsnap DH, Galgiani JN, Graybill JR, Sugar AM, Catanzaro A, et al. NIAID Mycoses Study Group Multicenter Trial of Oral Itraconazole Therapy for Invasive Aspergillosis. *Am J Med.* 1994 Aug;97(2):135-44.
32. Denning DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362:1142-51.
33. Dismukes WE. Antifungal therapy: lessons learned over the past 27 years. *Clin Infect Dis.* 42:1289. 2006.
34. Drew RH. *Pharmacology of amphotericin B.* Kaufmann CA, Thorner AR, editors. UpToDate. Wolters Kluwer. 2015.
35. *Duschinsky, R., Plevin, E. & Heidelberger, C. (1957). The synthesis of 5-fluoropyrimidines. Journal of the American Chemical Society* 79, 4559–60.

36. Elter T, Sieniawski M, Gossmann A, Wickenhauser C, Schröder U, Seifert H, Kuchta J, Burhenne J, Riedel KD, Fätkenheuer G, Cornely OA. Voriconazole brain tissue levels in rhinocerebral aspergillosis in a successfully treated young woman. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Sep;28(3):262-5.
37. Enoch, D. A., Ludlam, H. A. & Brown, N. M. (2006). *Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options*. *J Med Microbiol* 55, 809–818.
38. Eschenauer G, Depestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag*. 2007 Mar;3(1):71-97.
39. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2001) Caspofungin (MSD, Merck Sharp & Dohme Ltd). Scientific discussion, CPMP/246/01. <http://www.emea.eu.int/humandocs/PDFs/EPAR/cancidas/224601en6.pdf>
40. Fielding RM, Singer AW, Wang LH, Babbar S, Guo LS. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Feb;36(2):299-307.
41. Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. Jan; 27(1):68-88. 2014.
42. Flattery AM, Hickey E, Gill CJ, Powles MA, Misura AS, Galgoci AM, Ellis JD, Zhang R, Sandhu P, Ronan J, Abruzzo GK. Efficacy of caspofungin in a juvenile mouse model of central nervous system candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3491-7.
43. Fung-Tomc JC, Huczko E, Minassian B et al. In vitro activity of a new oral triazole, BMS-207147 (ER-30346). *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 313–8.
44. Fung-Tomc JC, White TC, Minassian B et al. In vitro antifungal activity of BMS-207147 and itraconazole against yeast strains that are non-susceptible to fluconazole. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 163–7.
45. Gavito-Higuera J, Mullins CB, Ramos-Duran L, Olivas Chacon CI, Hakim N, Palacios E. Fungal Infections of the Central Nervous System: A Pictorial Review. *J Clin Imaging Sci*. 2016 Jun 17;6:24.
46. Girmenia C. New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Sep;18(9):1279-95.
47. González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Luther M, Rinaldi MG, Graybill JR. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jun;45(6):1854-9.



48. Grant SM, Clissold SP. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs*. 1989 Mar;37(3):310-44.
49. Graybill, J. R., L. K. Najvar, M. F. Luther, and A. W. Fothergill. 1997. Treatment of murine disseminated candidiasis with L-743,872. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41:1775–1777.
50. Graybill, J. R., L. K. Najvar, E. M. Montalbo, F. J. Barchiesi, M. F. Luther, and M. G. Rinaldi. 1998. Treatment of histoplasmosis with MK-991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother*. 42:151–153.
51. Groll AH, Giri N, Petraitis V, Petraitiene R, Candelario M, Bacher JS, Piscitelli SC, Walsh TJ. Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. *J Infect Dis*. 2000 Jul;182(1):274-82.
52. Groll AH, Mickiene D, Petraitiene R, Petraitis V, Lyman CA, Bacher JS, Piscitelli SC, Walsh TJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of anidulafungin (LY303366): reappraisal of its efficacy in neutropenic animal models of opportunistic mycoses using optimal plasma sampling. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Oct;45(10):2845-55.
53. Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, et al Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal triazole ravuconazole following intravenous administration of its di-lysine phosphoester prodrug (BMS-379224) in rabbits. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:899-907
54. Grudzień MK, Pałka K, Pluciński FA, Mazurek AP. Molecular properties impact on bioavailability of second generation triazoles antifungal agents. *Acta Pol Pharm*. 2013 Sep-Oct;70(5):869-72.
55. Hata K, Kimura J, Miki H, et al. Efficacy of ER-30346, a novel oral triazole antifungal agent, in experimental models of aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2243-7
56. Hata K, Kimura J, Miki H et al. In vitro and in vivo antifungal activities of ER-30346, a novel oral triazole with a broad antifungal spectrum. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2237–44.5.
57. Haubrich RH, Haghghat D, Bozzette SA, Tilles J, McCutchan JA. High-dose fluconazole for treatment of cryptococcal disease in patients with human

immunodeficiency virus infection. The California Collaborative Treatment Group. *J Infect Dis.* 1994 Jul;170(1):238-42.

58. Haynes RR, Connolly PA, Durkin MM, LeMonte AM, Smedema ML, Brizendine E, Wheat LJ. Antifungal therapy for central nervous system histoplasmosis, using a newly developed intracranial model of infection. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1830-2.

59. Henry ME, Bolo NR, Zuo CS, Villafuerte RA, Cayetano K, Glue P, Damle BD, Andrews E, Lauriat TL, Rana NS, Churchill JH, Renshaw PF. Quantification of brain voriconazole levels in healthy adults using fluorine magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5271-6.

60. Hiemenz, J. W., and T. J. Walsh. 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin. Infect. Dis.* 22(Suppl. 2):S133-S144.

61. Hope WW, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, Hughes JE, Cotton MP, Bacher J, Keirns JJ, Buell D, Heresi G, Benjamin DK Jr, Groll AH, Drusano GL, Walsh TJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis: implications for echinocandin therapy in neonates. *J Infect Dis.* 2008 Jan 1;197(1):163-71.

62. Hope WW, Goodwin J, Felton TW, Ellis M, Stevens DA. Population pharmacokinetics of conventional and intermittent dosing of liposomal amphotericin B in adults: a first critical step for rational design of innovative regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:5303-8.

63. Hostetler JS, Heykants J, Clemons KV, Woestenborghs R, Hanson LH, Stevens DA. Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Oct;37(10):2224-7.

64. Hsue G, Napier JT, Prince RA, Chi J, Hospenthal DR. Treatment of meningeal coccidioidomycosis with caspofungin. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):292-4.

65. Ikeda, F., Y. Wakai, S. Matsumoto, K. Maki, E. Watabe, S. Tawara, T. Goto, Y. Watanabe, F. Matsumoto, and S. Kuwahara. 2000. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:614-618.

66. Imai T, Yamamoto T, Tanaka S, Kashiwagi M, Chiba S, Matsumoto H, Uede T. Successful treatment of cerebral aspergillosis with a high oral dose of itraconazole after excisional surgery. *Intern Med.* 1999 Oct;38(10):829-32.

67. Jafari HS, Sáez-Llorens X, Severien C, Parras F, Friedland I, Rinderknecht S, Ehrett S, Olsen KD, Abramowsky C, McCracken GH Jr. Effects of antifungal therapy on inflammation, sterilization, and histology in experimental *Candida albicans* meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Jan;38(1):83-9.
68. Janknegt R, deMarie S, Bakker-Woudenberg IAJM, Crommelin DJA. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clin Pharmacokinet.* 23 (4): 279-91. 1992.
69. Jans J, Brüggemann RJ, Christmann V, Verweij PE, Warris A. Favorable outcome of neonatal cerebrospinal fluid shunt-associated *Candida* meningitis with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2391-3.
70. 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 May;173(5):1216-21.
71. Kethireddy S e Andes D. CNS pharmacokinetics of antifungal agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3: 573 – 581. 2007.
72. Lass-Flörl C, Mayr A, Perkhöfer S, et al. assessment according to the methodology of the European Committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3637-41
73. Lat A, Thompson GR 3rd, Rinaldi MG, Dorsey SA, Pennick G, Lewis JS 2nd. Micafungin concentrations from brain tissue and pancreatic pseudocyst fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):943-4.
74. Latimer FG, Colitz CM, Campbell NB, Papich MG. Pharmacokinetics of fluconazole following intravenous and oral administration and body fluid concentrations of fluconazole following repeated oral dosing in horses. *Am J Vet Res.* 2001 Oct;62(10):1606-11.
75. Lawrence RM, Hoepfich 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 Mar;6(2):241-9.
76. Lee JW, Amantea MA, Francis PA, Navarro EE, Bacher J, Pizzo PA, Walsh TJ. Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Apr;38(4):713-8.
77. Leenders, A. C., P. Reiss, P. Portegies, K. Clezy, N. C. J. Hop, J. Hoy, J. C. C. Borleffs, T. Alloworth, R. Kauffman, P. Jones, F. P. Kroon, H. A. Verbrugh, and S. de Marie. 1997. Liposomal amphotericin B (Ambisome) compared with amphotericin B

both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* 11:1463–1471.

78. Lemetayer JD, Dowling PM, Taylor SM, Papich MG. Pharmacokinetics and distribution of voriconazole in body fluids of dogs after repeated oral dosing *J Vet Pharmacol Ther.* 2015 Oct;38(5):451-6.

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

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

81. Lutsar I, McCracken GH, Friedland IR. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 1998; 27:1117-29.

82. Lutsar I, Roffey S, Troke P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2003;37:728–32.

83. Machetti M, Zotti M, Veroni L, Mordini N, Van Lint MT, Bacigalupo A, Paola D, Viscoli C. Antigen detection in the diagnosis and management of a patient with probable cerebral aspergillosis treated with voriconazole. *Transpl Infect Dis.* 2000 Sep;2(3):140-4.

84. Madu A, Cioffe C, Mian U, Burroughs M, Tuomanen E, Mayers M, Schwartz E, Miller M. Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum of rabbits: validation of an animal model used to measure drug concentrations in cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Sep;38(9):2111-5.

85. Maesaki, S., M. A. Hossain, Y. Miyazaki, K. Tomono, T. Tashiro, and S. Kohno. 2000. Efficacy of FK463, a (1,3)--D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1728–1730.

86. M. A. Powles, J. Anderson, P. Liberator, and D. M. Schmatz, *Abstr. 36th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. F-42, 1996.

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

88. Mathur M, Johnson CE, Sze G. Fungal infections of the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am.* 2012 Nov;22(4):609-32.

89. Matsumoto, S., Y. Wakai, T. Nakai, K. Hatano, T. Ushitani, F. Ikeda, S. Tawara, T. Goto, F. Matsumoto, and S. Kuwahara. 2000. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:619–621.
90. Mayr A, Aigner M, Lass-Flörl C. 2011. Anidulafungin for the treatment of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Infect* 1(Suppl 17):1–12.
91. Menichetti F, Fiorio M, Tosti A, Gatti G, Bruna Pasticci M, Miletich F, Marroni M, Bassetti D, Pauluzzi S. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1996 May;22(5):838-40.
92. Mian UK, Mayers M, Garg Y, Liu QF, Newcomer G, Madu C, Liu W, Louie A, Miller MH. Comparison of fluconazole pharmacokinetics in serum, aqueous humor, vitreous humor, and cerebrospinal fluid following a single dose and at steady state. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1998 Oct;14(5):459-71.
93. Micafungin leaflet (2001) 3rd version, English translation. Fujisawa, Osaka
94. Mikamo, H., Y. Sato, and T. Tamaya. 2000. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:485–487.
95. Miller JL, Schell WA, Wills EA, Toffaletti DL, Boyce M, Benjamin DK Jr, Bartroli J, Perfect JR. In vitro and in vivo efficacies of the new triazole albaconazole against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb;48(2):384-7.
96. Mohan S, Jain KK, Arabi M, Shah GV. Imaging of meningitis and ventriculitis. *Neuroimaging Clin N Am.* 2012;22:557–83.
97. Montagna MT, Lovero G, Coretti C, De Giglio O, Martinelli D, Bedini A, Delia M, Rosato A, Codeluppi M, Caggiano G. In vitro activities of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. *J Med Microbiol.* 2014 Dec;63 (Pt 12): 1638-43.
98. Moore CB, Wallis CM, Denning DW. In vitro activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 441–3.
99. Mukai T, Ohkuma T, Nakahara K, Takaya T, Uematsu T, Azuma J (2001) Pharmacokinetics of FK463, a novel echinocandin analogue, in elderly and non-elderly subjects. In: Program and abstracts of the 41st interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy.

100. <sup>1</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6918485, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6918485> (accessed Sept. 22, 2016).
101. <sup>2</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=467825, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/467825> (accessed Sept. 22, 2016).
102. <sup>3</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=208952, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/208952> (accessed Sept. 22, 2016).
103. <sup>4</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=468595, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/468595> (accessed Sept. 22, 2016).
104. <sup>5</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=71616, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71616> (accessed Sept. 22, 2016).
105. Nau, R., F. Sorgel, and H. W. Prange. 1994. 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.* 122:61–65.
106. 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 Oct;23(4):858-83.
107. Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Mar;30(1):51-83.
108. New RR, Chance ML, Heath S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J Antimicrob Chemother.* 1981 Nov;8(5):371-81.
109. Nierenberg NE, Thompson GR, Lewis JS, Hogan BK, Patterson TF. Voriconazole use and pharmacokinetics in combination with interferon-gamma for refractory cryptococcal meningitis in a patient receiving low-dose ritonavir. *Med Mycol.* 2010 May;48(3):532-6.
110. Norrby, S. R. 1985. Role of cephalosporins in the treatment of bacterial meningitis in adults. Overview with special emphasis on ceftazidime. *Am. J. Med.* 79:56–61.

111. O'Connor L, Livermore J, Sharp AD et al. Pharmacodynamics of liposomal amphotericin B and flucytosine for cryptococcal meningoencephalitis: safe and effective regimens for immunocompromised patients. *J Infect Dis* 2013; 208: 351–61.
112. Okugawa S, Ota Y, Tatsuno K, Tsukada K, Kishino S, Koike K. A case of invasive central nervous system aspergillosis treated with micafungin with monitoring of micafungin concentrations in the cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:344–6.
113. Palmisani E, Barco S, Cangemi G, Moroni C, Dufour C, Castagnola E. Need of voriconazole high dosages, with documented cerebrospinal fluid penetration, for treatment of cerebral aspergillosis in a 6-month-old leukaemic girl. *J Chemother.* 2016 May 24:1-3.
114. Pardridge, W. M., R. Sakiyama, and G. Fierer . 1983. Transport of propranolol and lidocaine through the rat blood-brain barrier. Primary role of globulin-bound drug. *J. Clin. Invest.* 71:900–908.
115. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, et al. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1287–92.
116. Passler NH, Chan HM, Stewart AJ, Duran SH, Welles EG, Lin HC, Ravis WR. Distribution of voriconazole in seven body fluids of adult horses after repeated oral dosing. *J Vet Pharmacol Ther.* 2010 Feb;33(1):35-41.
117. Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(Suppl 1): i19-30.
118. 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. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50:291–322.
119. Petrikos G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Aug;30(2):108-17.
120. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, et al. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1032-7

121. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1723–7.
122. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006;43 (Suppl 1): S3–14.
123. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 2008;46:551-9
124. Pfaller M, Boyken I, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J ClinMicrobiol* 46:150–156.
125. Polak A. Pharmacokinetics of amphotericin B and flucytosine. *Post-grad. Med. J.* 55: 667–670. 1979.
126. Pyrgos VJ, Petratis V, Petratiene R, et al.: Permeability of the blood brain barrier (BBB) to amphotericin B (AMB) is focally increased in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis (HCME) [abstract A1-420]. Presented at the 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, CA; September 12–15, 2009.
127. Réminiac F, Sonnevile R, Massias L, Chochillon C, Wolff M. Very-high-dose caspofungin combined with voriconazole to treat central nervous system aspergillosis: substantial penetration of caspofungin into cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother.*2014; 58(6):3568-9.
128. Remond A, Dancer C, Woods ML: Fungal infections of the central nervous system: a review of fungal pathogens and treatment. *Neurol India.* 2007; 55:251–259.
129. Richardson M, Lass-Florl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *ClinMicrobiol Infect* 2008; 14(Suppl 4):5–24.
130. Ripp SL, Aram JA, Bowman CJ, Chmielewski G, Conte U, Cross DM, Gao H, Lewis EM, Lin J, Liu P, Schlamm HT. Tissue distribution of anidulafungin in neonatal rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2012; 95(1):89-94.
131. Rüping MJ, Albermann N, Ebinger F, Burckhardt I, Beisel C, Müller C, Vehreschild JJ, Kochanek M, Fätkenheuer G, Bangard C, Ullmann AJ, Herr W, Kolbe



K, Hallek M, Cornely OA. Posaconazole concentrations in the central nervous system. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(6):1468-70.

132. Saag MS, Powderly WG, Cloud GA, et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1992; 326: 83-89.

133. Sager G. Cyclic GMP transporters. *Neurochem Int.* 2004;45:865-73.

134. Saliba, F. & Dupont, B. Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol.* 2008; 46, 97–112.

135. Santos JR, César IC, Costa MC, Ribeiro NQ, Holanda RA, Ramos LH, Freitas GJ, Paixão TA, Pianetti GA, Santos DA. Pharmacokinetics/pharmacodynamic correlations of fluconazole in murine model of cryptococcosis. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 20;92:235-43.

136. Schmitt HJ, Edwards F, Andrade J, Niki Y, Armstrong D. Comparison of azoles against aspergilli in vitro and in an experimental model of pulmonary aspergillosis. *Chemotherapy.* 1992; 38: 118-126.

137. Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Heep M, et al. Single-ascending-dose pharmacokinetics and safety of the novel broad-spectrum antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusions (50, 100, and 200 milligrams) and oral administrations (100, 200, and 400 milligrams) of its prodrug, BAL8557, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:279-85

138. Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Maares J, et al. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of the new antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusion and oral administration of its prodrug, BAL8557, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:286-93

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

140. Schwartz S, Milatovic D, Thiel E. Successful treatment of cerebral aspergillosis with a novel triazole (voriconazole) in a patient with acute leukaemia. *Br J Haematol.* 1997 Jun;97(3):663-5.

141. Schwartz S, Thiel E. Cerebral aspergillosis: tissue penetration is the key. *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S387-93.

142. 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.
143. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis.* 2001; 15;33(10):1692-6.
144. Sorensen KN, Sobel RA, Clemons KV, Pappagianis D, Stevens DA, Williams PL. Comparison of fluconazole and itraconazole in a rabbit model of coccidioidal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(6):1512-7.
145. Stiefel M, Reiss T, Staeger MS, Rengelshausen J, Burhenne J, Wawer A, Foell JL. Successful treatment with voriconazole of *Aspergillus* brain abscess in a boy with medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007; 49(2):203-7.
146. Stockmann C, Constance JE, Roberts JK, Olson J, Doby EH, Ampofo K, Stiers J, Spigarelli MG, Sherwin CM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2014; 53(5):429-54.
147. Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchell GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:739-745.
148. Strenger V, Meinitzer A, Donnerer J, Hofer N, Dornbusch HJ, Wanz U, Seidel MG, Sperl D, Lackner H, Schwinger W, Sovinz P, Benesch M, Urban C. Amphotericin B transfer to CSF following intravenous administration of liposomal amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(9):2522-6.
149. Sudan A, Livermore J, Howard SJ, Al-Nakeeb Z, Sharp A, Goodwin J, Gregson L, Warn PA, Felton TW, Perfect JR, Harrison TS, Hope WW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluconazole for cryptococcal meningoencephalitis: implications for antifungal therapy and in vitro susceptibility breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(6):2793-800.
150. Tawara, S., F. Ikeda, K. Maki, Y. Morishita, K. Otomo, N. Teratani, T. Goto, M. Tomishima, H. Ohki, A. Yamada, K. Kawabata, H. Takasugi, K. Sakane, H. Tanaka, F. Matsumoto, and S. Kuwahara. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:57-62.

151. Taylor RL, Williams DM, Craven PC, Graybill JR, Drutz DJ, Magee WE. Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 610-1.
152. Taylor EM. The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41:81-92.
153. Thaler F, Bernard B, Tod M, Jedynek CP, Petitjean O, Derome P, Loirat P. Fluconazole penetration in cerebral parenchyma in humans at steady state. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 ;39(5):1154-6.
154. Theuretzbacher U. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of echinocandins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23(11):805-12.
155. Thye D, Kilfoil T, Kilfoil G, Henkel T (2002) Anidulafungin: safety and pharmacokinetics in subjects receiving concomitant cyclosporine. In: Program and abstracts of the 42nd interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Abstract no. A-1836
156. Thye D, Marbury T, Kilfoil T, Kilfoil G, Henkel T (2002) Anidulafungin: pharmacokinetics in subjects with renal impairment. In: Program and abstracts of the 42nd interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Abstract no. A-1391.
157. Tollemar J, Klingspor L, Ringdén O. Liposomal amphotericin B (AmBisome) for fungal infections in immunocompromised adults and children. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7 Suppl 2:68-79.
158. Uchida, K., Y. Nishiyama, N. Yokota, and H. Yamaguchi. 2000. In vitro antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. *J. Antibiot*. 53:1175–1181.
159. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2001) Cancidas TM (caspofungin acetate for intravenous injection), Merck Corporation, NDA 21-227. Background document for Antiviral Drug Products Advisory Committee Meeting. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3676b1\\_01.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3676b1_01.pdf).
160. Vermes, A., R. A. Mathôt, H. van der Sijs, J. Dankert, and H. J. Guchelaar. 2000. Population pharmacokinetics of flucytosine: comparison and validation of three models using STS, NPEM, and NONMEM. *Ther. Drug Monit*. 2000; 22:676–687.
161. Verweij PE, van den Bergh MF, Rath PM, de Pauw BE, Voss A, Meis JF. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1606-9.

162. Vogelsinger H, Weiler S, Djanani A, Kountchev J, Bellmann-Weiler R, Wiedermann CJ, Bellmann R. Amphotericin B tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(6):1153-60.
163. Wade, R. L., Chaudhari, P., Natoli, J. L., Taylor, R. J., Nathanson, B. H. & Horn, D. L. Nephrotoxicity and other adverse events among in patients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76, 361–367.
164. Walsh, T. J., J. W. Lee, P. Kelly, J. Bacher, J. Lecciones, V. Thomas, C. Lyman, D. Coleman, R. Gordee, and P. A. Pizzo. Antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3--glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions in treatment of experimental disseminated candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:1321–1328.
165. Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D, Pappas P, Seibel N, Greenberg RN, Dummer S, Schuster M, Holcenberg JS. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med.* 1999; 11;340(10):764-71.
166. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46:327–360.
167. Wiederhold NP, Pennick GJ, Dorsey SA, Furmaga W, Lewis JS 2nd, Patterson TF, Sutton DA, Fothergill AW. A reference laboratory experience of clinically achievable voriconazole, posaconazole, and itraconazole concentrations within the bloodstream and cerebral spinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(1):424–431.
168. Wiederhold NP. Pharmacokinetics and safety of posaconazole delayed-release tablets for invasive fungal infections. *Clin Pharmacol.* 2015. Dec 23;8:1-8.
169. Wiederhold NP, Kovanda L, Najvar LK, Bocanegra R, Olivo M, Kirkpatrick WR, Patterson TF. Isavuconazole Is Effective for the Treatment of Experimental Cryptococcal Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 22;60(9):5600-3.
170. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis.* 1998. 27(3):603-18.

171. Würthwein G, Groll AH, Hempel G, Adler-Shohet FC, Lieberman JM, Walsh TJ. Population pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in neonates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5092-8.
172. Yamada N, Kumada K, Kishino S, Mochizuki N, Ohno K, Ogura S. Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections. *J Infect Chemother*. 2011 Oct;17(5):731-4.
173. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA et al. In vitro activities of ravuconazole (BMS-207147) against 541 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2883–9.
174. Zarrin M, Mahmoudabadi AZ. Central nervous system fungal infections; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology* (2010); 3(2): 41-47.
175. Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29:198-21.

**Table 1.** Properties of the antifungal agents

<b>Antifungal agent</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>% Protein binding</b>	<b>Structure</b>	<b>Size (nm)</b>
<b>D-AmB</b>	924	>95	Micelles	0,035
<b>ABLC</b>	924	>95	Ribbon-like	1.600 – 11.000
<b>L-AmB</b>	924	>95	Liposomes	80
<b>ABCD</b>	924	-	Disk-like	120 – 140
<b>5-FC</b>	120	5	-	-
<b>Fluconazole</b>	309	10	-	-
<b>Voriconazole</b>	349	58	-	-
<b>Itraconazole</b>	705	98	-	-
<b>Posaconazole</b>	700	99	-	-
<b>Albaconazole</b>	432	98	-	-
<b>Ravuconazole</b>	437	98	-	-
<b>Isavuconazole</b>	437	98	-	-
<b>Caspofungin</b>	1093	97	-	-
<b>Micafungin</b>	1291	99,85	-	-
<b>Anidulafungin</b>	1140	84	-	-

Data taken from: 39, 46, 71, 93, 99 – 104, 154 – 156.

**Table 2.** Available results of the literature for each antifungal agent concentration in the CSF and brain of animal models available from 1990 to 2016.

<b>Antifungal agent</b>	<b>CSF concentration (µg/mL)</b>	<b>CSF average concentration (%)</b>	<b>Brain concentration (µg/g)</b>	<b>Brain average concentration (%)</b>	<b>Reference</b>
<b>D-AmB</b>	ND – 0,037	1,4 – 1,8	ND – 2,05	21 – 487	18, 19, 40, 51, 58, 67, 76
<b>L-AmB</b>	0,023 – 0,73	0,04 - 8	~0,487 – 2,83	0,4 – 240	18, 19, 51, 75, 111
<b>ABL C</b>	ND – 0,028	2,8	ND - ~3,8	29 – 1900	13, 19, 51
<b>ABCD</b>	0,002 – 0,037	0,008 – 0,037	0,03 – 0,59	20 – 59	40, 51
<b>5-FC</b>	1,5 – 3,7	14 - 43	~1 - ~4,5	13	70, 111
<b>Fluconazole</b>	5,15 – 136,3	49 – 84	1,51 - ~70	10 – 50	18, 58, 67, 70, 74, 84, 92, 135, 144, 149
<b>Voriconazole</b>	ND – 4,124	15 – 68	2,7 and 6,8 in guinea pigs	N.E	22, 78, 82, 116
<b>Itraconazole</b>	ND – 0,083	7,5 – 9,5 $\Theta$	<0,01 $\diamond$ / 0,262 $\pm$ 0,186 $\Delta$	NA	58, 66, 144
<b>Posaconazole</b>	NA	NA	NA	NA	-
<b>Albaconazole</b>	0,62	15	NA	NA	95
<b>Isavuconazole</b>	NA	NA	ND – 17,3	135	169
<b>Ravuconazole</b>	ND – 1,37	3,8 – 9,4	2,31 – 167,46	420 – 1040	53
<b>Micafungin</b>	0 - <1	NA	0 – 4	NA	52, 61
<b>Caspofungin</b>	NA	NA	4,23 – 52,39 $\neq$	8 – 22	42
<b>Anidulafungin</b>	0,07 ** 2,18 – 8,92**	0,9	ND – 3,907 ND – 0,6 **	11 – 55	25, 52, 130

NA: Not applicable.  $\diamond$  Values achieved for itraconazole.  $\Delta$  Values achieved for hydroxyl-itraconazole. \*\* Concentrations of drug-derived radioactivity (µg eq/g) were determined in selected tissues following a single intravenous bolus dose of 5 mg/kg of [<sup>14</sup>C]anidulafungin administered to male Long Evans rats (n = 1 animal per sampling time)<sup>25</sup>.  $\Theta$  Range of values found in all analyzed studies.  $\neq$  Values expressed in µM.N.E: Not estimated

**Table 3.** Available results of the literature for each antifungal agent concentration in the CSF and brain of humans available from 1990 to 2016.

Antifungal agent	CSF concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CSF concentration (%)	Brain concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Brain concentration (%)	References
<b>D-AmB</b>	ND – 0,023	0 – 1,2	0,15 – 5,8	9,8	77, 146
<b>L-AmB</b>	ND – 0,025	0 – 0,04	0,23 – 2,023	3	77, 142, 146, 148, 162
<b>ABLC</b>	ND – 0,074	0 – 2,3	0,25 – 0,29	29	146, 171
<b>ABCD</b>	0,007 – 0,021	0 – 1,6	0,20 – 2,16	25	146, 162
<b>5-FC</b>	19,32 – 68,88	84	NA	NA	11
<b>Fluconazole</b>	0 – 57,71	52 – 85	17,6 $\pm$ 6,6	130	6, 16, 20, 57, 91, 142, 146, 153
<b>Voriconazole</b>	ND – 15,3	14 – 100 127 – 172****	1,75 – 3,72**	120 – 470**	15, 36, 59, 82, 83, 109, 113, 127, 140, 142, 145, 146, 161, 167
<b>Itraconazole</b>	0,07 – 0,13	< 10 – 20	NA	NA	146, 161
<b>Posaconazole</b>	ND – 0,56	8,5 – 237	NA	NA	12, 131, 167
<b>Albaconazole</b>	NA	NA	NA	NA	-
<b>Isavuconazole</b>	NA	NA	NA	NA	-
<b>Ravuconazole</b>	NA	NA	NA	NA	-
<b>Micafungin</b>	0,0188 – 4,66	0,05 - 73	0,26	16	112, 172
<b>Caspofungin</b>	0,12 – 8	3 – 80	NA	NA	64, 69, 127
<b>Anidulafungin</b>	NA	NA	NA	NA	-

NA: Not applicable; \* VOR measured through fluoride magnetic resonance spectroscopy.  $\Delta$  Brain/plasma AUC0-24 for infected animals.  $\Theta$  Brain/plasma AUC0-24 for uninfected animals. \*\* Mean values estimated using the fluoride magnetic resonance spectroscopy technique, with all samples included. \*\*\* CSF penetration in a 6-month-old leukaemic patient.



**Table 4.**Indications of each antifungal agents for invasive fungal infections

Antifungal agent	Indication
AmB	Aspergillosis, cryptococcosis, candidiasis, zygomycosis, fusariosis, coccidioidomycosis paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and blastomycosis, mucormycosis, penicilliosis, phaeohyphomycosis Δ
L-AmB	
ABLC	
ABCD	
Fluconazole	Candidiasis (second line), cryptococcosisΔ
Itraconazole	Blastomycosis, Coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, aspergillosis (second line) Δ
Voriconazole	Aspergillosis, invasive candidiasis, fusariosis, scedosporidiosis Δ
Posaconazole	Invasive fungal infections Δ
Albaconazole	FCZ-Resistant isolates of <i>Cryptococcus neoformans</i> **
Ravuconazole	<i>Candida</i> spp., <i>C. neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> spp. And other hyaline and dematiaceous moulds; endemic moulds ***
Isavuconazole	Aspergillosis, mucormycosis Δ
5-FC	Cryptococcosis (in combination therapy) and candidiasis(second line) Δ
Micafungin	Invasive candidiasis, invasive fungal infections (prophylaxis) Δ
Caspofungin	Invasive candidiasis, aspergillosis (second line) Δ
Anidulafungin	Invasive candidiasis Δ

\*\* Data based on a rabbit model of cryptococcal meningitis (95). \*\*\* Data based on results of *in vitro* activity (43, 44, 53, 56,

107,120, 121).

## 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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_